



UNIVERSITE DE LOME
FACULTE DES SCIENCES
LOME-TOGO

N° d'ordre :



INSTITUT INTERNATIONAL
D'AGRICULTURE
TROPICALE

THESE
Pour l'obtention du Grade de
DOCTEUR EN SCIENCE DE LA VIE
Option : Sciences

Specialité : Biologie du Développement

Présentée

Par

Ouorou Kobi DOURO KPINDOU

**POTENTIALITES DES ENTOMOPATHOGENES *METARHIZIUM*
ANISOPLIAE (HYPOCREALES: CLAVICIPITACEAE) ET *BEAUVERIA*
BASSIANA (HYPOCREALES: OPHIOCORDYCIPTACEAE)
DANS LA GESTION DE *HELICOVERPA ARMIGERA* (HÜBNER),
(LEPIDOPTERA : NOCTUIDAE) AU BENIN**

Soutenue Publiquement le 20 Décembre 2011
Devant la commission d'Examen composée de :

Pr Honoré K. KOUMAGLO, Professeur, Université de Lomé :

Président

Pr Isabelle A. GLITHO, Professeur, Université de Lomé :

Directrice

Dr Manuele TAMÒ, Chercheur, Ecologiste des insectes, IITA-Bénin:

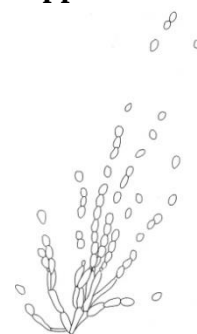
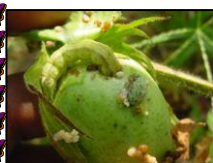
Co-Directeur

Pr Pierre ATACHI, Professeur, Université d'Abomey-Calavi, Bénin:

Rapporteur

Pr Guillaume K. KETOH, Maître de Conférences, Université de Lomé :

Rapporteur



DEDICACE

Je dédie ce modeste travail à Feu mon épouse **Foulérath B. IBRAHIM**, en reconnaissance de son soutien et qui n'a pu bénéficier des fruits de ses peines avant de quitter ce monde.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Dieu pour son entière bénédiction sur moi et sur ma famille tout au long de mon éducation et particulièrement au cours de ce travail de thèse.

La présente thèse est le fruit des travaux réalisés dans les laboratoires de l'Institut International d'Agriculture Tropicale, Station du Bénin (IITA-Bénin) à Abomey-Calavi, le Laboratoire d'Entomologie Appliquée (LEA) à l'Université de Lomé, dans les Centres d'Expérimentation du CRA-CF/INRAB à Kandi et dans les Champs des Producteurs de Coton de Banikoara. Ce travail a abouti grâce à l'appui de plusieurs personnes que je tiens à remercier. Je remercie très sincèrement :

Pr Isabelle A. GLITHO, Doyen de la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé, Directrice du Laboratoire d'Entomologie Appliquée de la Faculté des Sciences, qui, malgré ses multiples occupations, a accepté de diriger cette thèse de Doctorat. Par ces multiples critiques, conseils, elle m'a permis d'améliorer la qualité de ce travail ;

Dr Manuele TAMÒ, entomologiste, Ecologiste des insectes, Chercheur à l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA-Bénin), Coordonnateur du Programme « Méthodes Alternatives de Lutte contre les Ravageurs du Cotonnier au Bénin » et Co-directeur de cette thèse. Par sa constance disponibilité, ses multiples conseils et corrections, il a contribué à l'aboutissement heureux de cette étude ;

Pr Guillaume K. KETOH, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé et Directeur du COUL pour ses conseils et son soutien scientifique ;

Pr Komina AMEVOIN, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé. Ses conseils, son soutien scientifique et ses multiples corrections ont permis l'amélioration de la qualité du présent document ;

Dr Alexis ONZO, Entomologiste, Chercheur à l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA-Bénin) pour ses multiples contributions scientifiques ;

Pr Honoré K. KOUMAGLO, Professeur à la Faculté des Sciences, Directeur du Laboratoire des Extraits Végétaux et Arômes Naturels de la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider le jury de ma thèse.

Pr Pierre ATACHI, Professeur Titulaire des Universités du CAMES, Faculté des Sciences Agronomiques de l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) du Bénin, qui a bien voulu se charger de la pénible tâche de corriger le manuscrit.

Tous les Enseignants-Chercheurs du Laboratoire d'Entomologie Appliquée de la Faculté des Sciences de l'Université de Lomé (LEA/FDS/UL) qui nous ont formé dans cette Ecole Doctorale ;

Tous les membres du Jury dont les remarques ont enrichi la qualité de ce travail ;

Tout le Personnel de la Direction des Affaires Académiques et de la Scolarité (DAAS) de l'Université de Lomé pour avoir examiné et approuvé mon dossier pour la poursuite de cette étude ;

Tous les travailleurs du Programme « Méthodes Alternatives de Lutte contre les Ravageurs du Cotonnier au Bénin » et plus particulièrement **Denis DJEGUI, Sylvain ANATO, Firmin OBOGNON, Venance AHOMAGNON** pour leur franche collaboration pendant la durée de cette étude ;

Tous les amis, parents et alliés auprès de qui j'ai trouvé sincérité et encouragements ;

Mes enfants **Malick, Slaheddeen, Soléhath et Abdul-Aziz**, pour être restés à mes côtés en toutes circonstances et pour l'amour, la compréhension qu'ils m'ont témoigné tout au long de la réalisation de ce travail ;

L'Ambassade Royale des Pays-Bas près le Bénin pour le financement de ce travail ;

Si je ne puis ici nommer chacun, aucun n'est oublié.

Sommaire

DEDICACE	i
REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
LISTE DES FIGURES	x
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES PHOTOS	xiv
INTRODUCTION GENERALE.....	1
1. Problématique	2
2. Objectifs de la recherche	3
3. Hypothèses de la recherche.....	4
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. Généralités sur le cotonnier	6
1.2. Variétés de coton cultivées au Bénin	6
1.3. Importance de la culture du coton dans le Monde, en Afrique et au Bénin.....	6
1.4. Contraintes du cotonnier au Bénin.....	7
1.4.1. Contraintes Institutionnelles	7
1.4.2. Contraintes abiotiques	8
1.4.3. Contraintes biotiques.....	8
2. <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) : Généralités	9
2.1. Systématique.....	9
2.2. Cycle biologique et éthologie	9
2.3. Dégâts économiques de <i>H. armigera</i>	12
2.4. Méthodes de lutte contre <i>H. armigera</i>	13
2.4.1. La lutte mécanique.....	14
2.4.2. La lutte variétale ou génétique	14
2.4.3. La lutte physique.....	14
2.4.4. Les pratiques culturelles.....	15
2.4.5. La lutte chimique	15
2.4.6. La lutte biologique	16
2.4.6.1. Les insectes entomophages	17
• Les prédateurs.....	18
• Les parasitoïdes	19

2.4.6.2. Les microorganismes entomopathogènes.....	21
• Les protozoaires.....	21
• Nématodes.....	22
• Les bactéries.....	23
• Les virus.....	23
• Les champignons entomopathogènes.....	24
2.4.7. La lutte intégrée.....	29
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	31
1. Milieux d'étude.....	32
2. Matériel.....	32
2.1. Matériel biologique.....	32
2.1.1. Colonies d'insectes.....	32
2.1.2. Isolats fongiques.....	33
2.1.3. Matériel végétal utilisé dans l'évaluation de <i>B. bassiana</i> et de <i>M. anisopliae</i>	34
2.2. Insecticides chimiques et botaniques utilisés dans les essais comparatifs.....	34
2.2.1. Insecticides chimiques.....	34
2.2.2. Insecticide botanique.....	35
3. Méthodes.....	35
3.1. Production des pathogènes.....	35
3.2. Test de germination des conidies des champignons produits.....	37
3.3. Formulations des pathogènes dans les différentes expérimentations.....	37
3.3.1. Expérimentations au laboratoire.....	37
3.3.2. Expérimentations au champ.....	37
3.4. Evaluation des effets des champignons entomopathogènes <i>M. anisopliae</i> et <i>B. bassiana</i> sur les larves de <i>H. armigera</i> au laboratoire.....	37
3.4.1. Protocoles expérimentaux.....	38
3.4.1.1. Sensibilité des larves de <i>H. armigera</i> aux agents pathogènes.....	38
3.4.1.2. Réponse des larves de <i>H. armigera</i> aux différentes doses de deux isolats performants (Met 31 et Bb 11).....	38
3.4.2. Suivi des essais au laboratoire.....	40
3.5. Evaluation des agents pathogènes, <i>M. anisopliae</i> et <i>B. bassiana</i> dans les parcelles expérimentales en station et au champ.....	40
3.5.1. Transfert de dose d'une formulation huileuse de <i>Metarhizium anisopliae</i> appliquée sur le ver de capsule du cotonnier dans un champ expérimental.....	41
3.5.1.1. Protocole expérimental.....	41

3.5.1.2. Suivi de l'essai dans le champ expérimental.....	43
3.5.2. Etude comparative de l'efficacité des champignons entomopathogènes, de pesticides chimiques et botaniques dans la gestion des ravageurs du cotonnier et de leurs ennemis naturels au Bénin	43
3.5.2.1. Protocoles expérimentaux	43
3.5.2.2. Suivi des essais au champ	46
3.6. Analyse des données	47
3.6.1. Expérimentations au laboratoire	47
3.6.2. Expérimentations au champ	49
CHAPITRE III : EVALUATION DES EFFETS DE <i>M. ANISOPLIAE</i> ET DE <i>B. BASSIANA</i> SUR LES LARVES DE <i>H. ARMIGERA</i> AU LABORATOIRE	50
Introduction	51
1.1. Sensibilité des larves de <i>H. armigera</i> aux agents pathogènes	51
1.1.1. Mortalité, sporulation et temps moyens de survie des larves inoculées	52
1.1.1.1. Mortalité	52
1.1.1.2. Sporulation	53
1.1.1.3. Survie des larves	54
1.1.2. Effet des champignons entomopathogènes sur le développement de l'hôte.....	56
1.1.2.1. Formation des chrysalides	56
1.1.2.2. Mortalité et sporulation des chrysalides.....	57
1.1.2.3. Emergence des adultes	58
1.2. Réponse des larves de <i>H. armigera</i> aux différentes doses de deux isolats performants (Met 31 et Bb 11) et détermination de leurs DL50	60
1.2.1. Réponse des larves de <i>H. armigera</i> aux différentes doses de deux isolats performants (Met 31 et Bb 11).....	60
1.2.1.1. Effets des traitements sur le 3 ^e stade larvaire de <i>H. armigera</i>	60
• Mortalité des larves et sporulation des insectes morts après application de Met 31 aux L3	60
• Effet des traitements sur la formation des chrysalides, l'émergence des adultes et leur oviposition après application de Met 31 aux L3.....	62
1.2.1.2. Effet des traitements sur le 4 ^e stade larvaire de <i>H. armigera</i>	63
• Mortalité des larves et sporulation des insectes morts après application de Met 31 aux L4	63
• Mortalité des larves et sporulation des insectes morts après application de Bb 11 aux L4	65
• Effet des traitements sur la formation des chrysalides, l'émergence des adultes et leur oviposition après application de Met 31 aux L4.....	67

•	Effet des traitements sur la formation des chrysalides, l'émersion des adultes et leur oviposition après application de Bb 11 aux L4	68
1.2.2.	Détermination de la DL50.....	69
1.2.2.1.	Les valeurs de B	70
1.2.2.2.	Variation de la DL 50 après l'application de Met 31 sur les stades 3 et 4 de <i>H. armigera</i>	70
1.2.2.3.	Variation de la DL 50 après l'application de Bb 11 sur les stades 4 de <i>H. armigera</i>	71
2.	Discussion.....	72
3.	Conclusion	75
CHAPITRE IV : TRANSFERT DE DOSES D'UNE FORMULATION HUILEUSE DE <i>METARHIZIUM ANISOPLIAE</i> APPLIQUEE SUR LE VER DE CAPSULE DU COTONNIER DANS UN CHAMP EXPERIMENTAL.....		76
Introduction		77
1.	Distribution des gouttelettes	77
2.	Taux moyens de mortalité des stades immatures de <i>H. armigera</i> et sporulation des larves mortes	78
3.	Taux moyens de mortalité des stades immatures de <i>H. armigera</i> entre les lignes	80
4.	Formation des chrysalides, émergence des adultes et oviposition	81
5.	Discussion.....	83
6.	Conclusion	84
CHAPITRE V : ETUDE COMPARATIVE DE L'EFFICACITE DES CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGENES, DES PESTICIDES CHIMIQUES ET BOTANIQUE DANS LA GESTION DES RAVAGEURS DU COTONNIER ET DE LEURS ENNEMIS NATURELS AU BENIN.....		85
Introduction		86
1.	Conditions météorologiques	86
2.	Densité de population de <i>H. armigera</i> en milieu semi-réel.....	88
3.	Densité de population des autres carpophages (<i>Earias</i> spp., <i>D. watersi</i>) en milieu semi-réel	91
4.	Présence et dégâts des chenilles sur les organes fructifères en milieu semi-réel	92
5.	Impact des pesticides sur les ennemis naturels en milieu semi-réel.....	92
5.1.	Les coccinelles.....	92
5.2.	Les Fourmis	94
5.3.	Les araignées	95
6.	Les rendements en milieu semi-réel.....	96
7.	Effet des pesticides sur la population des chenilles en milieu paysan.....	97
8.	Dégâts sur les organes fructifères en milieu paysan.....	99
9.	Les rendements en milieu paysan.....	100

10.	Discussion.....	101
11.	Conclusion	103
CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES		104
DISCUSSION GENERALE		105
CONCLUSION		110
PERSPECTIVES		111
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		112
ANNEXES		134
ANNEXE I : Liste des Publications		
ANNEXE II : Réponse des stades larvaires de <i>Helicoverpa armigera</i> (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) à différentes doses d'application des champignons entomopathogènes <i>Metarhizium anisopliae</i> et <i>Beauveria bassiana</i>		
ANNEXE III: Dose transfer of an oil-based formulation of <i>Metarhizium anisopliae</i> sprays to cotton bollworm in an arena trial.....		

LISTE DES ABREVIATIONS

AFPP :	Association Française pour la Protection des Plantes
AIC:	Association Inter-professionnelle de Coton
ANOVA :	Analyse of Variance
ATL :	Atlantique
CABI:	Centre for Agriculture and Biosciences International
CEI :	Communauté des Etats Indépendants
CNUCED :	Conférence des Nations Unies sur le Commerce et le Développement Economique.
CRA-CF:	Centre de Recherches Agricoles Coton et Fibres
DFPV:	Département de Formation en Protection des Végétaux
<i>F</i> :	Valeur de <i>F</i>
FAO :	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAO :	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<i>g</i> :	gramme
ha :	hectare
IIBC :	International Institute of Biological Control
IITA:	International Institute of Tropical Agriculture
INRAB:	Institut National des Recherches Agricoles du Bénin
IPM :	Integrated Pest Management
LUBILOSA :	Lutte Biologique contre les Locustes et les Sauteriaux
m.s-1 :	Mètre par seconde
MAEP :	Ministère de l'Agriculture de l'Elevage et de la Pêche
MEF :	Ministère de l'Economie des Finances
ml:	millilitre
OBEPAB:	Office Béninois pour la Promotion de l'Agriculture Biologique
OCDE :	Organisation pour la Coopération et le Développement Economique
OEPP:	Organisation Européenne et Méditerranéenne pour la Protection des Plantes
<i>P</i> :	Valeur de <i>P</i>
PADSE:	Projet d'Appui à la Diversification des Systèmes d'Exploitation
PAN-UK:	Pesticide Action Net work United Kingdom
PDC :	Plan de Développement Communal
UAC:	Université d'Abomey-Calavi, République du BENIN
UBV :	Ultra Bas Volume
UK :	United Kingdom
UL:	Université de Lomé TOGO
US :	United State

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle de vie de <i>H. armigera</i> d'après les résultats de Hmimina (1986) à 25°C	11
Figure 2 : Sites de collecte du ravageur en République du Bénin	33
Figure 3 : Schéma d'un champ de l'essai: les arènes individuelles contenant des cibles de pulvérisation (lames porte objets et les larves de <i>H. armigera</i>) sur une plante de cotonnier.	42
Figure 4 : Evolution temporelle des taux moyens de mortalité corrigés après inoculation des larves du 3 ^e stade de <i>H. armigera</i> au Met 31.	61
Figure 5 : Evolution temporelle des taux moyens de sporulation des insectes morts après inoculation des larves de 3 ^e stade de <i>H. armigera</i> au Met 31.	61
Figure 6 : Taux moyens de formation des chrysalides et d'éclosion d'adultes deux semaines après inoculation des larves L3 de <i>H. armigera</i> au Met 31.	63
Figure 7 : Evolution temporelle des taux moyens de mortalité corrigés des larves L4 de <i>H. armigera</i> après inoculation au Met 31.	64
Figure 8 : Taux moyens totaux corrigés de mortalité des larves L3 et L4 de <i>H. armigera</i> après inoculation au Met 31	64
Figure 9 : Evolution temporelle des taux moyens de sporulation des insectes morts après inoculation des stades L4 de <i>H. armigera</i> au Met 31.	65
Figure 10 : Evolution temporelle des taux moyens de mortalité corrigés des larves L4 de <i>H. armigera</i> après inoculation au Bb 11	66
Figure 11 : Evolution temporelle des taux moyens de sporulation des larves mortes après inoculation des stades L4 de <i>H. armigera</i> au Bb 11	66
Figure 12 : Taux moyens de formation des chrysalides et d'éclosion d'adultes (♂, ♀) deux semaines après inoculation des larves L4 de <i>H. armigera</i> au Met 31.	67
Figure 13 : Taux moyens de formation des chrysalides et d'éclosion d'adultes (♂, ♀) deux semaines après inoculation des larves L4 de <i>H. armigera</i> au Bb 11.	69
Figure 14 : Valeurs de DL50, après inoculation des larves L3 de <i>H. armigera</i> à différentes doses de Met 31.....	71
Figure 15 : Valeurs de DL50, après inoculation des larves L4 de <i>H. armigera</i> à différentes doses de Met 31.....	71
Figure 16 : Valeurs de DL50, après inoculation des larves L4 de <i>H. armigera</i> à différentes doses de Bb 11.....	72
Figure 17 : Distribution des gouttelettes dans la parcelle expérimentale.	78
Figure 18 : Taux moyens de mortalité des larves de <i>H. armigera</i> après application de différentes doses de Met 31 dans le champ expérimental.	79

Figure 19 : Essai champ expérimental : Taux moyens de sporulation des insectes morts de <i>H. armigera</i> après incubation.....	79
Figure 20 : Taux moyens de mortalité des larves de <i>H. armigera</i> à différentes distances après application de $3,75 \times 10^{12}$ conidies/litre (75 g/ha).....	80
Figure 21 : Taux moyens de mortalité des larves de <i>H. armigera</i> à différentes distances après application de $2,5 \times 10^{12}$ conidies/litre (50 g/ha).....	81
Figure 22 : Taux moyens de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes (♂, ♀) trois semaines après application des larves L3 et L4 de <i>H. armigera</i> au Met 31 dans le champ expérimental.	82
Figure 23 : Pluviométrie moyenne lors de la conduite des essais en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi) de juin à octobre 2009.	87
Figure 24 : Température et humidité relative moyennes lors de la conduite des essais en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi) de juin à octobre 2009.....	87
Figure 25 : Fluctuation des effectifs de <i>H. armigera</i> sous l'influence des pesticides chimiques biologiques et botanique en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).	90
Figure 26 : Variation temporelle du taux d'efficacité des différents produits utilisés dans le contrôle de population de <i>H. armigera</i> en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi). ...	90
Figure 27 : Fluctuation des effectifs des autres carpophages (<i>Earias</i> spp. et <i>D. watersi</i>) dans le cotonnier sous l'influence des pesticides chimiques, biologiques et botanique en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).	91
Figure 28 : Fluctuation des effectifs des coccinelles dans les parcelles expérimentales en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).	94
Figure 29 : Fluctuation des effectifs des fourmis dans les parcelles expérimentales en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).	95
Figure 30 : Fluctuation des effectifs d'araignées dans les parcelles expérimentales en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).	96
Figure 31 : Effets des traitements sur le rendement du coton en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).	97
Figure 32 : Fluctuation des effectifs des chenilles de <i>H. armigera</i> sous l'influence des pesticides chimiques biologiques et botanique en milieu paysan à Banikoara.	98
Figure 33 : Fluctuation des effectifs des autres carpophages (<i>Earias</i> sp, <i>D. watersi</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>S. littoralis</i>) sous l'influence des pesticides chimiques biologiques et botanique en milieu paysan à Banikoara.....	99
Figure 34 : Rendement du coton de chaque traitement en milieu paysan à Banikoara.....	101

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Répartition et importance des ravageurs du cotonnier dans une zone phytosanitaire du Bénin	13
Tableau II : Répartition des prédateurs de <i>H. armigera</i> en Afrique	19
Tableau III : Différents isolats de champignons utilisés dans différents essais	34
Tableau IV : Stades larvaires de <i>H. armigera</i> utilisés, isolats de champignons et doses appliquées	39
Tableau V : Taux moyens corrigés de mortalité totale des larves L3, L4, L5 et L6 de <i>H. armigera</i> 21 jours après application de différents isolats de champignons entomopathogènes.	52
Tableau VI : Effets des agents pathogènes utilisés (toutes espèces et isolats confondus) sur les différents stades larvaires de <i>H. armigera</i> , 21 jours après application.....	53
Tableau VII : Taux moyens de sporulation totale des insectes morts dans les différents lots des stades larvaires L3, L4, L5 et L6 de <i>H. armigera</i> après incubation.	54
Tableau VIII : Temps Moyen de Survie (TMS) (Jours $\pm$ SE) et 95% IC des larves L3, L4, L5 et L6 de <i>H. armigera</i> inoculés avec les isolats de champignon	55
Tableau IX : Temps Moyen de Survie (TMS) (Jours $\pm$ SE) et 95% IC par stade larvaire de <i>H. armigera</i> , tous isolats de champignon confondus	56
Tableau X : Taux moyens de chrysalides formées pour chacun des stades larvaires de <i>H. armigera</i> 21 jours après application de différents isolats de champignons entomopathogènes.	57
Tableau XI : Taux moyens de chrysalides mortes pour chacun des stades larvaires de <i>H. armigera</i> 21 jours après application de différents isolats de champignons entomopathogènes.	58
Tableau XII : Taux moyens d'adultes émergés pour chacun des stades larvaires de <i>H. armigera</i> 21 jours après application de différents isolats de champignons entomopathogènes.	59
Tableau XIII : Nombre d'adultes émergés et d'œufs pondus après inoculation de 30 larves de 3 ^e stade de <i>H. armigera</i> à différentes doses de Met 31.....	62
Tableau XIV : Nombre d'adultes émergés et d'œufs pondus après inoculation des larves de 4 ^e Stade de <i>H. armigera</i> à différentes doses de l'isolat Met 31	68
Tableau XV : Nombre d'adultes émergés et d'œufs pondus après inoculation des larves de 4 ^e stade de <i>H. armigera</i> à différentes doses de l'isolat Bb 11	69
Tableau XVI : Modèle d'estimation de la valeur B résultant de la régression Cox pour les isolats de <i>M. anisopliae</i> et de <i>B. bassiana</i> testés sur les stades larvaires de <i>H. armigera</i> , y compris les coefficients de Wald.	70

Tableau XVII : Nombre d'adultes émergés et de larves écloses par femelle après application de différentes doses de Met 31 aux larves L3 et L4 de <i>H. armigera</i> dans un champ expérimental.	82
Tableau XVIII : Milieu semi-réel : Effets des différents pesticides sur le nombre moyen de chenilles.....	89
Tableau XIX : Milieu semi-réel : Effets les pesticides sur la présence des chenilles et leurs dégâts (%) sur les organes fructifères	93
Tableau XX : Milieu semi-réel : Effets les pesticides sur quelques ennemis naturels dans le champ.....	93
Tableau XXI : Milieu paysan : Effets des différents pesticides sur le nombre moyen de chenilles par cotonnier	98
Tableau XXII : Milieu paysan : Effets des traitements sur le nombre moyen de chenilles et leurs dégâts (%) sur les organes fructifères selon les pesticides.....	100

LISTE DES PHOTOS

Photo 1 : Conidies du champignon pénétrant la cuticule de l'insecte.....	26
Photo 2 : <i>Metarhizium anisopliae</i> sur SDA	35
Photo 3 : Flacons contenant le milieu liquide disposés sur un agitateur rotatif.....	36
Photo 4 : Bassine contenant du riz recouvert de conidies de <i>M. anisopliae</i>	36
Photo 5 : Inoculation d'une larve de <i>H. armigera</i> Photo 6 : Larves mises	39
Photo 7 : Larve L6 morte (a) chrysalide morte (b) de <i>H. armigera</i> en sporulation après sa mise sur couche dans du papier filtre légèrement mouillé	40
Photo 8 : Application des pesticides à l'aide d'appareil Berthoud 'Micro Ulva'	45
Photo 9 : Larves de 6 ^e stade de <i>H. armigera</i> mortes et recouvertes de conidies de champignons entomopathogènes de <i>B. bassiana</i> (a), de <i>M. anisopliae</i> (b) et une larve vivante (c)	54
Photo 10 : Adultes de <i>H. armigera</i> émergés après application de Met 31	62

Résumé

La noctuelle *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) est le ravageur le plus préjudiciable au cotonnier dans le monde et au Bénin en particulier. De 2007 à 2010, nous avons testé: (i) la sensibilité de ce ravageur aux champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* en vue de sélectionner des souches les plus performantes (ii) l'efficacité des souches potentielles de ces entomopathogènes dans des parcelles expérimentales et dans les champs des producteurs de coton. Les tests préliminaires ont été effectués au laboratoire avec six souches de *M. anisopliae* et deux souches de *B. bassiana* collectées des champs. Ils ont permis de sélectionner deux souches potentielles, la souche 31 de *M. anisopliae* et la souche Bb11 de *B. bassiana* car elles ont induit chez le ravageur des taux élevés de mortalité et de faibles taux de formation de chrysalides et d'émergence d'adultes d'une part et ont donné de forts taux de sporulation. Les souches sélectionnées ont provoqué chez les larves L3 du ravageur des taux de mortalité corrigés respectifs de 56,3% et de 34,4% avec des taux de sporulation respectifs de 42,6% et 48,6%. Quatre doses de Met 31 ont été testées sur les stades 3 et 4 du ravageur. Les mêmes doses de Bb11 ont été testées sur le stade 4. La DL50 pour chacune des souches a été déterminée sur les stades larvaires correspondants. Sur les larves L3, à la dose de 10^7 conidies/insecte, Met 31 a provoqué un taux de mortalité de 77,4%. Sur les larves L4, à la même dose, Met 31 et Bb 11 ont provoqué des taux de mortalité de 74,3% et 89,3% respectivement. A dose égale, les plus jeunes larves ont été plus vulnérables. Les taux de formation des chrysalides et d'émergence des adultes ont diminué avec l'augmentation des doses. Traités au jeune stade (L3) avec les doses élevées, les adultes qui ont émergé étaient presque tous des mâles malformés et aucune des femelles n'avait pondu d'œufs. L'analyse de la DL50 par la régression Cox a permis d'établir qu'il fallait, pour la souche Met 31, $4,7 \times 10^8$ conidies/insecte et $7,4 \times 10^{10}$ conidies/insecte pour tuer en 5 jours, 50% des larves L3 et L4 respectivement. Quant à la souche, Bb 11, il fallait $4,6 \times 10^7$ conidies/insecte pour tuer 50% des larves L4 en 5 jours. L'étude de l'efficacité en milieu réel et au champ des souches retenues a été focalisée sur la réduction de la densité de population du ravageur, les effets des différents pesticides utilisés sur les ennemis naturels et sur le rendement. Comparativement aux témoins, tous les pesticides utilisés ont montré leur efficacité à partir du 77^e jour après la levée du cotonnier (JAL). Cette efficacité s'est estompée à partir du 98^e JAL, pour le conventionnel. Les biopesticides, ont maintenu leur efficacité jusqu'à la fin des observations. En milieu paysan, les rendements ont varié entre $1,5 \pm 0,3$ t/ha et $1,6 \pm 0,3$ t/ha. *M. anisopliae* a été le biopesticide le moins nuisible aux ennemis naturels suivi de *B. bassiana*.

Mots Clés : Cotonnier, *Helicoverpa armigera*, Champignons entomopathogènes, Lutte biologique

Abstract

The moth *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) is the most damaging pest to cotton in the world and in Benin in particular. From 2007 to 2010, we conducted studies on: (i) the sensitivity of this pest to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in order to select the best performing strains (ii) the effectiveness of potential strains in experimental plots and in farmers' fields. The preliminary selection tests, conducted with six strains of *M. anisopliae* and two strains of *B. bassiana* on the pest in laboratory revealed two potential strains, due to their high mortality and sporulation rates, their low rates of pupae formed and adults emerged: the strains Met 31 of *Metarhizium* and Bb 11 of *Beauveria*, with respective adjusted mortality rates of 56.3 % and 34.4% and respective sporulation rates of 42.6% and 48.6%. Four doses of each of these strains obtained on a logarithmic scale, and the control were tested on stages 3 and 4 of *H. armigera* for determining the LD50. On L3 larvae at a dose of 10^7 conidia.insect⁻¹, Met 31 caused a mortality rate of 77.4%. On L4 larvae at the same dose, Met 31 and Bb 11 have caused mortality rates of 74.3% and 89.3%, respectively. At equal dose, younger larvae were more vulnerable. The formation rate of pupae and adult emergence decreased with increasing doses. Treated at young stage (L3) with higher doses, adults that emerged were almost all ill-formed males and no females had laid eggs. The analysis of LD50 by the Cox-regression has determined that Met 31, at 4.7×10^8 conidia/insect and at 7.4×10^{10} conidia.insect⁻¹ will kill in 5 days, 50% of L3 and L4 larvae, respectively. As for the strain Bb 11, it was 4.6×10^7 conidia.insect⁻¹ to kill 50% of L4 larvae in 5 days. The study of the effectiveness of selected strains was focused on the pest's population density reduction, the effects of different pesticides on natural enemies and yield. Compared with controls, all pesticides used have proven effective from 77 JAL, but the efficacy of the conventional treatment dropped from 98 JAL, the residual effect of tihan becoming almost nihil. At the same time, biopesticides, whose application had continued, were able to maintain their efficacy until the end of observations. In famers' fields, yields ranged from 1.5 ± 0.3 t/ha to 1.6 ± 0.3 t/ha. Pesticides used had variable activity on various natural enemies observed, *M. anisopliae* being the least harmful to natural enemies followed by *B. bassiana*.

Key words: Cotton, *Helicoverpa armigera*, entomopathogenic fungi, bio-control

INTRODUCTION GENERALE

1. Problématique

Le coton constitue non seulement la principale source de revenu monétaire des paysans qui le cultivent, mais il apporte aussi d'importantes devises à l'Etat. En effet, le coton est la principale culture d'exportation et contribue au développement socioéconomique du Bénin. Il constitue la base de l'agro-industrie béninoise dans la mesure où il représente environ 60% de tissu industriel local. En 2009, il a contribué en termes de valeur ajoutée, pour 13% à la formation du Produit Intérieur Brut (PIB). Le coton a aussi contribué pour 45% des recettes intérieures (Impôts et Trésor). Il constitue, la première source de devise du Bénin malgré ses faibles performances ces dernières années (MEF, 2010). La production de coton, sur le plan national, est passée de 272.371 tonnes en 1993 à 376.141 tonnes en l'an 2000 soit une augmentation de 38,10% pour une période de huit ans. De 2000 à 2005 cette production est passée de 376.141 tonnes à 426 251 tonnes soit un accroissement de 13,3% (MEF, 2010). Cette augmentation de production rythme également avec le niveau de consommation des pesticides. Ainsi, au plan national, la consommation de pesticides est passée de 1.972.764 litres en 1993 à 2.314.127 litres en l'an 2000, soit une augmentation de 17,30% en huit ans, puis à 2.453.880 litres en 2010, soit une augmentation de 6,04% (MEF, 2010). L'utilisation des pesticides en agriculture, précisément dans les zones de production cotonnière, présente des risques sérieux aussi bien pour l'homme que pour l'environnement. En effet, selon l'étude réalisée par l'Office Béninois pour la Promotion de l'Agriculture Biologique (OBEPAB, 2001), une ONG béninoise, au cours de la campagne 1999/2000, l'on a enregistré 147 cas d'intoxication dont 10 décès. Pour la même campagne, le CARDER-BORGOU a rapporté 73 cas d'intoxication humaine et 37 cas de décès dans le département du Borgou (partie Ouest du Bénin septentrional). Ces drames ne sont que l'expression des incidents qui se produisent depuis des années et qui ne font pas l'objet d'une documentation. Cette situation est devenue dramatique et alarmante avec l'utilisation de l'endosulfan pour faire face à la résistance de *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) aux pyréthrinoides. En effet, *H. armigera* est l'un des ravageurs les plus destructeurs du monde de l'agriculture en général et du cotonnier, *Gossypium hirsutum* L. (Malvaceae), en particulier. Chaque année, les larves de cette espèce causent d'importantes pertes économiques pour le coton. L'incidence du ravageur est d'autant plus grave que chaque chenille attaque plusieurs organes de la même plante : fleurs, feuilles, boutons floraux, fruits, capsules, bourgeons terminaux, et tiges, avant de migrer sur une autre plante (Kossou, 2002). Les attaques importantes de ce ravageur peuvent entraîner une perte totale de la production, si aucune action de lutte contre ce dernier n'est menée (Moussa *et al.*, 2002). L'usage régulier de ces insecticides chimiques entraîne le développement de la résistance chez les ravageurs et/ou le phénomène de résurgence parce qu'ils détruisent la faune bénéfique (Sinzogan *et al.*, 2004), limitant ainsi

l'utilisation des prédateurs, des parasitoïdes. Ceci a amené les chercheurs à se pencher vers d'autres alternatives comme l'utilisation des pesticides botaniques, des phéromones et des micro-organismes.

La gestion biologique contre les vers de la capsule du coton en utilisant des extraits de plantes sélectionnées a été ainsi étudiée. Les extraits de plantes qui ont été largement étudiés sont le neem (*Azadiracta indica* A. Juss) (Meliaceae). Des études au laboratoire et sur le terrain ont montré que les limonoïdes de neem ont été efficaces contre le ver de la capsule du coton et peuvent être utilisés comme alternative aux insecticides chimiques (Rao *et al.*, 1995 ; Gupta 2001).

Les phéromones sont des composés qui perturbent la reproduction des lépidoptères tels que *H. armigera*. Comparé aux insecticides chimiques classiques utilisés pour gérer ce ravageur, les résultats indiquent un degré élevé de confusion sexuelle dans les parcelles traitées à ces phéromones. Le niveau d'infestation de *H. armigera* dans ces parcelles a dépassé le niveau de seuil économique et a été considérablement plus élevé par rapport à celui dans les parcelles non-phéromone (Chamberlain *et al.* 2000).

Les micro-organismes pourraient réguler la densité de population de *H. armigera*. Trois agents pathogènes des insectes sont connus pour réguler les populations du ver de la capsule du coton. Il s'agit notamment des champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi*, du virus nucléopolyédrovirus *H. armigera* (HaNPV) et la bactérie du sol *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Sandhu *et al.*, 1993; Scholz *et al.*, 1998). La pathogénie et l'efficacité de ces champignons entomopathogènes à *H. armigera* ont été étudiées en laboratoire sous différentes températures et d'humidité (Duraimurugan et Regupathy, 2005 ; Gundannavar *et al.*, 2006 ; 2007 ; Lawo *et al.*, 2008 ; Kulkarni *et al.*, 2008 ; Prasad et Syed, 2009 ; 2010 ; Prasad *et al.*, 2010). Cependant, les tests d'efficacité de ces champignons entomopathogènes contre *H. armigera* dans des conditions du champ sont limités. Nous nous proposons alors de mener des recherches, en vue de développer un biopesticide à base de champignon entomopathogène pouvant entrer dans la stratégie de gestion intégrée de la noctuelle *H. armigera* qui est actuellement l'un des ravageurs les plus importants du cotonnier au Bénin.

2. Objectifs de la recherche

Pour aboutir à ce résultat, nous évaluerons :

1. l'efficacité, au laboratoire des champignons entomopathogènes indigènes isolés de certaines noctuelles et exotiques de l'unité de collection de IITA-Bénin et en déterminerons les plus performantes ;

2. les conditions de leur utilisation au champ à travers une expérimentation en milieu réel dans une station expérimentale ;
3. l'efficacité, au champ, d'un ou des isolats retenus pour leur performance au laboratoire dans des tests de comparaison avec les pesticides chimiques utilisés dans le conventionnel et un pesticide botanique, en l'occurrence l'huile de neem.

Ainsi, les hypothèses suivantes ont été posées.

3. Hypothèses de la recherche

Nos hypothèses de recherche ont été les suivantes :

- Les champignons entomopathogènes *M. anisopliae* et *B. bassiana* sont pathogènes à tous les stades larvaires de *H. armigera* ;
- Au moins un isolat de ces champignons est efficace et peut causer des mortalités dans la population de *H. armigera* ;
- Au moins un isolat de champignon est efficace dans les champs de coton et peut réduire la densité de population de *H. armigera* d'au moins 20% ;
- Comparativement aux pesticides de synthèse, les champignons entomopathogènes utilisés dans les champs de coton sauvegardent mieux les ennemis naturels.

Notre étude s'articulera autour de trois parties:

Dans une première partie, nous ferons le point de la recherche sur la lutte contre *H. armigera* à travers une approche bibliographique. Une seconde partie portera sur le matériel utilisé et les méthodes adoptées pour conduire les travaux au laboratoire et sur le terrain. Après avoir présenté les résultats dans une troisième partie, une discussion générale débouchera sur une conclusion et les perspectives.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralités sur le cotonnier

1.1. Historique et Taxonomie du cotonnier

Le cotonnier est une plante dicotylédone dialypétale de l'ordre des Malvales, de la famille des Malvacées et de la tribu des hibiscucées (Parry, 1982). Il appartient au genre *Gossypium* dont quatre espèces constituent le groupe des cotonniers cultivés : deux diploïdes (*G. herbaceum* L., *G. arboreum* L.) et deux tétraploïdes (*G. hirsutum* L., *G. barbadense* L.) (Mémento, 2002). La naissance du genre *Gossypium* est très ancienne ; elle remonte à 150 millions d'années, probablement en Afrique à l'époque du Gondwana, avant la formation des continents actuels qui a entraîné l'isolement des populations (Wender et Albert, 1992). A l'heure actuelle, la plupart des variétés modernes du cotonnier appartiennent à l'espèce *G. hirsutum*. Elle aurait comme centre de diversification, la presqu'île de Yucatan au Guatemala (Mémento, 2002) et assure 90% de la production mondiale de coton.

Le cotonnier est une plante arbustive pluriannuelle, son cycle peut être divisé en deux stades : le stade végétatif et le stade reproductif qui peuvent être subdivisés en quatre phases phénologiques (Parry, 1982) :

- Stade de levée : du semis à l'étalement des cotylédons (6 à 10 jours dans les conditions tropicales) ;
- Stade végétatif : de la plantule à l'ouverture de la première fleur. Elle dure 40 à 60 jours après levée ;
- Stade de floraison : du début de la floraison à l'arrêt de la croissance (appelé "Cutout"), atteint 80 à 100 jours après levée ;
- Stade de maturation : du "Cutout à l'ouverture complète des capsules.

Du semis à la récolte, le cycle dure environ 140 à 180 jours selon les variétés et les conditions environnementales (Pary, 1982).

1.2. Variétés de coton cultivées au Bénin

En vingt (20) ans (de 1989 à 2008), le Centre de Recherche Agricole Coton et Fibre (CRA CF) de l'Institut National des Recherches Agricoles du Bénin (INRAB) a procédé à quatre (04) changements variétaux. Au Bénin, la variété classique de coton H 279-15 est la principale variété cultivée sur toute l'étendue du territoire depuis 2003 (Lançon *et al.*, 2006).

1.3. Importance de la culture du coton dans le Monde, en Afrique et au Bénin

Le cotonnier est, en effet, une plante très recherchée dans plusieurs domaines tels que la

pharmacie, les industries de textiles, les huileries, l'alimentation animale, etc.

La culture du cotonnier et l'exploitation de ses produits sont d'une grande importance économique pour les pays producteurs, c'est "l'or blanc" (plus de 40 % des textiles mondiaux actuellement). Les pays producteurs de coton sont essentiellement :

- les principaux producteurs : les Etats-Unis, la Communauté des Etats Indépendants (CEI), la Chine, l'Inde et l'Egypte (l'Egypte produit de coton particulièrement fin et de bonne qualité) ;
- les producteurs secondaires : les pays de l'Afrique, la Turquie, la Syrie, le Pakistan, l'Australie (Mosiniak et Prat., 2005).

La région de l'Afrique Occidentale et Centrale est le cinquième producteur du coton au monde et fournit 5 % de l'ensemble de la production mondiale (OCDE, 2006a).

Le secteur cotonnier est la principale source de devises du Bénin. Il représente 80 % des recettes d'exportation du pays et contribue pour 12 % à la formation du PIB. (OCDE, 2006b). Le Bénin fait partie des sept plus grands producteurs du coton en Afrique de l'ouest et du centre (Ton, 2004). Parmi les diverses filières agricoles au Bénin, celle du coton est la mieux organisée et est soutenue par différentes structures. Le coton est produit par un grand nombre de paysans béninois et occupe la première place parmi les produits d'exportation, générant des revenus considérables (44 milliards de FCFA en 1995) aux producteurs généralement pauvres (Agbodjinou, 2002). Ainsi, la production cotonnière et les activités économiques qui lui sont liées font vivre une grande partie de la population béninoise, participant ainsi à la stabilité économique, sociale et politique du pays, mais depuis quelques années, cette culture est confrontée à de nombreuses contraintes qui limitent fortement son rendement. Elles sont d'ordres institutionnels, abiotiques et biotiques.

1.4. Contraintes du cotonnier au Bénin

1.4.1. Contraintes Institutionnelles

Avec la libéralisation de la filière, on observe l'apparition de divers acteurs privés qui y interviennent. En effet, le nombre d'usines d'égrenage au Bénin est passé de neuf (9) en 1994 à dix Sept (17) en 2001 et le nombre de sociétés distributrices d'intrants est passé de deux (2) en 1994 à plus de dix huit (18) en 2001. L'apparition de ces acteurs est intervenue pour dynamiser la filière. Lors des premières étapes du processus de privatisation, les choses ont semblé bien se passer avec la poursuite de l'accroissement de la production. Mais, depuis la campagne 1995-1996, la production stagne aux alentours de 350.000 tonnes, voire décline, et l'objectif des 500.000 tonnes en l'an 2000 n'a jamais été atteint. C'est ainsi qu'à partir de 2003, il a été

observé une chute constante de la production induite par de graves dysfonctionnements au sein de l'Interprofession cotonnière, mise en place en 2000. En effet, après la libéralisation de la filière cotonnière dans les années 1990, plusieurs institutions ont été créées avec, à leur tête, l'Association Interprofessionnelle de Coton (AIC) chargée de réguler le secteur. Ce processus de réforme a encouragé l'émergence des organisations des producteurs et la création d'autres institutions au sein desquelles les représentants des producteurs sont supposés jouer un rôle important afin de promouvoir le développement de la filière cotonnière ; mais ceci s'est soldé par des conflits d'attribution et d'intérêt. Ces dysfonctionnements se sont exacerbés pendant la campagne cotonnière 2005-2006 qui a connu une production de 190 000 tonnes ; les deux campagnes suivantes 2006-2007 et 2007-2008, si elles n'ont pas été aussi désastreuses, n'en sont pas moins restées en deçà des 300.000 tonnes (MAEP, 2008). A ces problèmes d'ordre institutionnel, s'ajoutent les contraintes climatiques.

1.4.2. Contraintes abiotiques

Elles sont essentiellement liées au climat et au sol. Il s'agit notamment de l'insuffisance et de la mauvaise répartition spatio-temporelle de la pluviométrie et de la baisse de fertilité des sols (pauvreté en matière organique, en azote et en phosphore). Outre ces différentes contraintes ci-dessus citées, le cotonnier est assujéti aux contraintes biotiques.

1.4.3. Contraintes biotiques

Les adventices, les maladies et les insectes ravageurs constituent essentiellement les contraintes biotiques du cotonnier.

D'une manière générale, les adventices, lorsqu'elles ne sont pas enlevées à temps, retardent de façon significative le développement des plants de cotonnier.

Les agents pathogènes responsables des maladies du cotonnier peuvent être des champignons, des bactéries, des virus ou des mycoplasmes. Les maladies les plus courantes du cotonnier sont : la pourriture des capsules du cotonnier, la fusariose, la verticilliose, la fonte des semis ou rhizoctone noir, le flétrissement du cotonnier et la pourriture des racines du coton (CNUCED, 2008)

Les principaux insectes ravageurs du cotonnier peuvent être classés en quatre groupes :

- Les piqueurs-suceurs : les jassides, les aleurodes et les cochenilles. Ces insectes sont les vecteurs potentiels de maladies du cotonnier (virose ou mycoplasme). Les insectes comme *Aphis gossypii*, *Bemisia tabaci* et *Ferrisia virgata* produisent des miellats aux conséquences néfastes (Parry, 1982).

- Les chenilles défoliatrices : *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), *Sylepta derogata* (Fabricius) (Lepidoptera : Pyralidae), *Cosmophila flava* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) : les dégâts foliaires les plus importants sont imputables à ces chenilles (Cauquil, 1986).

- Les carpophages, ravageurs de l'appareil reproducteur (boutons floraux, fleurs et capsules). Ils sont essentiellement constitués par les chenilles de lépidoptères: *Helicoverpa armigera*, *Diparopsis watersi* (Rothschild) (Lepidoptera: Noctuidae), *Earias biplaga* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae), *Earias insulana* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae), *Pectinophora gossypiella* (Saunders) (Lepidoptera : Gelechiidae), *Cryptophlebia leucotreta* (Meyrick), (Lepidoptera, Tortricidae) (Cauquil, 1990; 1993).

En période de fructification, des dégâts dus à des piqûres d'espèces d'Hémiptères s'observent : il s'agit des Pyrrhocoridae (*Dysdercus voelkeri*; *D. fasciatus* (Signoret); *D. superstitionis* (Fabricius)) et des Pentatomidae.

Au nombre de ces nuisibles, le ver de capsules *H. armigera* est le ravageur le plus préjudiciable au cotonnier dans le monde (Vaissayre et Cauquil 2000; Martin *et al.* 2000 ; Silvie *et al.* 2001) et au Bénin en particulier (Youdeowei, 2001 ; Ton, 2002).

2. *Helicoverpa armigera* (Hübner) : Généralités

2.1. Systématique

H. armigera est connue sous le nom de noctuelle de la tomate en français, en italien «nottua des pomodoro», en anglais britannique (UK) «cotton bollworm», en anglais américain (US) «tomato fruitworm», en espagnol «Oruga del tomate», en portugais «Lagarta do tomate» et en allemand «baumwollkapselwurm». Elle a été décrite pour la première fois par Fabricius en 1794 sous le nom de *Noctua Barbara*, puis sous le nom de *Noctua armigera* en 1808 par Hübner. Elle fut ensuite décrite sous le nom de *Heliothis armigera* en 1816 par Ochsenheimer et enfin sous le nom de *Helicoverpa armigera* par Hardwick en 1965. Après de nombreuses réticences, le nom *Helicoverpa armigera* a été confirmé suite aux travaux de Mitter *et al.* (1993). *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) est du règne animal, de l'embranchement des Arthropodes, de la classe des Insectes, de l'ordre des Lépidoptères, de la famille des Noctuidae, de la sous-famille des *Heliothinae*, du genre *Helicoverpa*, de l'espèce *Helicoverpa armigera*.

2.2. Cycle biologique et éthologie

Le développement de *H. armigera* passe par l'œuf, la larve qui comprend six stades, la

chrysalide et l'adulte (papillon de nuit). Les adultes vivent environ 10 jours au cours desquels les femelles peuvent pondre jusqu'à 1000 œufs (IPM, 2000) (Figure 1).

L'adulte

L'adulte mesure environ 18 mm de long avec une envergure comprise entre 30-45 mm (Reckhaus, 1997). Il n'existe pas de différence de taille entre le mâle et la femelle. Le dimorphisme sexuel existe et est fondé essentiellement sur la présence de courtes épines dissimulées par des poils sur les fémurs prothoraciques des mâles, mais absentes chez la femelle, ainsi que par la couleur des ailes antérieures qui sont brun clair chez le mâle et brun rougeâtre chez la femelle.

Les antennes sont filiformes chez les deux sexes, les yeux sont de couleur vert foncé (Nibouche, 1999). Les ailes antérieures portent une légère bande transversale plus foncée dans leur tiers distal, ainsi qu'une tâche réniforme peu marquée, enfumée. Les ailes postérieures sont gris clair avec une large bande marginale foncée et une petite tâche brune tout près de la base (Hardwick, 1965).

L'adulte de *H. armigera* a une activité essentiellement nocturne (Topper, 1987). L'accouplement en général a lieu environ 48 heures après l'émergence des adultes femelles, mais quelques individus sont, cependant, capables de s'accoupler dès la nuit qui suit l'émergence (Topper, 1987). En élevant cette espèce à une température de 35°C, Hmimina (1986) a remarqué qu'aucun accouplement n'était possible.

Les œufs

De couleur blanc-nacré lors de la ponte, les œufs virent au brun avant l'éclosion. Ils ont une forme subsphérique et leur taille est approximativement de 0,4 à 0,5 mm (Toguebaye et Couilloud, 1982). Les œufs sont pondus isolément ou par petits groupes, rarement de plus de 2 ou 3 œufs dans la nature. Sur le cotonnier, on trouve les œufs en majorité sur la face supérieure des feuilles, préférentiellement sur les jeunes feuilles et dans le tiers supérieur des plants (Reed, 1965, Partel *et al.*, 1974 ; Vaissayre, 1978).

La fécondité des femelles de *H. armigera*, élevées au laboratoire et nourries à l'eau sucrée, a été étudiée par plusieurs auteurs. En Ouganda, Coaker (1959) a indiqué des valeurs de 313 à 2107 œufs par femelle, avec une moyenne de 752 œufs. Ce nombre d'œufs pondus peut être réduit par une absence d'alimentation ou une alimentation en eau non sucrée (Mourikis et Vassilaina-Alexopoulou, 1970 ; Brader-Breukel, 1970).

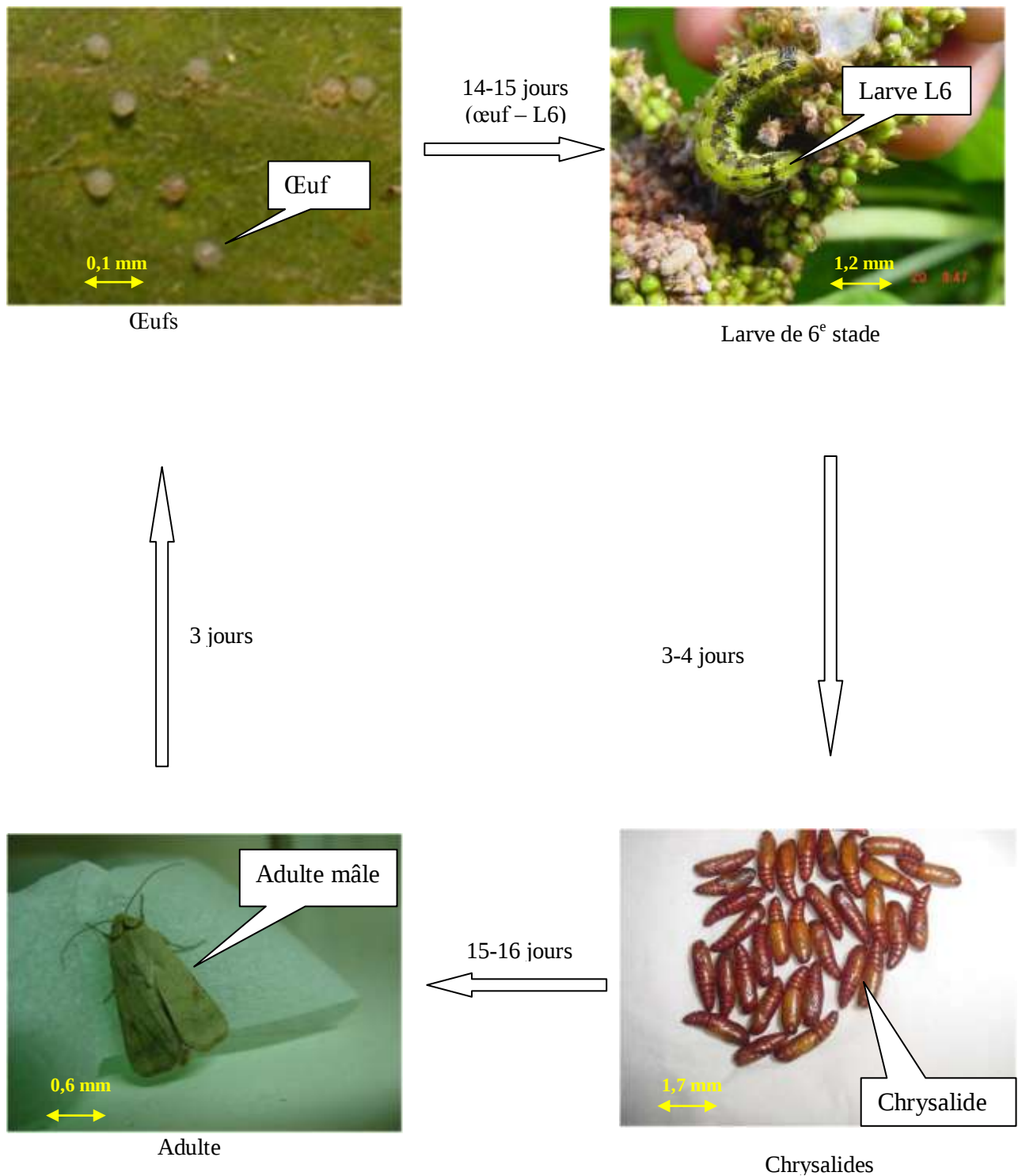


Figure 1 : Cycle de vie de *H. armigera* d'après les résultats de Hmimina (1986) à 25°C
G. x 6

Les larves

Les chenilles des premier et deuxième stades sont grisâtres, puis jaunâtres. Leur capsule céphalique est de couleur brun foncé (Alaux, 1994), mais prend ensuite une couleur orange à partir du troisième stade. Le corps est orné de minces bandes dorsales longitudinales foncées,

alternées de bandes claires (Toguebaye et Couilloud, 1982). Deux bandes latérales claires et sinueuses ornent aussi le corps des chenilles, sur lesquelles des stigmates sombres très caractéristiques se détachent. Les chenilles ont une tête bien développée, pourvue de fortes mandibules. Dès l'éclosion, les larves se nourrissent des feuilles, des fleurs, des gousses, des fruits, sauf au moment des mues. Elles sont extrêmement voraces, notamment au dernier stade larvaire (IPM, 2000). Selon Singh et Singh (1975), la larve reste immobile juste après éclosion et ne devient active que trois à quatre heures plus tard. A partir du troisième stade, les larves deviennent cannibales et prédatrices d'autres espèces (Delattre, 1973; Twine 1978). Reed (1965), décrit l'existence de 6 stades larvaires et signale que c'est lors du dernier stade que l'alimentation cesse et que la chenille cherche à s'enterrer. Il précise aussi que les mues larvaires ont lieu le plus souvent sur la face supérieure des feuilles.

La chrysalide

Lorsque le développement larvaire est achevé, la prénympe se met à la recherche d'un emplacement où s'effectuera la nymphose. En laboratoire, dans des conditions de température non précisées, Reed (1965) observe des durées de nymphose de 16 à 18 jours. Toutefois, il note qu'il existe une corrélation entre le poids des chrysalides et la durée de leur développement, les plus lourdes mettant plus de temps à émerger. Il précise également que chez les femelles, la durée de nymphose est plus courte, d'environ un jour par rapport à celle des mâles. D'abord de couleur brun verdâtre juste après la mue, la chrysalide prend ensuite une couleur marron ; elle mesure entre 15 et 20 mm (Delattre, 1973). Sa cuticule est très lisse, arrondi à l'avant et à l'arrière et porte deux aiguilles parallèles à sa partie postérieure.

2.3. Dégâts économiques de *H. armigera*

H. armigera est signalé comme le ravageur le plus dangereux dans le monde entier à cause de sa mobilité, sa grande polyphagie, son court cycle de reproduction et son taux élevé de reproduction (Fitt, 1989 ; Sharma, 2005). En 1969 et 1970, une invasion de cet insecte s'est déclarée en Nouvelle-Zélande sur des jeunes pins (*Pinus radiata* D. Don) (Pinaceae), et les larves ont consommé plus de 50% du feuillage d'environ 60% des arbres (CABI et l'OEPP, 2003). Il a aussi été signalé en Inde causant des dégâts sur la pomme de terre et sur le tournesol (CABI et OEPP, 2003). Il provoque de sérieux dégâts, en particulier sur le cotonnier, la tomate et le maïs. Sur le maïs, les chenilles se nourrissent des grains; sur la tomate, elles envahissent les fruits, empêchant leur développement et provoquant leur chute (CABI et OEPP, 2003). Cette culture subit d'importantes attaques par *H. armigera* se traduisant par des pertes atteignant 70% (Coulibaly et

al., 2004). Sur la tomate, la larve du ravageur attaque les fleurs et les fruits. Ce ravageur cause beaucoup de dégâts aux cotonniers dont les symptômes sont plus ou moins visibles sur la plante. Bien que les larves puissent également se nourrir des feuilles, elles préfèrent attaquer les organes reproducteurs de la plante (bourgeons, boutons floraux, fleurs et capsules). Les symptômes sont caractérisés par l'évidage des bourgeons et capsules avec un trou d'entrée. Les bourgeons et jeunes capsules attaqués tombent, après que les bractées aient jauni et séché alors que les capsules plus âgées restent sur la plante, mais ne s'ouvrent pas (Kranz *et al.*, 1981). Sur le cotonnier, deux ou trois larves sur une plante peuvent détruire toutes les capsules en 15 jours (CABI et OEPP, 2003). Selon Parry (1982), une seule chenille âgée de *H. armigera* peut dévorer cinq à six boutons floraux en une nuit. Mabbet *et al.*, (1980) ont noté une moyenne de 12,2 organes floraux par jour détruits durant la vie larvaire.

Le Tableau I montre les incidences de *H. armigera* et des autres ravageurs du cotonnier dans la zone d'étude au Bénin.

Tableau I: Répartition et importance des ravageurs du cotonnier dans une zone phytosanitaire du Bénin

Zone	Ravageurs et leur importance			
	Du feuillage		Des capsules	
Alibori et Atacora	<i>Sylepta derogata</i>	+++	<i>Helicoverpa armigera</i>	+++
	<i>Aphis gossypii</i>	+++	<i>Earias</i> Sp	+●
	<i>Altises</i> Sp.	+++		
	<i>Spodoptera littoralis</i>	+●		

+● = Faibles à moyennes infestations ++ = Moyennes infestations

+++ = Fortes infestations

Source : Association Interprofessionnelle du Coton (AIC, 2002).

2.4. Méthodes de lutte contre *H. armigera*

Face aux ravages constants causés par la noctuelle *H. armigera* dans les cultures, plusieurs moyens de lutte ont été développés, au nombre desquels : la lutte mécanique, l'utilisation de variétés résistantes, les méthodes physiques, la lutte chimique, les pratiques culturales, la lutte biologique et la lutte intégrée.

2.4.1. La lutte mécanique

Sous le contrôle mécanique des organismes nuisibles, notamment le ver de capsule, *H. armigera*, les larves peuvent être gérées par le ramassage à la main, le piégeage avec les herbes sèches enroulées, tandis que, les adultes peuvent être capturés avec différents pièges. Les pièges lumineux (lumière ultra-violette ou fluorescente) et les pièges à phéromones peuvent être utilisés efficacement pour contrôler la présence de ce ravageur, ainsi que la réduction de la prochaine génération, par conséquent, la réduction des populations de ravageurs.

Les larves de 3^e stade et au-delà peuvent facilement être ramassées à partir du feuillage et des gousses en développement et tuées par des coups de bâtons ou par leur mise dans une solution aqueuse d'insecticide. Ces méthodes sont très efficaces, mais le travail est pénible.

Les méthodes mécaniques de lutte contre les ravageurs sont des outils efficaces dans un programme de gestion intégrée des ravageurs. Elles peuvent être utilisées aussi bien comme une méthode préventive que curative de lutte contre *H. armigera*, mais elles ne sont pas très efficaces comme méthode unique de lutte.

2.4.2. La lutte variétale ou génétique

Selon McKinley (1988), la lutte génétique consiste à développer des variétés capables de résister aux attaques parasitaires ou à des prédateurs.

Deux mécanismes sous-tendent ce concept :

- l'antixénose, qui est le fait que par sa physiologie, sa morphologie ou sa phénologie (structure des organes, goût, odeur, couleur, longueur de son cycle de développement) la plante repousse ou amoindrit les dommages causés par les ravageurs (Benedict *et al.*, 1983 ; Robert et Foster, 1983) ;
- l'antibiose, qui est le fait que la plante est capable de produire une substance pouvant empêcher le développement du ravageur (Van Emden, 1987 ; Smith, 1989). Aux Etats-Unis, l'usage d'insecticides contre les chenilles carpophages (*H. armigera* et autres) a chuté de moitié depuis l'introduction du coton Bt (cotonnier génétiquement modifié produisant la toxine de *Bacillus thuringiensis* qui bloque le développement de l'insecte) (Benbrook, 2003).

2.4.3. La lutte physique

La lutte physique consiste en l'utilisation de pièges pour capturer les ravageurs. On distingue

deux types fondamentaux de méthodes en lutte physique : les méthodes actives et les méthodes passives (Vincent et Panneton, 2001). Selon ces auteurs, les méthodes actives utilisent de l'énergie (les chocs thermiques tels que la chaleur, les radiations électromagnétiques tels que la micro-onde, l'infrarouge, etc.) pour détruire, blesser et stresser les ennemis de cultures ou pour les enlever du milieu. Les méthodes passives procèdent par une modification du milieu et ont un caractère plus durable.

2.4.4. Les pratiques culturales

Elles consistent en la manipulation de l'habitat afin de réduire les populations de ravageurs. Il existe toute une gamme de pratiques culturales à savoir : le choix du site, la rotation des cultures, la modification des dates de semis et des récoltes, le travail du sol (labour), la destruction des résidus végétaux après récolte (incinération ou broyage), l'usage des plantes pièges (tournesol, rosier d'Inde, etc.), des plantes de couverture (légumineuses), la polyculture et le sarclage des mauvaises herbes. Par exemple, en Côte d'Ivoire, les semis précoces ont permis de réduire l'incidence de *H. armigera* (Nibouche, 1999). De même, l'utilisation du Rosier d'Inde (African Marigold) comme plante piège contre *H. armigera* s'est révélée efficace pour des cultures de tomate (Srinivasan *et al.*, 1994). Les plantes comme les carottes (*Daucus carota*, Apiaceae) sont de très bons pièges dans la lutte contre les espèces de *Meloidogyne* (Nématodes) mais qu'il faut détruire 2 à 3 semaines maximum après plantation (Slosson, 2007-2008). Les laitues (*Lactuca sp.*, Asteraceae) sont aussi utilisées efficacement comme plantes « pièges » contre les nématodes dans le nord-est de l'Espagne lorsqu'elles sont plantées tardivement en octobre ou novembre au lieu de septembre (Ornat *et al.*, 2001). Elles sont aussi utilisées avec le radis (*Raphanus sativus*, Brassicaceae) comme plantes « pièges » dans les jardins péri-urbains de Cuba (Cuadra *et al.*, 2000). La culture en bande augmente l'efficacité de gestion des chenilles de *H. armigera* (Gowda, 2005).

2.4.5. La lutte chimique

Cette lutte consiste à utiliser les produits chimiques pour combattre les ravageurs des cultures (AFPP, 1993). Bien qu'elle contribue substantiellement à augmenter le rendement, il n'en demeure pas moins que son utilisation comporte d'énormes dangers pour l'environnement, son utilisateur, le consommateur et même les organismes non-cibles. Au Bénin, la lutte contre *H. armigera* est essentiellement basée sur l'utilisation des produits chimiques de synthèse et a débuté depuis les années 1960. Elle se rapporte essentiellement au cotonnier, car apparemment, l'impact du ravageur sur les autres cultures telles que la tomate ne faisait pas encore l'objet

d'une préoccupation (AIC, 2002). De 1960 à 1970, la lutte contre les lépidoptères carpophages du cotonnier dont *H. armigera* se faisait à l'aide d'une utilisation massive d'organochlorés principalement, le Dichloro Diphényl Trichloroéthane (DDT) associé à d'autres produits et/ou aux organophosphorés (méthylparathion et monocrotophos) (AIC, 2002). En 1972, on avait assisté à l'introduction de l'endosulfan au sein d'une association « Endosulfan-DDT-Méthyl parathion » ; mais il fut très vite abandonné en 1973 au profit d'autres molécules telles que Polychlorocamphène, Toxaphène, Endrine (AIC, 2002). A partir de 1977, la prédominance de la chenille *Diparopsis sp.* qui n'était pas contrôlée par ce groupe d'insecticides a favorisé le remplacement des organochlorés par les Pyréthrinoïdes. Leur utilisation contre *H. armigera* et les autres lépidoptères a duré jusqu'en 1999 (AIC, 2002).

Certains auteurs ont relayé des plaintes de producteurs liées à une augmentation de l'utilisation des insecticides (Ochou, 1994 ; Ochou *et al.*, 1998). En effet, une diminution critique de la sensibilité de *H. armigera* aux Pyréthrinoïdes a été notifiée en 1995 par Vassal *et al.* (1997). Depuis la campagne 1999-2000, de nouvelles molécules telles que l'endosulfan, le tihan, sont alors recommandées au Bénin pour la lutte contre *H. armigera* dans les champs de cotonnier (AIC, 2002). Pour compléter ou relayer les insecticides là où ils sont inefficaces, il est nécessaire de rechercher d'autres moyens de gestion.

2.4.6. La lutte biologique

La lutte biologique est l'utilisation d'organismes vivants ou leurs produits pour prévenir ou réduire les dégâts causés par les ravageurs (Girling, 1992). Boivin (2001) précise que selon les modes d'utilisation, on reconnaît plusieurs types de lutte biologique :

- ✓ la lutte biologique classique consiste à acclimater un entomophage exotique (Fraval, *et al.*, 1997) ;
- ✓ la lutte biologique inondative ou augmentative consiste à introduire dans une culture des antagonistes multipliés en masse (par exemple, la Coccinelle *Rodolia cardinalis* fut prélevée en Australie, où se trouve son habitat naturel, et installée en Californie où les agrumes dépérissaient sous l'action de la Cochenille *Icerya purchasi*, les Trichogrammes utilisés pour contrôler la Pyrale de maïs, *Ostrinia nubilalis*, le parasitoïde, *Apoanagyrus lopezi* utilisé pour contrôler la cochenille farineuse de manioc, *Phenacoccus manihoti*) (Fraval, *et al.*, 1997) ;
- ✓ la lutte microbiologique utilise des micro-organismes, souvent conditionnés comme des insecticides (cas des champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana*, *Metarhizium*

anisopliae, *Nomurea riley*, du virus de la Polyhedrose Nucléaire de *H. armigera* (HaNPV) et de la bactérie du sol *B. thuringiensis* (Bt) (Michel *et al.*, 2000).

- ✓ la lutte autocide où l'auxiliaire est un individu de la même espèce, mais modifié (le plus souvent un mâle stérile), introduit dans la population pour en limiter la reproduction (la mouche méditerranéenne, *Ceratitis capitata* Wiedemann (Trypetidae)) (Fraval, *et al.*, 1997) ;
- ✓ la lutte biologique par conservation dont l'objectif est de modifier l'agrosystème, ses alentours ou les pratiques culturales afin de protéger et favoriser la présence d'ennemis naturels indigènes (larve du papillon foreur de la canne à sucre : *Chilo sacchariophagus* Bojer ((Lepidoptera : Pyralidae)) (Fraval, *et al.*, 1997).

Pour Lomer et Prior (1992), la lutte biologique contre les ravageurs se justifie par les avantages suivants :

- ✓ Contrairement aux pesticides, jusqu'à présent elle n'a pas fait apparaître de résistance chez les insectes ;
- ✓ elle est utilisable là où la lutte chimique est inacceptable ;
- ✓ effets permanents une fois que les ennemis naturels se sont bien établis ;
- ✓ pas d'effets secondaires nocifs (absence de résidus chimiques, de pollution chimique) ;
- ✓ sans danger pour l'environnement ou les cultures si l'agent de lutte biologique est spécifique à l'espèce cible ;
- ✓ effet souvent graduel et ne cause pas de perturbation forte sur l'environnement ;
- ✓ dépenses non renouvelables, car une fois le système bien établi, aucun frais supplémentaire n'est nécessaire.

Malgré ce succès connu de la lutte biologique, elle ne reste pas sans inconvénients, parmi lesquels :

- ✓ le coût élevé de la production en masse des auxiliaires ;
- ✓ la fragilité des insectes à élever ;
- ✓ les techniques de lâcher des parasitoïdes souvent compliquées et laborieuses ;
- ✓ le délai d'action, relativement long, entre le lâcher des parasitoïdes et l'effet recherché sur les hôtes ;
- ✓ la grande spécificité d'hôte (difficile à rentabiliser).

2.4.6.1. Les insectes entomophages

Les insectes entomophages sont des insectes qui se nourrissent d'autres insectes. Ils sont extrêmement nombreux, puisqu'on comptabilise plusieurs milliers d'espèces appartenant à 24

familles réparties dans 15 ordres différents (Delvare et Aberlenc, 1989). Tous les stades de développement d'un insecte, œuf, larve, nymphe, adulte sont attaqués par un ou plusieurs entomophages. Ces derniers, peuvent à leur tour, être victime d'autres consommateurs (hyperparasites). Ils sont subdivisés en prédateurs et parasitoïdes.

- **Les prédateurs**

Un prédateur est un insecte qui se développe en attaquant d'autres arthropodes pour les tuer et se nourrir de leur cadavre (Gauld et Bolton, 1988). Les prédateurs ont besoin de plusieurs proies pour effectuer la totalité de leur développement. Les larves et adultes sont mobiles, mais ils sont de formes et d'aspects, parfois, fort différents. Certains chassent à l'affût, édifiant des édifices plus ou moins complexes (toiles, entonnoirs), d'autres poursuivent leurs victimes sur ou dans le sol, sur les plantes ou en vol. Ces proies qui sont généralement de taille inférieure à celle du prédateur, sont, dans la majorité des cas, immédiatement détruites et consommées.

Ces caractéristiques générales se retrouvent notamment chez les espèces appartenant à l'ordre des Coléoptères (Carabes, Coccinelles), à celui des Hétéroptères (Reduviidae, Anthocoridae, Miridae, Pentatomidae) ou à celui des Neuroptères (Hémérobès, Chrysopes, Fourmilions) et à celui des Acariens (Phytoseides) (Gauld et Bolton, 1988).

Selon les familles, on note toutefois une tendance à exploiter des substances d'origine végétale soit à l'état larvaire (Diptères Asilidae, Empididae) (Musso, 1978), soit plus généralement à l'état imaginal. Ainsi, chez les Diptères, Syrphides, Cécidomyies entomophages, les Cantharides et les Téléphores, les adultes sont essentiellement floricoles. A ce stade, certaines espèces renforcent leur caractère utile grâce à de bonnes aptitudes pollinisatrices (Syrphes). D'autres sont, par contre, considérées comme plus ou moins nuisibles par leurs déprédations aux dépens des organes floraux (Cantharides et Téléphores sur les arbres fruitiers en Europe et surtout sur le mil en Afrique de l'Ouest).

Des acclimatations, plus ou moins couronnées de succès, se sont succédées dans l'Entre-deux-guerres, avec quelques échecs (pullulation de la coccinelle asiatique qui, sous sa forme introduite, était réputée aptère et incapable de passer l'hiver, mais qui s'est néanmoins développée et qui fait reculer les coccinelles autochtones) (<http://fr.academic.ru/contents.nsf/frwiki/>, 2011).

La cécidomye, *Aphidoletes aphidimyza*, Rondani (Diptera : Cecidomyiidae) est un prédateur spécialiste des pucerons utilisé avec succès en serre comme agent de lutte biologique (Boisclair *et al.*, 2010).

Le rôle des fourmis détruisant le ver de la capsule du cotonnier a été évalué en Australie et au Kenya. Sur le cotonnier, les espèces de fourmis appartenant aux genres *Pheidole* ou *Iridomyrmex*

étaient fréquemment observées et la mortalité des œufs de *H. armigera* en phase d'éclosion est extrêmement importante sur ces plants (Berg et Cock, 1993, 1995 ; Berg *et al.*, 1997 ; Manfield *et al.*, 2003).

Les chenilles sont attaquées par des coléoptères carabidés et des punaises (Reckhaus, 1997). Les travaux relatifs aux prédateurs de *H. armigera* en région Afrotropicale sont peu nombreux. Les synthèses de Van Den Berg *et al.* (1988) et de Greathead et Girling (1989) listent respectivement 14 et 34 genres et espèces de prédateurs, principalement dans les familles Anthocoridae, Reduviidae, Chrysopidae, Carabidae et Formicidae. Le Tableau II présente un nombre restreint de prédateurs de *H. armigera* en Afrique.

Tableau II : Répartition des prédateurs de *H. armigera* en Afrique

Ennemis naturels	Stade du ravageur attaqué	Pays
<i>Laius venustus</i> (Coleoptera : Malachiidae)	Larve	Soudan
<i>Microlestes discoidalis</i> (Coleoptera : Carabidae)	Larve	Soudan
<i>Nabis capsiformis</i> (Hemiptera: Nabidae)	Larve	Soudan
<i>Orius albidipennis</i> (Hemiptera: Anthocoridae)	Larve	Soudan
<i>Sycanus indagator</i> (Hemiptera: Reduviidae)	Larve	Ile Maurice

Source: CABI, 2007.

• Les parasitoïdes

Un parasitoïde est un insecte dont la vie larvaire s'effectue aux dépens de un (ou de plusieurs) hôtes, en tire sa subsistance et le tue comme résultat direct ou indirect de leur développement (Eggleton et Gaston, 1990). Les parasitoïdes sont donc en fait des prédateurs d'un type particulier.

On distingue :

- les parasitoïdes oophages qui pondent leurs œufs dans les œufs des arthropodes, ce qui entraîne la mort de ces derniers (l'œuf hôte devient une "réserve de nourriture" pour le développement du parasitoïde) (familles des Trichogrammatidae, Mymaridae, Scelionidae);

- les parasitoïdes ovarvaires qui pondent leurs œufs dans l'œuf de leur hôte, mais sans entraîner sa mort, l'œuf hôte poursuit son développement jusqu'à un de ces stades larvaires qui est alors tué par le parasitoïde qu'il héberge. Les parasitoïdes larvaires qui pondent leurs œufs sur ou dans leur hôte à un des stades larvaires de son développement.

On distingue les endoparasitoïdes qui consomment leur hôte de l'intérieur et les ectoparasitoïdes qui consomment leur hôte de l'extérieur. Dans ce dernier cas, ils peuvent être abrités à l'intérieur d'un fruit, d'une tige. Certaines espèces sont parasitoïdes solitaires, c'est-à-dire qu'il ne se développe qu'un seul insecte par hôte quel que soit le nombre d'œufs pondus, à la différence des parasitoïdes grégaires dont plusieurs individus peuvent se développer (jusqu'à quelques centaines) par hôte.

C'est parmi les Hyménoptères et les Diptères qu'on dénombre le plus grand nombre d'auxiliaires exploités en lutte biologique. L'utilisation des parasitoïdes a connu aussi bien des réussites que des échecs :

Au Togo, trois espèces d'ectoparasitoïdes nympholarvophages sont associées aux bruches dans le système de stockage du niébé. Il s'agit de *Dinarmus basalis* Rond. (Hymenoptera : Pteromalidae), *Eupelmus orientalis* Craw. (Hymenoptera : Eupelmidae) et *E. vuilleti* (Hymenoptera : Eupelmidae). Les études bio-écologiques réalisées par divers auteurs ont montré que *D. basalis* est un agent potentiel adéquat pour le contrôle biologique des populations des bruches (Glitho, 1990 ; Glitho et Monge, 1992 ; Tchamoou, 1995 ; Amevoin, 1998).

A Madagascar, (Bournier et Peryrelongue, 1973) ont pu contrôler *H. armigera* en réalisant des lâchers inondatifs réguliers de *Trichogramma brasiliensis* Ashm (Hymenoptera: Trichogrammatidae). De même, en Chine et en ex-URSS, les trichogrammes sont ou ont été largement utilisés en lâchers inondatifs contre *H. armigera* (King *et al*, 1989).

Les tentatives pour contrôler la jacinthe d'eau *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) envahissante dans les cours d'eau aux Etats-Unis par l'introduction dès 1972 de charançon phytophages d'Amérique du Sud, *Neochetina eichhorniae* et *N. bruchi* (Coléoptera : Curculionidae) n'ont pas été concluantes dans toutes les zones d'introduction en raison de facteurs abiotiques (température, qualité de l'eau) (Meyer, 2002).

Les charançons *Rhinocyllus conicus* (Coléoptera : Curculionidae) d'Europe ont été introduits au Canada en 1968 et en Virginie en 1969 pour contrôler des populations de chardons envahissants du genre *Carduus* (Asteraceae). Dans les années 1980, on s'aperçoit qu'ils s'attaquent également à des chardons indigènes du genre *Cirsium* protégées aux Etats-Unis (Meyer, 2002).

La mouche parasitoïde *Bessa remota* (Diptera : Tachinidae) introduite en 1925 aux îles Fidji pour contrôler le papillon du cocotier *Levuana iridescens* (Lépidoptera : Zyganidae) est

souvent citée comme exemple de succès dans la lutte biologique. Or, cet insecte aurait causé l'extinction de plusieurs espèces endémiques de papillons Zyganidés (Howarth, 1991).

La guêpe parasitoïde d'œuf, *Trissolcus basalis* (Hyménoptéra : Scelionidae) et la mouche, *Trichopoda pilipes* (Diptères, Tachinidés) introduites dans les années 1960 à Hawaï comme agents de lutte biologique contre la punaise verte *Nezara viridula* (Heteroptera : Pentatomidae) attaquent également la plus grande punaise endémique « koa bug », *Coleotichus blackburniae* (Hemiptera : Scutellaridae) (Meyer, 2002).

2.4.6.2. Les microorganismes entomopathogènes

La lutte biologique peut encore se faire par utilisation de microorganismes entomopathogènes ou pathogènes des mauvaises herbes indésirables. Quatre vingt à quatre vingt dix neuf virgule quatre vingt dix neuf pour cent des insectes meurent entre la naissance et la reproduction. Les 50% de cette mortalité sont imputables aux maladies microbiennes (Gillott, 1980). Réaumur (1726) décrit *Cordyceps* dans les larves de Noctuidae. La première tentative dans cette voie a été faite avec la muscardine verte (*Metarhizium anisopliae*). A ce jour on peut noter :

- **Les protozoaires**

En biologie, le terme protozoaire (Protozoa, du grec ancien proto- (« premier ») et du suffixe -zoa (« animal »)) désigne les protistes (eucaryotes unicellulaires) hétérotrophes qui ingèrent leur nourriture par phagocytose. Les familles de protozoaires les plus utilisées en lutte biologique sont les Amoebidae et les Nosematidae (Greathead *et al.*, 1994). Par exemple, *Balamoeba locustae* (Amoeba appartenant au phylum des Sarcomastigophora) est très efficace pour le contrôle des locustes (Canning, 1982). Parmi les néogregarines, ce sont les microsporidies qui offrent le plus de potentiel en lutte microbiologique en tant qu'organismes unicellulaires eucaryotes (Canning, 1982). Ce sont des parasites intra-cellulaires obligatoires qui forment des spores caractéristiques. Chez les microsporidies du genre *Nosema*, l'infection se réalise par ingestion des spores, celles-ci germent dans le tube digestif et traversent les tissus épitéliaux (Maddox, 1987). L'espèce *Nosema locustae* (Canning) (Microsporida: Nosematidae) a été utilisée avec succès dans la lutte contre les acridiens aux USA. Une mortalité de plus de 95% a été obtenue avec une infection précoce des larves (Greathead, 1992; Kevan, 1992). Des mortalités ont été obtenues avec *Vairimorpha necatrix* (Kramer) (Microsporida: Nosematidae) en infectant des larves de lépidoptères particulièrement des noctuidae. Dans les régions sahéliennes d'Afrique et les régions arides d'Asie, *N. locustae* est très prometteur dans la lutte anti-acridienne en raison des possibilités de production et de dissémination par ultra bas volume et de

son innocuité vis-à-vis des vertébrés. Les microsporidies *Nosema pyrausta* (Paillot) (Microsporidia: Nosematidae) et *V. necatrix* sont potentiellement exploitables contre les ravageurs des cultures localement importantes (Andreadis, 1987). La revue de littérature est ambiguë sur l'utilisation des microsporidies. Nous avons deux pôles divergents; d'une part, ceux qui ne considèrent pas les microsporidies comme des agents de lutte biologique efficaces, car n'entraînant pas la mort de l'hôte mais plutôt des dommages tels les effets débilissants ou affaiblissants et, d'autre part, ceux qui soutiennent que ce sont des agents de lutte efficace. En tant que parasite intracellulaire obligatoire, les microsporidies, tout comme les virus, sont très difficiles à multiplier de façon massive pour la production de biopesticides (Khachatourians, 1986; Poinar et Thomas., 1985). Cependant, des formulations commerciales existent. Parmi les Amoebidae, *Melameba locustae* (King et Taylor) (Microsporida : Amoebidae) est connu comme agent pathogène pouvant conduire à la mortalité des criquets et des grillons (Kevan, 1992). Il infecte principalement les tubes de Malpighi des criquets (Kevan, 1992) et de certains tétrigidés et gryllidés (Henry et Oma, 1981; Braun *et al.*, 1988; Streett et McGuire, 1990). *Melameba locustae* semble celui de tous les protozoaires amiboïdes entomophiles qui présente le plus d'intérêt en lutte microbiologique (McLaughlin, 1971). Quant aux grégarines, on les retrouve particulièrement chez presque tous les groupes d'orthoptéroïdes (Steinhaus, 1949; 1963; Gunther et Herter, 1974). Ce sont les protozoaires intestinaux les plus rependus chez les insectes et particulièrement chez les criquets (Steinhaus, 1949 ; Theodoridès *et al.*, 1958; Greathead, 1966). Les dommages qu'ils infligent à l'épithélium intestinal permettent à d'autres bactéries entomopathogènes d'envahir l'hôte et de provoquer des septicémies (Dempster, 1963). Harry (1970) a montré que l'eugrégarine *Gregarina garnhami* (Canning) (Eugregarina : Gregarinidae), empêchait les imagos de criquets pèlerins *Schistocerca gregaria* (Orthoptera : Acrididae) de prendre du poids. Pour McLaughlin (1971), ces protozoaires sont potentiellement utilisables en lutte biologique, bien que plusieurs auteurs ne soient pas de cet avis.

- **Nématodes**

Les vers ronds, némas ou nématodes (Nemates, Nemata ou Nematoda) constituent un embranchement de vers non segmentés. Classés parmi les ecdysozoaires, ils sont recouverts d'une épaisse cuticule. Ils mènent une vie libre ou parasitaire. Ce groupe comprend des vers dont le cycle ne nécessite pas d'hôte intermédiaire (monoxène) (Chitwood, 1957). Il existe plusieurs espèces de nématodes parasites d'insectes. Pour la plupart d'elles, l'infection se fait à partir d'œufs déposés sur les feuilles des plantes. Les œufs éclosent et les larves regagnent l'homocèle et au quatrième stade quittent l'hôte par perforation des tissus intersegmentaires. Il s'en suit la

mort de l'insecte. Certaines espèces de Steinernatidae et Heterorhabditidae vivent en symbiose avec des bactéries du genre *Xenorhabdus*. Les larves pénètrent l'hôte par les orifices naturels et même par la cuticule où elles libèrent les bactéries qui tuent rapidement l'hôte. Quoique de bons agents en lutte biologique, l'utilisation des nématodes en zone sèche est limitée par les facteurs abiotiques particulièrement les UV qui sont au détriment de tous les micro-organismes (Ignoffo et Hostetter, 1977; Roberts et Campbell, 1977; Gardner *et al.*, 1977 ; Burges, 1981) et peuvent entraver le processus d'infection de l'hôte (Greathead *et al.*, 1994). Bhatnagar *et al.*, (1982) ont observé en Inde sur les larves de *Heliothis sp.* récoltées au champ, un niveau de parasitisme de 93 % occasionné par le nématode Mermithidae, *Ovomermis albicans*.

- **Les bactéries**

Les bactéries sont des organismes unicellulaires dont les dimensions sont de l'ordre du micromètre. Plus d'une centaine de bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte biologique (Starnes *et al.*, 1993). Ces bactéries entomopathogènes appartiennent surtout à trois grandes familles qui sont les Bacillaceae, Enterobacteriaceae et Pseudomonaceae (Greathead *et al.*, 1994). À l'heure actuelle, *B. thuringiensis* Berliner et *B. sphaericus* sont les espèces les plus utilisées en lutte biologique contre les ravageurs (Kouassi, 2001). En Tanzanie, une mortalité de 4 à 39 % due à des maladies bactériennes est observée dans les populations de *H. armigera* (Nyambo, 1990).

- **Les virus**

Un virus est une entité biologique qui nécessite une cellule hôte, dont il utilise les constituants pour se multiplier. Les virus existent sous une forme extracellulaire ou intracellulaire. Un virus se caractérise par son incapacité à se multiplier seul par division. Il a besoin, pour cela, d'utiliser une cellule hôte : un virus est un parasite intracellulaire obligatoire. Il est composé d'une ou plusieurs molécules d'acide nucléique (soit d'ADN, soit d'ARN, simple ou double brin) entourées d'une coque de protéines, appelée la capside, et, parfois, d'une enveloppe. Il ne possède, en général, aucune enzyme pouvant produire de l'énergie. Les virus entomopathogènes se divisent généralement en deux grands groupes distincts ; d'une part, ceux possédant des corps d'inclusion paracristallin et, d'autre part, 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) (Arata *et al.*, 1978 ; Faulkner et Boucias, 1985). 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 (Payne, 1982). Les baculovirus ont depuis longtemps présenté un intérêt principalement pour leur spécificité. Ils n'ont, en effet, été observés que chez les invertébrés et en particulier chez les insectes (Devauchelle, 1993). Ce sont des virus en bâtonnet dont le génome est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire de haut poids moléculaire (70-85 106 daltons). Les virus entomopox sont parasites de plusieurs acridiens ravageurs de cultures (Purrini *et al.*, 1988) et sont comme les baculovirus, inoffensifs pour les vertébrés, d'où leur grand intérêt en lutte biologique (Street et McGuire, 1990). Il est rapporté par Meynadier *et al.*, (1992) que dans certains cas, les virus liquéfient les corps gras, entraînant une turgescence de l'insecte suivi de sa mort. Les polyèdres formés dans le noyau provoquent la polyedrose nucléaire (NPV) et affectent principalement les lépidoptères et hyménoptères, tandis que les baculovirus à corps d'inclusion granulaire (GV) causent la granulose et affectent surtout les lépidoptères.

Les chenilles mortes de virose sont souvent retrouvées dans les parcelles, pendues aux feuilles ou aux tiges par la partie postérieure du corps liquéfié (Michel et Bournier, 1997). La présence d'une polyédrose nucléaire chez *H. armigera* a été observée dans diverses régions du globe notamment en Inde (Patel *et al.*, 1968), au Tchad (Atger, 1969), au Malawi (Mckinley, 1971), en Australie (Teakle, 1973). En Tanzanie, Nyambo (1990) a noté que la polyédrose nucléaire touchait 1 à 23 % des chenilles récoltées au champ et que le taux de mortalité dû à cette virose pouvait varier selon la plante hôte et les conditions biotiques de l'année de culture du cotonnier.

Les caractéristiques principales des bioinsecticides viraux sont la spécificité, la haute virulence, la rapidité d'action et leur persistance dans l'environnement (Dent, 1991). La rémanence des virus est, cependant, affectée par les radiations UV. En effet, les NPV et GV sont inactivés après quelques heures d'exposition au rayonnement solaire (Franz, 1971).

- **Les champignons entomopathogènes**

Tous les champignons au sens commun du terme, parfois dits aussi «champignons supérieurs», appartiennent au groupe des Eumycètes et se répartissent au sein des Basidiomycètes ou des Ascomycètes. Ce qu'on appelle couramment champignon n'est en fait que la fructification temporaire et visible, le « sporophore » (autrefois appelé carpophore), d'un organisme à caractère plus durable et plus discret dont la structure habituellement filamenteuse constitue le «mycélium».

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

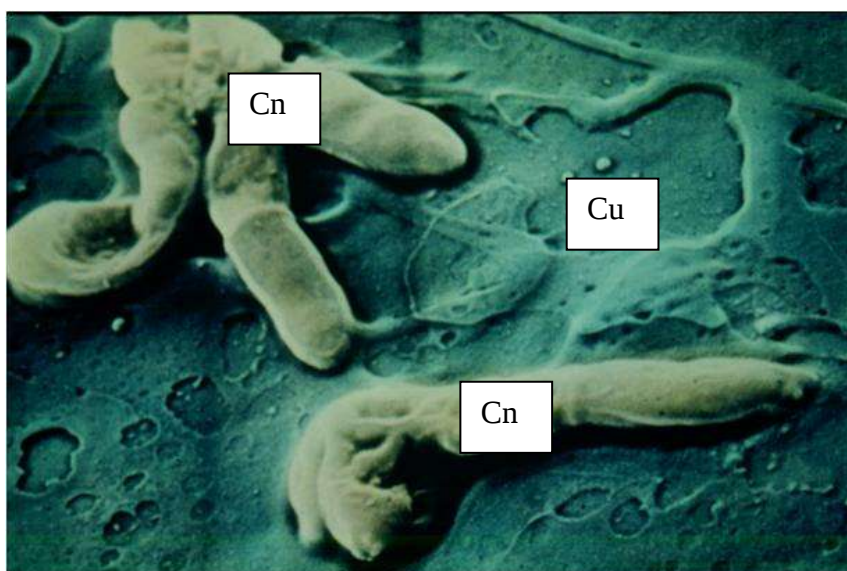
la régulation naturelle des populations d'insectes (Ferron, 1978 ; Wraight et Roberts, 1987). Ils appartiennent au sous-taxon des Mastigiomycotinae, Zygomycotinae, Ascomycotinae et Deuteuromycotinae. Le plus grand nombre des pathogènes se trouvent dans la classe des Zygomycètes, mais les plus utilisées en lutte biologique proviennent des Deuteromycètes (champignons imparfaits). Les espèces de la classe des Sordariomycètes (*Beauveria*, *Metharizium*, *Verticillium*, *Hirsutella*) et de celle des Zygomycètes (*Erynia*, *Entomophthora*, *Entomophaga*) sont les plus utilisées en lutte biologique (Wraight et Roberts, 1987; Goettel, 1992). Les champignons sont connus pour leur capacité à infecter une large gamme d'insectes : les Lépidoptères, les Homoptères, les Hyménoptères, les Coléoptères et les Diptères. Certains isolats de *B. bassiana* (Balsamo) Vuillemin et *M. anisopliae* couvrent tous ces ordres susmentionnés (Greathead et Prior, 1990). La plupart des recherches ont été faites sur le genre *Beauveria* et *Metarhizium* à cause de leur présence naturelle dans les sols et les cultures (Whitten et Oakeshott, 1991 ; Prior, 1992, 1997). Ils ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs des cultures et sont donc l'objet d'études de plus en plus poussées. La pathogénécité de l'inoculum sporal et la spécificité de l'hôte sont deux paramètres importants dans le choix de l'isolat fongique. Les microchampignons entomopathogènes sont des agents de lutte très intéressants du fait de leur aptitude à infecter l'hôte par ingestion ou par simple contact, rendant tous les stades (œuf, larve, adulte) sensibles (Carruthers et Soper, 1987). Ils peuvent être produits en masse à moindre coût et peuvent être appliqués avec les méthodes conventionnelles. Les principaux facteurs limitant l'utilisation en champ des microchampignons sont abiotiques et vont entraîner la perte d'efficacité de l'inoculum fongique sur le couvert végétal. Les effets de certains facteurs abiotiques sur la viabilité des conidies ont été très étudiés : il s'agit de la température (Roberts et Campbell, 1977; Doberski, 1981; Stathers *et al.*, 1993), de l'effet du rayonnement solaire sur la rémanence ou l'inactivation de l'inoculum infectieux (Ignoffo et Hostetter, 1977; Roberts et Campbell, 1977; Gardner *et al.*, 1977 ; Burges, 1981), de l'effet de l'humidité (Fargues, 1972; Hall et Papierok, 1982; Ramoska, 1984; Riba et Marcandier, 1984; Khachatourians, 1986).

- **Mode d'action des champignons entomopathogènes *B. bassiana* et *M. anisopliae***

Les champignons viennent à bout des insectes par déficience nutritionnelle, après invasion et destruction des tissus et/ou par libération de toxines. L'infection peut se faire par la voie respiratoire (Clark *et al.*, 1968), la voie alimentaire (Bao et Yendol, 1971) ou par la voie tégumentaire (Ferron, 1978).

La pénétration des champignons à travers le tégument externe de l'insecte hôte est la voie

d'invasion la plus commune (Ferron, 1978). Le tégument de l'insecte est composé de chitine et de protéines associées à des composés lipidiques et phénoliques, le tout servant de barrière contre les invasions des microorganismes. Les conidies (spores fongiques asexuées) en germination pénètrent la cuticule de l'insecte (Photo 1) par l'action combinée de la pression mécanique et de la dégradation enzymatique (Gillespie, 1988; Feng *et al.* 1994). L'action mécanique s'effectue au moyen de la pression exercée par l'hyphe au niveau des lacunes de la cuticule qui cède finalement. L'action enzymatique, quant à elle, s'effectue au moyen d'enzymes diverses : protéases (Bidochta et Khachatourians, 1990), lipases (Paris *et al.* 1985), estérases et chitinases émises par le champignon (Hübner, 1958; Grula *et al.* 1978; Pekrul et Grula, 1979). Pour plusieurs isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*, les protéases (endoprotéases) constituent l'enzyme-clé de la dégradation de la cuticule de l'insecte infecté (Smith *et al.* 1981; St Leger *et al.* 1986, 1987ab, 1989).



Grossissement : 468 x 366 jpg

Photo 1 : Conidies du champignon pénétrant la cuticule de l'insecte.

Cn = Conidies ; Cu = Cuticule de l'insecte

Source : Lubilosa, (1995).

Une fois la cuticule traversée, le champignon se multiplie 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'hémocœle, puis se développent en hyphes (filaments courts). Ce développement s'accompagne de la production de métabolites toxiques (mycotoxines) qui tuent l'hôte (Burge, 1988). Les toxines produites peuvent inactiver le système

de défense de l'insecte. Dans les premiers moments de l'infection, l'insecte montre peu ou pas de symptômes, mais, par la suite, l'insecte, moins actif, cesse de se nourrir, puis perd la locomotion (McCoy *et al.* 1988). Les hyphes se nourrissent d'eau à partir des organes internes de l'insecte, provoquant ainsi la déshydratation de ce dernier. Son hémolymphe diminue progressivement avec modification des propriétés physico-chimiques : l'hémolymphe initialement acide tend vers la neutralité. Il se forme des cristaux qui ralentissent la circulation de cet hémolymphe et finissent par immobiliser l'insecte. La consistance de l'insecte diminue, puis surviennent dans l'ordre la paralysie, le ramollissement et la mort de l'insecte par asphyxie (Lomer et Lomer, 1997). En résumé, la mort de l'insecte peut résulter d'une action combinée de la pression mécanique (Papierok, 1996), de l'action enzymatique et de la toxicose (Gillespie, 1988; Johnson et Goettel, 1993). Après la mort de l'insecte, si le taux d'humidité est suffisamment élevé, il y a émergence du champignon à travers la cuticule et une sporulation sur l'insecte mort. Le champignon peut rester à l'intérieur de l'insecte plusieurs mois, si les conditions sont défavorables et produire des spores lorsque les conditions redeviennent favorables (Gillespie, 1988).

○ **Le genre *Beauveria* et son utilisation dans la lutte biologique**

L'exploitation directe d'organismes vivants pour éliminer les ravageurs nécessite une compréhension des mécanismes d'interaction entre l'agent entomopathogène et l'insecte nuisible visé (Wraight et Roberts, 1987). En effet, la pathogénie de l'inoculum sporal et la spécificité de l'hôte sont deux paramètres importants dans le choix de l'isolat fongique. Le microchampignon *B. bassiana* s'avère être un agent de lutte intéressant, puisqu'il possède l'avantage, par rapport aux autres microorganismes pathogènes, d'infecter l'hôte sans être ingéré. Ce qui peut rendre les différents stades de développement de l'hôte sensibles à ce biopesticide. Cette caractéristique explique le fait que ce mycète peut être efficace contre les insectes piqueurs-suceurs qui sont relativement peu exposés à l'infection par des spores déposées sur le feuillage des plantes (Wraight et Roberts, 1987).

Les espèces de champignon du genre *Beauveria* ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs des cultures et font donc l'objet de nombreuses études. Le large spectre d'action et la virulence de *B. bassiana* ont permis de l'utiliser avec succès en milieu agricole en Ex-URSS et en Europe de l'Est (Lipa, 1985). Des résultats positifs dans la répression des ravageurs avec *B. bassiana* en Amérique ont été obtenus aux USA (Roberts, 1981), au Bénin dans les cultures maraîchères (Godonou *et al.*, 2009). En outre, la persistance des conidies dans le sol peut assurer un contrôle à long terme en provoquant des mortalités dans les générations

suivantes de l'hôte (Gaugler et Lashomb, 1989).

Gowda et Prasad (1992) indiquent des taux d'infection de 6 à 12 % par *B. bassiana* pour des chenilles de *H. armigera* collectées sur des pois d'Angole en Inde. Au niveau de la biosécurité, plusieurs études ont prouvé que ce mycète n'était pas dangereux pour les vertébrés (Faria et Wraight, 2001). Le champignon *B. bassiana*, comme la plupart des microchampignons entomopathogènes, peut être produit en masse et peut être appliqué avec les appareils conventionnels d'application existants (types UVB et à pression entretenue) (Faria et Wraight, 2001).

○ **Le genre *Metarhizium* et son utilisation dans la lutte biologique**

L'utilisation du genre *Metarhizium* comme agent de lutte biologique dans le domaine agricole est très ancienne : *M. anisopliae* était utilisé délibérément pour le contrôle d'insectes ravageurs par le russe Metchnikoff (1880), père de la lutte microbiologique. Les espèces les plus utilisées dans cette lutte sont : *M. anisopliae* et *M. flavoviride*. Déjà en 1960, *M. anisopliae* a causé une épizootie dans un essaim de criquets pèlerins en Ethiopie (Balfour-Browne, 1960). Utilisé à grande échelle au Brésil, il est venu à bout de la cercope de la canne à sucre *Mahanarva posticana* (Stål) (Roberts *et al.* 1991). En Inde, Gopalakrishnan et Narayanan (1988) ont identifié *M. anisopliae* Sorokin Var minor Tulloch, à partir des larves mortes de *H. armigera* collectées dans un champ de tomate. Urs et Govindu (1971) ; Gopalakrishnan et Narayanan (1989) ont obtenu en laboratoire l'infection de *H. armigera* par ce champignon. Extrêmement virulent, il provoque une mortalité de 80 à 100 % en deux à dix jours, suivant le stade larvaire infecté. Gopalakrishnan et Narayanan (1989) précisent que tous les stades de l'insecte, hormis l'œuf, peuvent être touchés. Les adultes mis en contact avec une suspension de conidies ne meurent pas. Cependant, les femelles infestées pondent des œufs stériles. Ce champignon a été aussi observé à maintes reprises parasitant les sauteriaux (Veen, 1968 ; Humber et Soper, 1986). En ce qui concerne *M. flavoviride*, de bons résultats ont été obtenus dans la lutte contre la delphacide brune du riz (*Nilaparvata lugens* (Stål)) aux Philippines (Rombach *et al.*, 1986).

Ces dernières années, l'Institut Internationale d'Agriculture Tropicale (IITA)-Station du Bénin, à travers son programme Lutte Biologique contre les Locustes et les Sauteriaux (LUBILOSA), a mis au point un biopesticide appelé «Green Muscle» qui est une formulation huileuse des conidies de *M. anisopliae*, et qui s'est révélée efficace contre les criquets (Lomer *et al.* 1993 ; 1997b ; Douro-Kpindou *et al.*, 1997 ; Langewald *et al.*, 1997a). Une autre formulation à base de *M. anisopliae* a été utilisée pour contrôler le criquet puant *Zonocerus variegatus* (L.) (Orthoptera : Pyrgomorphidae) (Douro-Kpindou *et al.*, 1995 ; Bateman, 1998 ; Lomer *et al.*,

1997a ; Douro-Kpindou *et al.*,2005).

Toujours à l'IITA-Bénin, le champignon *Metarhizium* a été utilisé dans plusieurs études dans le cadre du Projet Termite. Ainsi, des isolats locaux et Kenyans de *Metarhizium* utilisées contre les termites : *Macrotermes subhyalinus* (Rambur) ont toutes montré une pathogénie pour cette espèce. L'isolat local ATL 16 (champignon isolé sur un termite mort par le projet Termite, IITA-Bénin, à Zinvié (Bénin) et les isolats provenant des Etats-Unis, du Mexique et du Kenya paraissent les plus virulentes (Jimaja, 2000).

Des essais en laboratoire, menés dans le cadre du programme IIBC/IITA/DFPV, ont démontré qu'une dose de $3,75 \times 10^4$ spores/g de poids vif de cet isolat produisait une mortalité de 100% au bout de 4 à 7 jours selon l'espèce acridienne. En 1992 et en 1993, des essais sur le terrain ont été effectués au Niger, au Bénin et au Mali, à la dose de 5×10^{12} spores/ha. Le taux de mortalité des sauteriaux dans les parcelles était difficile à évaluer à cause du délai de mortalité et de la mobilité des insectes. Parmi les échantillons capturés quelques jours après le début des applications et placés en cage sur le terrain, la mortalité s'élevait à 80 % voire 95 % après 10 à 15 jours. Lors de ces essais, il a été découvert qu'après une semaine, les spores du champignon pouvaient persister dans la végétation traitée et occasionnée une mortalité de 40 % des acridiens.

2.4.7. La lutte intégrée

Elle consiste à l'application rationnelle d'une combinaison de mesures biologiques, chimiques, physiques, culturelles ou mettant en œuvre l'amélioration des végétaux. L'emploi de préparations phytopharmaceutiques y est limité au strict nécessaire pour maintenir les populations d'organismes nuisibles en dessous du seuil de nuisibilité. (Mémento, 2002).

La lutte intégrée est une démarche de planification et de gestion qui implique différentes méthodes de réduction des populations d'organismes nuisibles à des niveaux acceptables. Pour atteindre cet objectif, la lutte intégrée dispose de plusieurs méthodes : la prévention de la prolifération des organismes nuisibles, l'emploi de méthodes culturelles (comme par exemple la rotation des cultures ou la résistance variétale), la lutte biologique qui fait appel aux ennemis naturels des ravageurs et l'épandage modéré de pesticides, de préférence naturels, c'est-à-dire à base de plantes dont la rémanence est faible, et en dernier ressort les pesticides de synthèse utilisés de façon ciblée (CTA, 2008). C'est un système de gestion des populations de ravageurs qui met en œuvre toutes les techniques appropriées, d'une manière aussi compatible que possible, pour maintenir ces populations en dessous des niveaux qui provoquent des dommages d'importance économique. Ce n'est pas une simple juxtaposition ou superposition de deux techniques de lutte (telles que la lutte chimique et la lutte biologique) mais l'intégration de toutes

les techniques de lutte adaptées aux facteurs naturels de régulation et de limitation de l'environnement.

Quelques programmes de lutte intégrée ont abouti à des résultats concrets (Breniere, 1981) :

- ✓ la mouche des fruits, *Dacus dorsalis* (Hendel) (Diptera : Tephritidae) a été éliminée de plusieurs îles de l'archipel des Mariannes par la combinaison de lâchers de mâles stériles, d'insecticides et d'attractifs ;
- ✓ le nématode de l'avoine, *Heterodera avenae* (Wollenweber) (Tylenchida : Heteroderidae) a été combattu grâce à la sélection par les généticiens et les entomologistes de l'INRA (France) de variétés de blé et d'avoine résistantes ;
- ✓ il en est de même des variétés d'arbres fruitiers résistantes aux nématodes à galles ou anguillule des racines du genre *Meloidogyne*.
- ✓ la pyrale du maïs en France fait l'objet d'une véritable stratégie de lutte comprenant l'emploi coordonné d'insecticide biologique à base de *B. thuringiensis*, la recherche de variétés tolérantes, les traitements biologiques par l'apport d'hyménoptères oophages de la famille des *Trichogrammes*, la mise au point de seuils de nuisibilité et de moyens de prévision des dégâts. Enfin, l'efficacité de techniques de lutte mécanique par enfouissage des résidus de récolte a été démontrée.
- ✓ de même, en matière d'agrumes, un programme de lutte intégrée est adopté en Corse (France), associant lutte biologique par l'utilisation d'entomophages et lutte insecticide appliquée à des dates déterminées limitant l'effet toxique à l'égard de l'entomofaune utile. Une programmation analogue est préconisée à l'île de la Réunion dans la lutte contre les mouches des fruits.

Quant à la lutte intégrée en Afrique de l'ouest contre les ravageurs du cotonnier, elle reste fortement tributaire de la lutte chimique sans laquelle la productivité ne peut être assurée (Traoré, 2008). Or, bien qu'elle contribue substantiellement à augmenter le rendement, son utilisation comporte d'énormes dangers pour l'être humain, l'environnement, le consommateur et même les organismes non-cibles. Afin de faire face à la problématique de synthétiser de nouvelles molécules insecticides et puisque les pesticides ne peuvent pas être abandonnés, c'est la gestion intégrée qui est encouragée (Traoré, 2008). Ceci rend donc obligatoire la découverte d'alternatives moins polluantes comme l'insecticide à base de *M. anisopliae*, connu sous le nom commercial de Green Muscle utilisé dans la lutte contre les acridiens (Lomer *et al.*, 1997a). C'est dans ce cadre que se situe notre étude dont la deuxième partie décrit le matériel et les différentes méthodes utilisées.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Milieux d'étude

Les travaux ont été réalisés dans trois milieux différents à savoir:

- les laboratoires de l'IITA-Bénin de mars à mai 2009 où les températures ont varié entre $20,9 \pm 1,2^{\circ}\text{C}$ et $26 \pm 0,050^{\circ}\text{C}$ et l'humidité relative (%RH) entre $65,5 \pm 5\%$ et $91,3 \pm 4,9\%$;
- les parcelles expérimentales du Centre de Recherches Agricoles Coton et Fibres (CRA-CF) de l'Institut National des Recherches Agricoles du Bénin, appelées ici milieu semi-réel et ;
- les champs des producteurs dénommés milieu paysan.

Les travaux en milieu semi-réel et en milieu paysan ont été conduits durant la campagne agricole 2009-2010 (juin-décembre) au Nord-est du Bénin : (i) le Centre Permanent d'Expérimentation (CPE) du Centre de Recherches Agricoles Coton et Fibres (CRA-CF) à Angaradébou (Kandi) ($11^{\circ} 20' \text{ N}$, $2^{\circ} 59' \text{ E}$) ; (ii) les champs paysans dans cinq villages de la commune de Banikoara : Goumonri ($11^{\circ} 10' \text{ N}$, $2^{\circ} 17' \text{ E}$) ; Ounet ($11^{\circ} 13' \text{ N}$, $2^{\circ} 24' \text{ E}$) ; Godou ($11^{\circ} 16' \text{ N}$, $2^{\circ} 34' \text{ E}$) ; Kokey ($11^{\circ} 25' \text{ N}$, $2^{\circ} 33' \text{ E}$) ; Founougo ($11^{\circ} 29' \text{ N}$, $2^{\circ} 32' \text{ E}$) (Figure 2). Les sites qui ont abrité les expérimentations étaient des anciens champs de coton qui ont été l'objet de plusieurs campagnes de coton sans interruption. Le climat, dans la zone, est de type soudanais avec une saison sèche de novembre à avril et une saison pluvieuse de mai à octobre. La pluviométrie moyenne se situe entre 800 et 1300 mm de pluie par an. L'humidité relative atteint 80 % pendant la saison pluvieuse et peut chuter à 35 % pendant la saison sèche (PDC-Kandi, 2009). Les sols sont de type ferrugineux tropicaux et la végétation est constituée de savane arborée à arbustive avec quelques forêts galeries qui abritent une faune variée (PDC-Kandi, 2009).

2. Matériel

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Colonies d'insectes

Les larves de *H. armigera* ont été collectées dans les champs de tomates et de cotonnier de différentes localités des zones agro-écologiques du Nord-Bénin à savoir l'extrême-Nord, la zone cotonnière du Nord et la Zone vivrière du Sud-Borgou (Figure 2). Elles ont été élevées au laboratoire à l'IITA-Bénin sous un régime alimentaire artificiel composé de haricots, de l'agar, de maïs, de levure de brasserie, de l'acide ascorbique, de l'acide sorbique, de miel, de formaldéhyde et de Metyl p-hydroxy benzoate (Teakle et Jensen., 1985). L'humidité relative et la température, dans le laboratoire, ont été maintenues respectivement à $70 \pm 5\%$ HR et $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ avec une photopériode de 12:12 h L:D. Les larves de 3^e, 4^e, 5^e et 6^e stades ont été utilisées, car ce sont ces stades qui causent les dégâts les plus importants (Saour et Causse, 1996).

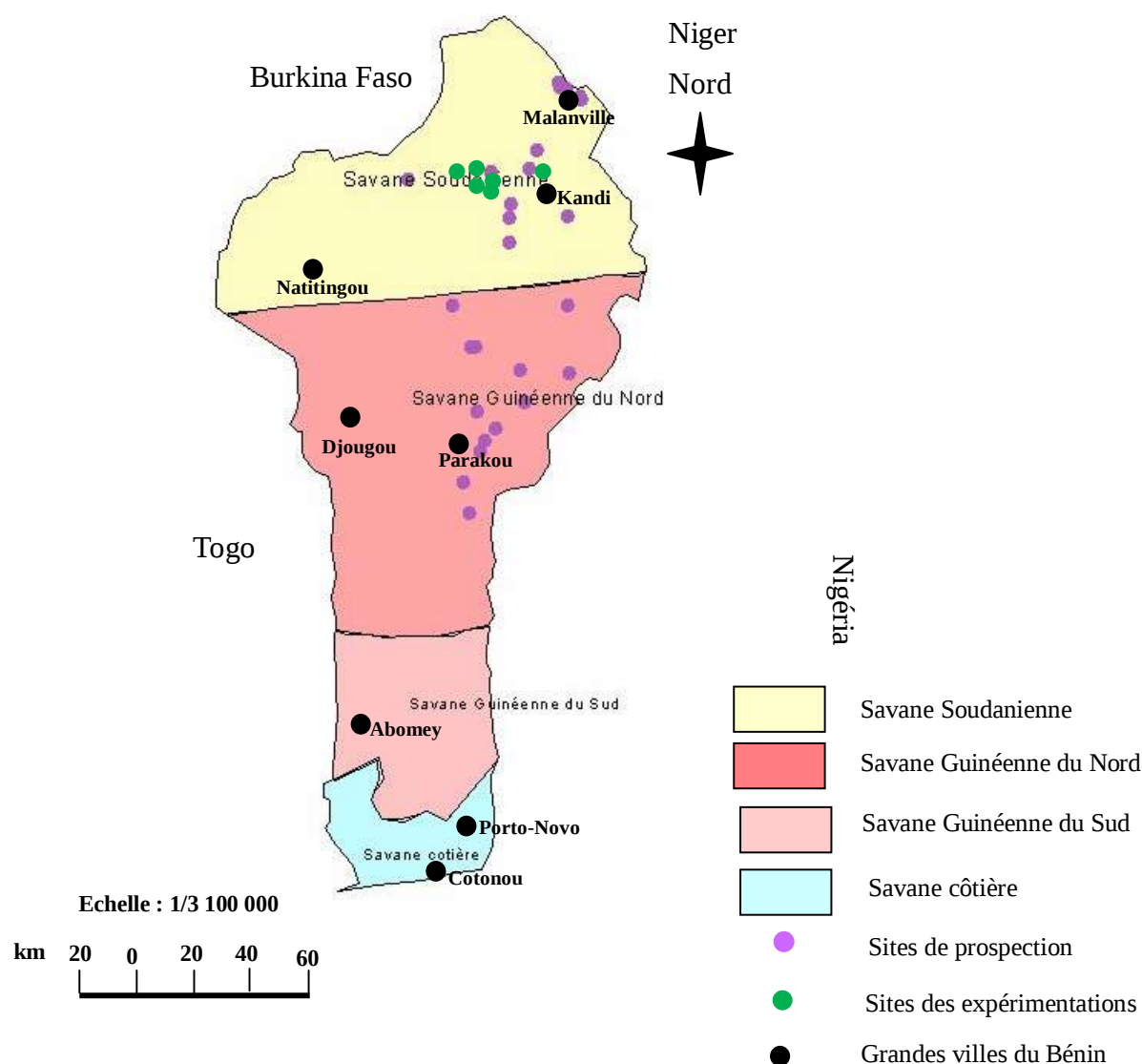


Figure 2 : Sites de collecte du ravageur en République du Bénin

De plus, à partir du 3^e stade, la mortalité due à l'effet de la manipulation devient moindre lors de la mise en place des expérimentations et des observations. A la 2^e génération des larves collectées des champs, l'élevage avait suffisamment d'insectes pour un test au Laboratoire. Ainsi, les larves de 3^e, 4^e, 5^e et 6^e stade de cette génération ont été utilisées pour la mise en place de la première expérimentation sur l'étude de la sensibilité de ces larves aux isolats de champignons entomopathogènes. Au moment de la mise en place de l'expérimentation sur la mesure de la réponse des larves de *H. armigera* aux différentes doses et de celle dans le champ expérimental, l'élevage était respectivement à sa cinquième et septième génération.

2.1.2. Isolats fongiques

Les huit isolats de champignons entomopathogènes, deux de *B. bassiana* et six de *M. anisopliae* ont été obtenus de la collection des entomopathogènes de IITA-Bénin (Tableau III).

Tableau III : Différents isolats de champignons utilisés dans différents essais

Espèces de champignons	N° d'enregistrement	Abréviations	Hôte (Pays d'origine)	Auteur (Année)
<i>M. anisopliae</i>	28	Met 28	<i>Eldana saccharina</i> , (Bénin)	IITA-BENIN (1996)
<i>M. anisopliae</i>	32	Met 32	<i>Sesamia calamistis</i> (Bénin)	IITA-BENIN (1996)
<i>M. anisopliae</i>	92	Met 92	<i>Busseola fusca</i> , (Kenya)	ICPE (1989)
<i>B. bassiana</i>	12	Bb 12	<i>Sesamia calamistis</i> , (Bénin)	IITA-BENIN 1997
<i>M. anisopliae</i>	31	Met 31	<i>Sesamia calamistis</i> , (Bénin)	IITA-BENIN (1996)
<i>M. anisopliae</i>	34	Met 34	<i>Eldana saccharina</i> , (Bénin)	IITA-BENIN (1996)
<i>M. anisopliae</i>	341	Met 341	<i>Nezara viridula</i> (Brésil)	Cornell University (1983)
<i>B. bassiana</i>	11	Bb 11	<i>Sesamia calamistis</i> , (Bénin)	IITA-BENIN (1997)

2.1.3. Matériel végétal utilisé dans l'évaluation de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*

La variété de coton H-279-15, vulgarisée par les services de recherches de l'INRAB, est celle utilisée dans le cadre de notre essai. Son cycle végétatif dure 90 jours et son rendement est de 1216 kg/ha en milieu paysan et 1874kg/ha en milieu semi-réel (INRAB/CRA-CF, 1994-1999 ; 2004-2005).

2.2. Insecticides chimiques et botaniques utilisés dans les essais comparatifs

2.2.1. Insecticides chimiques

Les pesticides chimiques utilisés sont : Tihan (175 O-TEQ) utilisé contre *H. armigera* par le Programme National, le binaire acaricide (lambda-cyhalothrine : 15 g/l + profenofos : 200 g/l) et le binaire aphicide (cyperméthrine : 72 g/l + acétamipride : 16 g/l). Les pesticides de synthèse utilisés sont ceux fournis aux paysans par la société agréée « Société de Distribution des Intrants (SDI), dans le cadre de la protection du cotonnier au Bénin.

2.2.2. Insecticide botanique

L'huile de neem utilisée dans les essais comparatifs au niveau des parcelles expérimentales et dans les champs des cotonculteurs a été achetée auprès d'un fabricant local (COOBENEEM, Porto-Novo, Bénin)

3. Méthodes

3.1. Production des pathogènes

Selon l'expérimentation à mettre en place, deux procédés ont été utilisés pour la production des pathogènes : (i) la sélection des isolats entomopathogènes et (ii) la réponse des larves de *H. armigera* à différentes doses des meilleurs isolats et l'efficacité de ces isolats en milieu semi-réel et réel.

Pour la sélection des isolats, les conidies des différents isolats ont été produites dans des boîtes de Pétri ($\varnothing = 9$ cm) contenant du Sabouraud Dextrose Agar (SDA) et incubées à $26 \pm 1^\circ\text{C}$ (Photo 2). Après 10 jours d'incubation, les conidies ont été récoltées avec de l'huile d'arachide et filtrées. Trois répétitions par boîte ont été faites.



Photo 2 : *Metarhizium anisopliae* sur SDA

Après avoir retenu deux isolats jugés performants de part leurs taux élevés de mortalité et sporulation, les conidies de celles-ci ont été produites par l'unité de production de IITA-Bénin par un procédé diphasique (liquide, solide) (Cherry *et al.*, 1999). La phase liquide consiste en l'inoculation dans un liquide stérile contenant 20 g/l de sucrose et 20 g/l de mélasse de brasserie (levure). Ce liquide a été mis en incubation pour trois jours dans des flacons de 250 ml sur un agitateur orbital à 150 tours par minute dans une chambre où la température oscille entre 24-28°C (Photo 3). Pour la phase solide, 1000 g par sachet de riz précuit à l'huile végétale ont été stérilisés. Après refroidissement, chacun des sachets a été introduit dans une bassine

préalablement désinfectée. Pour la sporulation, le mélange (250 ml) issu de la phase liquide a été ensuite versé sur les 1000 g de riz contenu dans la bassine. Ces bassines qui reçoivent de l'air à travers des trous fermés avec des chiffons stérilisés ont été incubées pendant 15 jours (Photo 4). Après ouverture des bassines et 5-7 jours de séchage, le riz recouvert de conidies a été tamisé. Les conidies, ainsi, récupérées ont été séchées encore jusqu'à l'obtention de 5 à 10% de contenu d'eau.

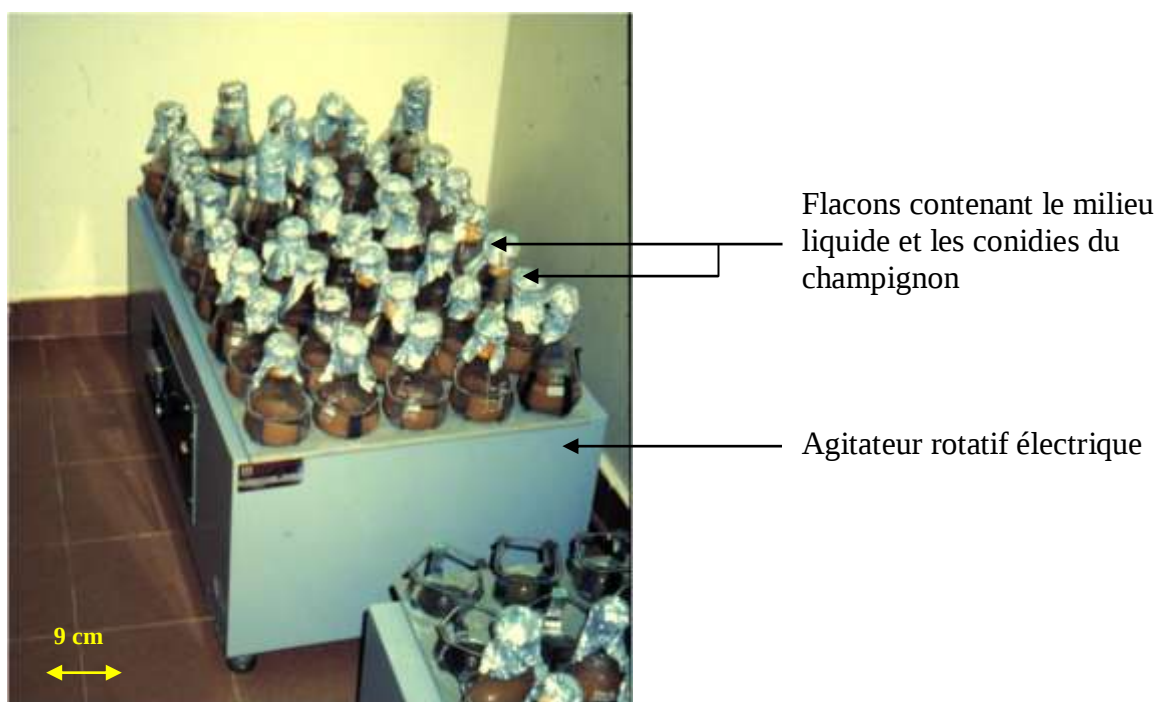


Photo 3 : Flacons contenant le milieu liquide disposés sur un agitateur rotatif

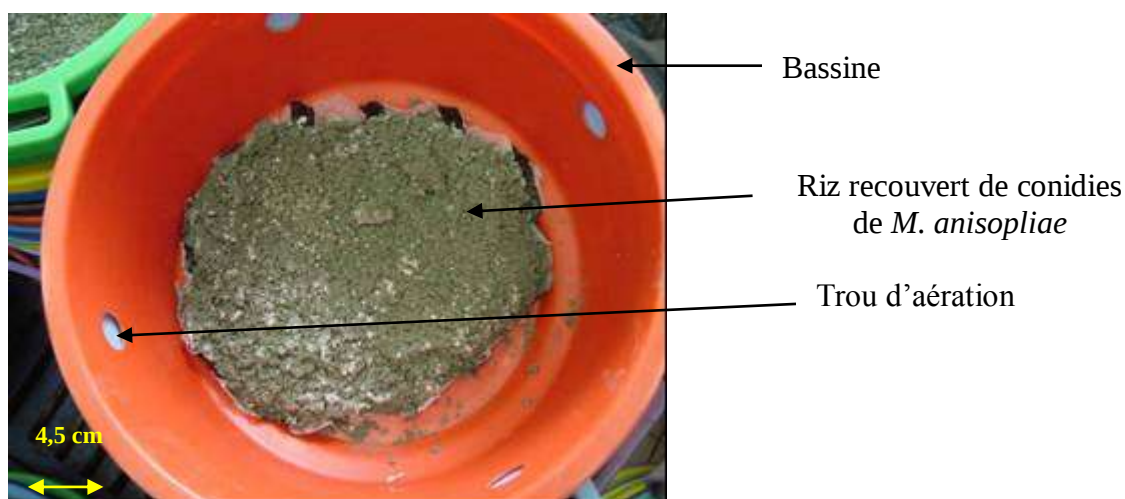


Photo 4 : Bassine contenant du riz recouvert de conidies de *M. anisopliae*

3.2. Test de germination des conidies des champignons produits

Le test de germination a été réalisé par comptage des conidies sur un sous-échantillon de 100 conidies. Les taux des conidies viables (TCV) ont été calculés selon la formule qui suit:

$$TVC(\%) = \frac{a}{a + b} \times 100$$

où a = nombre de conidies germées dans les 24 heures; b = nombre de conidies non germées.

3.3. Formulations des pathogènes dans les différentes expérimentations

Elles ont été de deux types : (i) pour les expérimentations au laboratoire et (ii) pour les expérimentations en milieux semi-réel et réel.

3.3.1. Expérimentations au laboratoire

Pour les expérimentations au laboratoire, l'application étant directe (topique sur le pronotum), les conidies ont été mélangées à l'huile d'arachide selon la concentration voulue.

3.3.2. Expérimentations au champ

Quant aux essais en milieu semi-réel et réel, les conidies (sèches) ont été mélangées dans une formulation huileuse contenant 70% de pétrole et 30% d'huile d'arachide. Cette formulation a été appliquée à l'aide d'un appareil pulvérisateur, Ultra-Bas Volume (UBV) à disque rotatif contenant 5 batteries. Cet appareil est celui communément utilisé par les producteurs de coton. Un gramme de conidies sèches contient 5×10^{10} conidies (Cherry *et al.*, 1999).

3.4. Evaluation des effets des champignons entomopathogènes *M. anisopliae* et *B. bassiana* sur les larves de *H. armigera* au laboratoire

Deux types d'expérimentations ont été mis en place :

- dans la première, la sensibilité des larves de *Helicoverpa* à six isolats de *M. anisopliae* et deux isolats de *B. bassiana* disponibles dans la banque de pathogènes de IITA-Bénin (Tableau III) a été mesurée ;
- dans la seconde, différentes doses, d'un isolat de *M. anisopliae* (Met 31) et d'une autre de *B. bassiana* (Bb 11) qui ont provoqué des taux élevés de mortalité et de sporulation lors de la première expérimentation, ont été appliquées sur les larves L3 et L4 de *H. armigera* en vue de la détermination de leur DL50.

3.4.1. Protocoles expérimentaux

3.4.1.1. Sensibilité des larves de *H. armigera* aux agents pathogènes

Les conidies de chacun des isolats de champignons mentionnés dans le Tableau III ont été formulées dans de l'huile d'arachide à une concentration de 10^8 conidies par ml. Six cents larves de chacun des stades larvaires L3, L4, L5, L6 de *H. armigera* ont été utilisées pour cet essai biologique. Les stades larvaires ont été testés séparément. Chacun de ces tests a consisté en neuf traitements composés de huit isolats de champignons et d'un témoin (larves inoculées à l'huile d'arachide sans conidies). Chacun des traitements a été répété chacun trois fois dans un dispositif de bloc complètement aléatoire dont l'avantage est la précision des comparaisons des traitements et qui nécessite également une homogénéisation des conditions telles que celles du laboratoire (Diedhiou, 1987). Chacune des répétitions contenait vingt larves de *H. armigera*. Cinq μ l de la formulation ont été déposés sur le pronotum de la larve. Le taux de germination des isolats utilisés variait entre 91,1% et 99,2%, 24 heures après incubation. Au cours des expérimentations, les températures moyennes ont varié entre $24,2 \pm 0,2^\circ\text{C}$ et $25,8 \pm 0,1^\circ\text{C}$ avec une humidité relative moyenne comprise entre $80,40 \pm 1,4\%$ et $87,6 \pm 0,9\%$.

3.4.1.2. Réponse des larves de *H. armigera* aux différentes doses de deux isolats performants (Met 31 et Bb 11)

Sur la base des résultats de l'expérimentation précédente, deux isolats (Met 31 et Bb 11) ayant présentés les meilleurs effets sur les larves ont été retenues leurs DL50 ont été évaluées dans deux expérimentations (Tableau IV):

- Dans un premier temps, pour raison de disponibilité des larves dans l'insectarium, seul l'isolat de *M. anisopliae* (Met 31) a été utilisé pour inoculer les larves de 3^e stade de *H. armigera*. Les concentrations utilisées de conidies étaient de 0, 5×10^6 , 5×10^7 , 5×10^8 , 5×10^9 conidies par ml avec un volume d'application de $2 \mu\text{l/insecte}$, la concentration dans la suspension mère étant faible.

- Dans un deuxième temps les deux isolats Met 31 et Bb 11 ont été utilisés pour inoculer les larves de 4^e stade de *H. armigera*. Pour cette expérimentation, les concentrations de conidies/ml étant plus élevées (0, 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} conidies/ml) le volume d'application a été de $1 \mu\text{l/insecte}$.

Egalement, pour cette expérimentation des différentes doses, 20 larves ont été utilisées par répétition, à raison de trois répétitions par traitement. Les témoins étaient constitués de larves inoculées avec l'huile d'arachide sans conidies.

Tableau IV : Stades larvaires de *H. armigera* utilisés, isolats de champignons et doses appliquées

Expérimentation	Stades larvaires	Isolats	Concentration (conidies/ml)	Volume d'application	Dose (conidies/insecte)
I	L3	Met 31	0	2µl	0
			5×10^6		10^4
			5×10^7		10^5
			5×10^8		10^6
			5×10^9		10^7
II	L4	Met 31	0	1µl	0
			5×10^7		10^4
			5×10^8		10^5
			5×10^9		10^6
			5×10^{10}		10^7
		Bb 11	0	1µl	0
			5×10^7		10^4
			5×10^8		10^5
			5×10^9		10^6
			5×10^{10}		10^7

De même, après inoculation, les boîtes ont été disposées dans un bloc aléatoire complet.

Pour ces deux types d'essai, ce sont les conidies contenues dans l'huile d'arachide qui ont été utilisées. L'application topique (Photo 5) a été la méthode utilisée pour inoculer les larves (Bateman *et al.*, 1996 ; Peveling *et al.*, 1997). Les larves ont été mises individuellement dans des boîtes de 3,8 x 2,9 x 4,0 cm munies de couvercle perforé pour la ventilation (Photo 6).



640 x 480 jpg

Photo 5 : Inoculation d'une larve de *H. armigera*

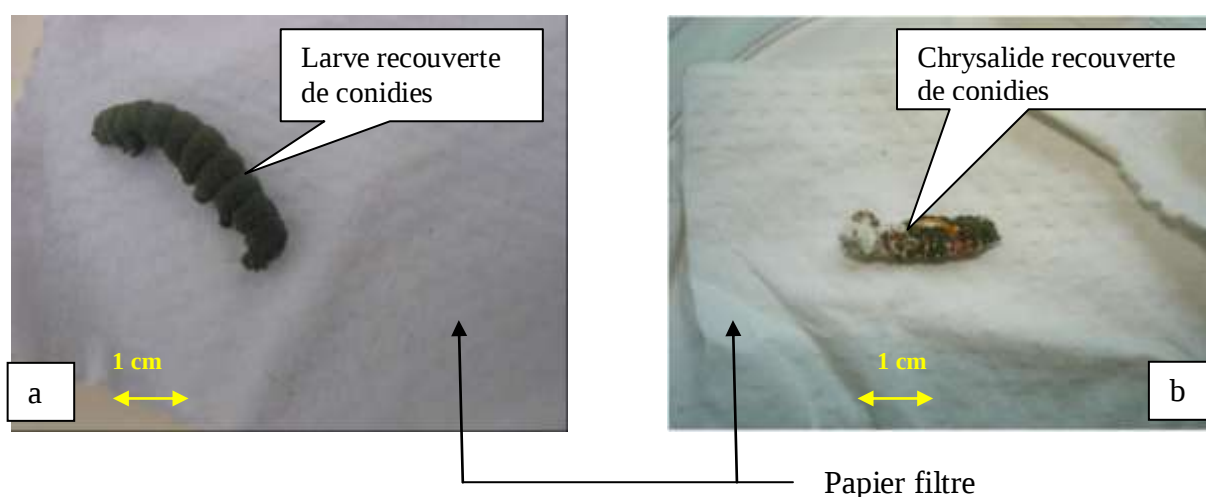


640 x 480 jpg

Photo 6 : Larves mises individuellement dans les boîtes

3.4.2. Suivi des essais au laboratoire

Les insectes, après inoculation, ont été mis en incubation et ont été nourris avec le milieu artificiel ci-dessus décrit. Les observations ont porté sur la mortalité, et la sporulation des insectes morts. Les observations ont également porté sur la chrysalidation des survivants, le nombre de chrysalides mortes et le nombre d'adultes émergés des chrysalides qui ont survécues. Pour les traitements où les deux sexes ont été présents, les adultes ont été mis en accouplement et les œufs pondus ont été comptés. En effet, les larves ou chrysalides mortes prélevés ont été séchées pendant 24 heures, puis incubées dans des boîtes de Pétri (Ø = 9 cm) contenant du papier buvard légèrement imbibé pour l'observation d'éventuelles sporulations (Photo 7a et b).



640 x 480 jpg

Photo 7 : Larve L6 morte (a) chrysalide morte (b) de *H. armigera* en sporulation après sa mise sur couche dans du papier filtre légèrement mouillé

3.5. Evaluation des agents pathogènes, *M. anisopliae* et *B. bassiana* dans les parcelles expérimentales en station et au champ

Ces expérimentations ont lieu en deux temps et dans des milieux différents :

- en milieu semi-réel dans les parcelles expérimentales de la station de IITA-Bénin dont le but est de comprendre la relation existante entre le contact direct des gouttelettes d'application du biopesticide et la mortalité du ravageur dans un champ de coton avant les essais au champ proprement dits ;
- en milieu réel (parcelles expérimentales du centre de recherches et en milieux paysans) dont l'objectif est de tester l'efficacité ces biopesticides dans des essais comparatifs avec les pesticides chimique et l'huile de neem.

3.5.1. Transfert de dose d'une formulation huileuse de *Metarhizium anisopliae* appliquée sur le ver de capsule du cotonnier dans un champ expérimental

3.5.1.1. Protocole expérimental

L'objectif de cet essai était de quantifier la distribution des gouttelettes dans la végétation du cotonnier lors des applications et d'étudier la relation qui pourrait exister entre cette distribution et la mortalité du ravageur.

L'expérimentation a été conduite à la station IITA-Bénin (06° 25 'N; 002° 19' E) dans trois champs de coton d'une superficie d'un quart d'ha chacun. Le coton a été planté à un espacement de 0,80 m x 0,40 m. A la levée, les plantes de coton ont été éclaircies en laissant un maximum de deux plantes par poquet. Dans chacun des champs, trois lignes de cotonnier (L1, L2 et L3) ont été marquées à des distances respectives de 0,4 m, 2 m et 5 m par rapport à la ligne d'application du biopesticide. Les lignes étaient perpendiculaires à la direction du vent. Chacune des lignes constitue ici un sous-traitement, les traitements étant les doses à appliquer. Sur chacune des lignes, 3 plants de cotonnier distants d'environ 5 m ont été marqués. Chacun de ces plants occupant un espace de 0,32 m² (0,8 m x 0,4 m) est appelé arène.

Dans chacune des arènes, dix larves de 3^e et 4^e stade de *H. armigera* ont été lâchées sur un plant de cotonnier. Une lame porte objets (7,6 cm x 2,6 cm) permettant de capter les gouttelettes a été attachée à la même plante de cotonnier, à hauteur d'environ 0,5 m, le côté plat orienté vers la direction du vent (Figure 3).

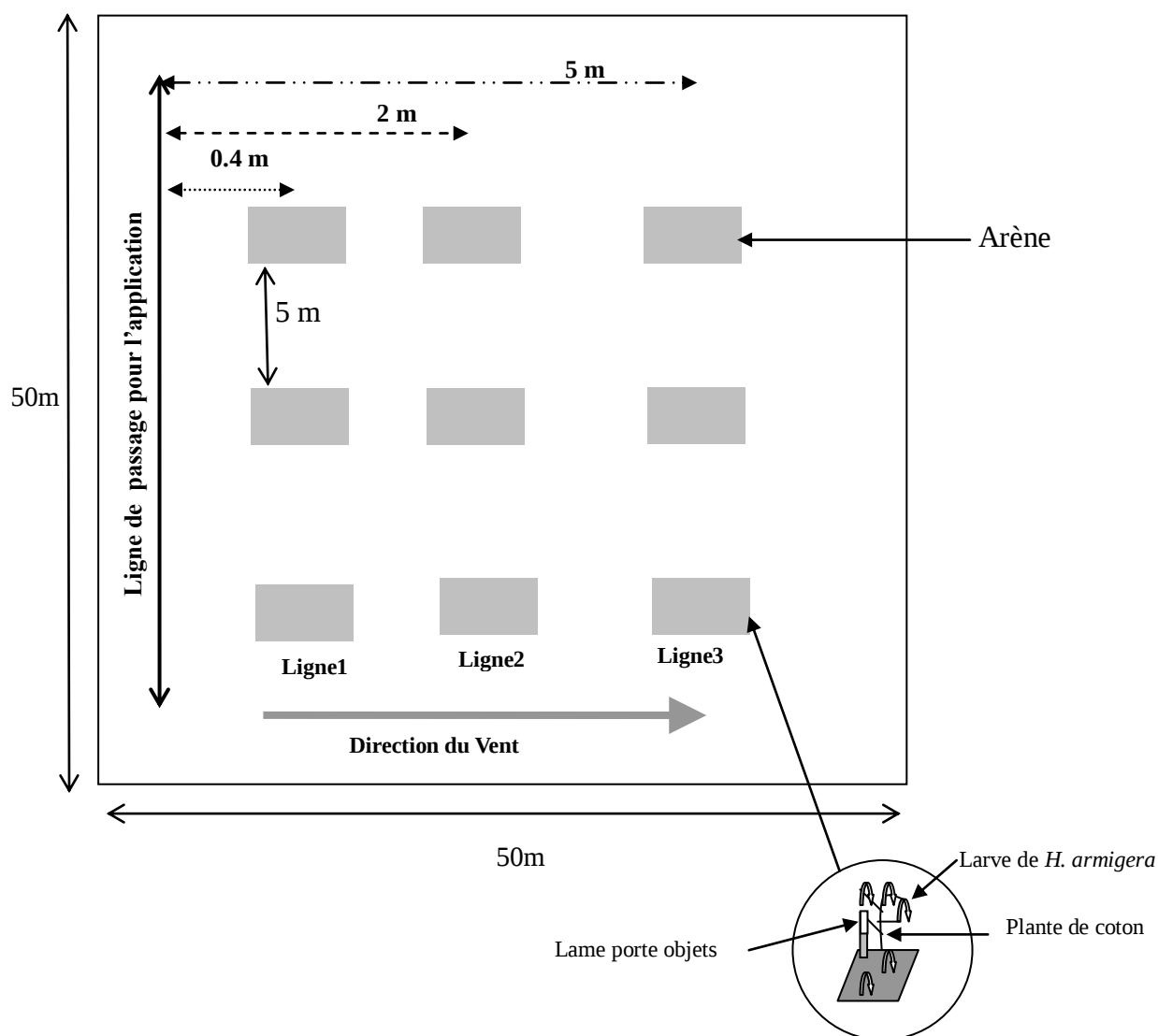


Figure 3 : Schéma d'un champ de l'essai: les arènes individuelles contenant des cibles de pulvérisation (lames porte objets et les larves de *H. armigera*) sur une plante de cotonnier.

L'isolat de champignon Met 31 qui a été utilisé et a été produit dans un milieu diphasique (Cherry *et al.*, 1999) à l'IITA, station du Bénin.

Le test consistait en trois traitements: le témoin (formulation sans conidies du champignon), une formulation contenant $2,5 \times 10^{12}$ conidies/litre/ha et une formulation contenant $3,75 \times 10^{12}$ conidies/litre/ha. La formulation était composée de 30% d'huile d'arachide et 70% de pétrole à laquelle on y a ajoutées les différentes quantités respectives de conidies. La formulation témoin était composée uniquement du mélange huile : pétrole (30 :70). Toutes les formulations ont été appliquées à l'aide d'un pulvérisateur manuel de type Berthoud "Micro Ulva (Berthoud, rue de l'Industrie 69220 Belleville, France) équipé d'un réducteur rouge et cinq piles. La zone censée être couverte par l'application a été de 50 m² (5 m x 10 m) ; donc une quantité nécessaire pour chacune des formulations a été mesurée avant l'application. Le débit était d'environ 60 ml/s. Lors de l'application, la température était de $29 \pm 1^\circ\text{C}$ et la vitesse du vent variait entre 2,5 et

4m.s⁻¹. Chacun des champs a abrité un traitement de manière à éviter la contamination.

Au moment de l'application du biopesticide, la taille moyenne des plantes de coton était d'environ 1,5 m.

3.5.1.2. *Suivi de l'essai dans le champ expérimental*

Après l'application du biopesticide, les lames porte objets, attachées aux cotonniers, ont été récupérées et des gouttelettes ont été estimées, utilisant la méthode de Bateman (1993). Les larves de *H. armigera* ont été recapturées autant que possible et mises individuellement dans des boîtes en plastique (3,8 x 2,9 x 4,0 cm) munies de couvercles perforés pour la ventilation. Elles ont été étiquetées et transportées au laboratoire pour l'incubation. Les larves ont été soumises à un régime artificiel (Teakle et Jensen, 1985) et les larves mortes ont été prélevées quotidiennement. Le nombre de chrysalides issues des larves qui ont survécues et les adultes émergés ont été enregistrés. Les chrysalides, mortes et sporulées ont également été enregistrées. Les adultes mâles et femelles d'un même traitement ont été mis ensemble pour l'accouplement et le nombre de larves issues des œufs incubés a été compté.

3.5.2. Etude comparative de l'efficacité des champignons entomopathogènes, de pesticides chimiques et botaniques dans la gestion des ravageurs du cotonnier et de leurs ennemis naturels au Bénin

3.5.2.1. *Protocoles expérimentaux*

Deux expérimentations ont été mises en place :

- une dans les parcelles expérimentales du Centre Permanent d'Expérimentation (CPE) du Centre de Recherches Agricoles Coton et Fibres à Angaradébou (Kandi) (11° 20' N, 2° 59' E) que nous avons appelé milieu semi-réel ;
- l'autre dans les champs paysans dans cinq villages de la commune de Banikoara (11° 10' N, 2°17' E - 11° 29' N, 2°32' E) que nous avons appelé milieux paysans.

a) Milieu semi-réel

Dans le milieu semi-réel, les essais ont consisté en cinq traitements dont un témoin positif qui est le traitement conventionnel aux pesticides de synthèses constitués de tihan, de binaire acaricides et aphicides). Les autres traitements étaient : le témoin (sans application de pesticide), le cotonnier traité à l'huile de neem, le cotonnier traité au *M. anisopliae* (isolat Met 31) et le cotonnier traité au *B. bassiana* (isolat Bb 11). Chacun des traitements a été répété quatre fois

dans un dispositif de Bloc Aléatoire Complet (BAC). Les surfaces parcellaires étaient de 352 m² (17,6 m x 20 m). Le cotonnier était semé à un écartement de 0,8 m entre les lignes et de 0,40 m sur la ligne. Deux semaines après la levée, le démariage a été effectué laissant deux plants par poquet. La fumure a été appliquée 30 jours après levée (NPK, 200 kg/ha) et deux semaines après l'épandage du NPK (Urée, 50 kg/ha). Trois désherbages ont eu lieu. L'application des biopesticides a été faite à la dose de 50 g m.a. (matière active)/ha et l'huile de neem diluée avec du pétrole (50 :50) à 1 litre à l'ha. La dilution de l'huile de neem a permis de diminuer sa viscosité et d'avoir un débit similaire à ceux des biopesticides utilisés et qui est d'environ 60 ml.s⁻¹. Le volume d'application des biopesticides était de deux litres à l'hectare. Les produits chimiques sont des formulations liquides et crémeuses dont le volume d'application est de 10 l/ha. La dose d'application recommandée et utilisée dans les parcelles à pesticides chimiques était de 200 ml/ha pour le tihan, 1 l/ha pour le binaire acaricide et 0,5 l/ha pour le binaire aphicide.

Les biopesticides et l'huile de neem ont été appliqués sur seuil qui est de cinq larves de *H. armigera* et de dix larves des autres carpophages pour 40 plantes de cotonnier (PADSE, 2003/2004). Ainsi, es applications ont eu lieu les 50^e, 57^e, 64^e, 71^e, 78^e, 85^e jours après la levée du cotonnier L'application des pesticides chimiques a été faite selon le standard qui est une application calendaire : le tihan, 45^e et 60^e jour après la levée du cotonnier, le binaire acaricide deux fois tous les 15 jours après l'application de tihan et le binaire aphicide deux fois après celle du binaire acaricide. Toutes les applications ont été faites à l'aide d'appareils Berthoud 'Micro Ulva' (Berthoud, rue de l'Industrie 69220 Belleville, France) contenant cinq batteries (Photo 8). Les températures et humidité relative moyennes ($\pm$ SE) enregistrées lors des applications étaient comme suit : $T_{\min} = 23,2 \pm 0,2$ °C, $T_{\max} = 31,8 \pm 0,4$ °C, $HR_{\min} = 63,9 \pm 1,5\%$, $HR_{\max} = 94,2 \pm 0,5\%$. L'endroit où l'essai a été mis en place a fait l'objet d'une succession de plusieurs cultures de coton et de maïs.



640 x 480 jpg

Photo 8 : Application des pesticides à l'aide d'appareil Berthoud 'Micro Ulva'

b) Milieux paysans

Cinq producteurs de coton ont été choisis dans cinq arrondissements de Banikoara. Chacun de ces producteurs a abrité quatre traitements utilisés en milieu semi-réel sur des superficies parcellaires d'un quart d'hectare à savoir : le coton conventionnel, le cotonnier traité à l'huile de neem, le cotonnier traité au *M. anisopliae* (isolat Met 31) et le cotonnier traité au *B. bassiana* (isolat Bb 11). Le témoin n'a pu être installé dans les champs des producteurs qui craignaient des infestations dans leur champ. Les pratiques culturales (semis, démariage, fumure, désherbage) ont été les mêmes qu'au niveau du milieu semi-réel, de même que les paramètres d'application des produits phytosanitaires (chimiques, biologiques, botanique). Les températures et l'humidité relative moyennes ($\pm$ SE) enregistrées lors des applications étaient comme suit : $T_{\min} = 24,1 \pm 0,3$ °C, $T_{\max} = 32,9 \pm 0,7$ °C, $HR_{\min} = 61,9 \pm 2,5\%$, $HR_{\max} = 92,2 \pm 1,5\%$. Dans ce milieu, les paysans ont semé du maïs dans les allées de 5 m de largeur, jugées très grandes. Ceci a permis de diminuer les dérives des applications d'une parcelle à une autre.

3.5.2.2. *Suivi des essais au champ*

a) **Milieux semi-réel**

- ***Evaluation de la densité de population des chenilles carpophages***

Pour ce paramètre, trois sous-parcelles de 5 m x 5 m ont été délimitées de manière diagonale dans les parcelles ; chacune des sous-parcelles contenant ainsi 6 lignes de cotonnier. Dans chacune de ces sous-parcelles, 6 plantes de cotonnier, à raison d'une plante par ligne, ont été, soit un total de 18 plantes par parcelle. Ainsi, la densité de population des chenilles carpophages a été évaluée en comptant, toutes les semaines à partir du 35^e jour après levée (JAL), le nombre de chenilles (*H. armigera*, *Earias* sp, *Diparopsis watersi*, *Pectinophora gossypiella*, *Spodoptera littoralis*), sur ces 18 plantes de cotonnier préalablement marquées.

- ***Evaluation des dégâts sur les organes fructifères***

Les dégâts en pour cent (organes piqués, pourris) et la présence des chenilles carpophages ont été évalués trois fois (40^e, 80^e, 100^e JAL pour les fleurs ; 80^e, 90^e et 120^e JAL pour les capsules) sur les organes fructifères parce qu'elle est destructive. Pour cette observation, 15 boutons floraux et/ou 15 capsules par plante sur cinq plantes/sous-parcelle choisies au hasard, ont été collectés pour un dépouillement à la station. Cette collecte a été effectuée uniquement sur les plantes autres que celles destinées pour l'évaluation de la densité.

- ***Evaluation de la densité de population de quelques ennemis naturels (coccinelles, fourmis, araignées)***

Des adultes de certains ennemis naturels (coccinelles, fourmis, araignées) ont été comptés, une fois avant et deux fois après les applications des différents produits, soit aux 37^e, 52^e et 67^e JAL. Ce comptage a été effectué sur les mêmes plantes de cotonnier utilisées pour l'évaluation de la densité des chenilles carpophages.

- ***Conditions météorologiques***

Durant la conduite des expérimentations, les paramètres météorologiques, comme la pluviométrie, la température et l'humidité relative, ont été enregistrés.

b) **Milieux paysans**

En dehors de l'évaluation des ennemis naturels, les paramètres observés ont été les mêmes que

ceux évalués dans le milieu semi-réel.

Les superficies parcellaires étant plus grandes (1/4 ha par parcelle expérimentale), les sous-parcelles délimitées étaient d'une superficie de 80 m² (10 m x 8 m), chacune d'elles étant constituées de 10 lignes de cotonnier. Ainsi, 10 plantes de cotonnier par sous-parcelle, à raison d'une plante par ligne, soit un total de 30 plantes/parcelle ont été marquées. Les observations des chenilles carpophages ont été donc faites hebdomadairement sur les 30 plantes par parcelle du 60^e (JAL) au 131 (JAL).

Dix boutons floraux et/ou capsules par sous-parcelle, soit un total de 30 organes fructifères ont été récoltés puis examinés trois fois au cours du cycle végétatif du cotonnier (50^e, 85^e, 100^e JAL pour les fleurs ; 85^e, 100^e et 115^e JAL pour les capsules).

- ***Evaluation des rendements dans les deux milieux***

Trois autres sous-parcelles/parcelle, mais de superficies identiques que celles délimitées pour les observations sur la densité de population des chenilles, ont été marquées à cette fin. Toutes les plantes de cotonnier se trouvant dans la sous parcelle ont été récoltées et le coton a été pesé.

3.6. Analyse des données

3.6.1. Expérimentations au laboratoire

Les taux de mortalité (Tm) des larves traitées ont été corrigés en utilisant la formule d'Abbott (1925) :

$$Tm(\%) = \left(1 - \frac{nTa}{nCa}\right) \times 100$$

où nTa est le nombre de larves survivantes dans les traitées et nCa est le nombre de larves survivantes dans le témoin.

Les taux d'infection (Ti) ou taux de sporulation ont été calculés sur la base du nombre de larves ou chrysalides mortes qui ont sporulé :

$$Ti(\%) = \frac{NCS}{NC} \times 100$$

où NCS représente le nombre de larves ou chrysalides mortes avec sporulation des champignons et NC pour le nombre total de larves ou chrysalides mortes.

Les taux d'émergence (Te) ont été calculés sur la base du nombre de larves inoculées :

$$Te(\%) = \frac{NAE}{NTL} \times 100 \text{ où } NAE \text{ représente le nombre d'adultes qui ont émergé et } NTL, \text{ le nombre}$$

total de larves inoculées.

Les Temps Moyens de Survie (TMS) ont été calculés, utilisant une analyse de Kaplan Meier de survie (SPSS, 1989-2003). Les différences dans les taux de mortalité et de la sporulation des larves, le temps moyen de survie (TMS), les pourcentages de chrysalides formées, mortes, les taux de chrysalides avec sporulation et les taux d'émergence des adultes ont été soumis à une analyse de variance (ANOVA), utilisant le modèle linéaire général (GLM) procédure de SAS (SAS, 2002-2008). Lorsque les valeurs de F sont statistiquement significatives, les moyennes ont été comparées à l'aide du test SNK (Student-Newman-Keuls) au seuil de probabilité de 5%. Pour normaliser la distribution des données, les pourcentages ont été transformés en arcsinus, les TMS et les nombres moyens de chenilles par plante de cotonnier ou dans les organes fructifères ont été transformés en log, avant d'être soumis à une analyse de variance. L'efficacité de l'agent pathogène a été comparée en utilisant la mortalité finale (soit mortalités cumulées de 21 jours). Pour toutes les analyses de variance (ANOVA), le logiciel SAS version 9.2 (2002-2008) a été utilisé.

Pour les expérimentations dans les parcelles expérimentales en station, les taux de mortalité $da(Tm)$ des larves traitées non pas été corrigés et ont été calculés selon la formule ci-après :

$$Tm(\%) = \left(\frac{nTa}{N} \right) \times 100$$

où nTa est le nombre cumulé des larves mortes après pulvérisation et N est le nombre de larves récupérées pour incubation.

Les nombres moyens de gouttelettes ont été utilisés pour tracer les histogrammes.

Estimation de la DL50 (Dose Létale 50)

L'analyse et la modélisation des données temps-dose-mortalité ont été effectuées en utilisant le modèle « cox-régression » (SPSS, 1989-2003). Les modèles de régression de Cox utilisent la fonction de risque pour estimer le risque d'échec relatif. La fonction de risque $h(t)$ est une évaluation de la mort potentielle d'un individu par unité de temps à un moment donné, étant donné que l'individu a survécu jusqu'à ce moment. Les modèles de Cox-régression sont exprimés en termes de fonction de risque comme suit :

$$h(t) = [h_0(t)] e^{(BX)} \quad (1)$$

où X représente log (dose), B le coefficient de régression, e la base du logarithme népérien, et $h_0(t)$ est la fonction de risque lorsque X est égal à 0.

La fonction cumulative de risque, $H(t)$, est liée à la fonction de survie et peut être dérivée de la fonction de survie comme suit :

$$H(t) = -\ln S(t) \quad (2)$$

La fonction de risque et la fonction de survie sont étroitement liées, et toutes les deux ont été calculées en utilisant le procédé de Cox-régression (SPSS, 1989-2003).

La DL50 est définie comme la dose d'un agent (chimique ou biologique) nécessaire pour produire la mort de la moitié des organismes testés à un moment donné après application (Maddox, 1982). La DL 50 peut être dérivée des équations (1) et (2) comme suit :

$$X = 10^{(\ln(\ln(0,5) - \ln(h_0(t)))) / B}$$

Les intervalles de confiance pour la DL50 ont été calculés sur la base des mêmes équations, utilisant les informations suivantes : Ecart type (SE) de B et Ecart type (SE) de $h_0(t)$.

3.6.2. Expérimentations au champ

Pour les expérimentations en milieu réel, les nombres moyens d'insectes sur les plantes et dans les organes fructifères, les taux moyens de dégâts causés à ces organes et les rendements moyens ont été utilisés pour les graphiques et les tableaux. A cause de leur faible nombre, les chenilles carpophages, *Earias* sp, *D. watersi*, *P. gossypiella*, *S. littoralis*, ont été regroupées sous la rubrique de « autres ». Pour normaliser les données et stabiliser les variances, les taux moyens de dégâts des organes fructifères ont subi une transformation arcsinus et les nombres moyens des insectes et les rendements, une transformation $\text{Log}(x+1)$, avant toute analyse. L'analyse de variance ANOVA a été faite à l'aide du logiciel SAS version 9.2 pour comparer les traitements, et en cas de différence significative, le test Student-Newman-Keuls (SNK) a été utilisé pour séparer les moyennes. Tous ces paramètres ont été analysés au seuil de signification de 5%.

L'analyse des résultats de comptage (densité, D) de *H. armigera* dans le milieu semi-réel a consisté au calcul d'abord de l'efficacité des pesticides (Ep), selon la formule de Henderson-Tilton (1955) :

$$Ep(\%) = \left[1 - \left(\frac{DTa}{DTb} \times \frac{DCb}{DCa} \right) \right] \times 100, \text{ où}$$

DTb et DCb = densité de *H. armigera* avant application du pesticide dans respectivement les parcelles traitées et témoins ; et DTa et DCa = densité de *H. armigera* après application du pesticide dans respectivement les parcelles traitées et témoins.

**CHAPITRE III : EVALUATION DES EFFETS DE *M.*
ANISOPLIAE ET DE *B. BASSIANA* SUR LES LARVES DE *H.*
ARMIGERA AU LABORATOIRE**

Introduction

L'utilisation de pesticides synthétiques pour protéger les cultures et pour tuer les ravageurs entraîne quelques conséquences malheureuses comme la pollution de l'environnement, la résistance aux ravageurs et la toxicité pour les autres organismes non visés. Pour allier la peur de l'effet des résidus chimiques dangereux à la santé humaine et animale, plusieurs études ont été menées afin de déterminer les méthodes de contrôle les plus efficaces sans utiliser des insecticides. Une des dernières méthodes de découverte est l'utilisation des ennemis naturels des insectes tels que bactéries, virus et champignons (Quintela et McCoy, 1997 ; McCoy *et al.*, 200 ; Sabbour et Sahab, 2005).

Des biopesticides à base de *B. bassiana*, une large gamme de champignons entomopathogènes sont commercialisés et utilisés dans la gestion des insectes nuisibles (Reddy *et al.*, 2008). Ces champignons entomopathogènes hyphomycètes ont un grand potentiel comme agents de lutte biologique contre les insectes et constitue une composante importante au sein de systèmes intégrés de gestion des ravageurs. Ils sont développés dans le monde entier pour le contrôle de nombreux ravageurs d'importance agricole (Ferron, 1985 ; Thungrabeab et Tongma, 2007). Il a émergé comme l'un des agents de lutte biologique les plus prometteurs et des recherches approfondies de ces pathogènes qui peuvent permettre la suppression d'une gamme variée d'insectes ravageurs d'importance économique (Coates *et al.*, 2002 ; McGurire *et al.*, 2005 ; Kaur et Padmaja, 2008). Heureusement nombreux sont les lépidoptères qui sont parmi ces hôtes de ces champignons, y compris plusieurs autres espèces de ravageurs des cultures agricoles importance économique (Abdel-Razek *et al.*, 2006 ; Lozano-Gutierrez et España-Luna, 2008).

Dans ce chapitre, nous évaluons les potentialités de certains isolats de champignons entomopathogènes, *B. bassiana* et *M. anisopliae* sur les larves de *H. armigera* dans le but de développer un produit microbiologique à utiliser dans les champs de coton.

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) est un ravageur important sur plusieurs cultures et est largement distribué dans le monde entier (Fitt, 1989 ; Sharma, 2005 ; Lawo *et al.*, 2008). Il a maintenant acquis le statut de fléau national au Bénin en tant que ravageur qui se nourrit de plusieurs cultures d'importance économique. Il est connu pour développer une résistance à presque tous les insecticides utilisés pour son contrôle (Djihinto *et al.*, 2009).

1.1. Sensibilité des larves de *H. armigera* aux agents pathogènes

Dans cette étude, la pathogénie de 6 isolats de *M. anisopliae* et de 2 isolats de *B. bassiana* a été mesurée séparément sur les stades L3, L4, L5 et L6 de *H. armigera*.

1.1.1. Mortalité, sporulation et temps moyens de survie des larves inoculées

1.1.1.1. Mortalité

Le tableau V montre que les champignons entomopathogènes utilisés ont été pathogènes pour tous les stades larvaires testés. Pris séparément, chacun des isolats a provoqué moins de mortalité parmi les larves de 6^e stade que dans les stades plus jeunes. En effet, après inoculation des larves, les taux moyens de mortalité corrigés ont varié de $3,6 \pm 1,8\%$ (Met 28, L6) à $56,3 \pm 0,8\%$ (Met 31, L3). Les isolats de champignon Met 28, Met 32 et Bb 12 ont provoqué les plus faibles taux de mortalité et ce, quelque soit le stade larvaire. L'isolat Met 31 a été de loin celui qui a provoqué le plus fort taux de mortalité. Ces taux de mortalité étaient significativement plus élevés que ceux causés par chacun des autres isolats pour tous les stades larvaires ($F_{7,14} = 16,90$; $P < 0,0001$; $F_{7,14} = 15,22$; $P < 0,0001$; $F_{7,14} = 8,72$; $P = 0,0003$; $F_{7,14} = 11,13$; $P < 0,0001$; pour respectivement les stades larvaires L3, L4, L5 et L6). Les isolats Met 34, Met 341 et Bb 11 ont provoqué des mortalités globalement similaires (Tableau V).

Tableau V : Taux moyens corrigés de mortalité totale des larves L3, L4, L5 et L6 de *H. armigera* 21 jours après application de différents isolats de champignons entomopathogènes.

Traitements	Stades larvaires			
	L3 (n = 20 ; r = 3)	L4 (n = 20 ; r = 3)	L5 (n = 20 ; r = 3)	L6 (n = 20 ; r = 3)
Met 28	$7,3 \pm 1,9$ c	$5,5 \pm 0,1$ d	$3,6 \pm 1,8$ b	$3,6 \pm 1,8$ b
Met 32	$7,3 \pm 1,9$ c	$5,5 \pm 0,1$ d	$5,5 \pm 0,1$ b	$5,4 \pm 3,0$ b
Met 92	$30,7 \pm 5,9$ b	$14,4 \pm 3,3$ cd	$9,1 \pm 1,8$ b	$5,5 \pm 3,2$ b
Met 31	$56,3 \pm 0,8$ a	$45,3 \pm 4,0$ a	$30,7 \pm 5,9$ a	$23,5 \pm 4,4$ a
Met 34	$30,6 \pm 8,4$ b	$25,1 \pm 8,5$ bc	$16,1 \pm 7,9$ b	$9,1 \pm 1,8$ b
Met 341	$36,2 \pm 7,4$ b	$30,7 \pm 7,5$ b	$18,0 \pm 4,4$ b	$9,1 \pm 1,8$ b
Bb 11	$34,4 \pm 4,2$ b	$28,9 \pm 4,3$ b	$9,0 \pm 3,4$ b	$7,2 \pm 1,7$ b
Bb 12	$8,9 \pm 6,3$ c	$7,2 \pm 3,6$ d	$5,4 \pm 3,0$ b	$3,6 \pm 1,8$ b
Témoins	-	-	-	-
$F_{7,14}$	16,90	15,22	8,72	11,13
P	< 0,0001	< 0,0001	0,0003	< 0,0001

Dans une même colonne les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (Analyse de variance suivie du test SNK au seuil de 5%).

Une analyse de variance réalisée pour comparer les taux de mortalité provoqués par tous les agents pathogènes utilisés (sans distinction), a montré une diminution significative de ces taux avec l'âge des larves ($F_{3,64} = 26,99$; $P < 0,0001$) (Tableau VI). Pour tous les isolats de champignons confondus, ces taux corrigés de mortalité ont varié de $8,4 \pm 1,9\%$ (Stade L6) à $26,2 \pm 3,7\%$ (Stade L3). L'interaction agents pathogènes et stades larvaire nous a également montré que le taux de mortalité causé par chacun des isolats de champignons utilisés est fonction du stade larvaire ($F_{21,64} = 1,82$; $P = 0,0356$).

Tableau VI : Effets des agents pathogènes utilisés (toutes espèces et isolats confondus) sur les différents stades larvaires de *H. armigera*, 21 jours après application

Stades larvaires	Mortalité (%)	Sporulation (%)	Chrysalides Formées (%)	Chrysalides Mortes (%)	Adultes émergés (%)
Témoins (n=20; r=24)	-	$0,0 \pm 0,0$ a	$91,2 \pm 0,9$ a	$14,0 \pm 0,8$ a	$78,3 \pm 1,2$ a
L3 (n=20; r=24)	$26,2 \pm 3,7$ a	$27,5 \pm 4,8$ b	$69,1 \pm 3,3$ b	$39,4 \pm 3,4$ b	$42,9 \pm 3,3$ b
L4 (n=20; r=24)	$20,3 \pm 3,2$ b	$20,7 \pm 3,6$ bc	$72,9 \pm 2,8$ c	$36,2 \pm 2,8$ b	$46,9 \pm 2,9$ b
L5 (n=20; r=24)	$12,1 \pm 2,2$ c	$22,5 \pm 3,3$ bc	$80,4 \pm 1,9$ d	$31,1 \pm 2,3$ c	$55,6 \pm 2,3$ c
L6 (n=20; r=24)	$8,4 \pm 1,9$ c	$14,0 \pm 3,0$ c	$84,0 \pm 1,3$ e	$20,1 \pm 2,0$ d	$67,1 \pm 1,9$ d
<i>F</i>	26,99	15,22	32,74	21,09	47,48
<i>P</i>	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

Dans une même colonne les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (Analyse de variance suivie du test SNK au seuil de 5%).

1.1.1.2. Sporulation

La sporulation est la production des conidies sur le corps de l'insecte (Photo 9). Les insectes morts suite à l'application de l'isolat de *Beauveria* Bb 11 et de ceux des isolats de *Metarhizium* Met 34, Met 31 ont mieux sporulé. Les taux moyens de sporulation qui étaient de $42,6 \pm 10,3\%$ pour Met 31 (L3) et de $48,6 \pm 8,4\%$ pour Bb11 (stade L3) ont significativement diminué avec l'âge des stades larvaires traités ($F_{3,72} = 3,14$; $P = 0,0305$) (Tableau VII). Contrairement aux taux de mortalité, l'interaction isolats x âge des stades larvaires n'a pas été déterminante de manière significative pour tous les isolats ($F_{24,72} = 0,38$; $P = 0,9951$). Tous isolats de champignons confondus, ces taux de sporulation étaient de $14,0 \pm 3,0\%$, $22,5 \pm 3,3\%$, $20,7 \pm 3,6\%$ et $27,5 \pm 4,8\%$ pour les stades larvaires L6, L5, L4 et L3, respectivement (Tableau VI). Aucune sporulation n'a été observée sur les insectes morts dans les Témoins (Tableau VII).

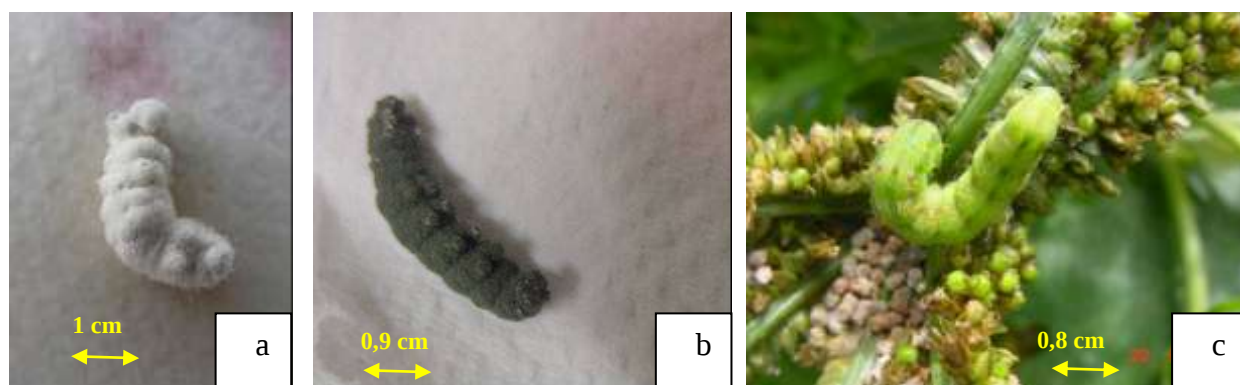


Photo 9 : Larves de 6^e stade de *H. armigera* mortes et recouvertes de conidies de champignons entomopathogènes de *B. bassiana* (a), de *M. anisopliae* (b) et une larve vivante (c)

Tableau VII : Taux moyens de sporulation totale des insectes morts dans les différents lots des stades larvaires L3, L4, L5 et L6 de *H. armigera* après incubation.

Traitements	Stades larvaires			
	L3 (n = 20 ; r = 3)	L4 (n = 20 ; r = 3)	L5 (n = 20 ; r = 3)	L6 (n = 20 ; r = 3)
Témoins	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 b	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a
Met 28	25,0 ± 14,4 ab	27,8 ± 14,7 ab	27,8 ± 14,7 a	16,7 ± 16,7 a
Met 32	11,1 ± 11,1 ab	11,1 ± 11,1 ab	11,1 ± 11,1 a	11,1 ± 11,1 a
Met 92	13,9 ± 7,3 ab	15,0 ± 7,6 ab	11,1 ± 11,1 a	11,1 ± 11,1 a
Met 31	42,6 ± 10,3 a	41,8 ± 2,7 a	35,0 ± 5,0 a	24,6 ± 4,5 a
Met 34	45,8 ± 19,7 a	32,5 ± 6,3 ab	24,2 ± 8,2 a	17,5 ± 2,5 a
Met 341	34,7 ± 9,7 ab	22,4 ± 1,4 ab	14,5 ± 2,8 a	10,8 ± 5,8 a
Bb 11	48,6 ± 8,4 a	37,9 ± 2,8 ab	33,7 ± 5,2 a	20,0 ± 6,7 a
Bb 12	0,0 ± 0,0 b	8,3 ± 8,3 ab	11,1 ± 11,1 a	0,0 ± 0,0 a
$F_{8,16}$	4,68	3,14	1,65	1,26
P	0,0042	0,0244	0,1863	0,3280

Dans une même colonne les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (Analyse de variance suivie du test SNK au seuil de 5%).

1.1.1.3. Survie des larves

Comparativement à tous les autres isolats des champignons entomopathogènes utilisés, la survie des larves du troisième stade a été significativement plus affectée par les isolats Met 31 et Bb 11 ($F_{8,16} = 16,79$; $P = <0,0001$). Les larves traitées avec les isolats Met 28, Met 32, Met 92 et Bb 12

ont eu des temps de survie similaires. Aussi, à partir du quatrième stade larvaire, aucune différence significative n'a été observée entre les isolats Met 31, Met 34, Met 341 et Bb 11. Les valeurs des temps moyens de survie (TMS) sont résumées dans le Tableau VIII. Quel que soit le stade larvaire, une diminution des TMS s'observe des témoins vers les traités ; les TMS les moins élevés étant enregistrés au niveau des larves traitées avec les isolats Met 31 et Bb 11 mettant respectivement $15,9 \pm 0,7$ jours et $16,6 \pm 0,9$ jours en moyenne pour tuer. Soit, respectivement 6 j et 5j de moins que la mortalité naturelle, c'est-à-dire celle des témoins. Les TMS ont augmenté du 3^e au 6^e stade larvaire avec $17,2 \pm 0,6$ jours, $18,1 \pm 0,5$ jours, $19,2 \pm 0,3$ jours et $19,7 \pm 0,2$ jours pour L3, L4, L5 et L6, respectivement (Tableau IX).

Tableau VIII : Temps Moyen de Survie (TMS) (Jours $\pm$ SE) et 95% IC des larves L3, L4, L5 et L6 de *H. armigera* inoculés avec les isolats de champignon

Isolats de Champignons	Temps Moyen de Survie (Jours $\pm$ SE) (95%IC)			
	L 3 (n = 20 ; r = 3)	L 4 (n = 20 ; r = 3)	L5 (n = 20 ; r = 3)	L6 (n = 20 ; r = 3)
Témoins	21,5 $\pm$ 0,3 a (20,9 - 22,2)	21,4 $\pm$ 0,4 a (20,6 - 22,1)	21,3 $\pm$ 0,4 a (20,3 - 22,0)	21,4 $\pm$ 0,2 a (21,0 - 21,9)
Met 28	19,9 $\pm$ 0,7 a (18,5 - 21,2)	20,0 $\pm$ 0,7 a (18,8 - 21,3)	20,3 $\pm$ 0,6 a (19,1 - 21,5)	20,3 $\pm$ 0,6 ab (19,1 - 21,5)
Met 32	19,9 $\pm$ 0,7 a (18,6 - 21,3)	20,1 $\pm$ 0,7 a (18,8 - 21,4)	20,2 $\pm$ 0,6 a (18,9 - 21,4)	20,2 $\pm$ 0,6 ab (18,9 - 21,4)
Met 92	18,5 $\pm$ 0,9 ab (16,7 - 20,3)	19,1 $\pm$ 0,8 a (17,6 - 20,6)	19,8 $\pm$ 0,7 a (18,5 - 21,1)	20,0 $\pm$ 0,6 ab (18,7 - 21,4)
Met 31	12,8 $\pm$ 1,0 d (10,8 - 14,8)	15,6 $\pm$ 1,0 b (13,7 - 17,5)	17,0 $\pm$ 0,9 c (15,1 - 18,8)	18,6 $\pm$ 0,8 b (17,1 - 20,1)
Met 34	16,6 $\pm$ 1,0 bc (14,7 - 18,5)	17,9 $\pm$ 0,8 ab (16,2 - 19,5)	18,6 $\pm$ 0,8 ab (17,0 - 20,2)	19,7 $\pm$ 0,7 abc (18,4 - 21,1)
Met 341	15,8 $\pm$ 1,0 c (13,9 - 17,8)	17,5 $\pm$ 0,9 ab (15,7 - 19,2)	19,0 $\pm$ 0,7 ab (17,6 - 20,5)	19,7 $\pm$ 0,7 ab (18,4 - 21,0)
Bb 11	14,7 $\pm$ 1,1 cd (12,4 - 16,9)	15,0 $\pm$ 1,1 b (13,5 - 17,8)	18,6 $\pm$ 0,9 ab (17,3 - 20,7)	18,9 $\pm$ 0,8 ab (17,6 - 20,9)
Bb 12	19,8 $\pm$ 0,7 a (18,5 - 21,1)	19,6 $\pm$ 0,8 a (18,2 - 21,1)	19,9 $\pm$ 0,7 a (18,7 - 21,3)	20,2 $\pm$ 0,6 ab (18,9 - 21,5)
$F_{8,16}$	16,79	6,37	4,46	2,38
P	<0,0001	0,0009	0,0053	0,0493

Dans une même colonne les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (Analyse de variance suivie du test SNK au seuil de 5%); IC = Intervalle de Confiance

Tableau IX : Temps Moyen de Survie (TMS) (Jours $\pm$ SE) et 95% IC par stade larvaire de *H. armigera*, tous isolats de champignon confondus

Isolats de Champignons	TMS (Jours $\pm$ SE) (95% IC)
Témoins	21,4 $\pm$ 0,0 a (20,8 - 22,0)
L3	17,2 $\pm$ 0,6 c (15,5 - 19,0)
L4	18,1 $\pm$ 0,5 bc (16,6 - 19,8)
L5	19,2 $\pm$ 0,3 b (17,8 - 20,7)
L6	19,7 $\pm$ 0,2 b (18,4 - 21,1)
$F_{4,103}$	11,97
P	<0,0001

Dans une même colonne les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (Analyse de variance suivie du test SNK au seuil de 5%); IC = Intervalle de Confiance

1.1.2. Effet des champignons entomopathogènes sur le développement de l'hôte

L'évolution des survivants des larves traitées a été suivie. Ainsi, leur taux de chrysalides formées, le taux de mortalité de ces chrysalides, le taux d'émergence des adultes ont été évalués. Après émergence, les adultes ont été mis en accouplement afin d'étudier le comportement de leur progéniture.

1.1.2.1. Formation des chrysalides

Le faible taux moyen de chrysalides formées a été enregistré au niveau des larves de 3^e stade traitées avec l'isolat Met 31 ($40,7 \pm 0,7\%$) et le plus élevé au niveau des témoins du 6^e stade ($95,0 \pm 1,4\%$) (Tableau X). Pour le 3^e stade larvaire, la différence entre les taux moyens de chrysalides formées a été significative entre l'isolat Met 31 et les autres ($F_{8,16} = 18,89$; $P < 0,0001$).. Les isolats autres que Met 31 ont montré une certaine similarité d'un stade larvaire à l'autre dans la formation des chrysalides (Tableau X). Contrairement aux taux de mortalité, les taux de chrysalides formées ont augmenté avec l'âge des insectes, quel que soit l'isolat de champignons entomopathogènes que nous avons utilisé ($F_{3,74} = 32,74$; $P < 0,0001$) (Tableau VI)

Tableau X : Taux moyens de chrysalides formées pour chacun des stades larvaires de *H. armigera* 21 jours après application de différents isolats de champignons entomopathogènes.

Traitements	Stades larvaires			
	L3 (n = 20 ; r = 3)	L4 (n = 20 ; r = 3)	L5 (n = 20 ; r = 3)	L6 (n = 20 ; r = 3)
Témoins	91,5 ± 0,8 a	89,2 ± 0,8 a	89,2 ± 1,7 a	95,0 ± 1,4 a
Met 28	85,0 ± 2,9 ab	86,7 ± 1,7 a	88,3 ± 1,7 a	88,3 ± 1,7 ab
Met 32	85,0 ± 2,9 ab	86,7 ± 1,7 a	86,7 ± 1,7 ab	86,7 ± 1,7 b
Met 92	74,5 ± 5,2 bc	78,3 ± 1,7 ab	83,3 ± 1,7 ab	86,7 ± 3,3 b
Met 31	40,7 ± 0,7 e	50,0 ± 2,9 d	63,3 ± 4,4 c	70,0 ± 2,9 c
Met 34	64,2 ± 5,8 dc	68,3 ± 6,7 bc	76,7 ± 6,0 ab	83,3 ± 1,7 b
Met 341	58,3 ± 6,0 d	63,3 ± 6,0 c	75,0 ± 2,9 b	83,3 ± 1,7 b
Bb 11	60,0 ± 2,9 d	65,0 ± 2,9 c	83,3 ± 1,7 ab	85,0 ± 0,0 b
Bb 12	83,3 ± 4,4 ab	85,0 ± 2,9 a	86,7 ± 1,7 ab	88,3 ± 1,7 ab
$F_{8,16}$	18,89	16,00	8,91	12,61
P	< 0,0001	< 0,0001	0,0001	0,0001

Dans une même colonne les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (Analyse de variance suivie du test SNK au seuil de 5%).

1.1.2.2. Mortalité et sporulation des chrysalides

Le plus fort taux de mortalité des chrysalides a été provoqué par l'isolat de *M. anisopliae*, Met 31 avec 70,8 ± 4,2% (stade L3) (Tableau XI). Certaines chrysalides mortes résultant de larves inoculées par Met 28, Met 32 et Met 92 ont sporulé avec des taux respectivement égaux à 5,6 ± 5,6%, 9,5 ± 9,5% et 13,1 ± 7,2%. Les taux de mortalité des chrysalides étaient, tous isolats confondus, de 20,1 ± 2,0%, 31,1 ± 2,3%, 36,2 ± 2,8%, 39,4 ± 3,4% pour les stades larvaires L6, L5, L4, L3, respectivement (Tableau VI).

Tableau XI : Taux moyens de chrysalides mortes pour chacun des stades larvaires de *H. armigera* 21 jours après application de différents isolats de champignons entomopathogènes.

Traitements	Stades larvaires			
	L3 (n = 20 ; r = 3)	L4 (n = 20 ; r = 3)	L5 (n = 20 ; r = 3)	L6 (n = 20 ; r = 3)
Témoins	15,3 ± 0,9 c	15,6 ± 1,9 c	12,8 ± 0,7 b	12,3 ± 2,0 cd
Met 28	40,9 ± 4,6 bc	40,2 ± 4,9 abc	35,7 ± 4,5 ab	33,9 ± 2,7 a
Met 32	37,1±3,0 bc	34,6 ± 3,5 bc	28,9 ± 0,5 ab	28,9 ± 0,5 ab
Met 92	33,0±9,3 bc	31,7 ± 6,9 bc	30,0 ± 6,8 ab	21,1 ± 3,4 bcd
Met 31	70,8 ± 4,2 a	57,1 ± 5,0 a	45,5 ± 5,4 a	24,1 ± 3,4 abc
Met 34	20,0 ± 8,0 bc	18,6 ± 7,5 c	16,9 ± 7,3 b	8,0 ± 5,2 d
Met 341	35,0 ± 3,4 bc	32,1 ± 2,9 bc	26,7 ± 1,0 ab	14,0 ± 1,9 cd
Bb 11	50,2 ± 2,4 ab	46,3 ± 2,1 ab	36,0 ± 0,7 ab	11,8 ± 0,0 cd
Bb 12	30,6 ± 10,2 bc	29,0 ± 8,6 bc	28,8 ± 8,8 ab	18,8 ± 4,8 bcd
$F_{8,16}$	6,03	5,59	3,45	7,59
P	0,0012	0,0017	0,0168	0,0003

Dans une même colonne les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (Analyse de variance suivie du test SNK au seuil de 5%).

1.1.2.3. Emergence des adultes

Tout comme la formation des chrysalides, l'émergence des adultes a été faible dans les lots des chrysalides issues de l'inoculation avec les isolats Met 31 et Bb 11. Ces pourcentages d'adultes émergés étaient de 13,7 ± 3,7% (stade L3), 21,7 ± 3,3% (stade L4), 35,0 ± 5,8% (stade L5) et 53,3 ± 4,4% (stade L6) pour l'isolat Met 31. Pour l'isolat de Bb 11, ces taux d'émergence étaient de 30,0 ± 2,9% (L3), 35,0 ± 2,9% (L4), 53,3 ± 1,7% (L5) et 75,0 ± 0,0% (L6). Pour tout stade larvaire traité, les témoins ont eu le taux d'émergence le plus élevé, mais ces taux d'émergence dans les témoins n'ont été significativement différents de ceux dans les traités que pour les stades plus jeunes (L3 & L4) ($F_{8,16} = 15,31$; $P < 0,001$; $F_{8,16} = 14,39$; $P < 0,001$, respectivement) (Tableau XII). Les taux d'émergence des adultes au niveau des larves de 3^e stades traitées avec les isolats Met 28, Met 32, Met 92, Met 34, Met 341 et Bb 12 étaient globalement similaires avec respectivement 50,0±2,9%, 53,3±1,7%, 49,0±3,9%, 50,8±4,7%, 38,3±6,0% et 58,3±10,1% (Tableau XII).

Tableau XII: Taux moyens d'adultes émergés pour chacun des stades larvaires de *H. armigera* 21 jours après application de différents isolats de champignons entomopathogènes.

Traitements	Stades larvaires			
	L3 (n = 20 ; r = 3)	L4 (n = 20 ; r = 3)	L5 (n = 20 ; r = 3)	L6 (n = 20 ; r = 3)
Témoins	77,3 ± 0,2 a	75,0 ± 1,4 a	77,5 ± 1,4 a	83,3 ± 3,0 a
Met 28	50,0 ± 2,9 b	51,7 ± 3,3 b	56,7 ± 3,3 ab	58,3 ± 1,7 de
Met 32	53,3 ± 1,7 b	56,7 ± 3,3 b	61,7 ± 1,7 ab	61,7 ± 1,7 cde
Met 92	49,0 ± 3,9 b	53,3 ± 4,4 b	58,3 ± 6,0 ab	68,3 ± 3,3 bcd
Met 31	13,7 ± 3,7 d	21,7 ± 3,3 d	35,0 ± 5,8 c	53,3 ± 4,4 e
Met 34	50,8 ± 4,7 b	55,0 ± 5,0 b	63,3 ± 6,0 ab	76,7 ± 4,4 ab
Met 341	38,3 ± 6,0 bc	41,7 ± 7,3 bc	55,0 ± 2,9 b	71,7 ± 3,3 abcd
Bb 11	30,0 ± 2,9 c	35,0 ± 2,9 c	53,3 ± 1,7 b	75,0 ± 0,0 abc
Bb 12	58,3 ± 10,1 b	60,0 ± 5,8 b	61,7 ± 7,3 ab	71,7 ± 4,4 abcd
$F_{8,16}$	15,31	14,39	5,93	8,41
P	< 0,001	0,0001	0,0013	0,0002

Dans une même colonne les moyennes suivies par la même lettre ne sont pas significativement différentes (Analyse de variance suivie du test SNK au seuil de 5%).

1.2. Réponse des larves de *H. armigera* aux différentes doses de deux isolats performants (Met 31 et Bb 11) et détermination de leurs DL50¹

1.2.1. Réponse des larves de *H. armigera* aux différentes doses de deux isolats performants (Met 31 et Bb 11)

1.2.1.1. Effets des traitements sur le 3^e stade larvaire de *H. armigera*

- **Mortalité des larves et sporulation des insectes morts après application de Met 31 aux L3**

L'allure des courbes des taux moyens de mortalité enregistrée pour toutes les doses de Met 31 utilisées a été la même (Figure 4). Les taux moyens de mortalité sont dose dépendante. La dose 10⁷ conidies par insecte a causé un taux moyen de mortalité significativement plus élevé que ceux causés par les doses 10⁴ et 10⁵ conidies par insecte. Entre les doses 10⁷ conidies/insecte et 10⁶ conidies/insecte, la différence a été significative du 4^e au 10^e jour après inoculation pour s'estomper à partir du 11^e jour après inoculation (Figure 4). Les taux de mortalité corrigés obtenus au bout de 16 jours étaient de 26,8 ± 6,8%, 27,4 ± 1,2%, 67,9 ± 5,5%, 77,4 ± 4,3% respectivement pour les doses de 10⁴, 10⁵, 10⁶ et 10⁷ conidies par insecte. La dose de 10⁶ conidies par insecte ne s'est démarquée des plus faibles doses qu'à partir du 9^e jour après inoculation. Les doses 10⁴ conidies/insecte et 10⁵ conidies/insecte ont eu des taux de mortalité similaires.

La tendance observée au niveau des taux moyens de mortalité a été la même pour les taux moyens de sporulation des insectes morts après inoculations des larves avec différentes doses (Figure 5). Les taux de sporulation enregistrés, au 16^e jours après inoculation, ont été de 6,7 ± 6,7%, 55,0 ± 10,4%, 77,4 ± 10,1%, 71,3 ± 11,4% pour respectivement 10⁴, 10⁵, 10⁶ et 10⁷ conidies par insecte. Nous notons une augmentation rapide du taux de sporulation au niveau des insectes morts issus des plus fortes doses, 10⁷ et 10⁶ conidies/insecte et une certaine stabilisation à partir du 9^e jour et 13^e jour respectivement. Ceci est dû au fait qu'il n'y a plus eu de mortalité à partir de ces jours dans les deux traitements. Pour toutes les doses utilisées, les premiers insectes morts n'ont pas sporulé avec un nombre plus important pour les doses les plus faibles (10⁵ et 10⁴ conidies/insecte). Malgré ces taux de sporulation relativement plus élevés observés au niveau de ces fortes doses, aucune différence significative n'a été enregistrée entre elles et 10⁵

¹ Ce chapitre a été soumis à *BIOTECHNOLOGIE AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT* comme O.K. Douro Kpindou, D. Djegui, I. A. Glitho, K. Amenvoin et Manuele Tamo (2011). Réponse des stades larvaires de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) à différentes doses d'application des champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*

conidies/insecte (Figure 5).

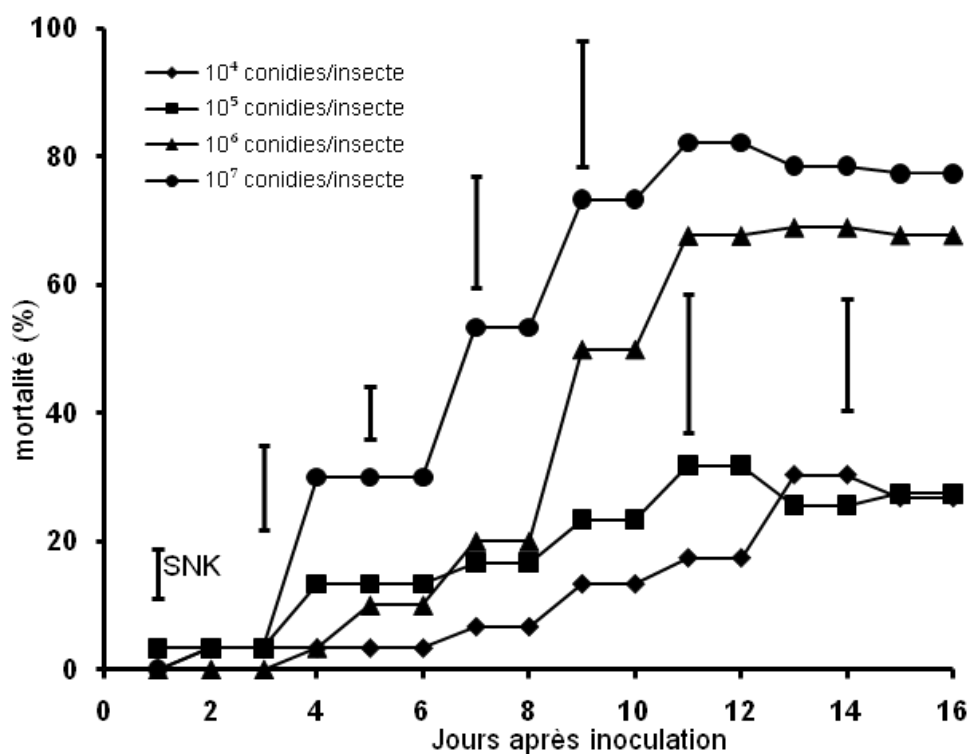


Figure 4 : Evolution temporelle des taux moyens de mortalité corrigés après inoculation des larves du 3^e stade de *H. armigera* au Met 31.
(Les taux de mortalité des témoins ont été utilisés pour corriger les taux de mortalité des traités)

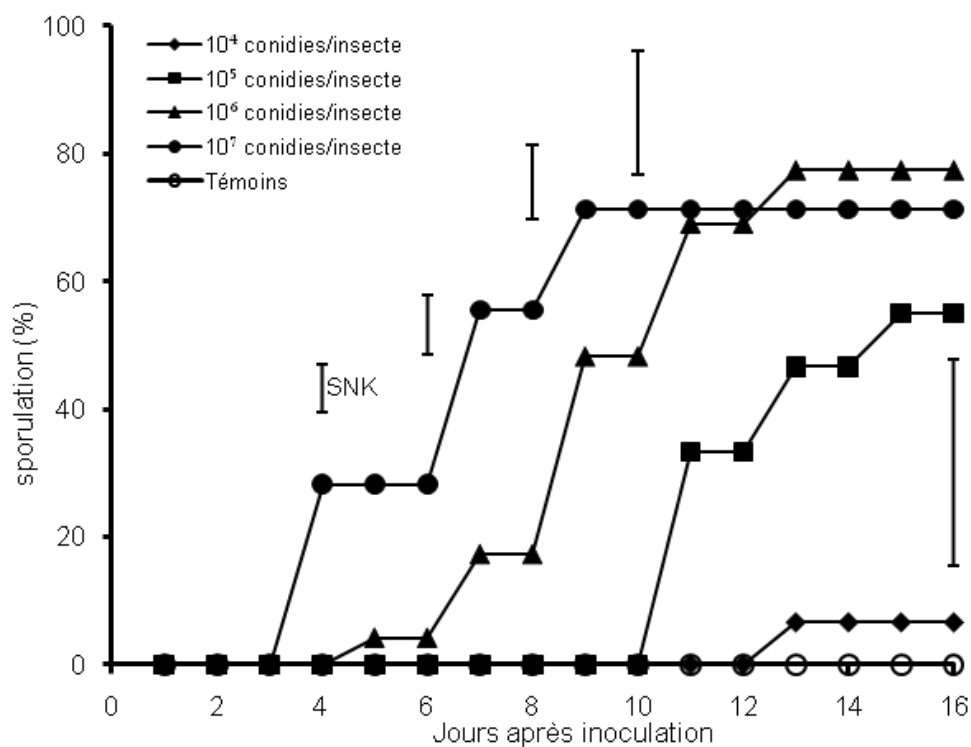


Figure 5 : Evolution temporelle des taux moyens de sporulation des insectes morts après inoculation des larves de 3^e stade de *H. armigera* au Met 31.

- **Effet des traitements sur la formation des chrysalides, l'émergence des adultes et leur oviposition après application de Met 31 aux L3**

Les taux moyens de chrysalides formées ont varié de $13,3 \pm 6,7\%$ (10^7 conidies/insecte) à $70,0 \pm 5,8\%$ (Témoins). Les plus faibles taux de formation de chrysalides ont été enregistrés au niveau des doses les plus élevées (10^7 et 10^6 conidies par insecte) avec les plus faibles taux d'émergence d'adultes (Figure 6). En dehors des témoins, les adultes issus des larves traitées à l'isolat Met 31 étaient presque tous des mâles malformés (ailes endommagées) (Photo 10). Le nombre de femelles à l'émergence était trop faible. Cela ne permet pas de bien apprécier l'effet des traitements sur la ponte (Tableau XIII).

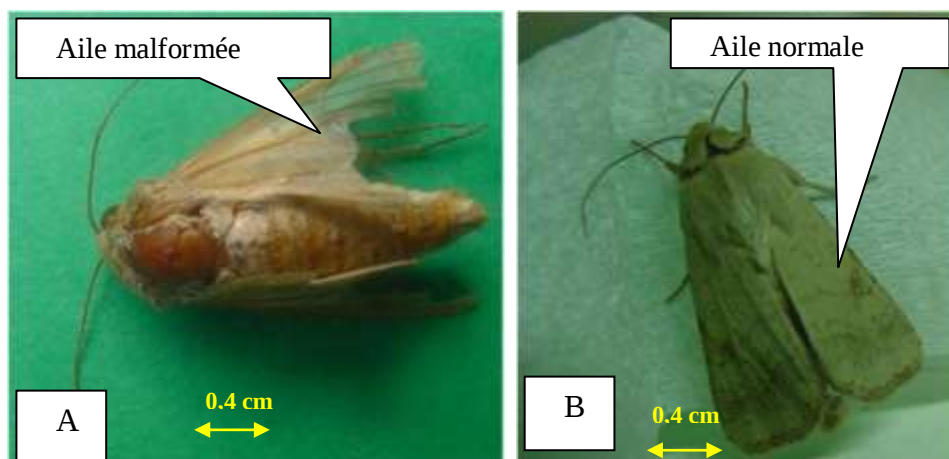


Photo 10 : Adultes de *H. armigera* émergés après application de Met 31

A- Traité à ailes endommagées et B- Témoin à ailes normales

Tableau XIII : Nombre d'adultes émergés et d'œufs pondus après inoculation de 30 larves de 3^e stade de *H. armigera* à différentes doses de Met 31.

Traitements (Conidies/insecte)	Nombre d'adultes	Nombre de ♂	Nombre de ♀	♂ malformés	♀ malformées	Nombre d'œufs pondus
Témoins	17	10	7	0	0	413
10^4	6	5	1	5	1	0
10^5	4	3	1	0	0	0
10^6	1	1	0	1	0	0
10^7	1	1	0	1	0	0

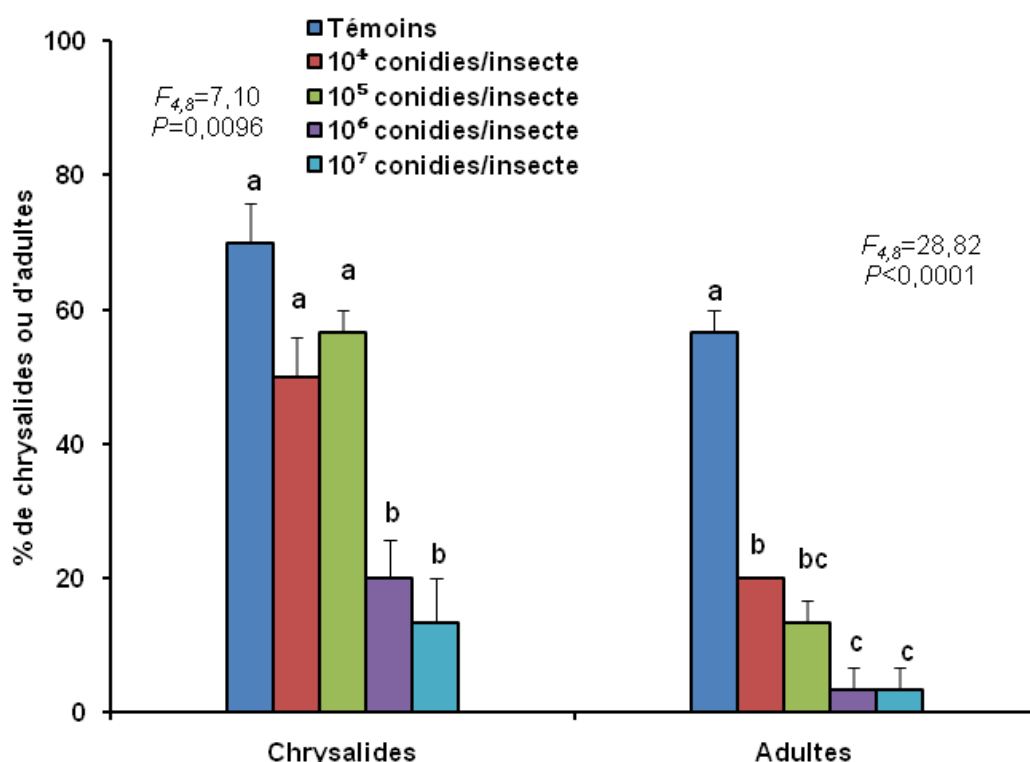


Figure 6 : Taux moyens de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes deux semaines après inoculation des larves L3 de *H. armigera* au Met 31.

Les histogrammes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (Analyse de variance suivie de SNK).

1.2.1.2. Effet des traitements sur le 4^e stade larvaire de *H. armigera*

- **Mortalité des larves et sporulation des insectes morts après application de Met 31 aux L4**

Les taux moyens de mortalité corrigés provoqués par 10⁴, 10⁵ et 10⁶ conidies/insecte étaient faibles. Dix huit jours après inoculation des larves, ces taux étaient de 25%, 10% et 0,5% pour 10⁶, 10⁵ et 10⁴ conidies/insecte respectivement. Comparativement aux taux de mortalité causés par la plus forte dose (10⁷ conidies/insecte), ceux causés par les plus faibles doses étaient significativement plus faibles au seuil de 5% (Figure 7).

A la dose de 10⁷ conidies/insecte, les taux de mortalité corrigés enregistrés pour les larves du 4^e stade de *H. armigera* étaient similaires à ceux obtenus pour les larves du 3^e stade (Figure 8). Les doses 10⁶, 10⁵ et 10⁴ conidies/insecte ont tué plus les larves L3 que les larves L4.

Le plus fort taux de sporulation observé était de 54% pour les insectes morts dans le lot des larves traitées avec 10⁷ conidies/insectes. Seuls les insectes morts issus des doses les plus élevées (10⁷ et 10⁶ conidies/insecte) ont sporulé (Figure 9). Aucun insecte dans les témoins n'a sporulé.

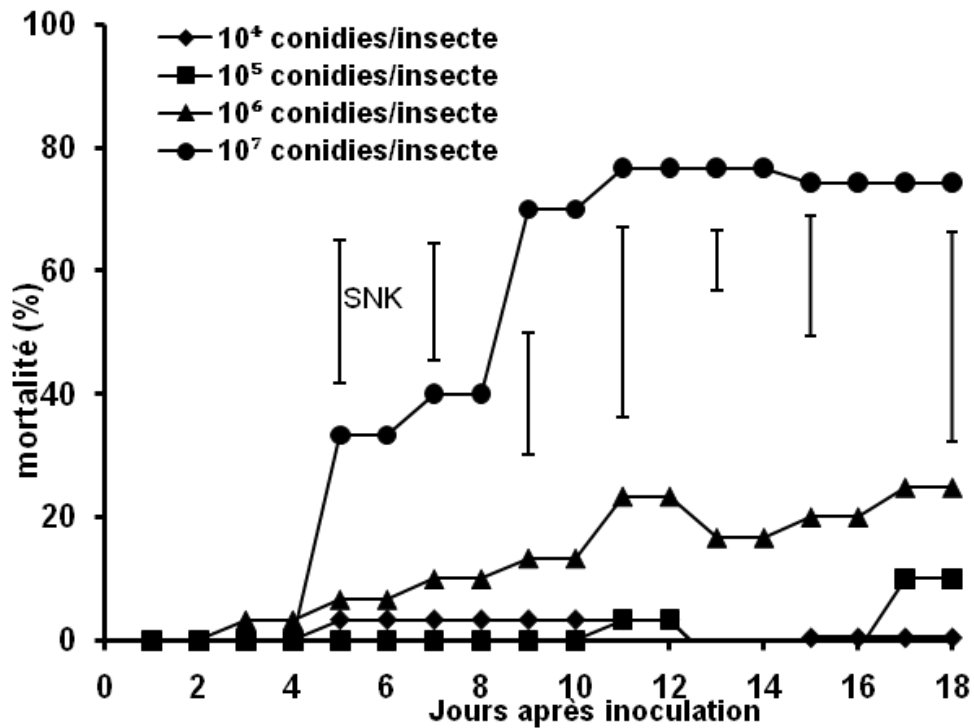


Figure 7 : Evolution temporelle des taux moyens de mortalité corrigés des larves L4 de *H. armigera* après inoculation au Met 31.

(Les taux de mortalité des témoins ont été utilisés pour corriger les taux de mortalité des traités)

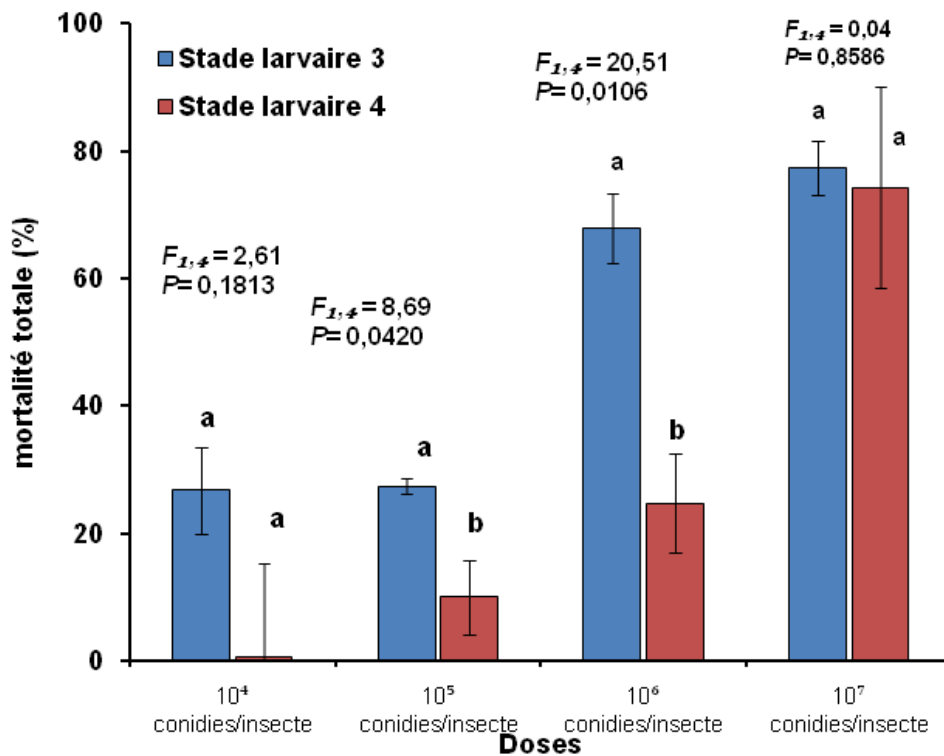


Figure 8 : Taux moyens totaux corrigés de mortalité des larves L3 et L4 de *H. armigera* après inoculation au Met 31

(Les taux de mortalité des témoins ont été utilisés pour corriger les taux de mortalité des traités)

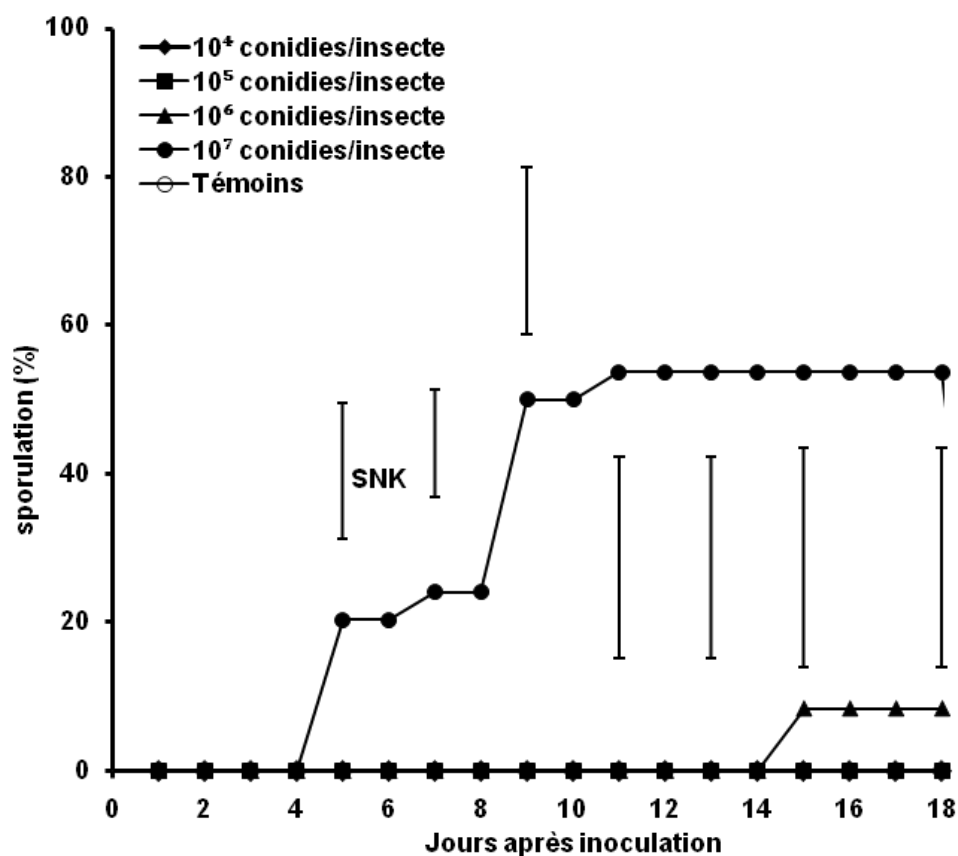


Figure 9 : Evolution temporelle des taux moyens de sporulation des insectes morts après inoculation des stades L4 de *H. armigera* au Met 31.

- **Mortalité des larves et sporulation des insectes morts après application de Bb 11 aux L4**

Les taux de mortalité corrigés enregistrés, 14 jours après inoculation, au niveau du 4^e stade larvaire de *H. armigera* étaient de $13,7 \pm 8,8\%$; $17,7 \pm 3,4\%$; $57,4 \pm 4,9\%$ et de $89,3 \pm 0,4\%$ pour les doses 10^4 conidies/insecte, 10^5 conidies/insectes, 10^6 conidies/insecte et 10^7 conidies/insecte, respectivement. A partir du 7^e jour après inoculation (JAI), nous notons une différence significative entre 10^7 conidies/insecte et toutes les autres doses. De même, une différence significative au seuil de 5% a été observée, à partir du 9^e JAI, entre 10^6 et les plus faibles dose (Figure 10).

Tout comme pour l'isolat de *Metarhizium* Met 31, seules les larves mortes issues des doses les plus élevées (10^7 et 10^6 conidies/insecte) avaient sporulé, avec un taux de sporulation de 77,8% pour 10^7 conidies/insecte et 4,8% pour 10^6 conidies/insecte (Figure 11).

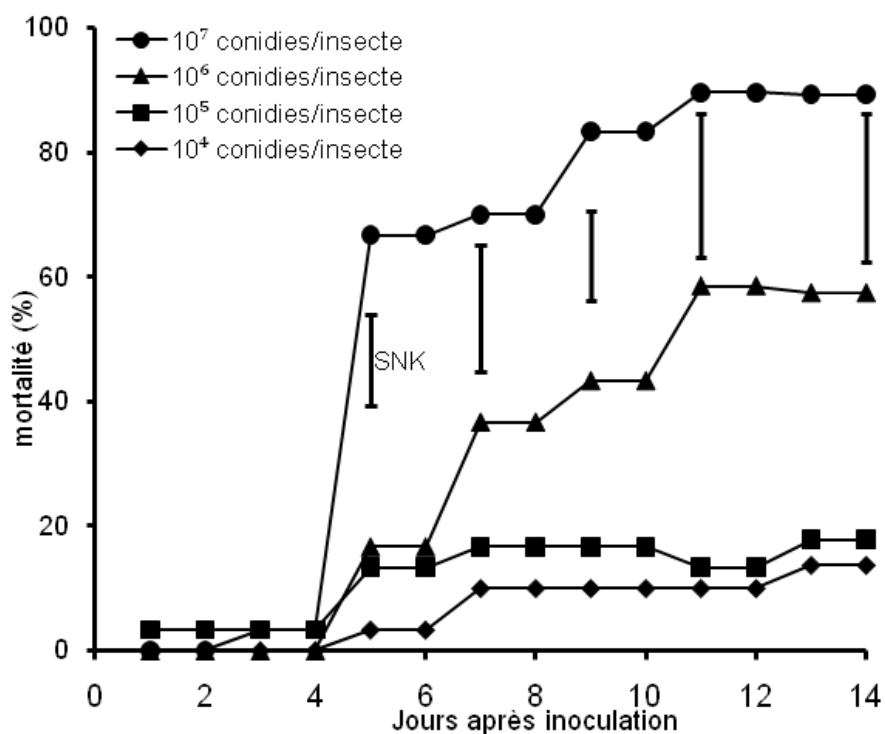


Figure 10 : Evolution temporelle des taux moyens de mortalité corrigés des larves L4 de *H. armigera* après inoculation au Bb 11

(Les taux de mortalité des témoins ont été utilisés pour corriger les taux de mortalité des traités)

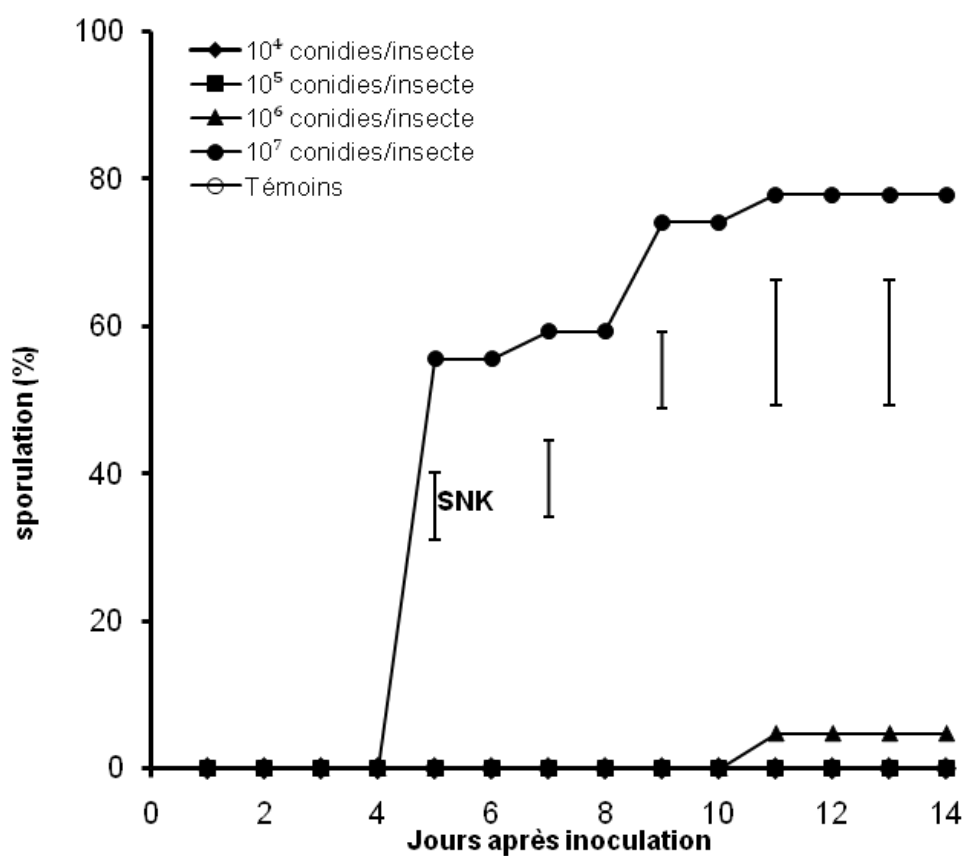


Figure 11 : Evolution temporelle des taux moyens de sporulation des larves mortes après inoculation des stades L4 de *H. armigera* au Bb 11

- **Effet des traitements sur la formation des chrysalides, l'émergence des adultes et leur oviposition après application de Met 31 aux L4**

Les taux de chrysalides formées étaient de $90,0 \pm 10\%$, $80,0 \pm 5,8\%$, $76,7 \pm 8,8\%$, $63,3 \pm 8,8\%$ et $20,0 \pm 10\%$ respectivement pour le témoin, les doses 10^4 , 10^5 , 10^6 et 10^7 conidies/insecte. Seule la plus forte dose, 10^7 conidies/insecte, a eu un taux de chrysalidation significativement inférieur aux autres ($F_{4,8} = 8,79$; $P = 0,0050$) (Figure 12). D'une manière générale, le taux d'émergence des adultes mâles a été plus élevé que celui des adultes femelles. Malgré le taux d'émergence élevé des adultes mâles au niveau des témoins, ces taux étaient similaires pour tous les traitements. Ceci serait dû à la grande variabilité de l'émergence qu'il y a eu au niveau des répétitions. Comparativement aux traités, un taux significativement plus élevé de femelles a émergé au niveau des témoins. La dose de 10^7 conidies par insecte n'a enregistré aucune émergence femelle (Figure 12).

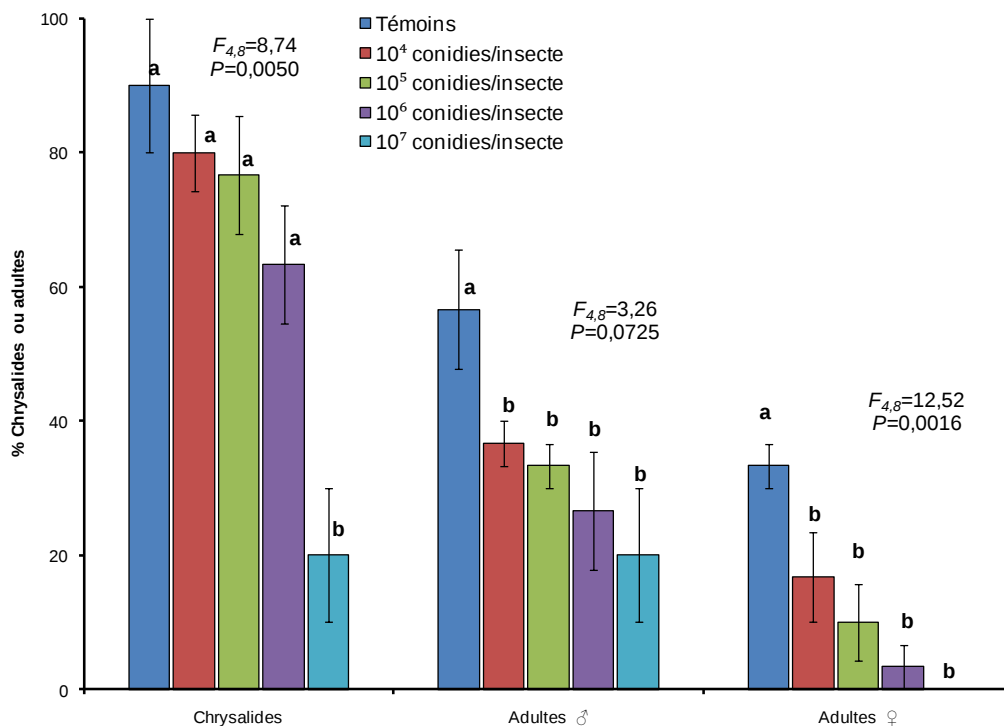


Figure 12 : Taux moyens de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes (♂, ♀) deux semaines après inoculation des larves L4 de *H. armigera* au Met 31.

Les histogrammes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (Analyse de Variance suivie de SNK).

Le nombre de mâles, de femelles et le nombre d'œufs pondus sont présentés dans le Tableau XIV. Ici, nous constatons un taux d'émergence plus élevé comparativement à celui des larves L3 traitées. Tous les adultes émergés au niveau des témoins étaient tous sains et les femelles avaient pondu en moyenne jusqu'à $196,7 \pm 42,1$ œufs (Tableau XIV).

Tableau XIV : Nombre d'adultes émergés et d'œufs pondus après inoculation des larves de 4^e Stade de *H. armigera* à différentes doses de l'isolat Met 31

Traitements (Conidies/insecte)	Nombre d'adultes	Nombre de ♂	Nombre de ♀	♂ malformés	♀ malformées	Nombre moyen d'œufs pondus
Témoins	27	17	10	0	0	$196,7 \pm 42,1$ a
10^4	16	11	5	9	4	$95,0 \pm 10,4$ b
10^5	13	10	3	7	2	$86,7 \pm 13,0$ b
10^6	9	8	1	1	1	$20,7 \pm 4,3$ c
10^7	6	6	0	6	0	$0,0 \pm 0,0$ d
$F_{4,10}$						37,53
P						<0,0001

- ***Effet des traitements sur la formation des chrysalides, l'émergence des adultes et leur oviposition après application de Bb 11 aux L4***

Tout comme pour le *Metarhizium*, les taux de chrysalides formées ont été élevés pour le 4^e stade. Ils ont varié entre $13,3 \pm 3,3\%$ (10^7 conidies/insecte) et $90 \pm 0,0\%$ (Témoins). La formation des chrysalides et l'émergence des adultes ont été doses dépendantes. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée entre les témoins et les plus faibles doses (10^4 et 10^5 conidies par insecte) (Figure 13). Au niveau des témoins 53,3% de mâles contre 36,6% de femelles ont émergé ; ce qui signifie que toutes les chrysalides formées au niveau des témoins sont devenues adultes (Figure 13). Les mâles étaient en nombre plus importants que les femelles (Figure 13, Tableau XV). Aucune différence significative n'a été observée au niveau de l'émergence d'adultes mâles due, probablement, à une grande variabilité de l'émergence dans les répétitions (voir SE). Quant au niveau de l'émergence des femelles, cette différence a été observée entre les témoins et les insectes traités. Tout comme pour l'isolat de *Metarhizium* Met 31, aucune femelle n'a émergé pour la dose de 10^7 conidies /insecte de l'isolat de *Beauveria* Bb 11.

Tableau XV : Nombre d'adultes émergés et d'œufs pondus après inoculation des larves de 4^e stade de *H. armigera* à différentes doses de l'isolat Bb 11

Traitements (Conidies/insecte)	Nombre d'adultes	Nombre de ♂	Nombre de ♀	♂ malformés	♀ malformées	Nombre moyen d'œufs pondus
Témoins	27	16	11	0	0	187,7 ± 34,2 a
10 ⁴	17	13	4	11	1	103,3 ± 21,7 ab
10 ⁵	13	9	4	7	2	60,0 ± 25,7 b
10 ⁶	8	7	1	5	1	43,3 ± 13,6 b
10 ⁷	4	4	0	4	0	0,0 ± 0,0 c
$F_{4,10}$						14,20
P						0,0004

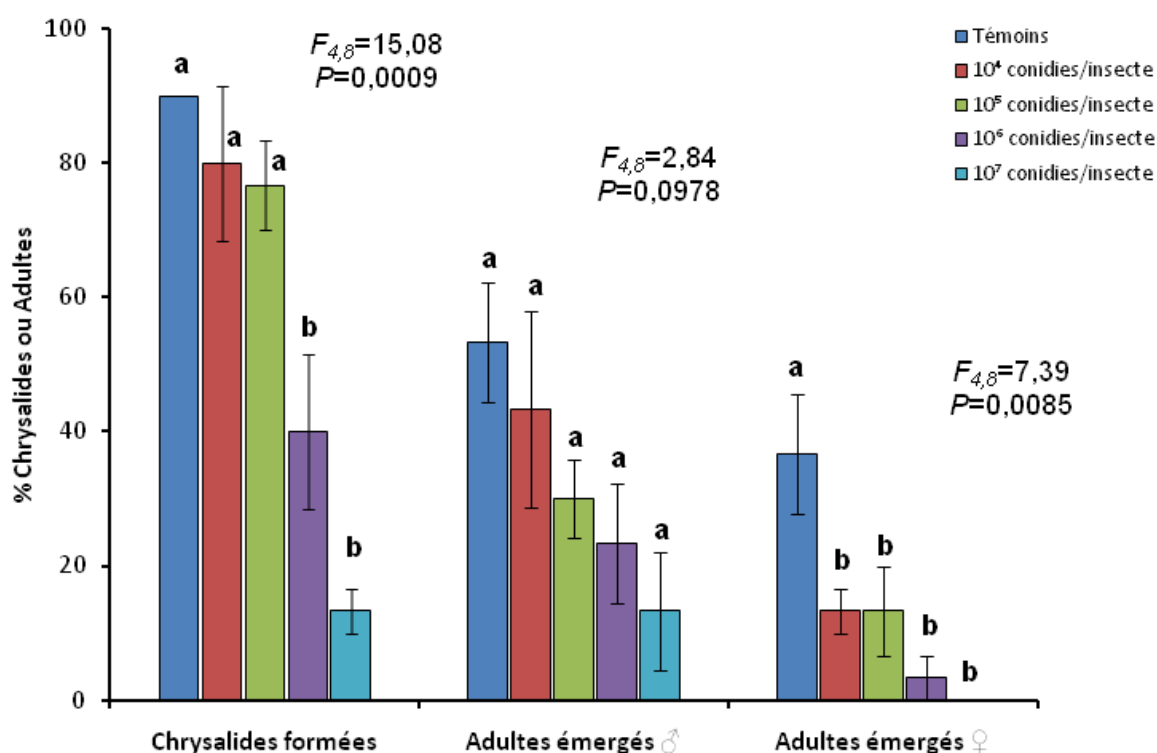


Figure 13 : Taux moyens de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes (♂, ♀) deux semaines après inoculation des larves L4 de *H. armigera* au Bb 11.

Les histogrammes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (Analyse de Variance suivie de SNK).

1.2.2. Détermination de la DL50

Une analyse suivie d'une modélisation des données qui sont fonction du temps de la dose et de la mortalité pour les deux isolats, Met 31 et BB 11 ont été réalisées utilisant le modèle de régression de Cox (SPSS, 1980-2003). La régression de Cox ou modèle à risque proportionnel est une classe de modèles de survie en statistiques. Les modèles de survie étudient le temps écoulé avant qu'un événement ne survienne. Historiquement, dans le modèle de Cox, cet

événement est le décès de l'individu, c'est pourquoi on parle généralement de survie et de décès. D'un point de vue statistique, la nature de l'événement n'est bien sûr pas importante, il s'agira alors d'interpréter les coefficients en conséquence.

L'analyse de régression de Cox avait indiqué que les différentes doses des champignons utilisés étaient un prédicateur significatif et indépendant de la survie des larves de *H. armigera* testées ($P < 0.05$) (Tableau XVI) et que le modèle a fourni une bonne régression.

1.2.2.1. Les valeurs de B

Les valeurs de B ont montré l'existence d'une relation de dose-réponse. Cette relation a été forte pour l'isolat Bb 11 qui a eu une valeur de B plus élevée ($B = 0,440$)

Tableau XVI : Modèle d'estimation de la valeur B résultant de la régression Cox pour les isolats de *M. anisopliae* et de *B. bassiana* testés sur les stades larvaires de *H. armigera*, y compris les coefficients de Wald.

Isolats de champignons	Stade de <i>H. armigera</i>	B	SE	Wald	ddl	Sig.
Met 31	L3	0,312	0,087	12,844	1	0,000
Met 31	L4	0,344	0,091	14,296	1	0,000
Bb 11	L4	0,440	0,093	22,132	1	0,000

B = Valeur B de la régression Cox ; SE = Erreur Standard ; Wald = coefficient de Wald ; ddl = degré de liberté ; Sig. = Significance

1.2.2.2. Variation de la DL 50 après l'application de Met 31 sur les stades 3 et 4 de *H. armigera*

Les courbes de DL50 des stades 3 et 4 de *H. armigera* sont représentées dans les Figures 14 et 15 respectivement. L'ajustement des données par le modèle de régression de Cox pour les courbes de DL 50 a été relativement bon, et est fonction de la valeur de B. Plus B était élevé, moins larges étaient les intervalles de confiance. Il fallait $3,47 \times 10^{18}$ conidies/insecte, $7,40 \times 10^{10}$ conidies/insecte, $1,60 \times 10^{10}$ conidies/insecte et $3,72 \times 10^8$ conidies/insecte pour tuer 50% des larves de 4^e stade, en respectivement, 3 jours, 5 jours, 7 jours et 9 jours, tandis qu'il fallait $3,85 \times 10^{17}$ conidies/insecte, $4,67 \times 10^{10}$ conidies/insecte, $4,23 \times 10^8$ conidies/insecte et $3,19 \times 10^6$ conidies/insecte pour tuer 50% des larves de stade 3, en respectivement 2 jours, 5 jours, 7 jours et 9 jours (Figure 14 & 15).

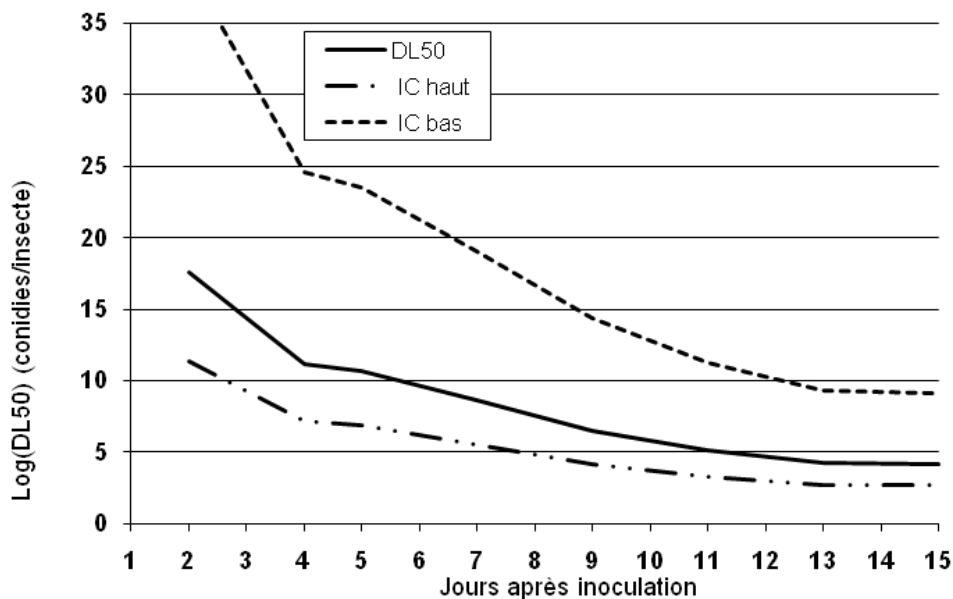


Figure 14 : Valeurs de DL50, après inoculation des larves L3 de *H. armigera* à différentes doses de Met 31.

1.2.2.3. Variation de la DL 50 après l'application de Bb 11 sur les stades 4 de *H. armigera*

Le modèle de régression Cox pour la courbe de DL 50 de Bb 11 a bien ajusté les données, en fonction de la valeur élevée de B ($B = 0,440$). Ceci se remarque également par la grandeur des intervalles de confiance. La dose-réponse a été une relation très forte pour Bb 11 (Figure 15).

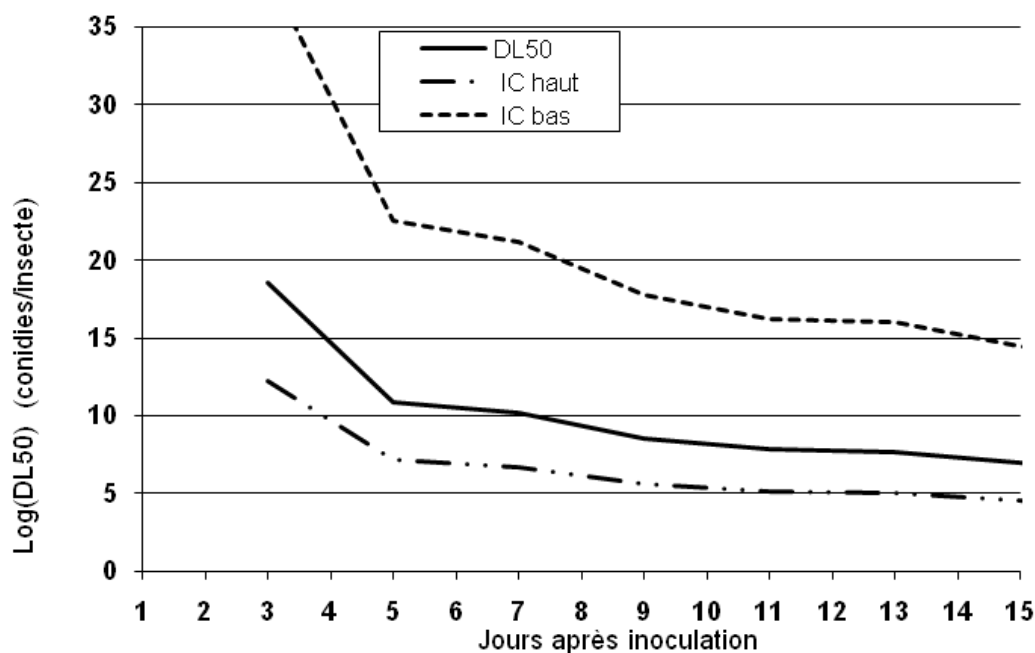


Figure 15 : Valeurs de DL50, après inoculation des larves L4 de *H. armigera* à différentes doses de Met 31.

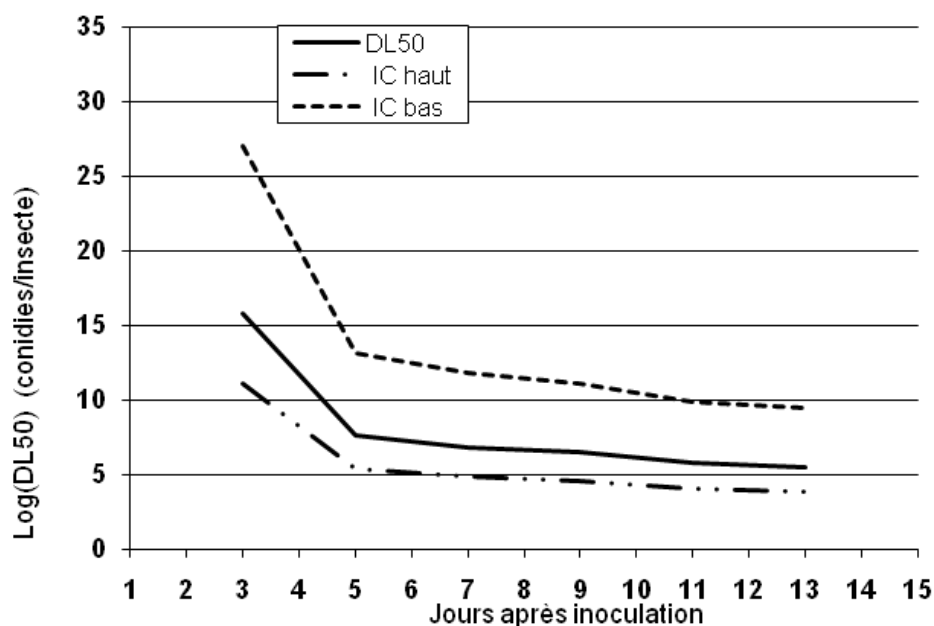


Figure 16 : Valeurs de DL50, après inoculation des larves L4 de *H. armigera* à différentes doses de Bb 11.

2. Discussion

D'une manière générale, les résultats obtenus des différentes expérimentations au laboratoire montrent que tous les isolats des champignons entomopathogènes utilisés sont pathogènes aux larves de *H. armigera*. Ces résultats vont dans le même sens que certains auteurs qui avaient, en effet montré cette susceptibilité des larves de *H. armigera*, à certains isolats de *Metarhizium* et de *Beauveria* au laboratoire (Gundannavar *et al.*, 2007 ; Lozano-Gutierrez et España-Luna, 2008 ; Kumar et Chowdhry, 2004). Les taux de mortalité des larves et des chrysalides, de formation des chrysalides et d'émergence des adultes ont été fonction à la fois du genre du champignon, de l'isolat, des doses utilisées et des stades larvaires de *H. armigera* traités. Pour un même isolat, les petites larves ont été plus vulnérables. Les différents résultats obtenus montrent que la mortalité des larves de *H. armigera* est fonction de la quantité de conidies qu'elles reçoivent. Les deux genres de champignons ont été infectieuses pour tous les stades utilisés en adéquation avec les résultats de Kulkarni *et al.*, (2008). Au stade L3, les effets des doses 10^6 et 10^7 conidies/insecte pour le *Metarhizium* s'équivalent statistiquement, malgré le taux de mortalité plus élevé enregistré avec la dose de 10^7 conidies/insecte. Ce taux de mortalité a été nettement supérieur pour 10^7 lorsque ces mêmes doses ont été appliquées sur les stades L4 ; ceci, à cause probablement de la taille plus importante des larves L4 comparativement à celle des L3. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Bateman *et al.*, (1996) qui ont trouvé que l'infection des criquets par les champignons est fonction de leur poids. Le nombre de chenilles L3 mortes

après inoculation du *Metarhizium* et qui ont sporulé a été également fonction de la dose. Il ressort qu'une dose de 10^6 conidies par insecte, soit une concentration de 5×10^8 conidies/ml permettra d'atteindre les mêmes taux de mortalité que 10^7 conidies/insecte en deux semaines, bien entendu que l'insecte déjà infecté n'arrive plus à s'alimenter correctement (Thomas *et al.*, 1997).

Pour tuer efficacement les larves L4, il est indispensable, selon nos résultats d'augmenter la dose de 10^6 à 10^7 conidies/insecte. Les chenilles mortes L4 issues des faibles doses (10^4 , 10^5 conidies/insecte) n'ont pas sporulé, ce qui serait dû probablement à la faible quantité de conidies reçue par rapport à leur poids ou à une humidité élevée dans les boîtes d'incubation des insectes morts, favorisant l'apparition plus rapide des bactéries et par conséquent, un pourrissement des larves mortes.

Les chrysalides mortes et issues des larves traitées avec certains isolats de *Metarhizium* ont sporulé, indiquant que les conidies peuvent rester dans un état de latence dans l'insecte et devenir virulent dès que ce dernier ne s'alimente plus (chrysalide). En effet, en Australie, Wilson (1983) a noté 15 à 20% de mortalité des chrysalides due au *B. bassiana*.

Parmi les isolats de *Metarhizium* utilisés, l'isolat de Met 31 est celui qui a causé le plus de mortalité au niveau des larves L3 de *H. armigera* et des chrysalides. Elle a provoqué un taux de mortalité corrigé de 56%. Par ailleurs, c'est pour cet isolat que les taux de formation des chrysalides et d'émergence des adultes ont été moindres. Quarante et deux pour cent des larves mortes issues des larves traitées avec cet isolat Met 31 ont sporulé ; ce taux fait partie des meilleurs taux de sporulation enregistrés pour ces expérimentations. En effet, la sporulation des insectes est l'un des facteurs déterminants pour le choix d'un isolat à utiliser comme biopesticide sur le terrain. Elle permet l'augmentation de l'inoculum, favorisant ainsi la transmission des conidies aux insectes non touchés lors des applications sur le terrain (Langewald *et al.*, 1997b; Adu-Mensah, 2002; Douro Kpindou et al, 2005. La combinaison de ces paramètres (taux de mortalité de larves et de chrysalides plus élevé, le taux relativement élevé de sporulation, le plus bas taux de chrysalides formées d'émergence des adultes) fait de Met 31 un bon candidat parmi les isolats de *Metarhizium* testés pour une étude plus approfondie dans une perspective de son utilisation comme biopesticide.

Les taux de sporulation les plus élevés ont été observés avec Bb 11. Des deux isolats de *Beauveria* utilisés, Bb 11 est celui qui a provoqué le plus de mortalité des larves et des chrysalides avec pour conséquence, un faible taux de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes.

Les insectes morts issus de l'inoculation des larves par Bb 12 n'ont montré aucune sporulation pour le troisième et le sixième stade larvaire. Pour les autres stades traités, ce taux est très faible.

Cela fait de cet isolat un candidat inapproprié pour son utilisation comme biopesticide.

Le développement larvaire de l'hôte inoculé a été affecté comparativement au témoin. Les intervalles de confiance (IC) des Temps moyens de survie (MST) de Met 31 et de BB 11 montrent la possibilité de tuer des chenilles en 11 jours ou 13 jours respectivement comparativement aux plus bas TMS au niveau des témoins (20 jours). On note une similitude des temps moyens de survie (TMS) pour certains isolats.

D'une manière générale, à l'émergence, les mâles sont plus nombreux que les femelles. Le taux de femelles émergées dans les témoins a varié entre 37% et 41% qui est similaire à ceux observés par Singh et Singh, (1975), Mourikis et Vassilana-Alexopoulou, (1970), Reed (1965). Ce sex-ratio de l'hôte inoculé a été affecté avec incidence prononcée sur l'émergence des femelles : Plus tôt l'hôte est traité, moins nombreuses sont les femelles qui émergent. Aussi, plus la dose est élevée, moins est l'émergence, en générale et celle des femelles en particulier. A la plus forte dose, aucune émergence de femelles ne s'observe. De nos résultats, il ressort que les chrysalides femelles sont beaucoup plus vulnérables que les chrysalides mâles. De plus les mâles qui émergent sont malformés limitant ainsi leur déplacement. Ce qui est un résultat intéressant dans le cadre de la gestion du ravageur avec les biopesticides à base de champignons entomopathogènes. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Mondedji (2010) après inoculation des larves de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera : Plutellidae) aux extraits de feuilles de neem. Les femelles étant à l'origine de l'augmentation de la population, l'absence de femelles suite aux applications est un résultat très intéressant pour le contrôle des populations du ravageur. Des investigations seront faites plus tard dans le but de comprendre les causes physiologiques de cet incidence sur l'absence d'émergence des femelles.

Le modèle de régression de Cox est plus flexible dans l'analyse des essais biologiques de biopesticides que les modèles précédents tels que des analyses de Probit et de Logit. Preisler *et al.*, (1989) ont discuté des problèmes liés à l'analyse des données des expériences de temps-dose-réponse et ont conclu que : la manière classique de procéder à une analyse des données indépendantes sur le temps ou la dose est de séparer soit l'effet de la dose soit l'effet du temps des données temps-dose-mortalité utilisées dans les essais biologiques. Ces modèles qui considèrent des effets de temps et de dose semblent être plus appropriés pour évaluer l'efficacité d'un microbe pathogène ou d'un pesticide sur la cible (Robertson et Preisler, 1992). Les modèles de régression de Cox ont bien fonctionné en modélisant des liens existant dans temps-dose-survie des isolats fongiques infectant les larves de *H. armigera* dans ces expérimentations.

Toutes les régressions de Cox adaptées aux données de survie obtenues à partir des larves L3-L4 traitées avec différentes doses des différents isolats, ont eu des valeurs moyennes de B. Les ajustements des valeurs de B étaient tous significatifs, indiquant que les données montrent une

réponse effet/dose significative. Pour la même raison, les courbes de DL 50 ne sont pas très raides et leurs intervalles de confiance sont relativement moins grands. Nos résultats sont conformes à ceux de Abebe (2002) qui a utilisé certains isolats de *M. anisopliae* et de *B. bassiana* virulentes contre les termites.

Nos résultats montrent également que pour un même stade larvaire, le temps mis pour mourir est fonction de la dose appliquée. De même, à un temps donné, la dose à appliquer est fonction du stade larvaire : plus le stade est évolué, plus la quantité de conidies à appliquer sera élevée. A 5 jours, il faut $4,7 \times 10^{10}$ conidies pour L3 contre $7,4 \times 10^{10}$ conidies pour L4.

3. Conclusion

Des résultats obtenus, il ressort que tous les isolats de champignons entomopathogènes utilisés sont pathogènes aux larves de *H. armigera*. L'isolat Met 31 et l'isolat Bb 11 ont été les plus virulents et ayant les potentialités pour être utilisés comme biopesticides.

Des deux stades larvaires de *H. armigera* utilisés, le stade L3 est le plus vulnérable. Les concentrations de 5×10^8 et de 5×10^9 conidies/ml ont donné des résultats similaires. Une augmentation de dose est nécessaire pour passer d'un stade larvaire plus jeune à un stade larvaire plus avancé. Après avoir évalué les effets de ces champignons entomopathogènes au laboratoire, un test dans un champ expérimental a été mis en place afin de mieux cerner le transfert de leurs conidies sur le ver de capsule du cotonnier.

**CHAPITRE IV : TRANSFERT DE DOSES D'UNE
FORMULATION HUILEUSE DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*
APPLIQUEE SUR LE VER DE CAPSULE DU COTONNIER
DANS UN CHAMP EXPERIMENTAL²**

² Ce chapitre a été publié à *International Journal of Tropical Insect Science* comme O.K. Douro Kpindou, Denis Djegui, Isabelle A. Glitho et Manuele Tamo (2011). Dose transfer of an oil-based formulation of *Metarhizium anisopliae* sprays to cotton bollworm in an arena trial, 31 (4) 262-268.

Introduction

Les tests de laboratoire ont montré que la formulation huileuse des conidies de *M. anisopliae* a été efficace pour tuer les larves de ver de la capsule de cotonnier. Toutefois, l'application de ce type de formulation de biopesticide au champ pourrait montrer un effet plus lent que celui observé dans des expériences de laboratoire (Bateman et Thomas, 1996).

Le test dans un champ expérimental décrit dans le présent chapitre est utile pour établir un concept faisant un rapprochement entre les essais biologiques en laboratoire et les performances des biopesticides sur le terrain (Hewitt *et al.*, 1994). Ce concept est également précieux pour évaluer l'efficacité des pesticides sur les cibles cachées dans la végétation dense, comme les champs de coton. Les pourcentages de mortalité ou d'infection résultant de l'application directe sont liés à des techniques d'application et des facteurs physiques environnementaux (température, vitesse du vent, structure de la végétation, etc.). Dans les essais contre *Zonocerus variegatus* (L.) (Orthoptera: Pyrgomorphidae) lorsque l'application est satisfaisante (> 95% des insectes directement touchés par des gouttelettes), la vitesse de mortalité dans le champ a été 1-2 jours plus lent que les résultats attendus du laboratoire (Douro-Kpindou *et al.*, 1995). Contrairement à la pratique courante d'utiliser une zone claire (Bateman *et al.*, 1998), le champ de coton a été utilisée ici pour évaluer la répartition des gouttelettes dans la végétation, le transfert de dose pour les larves de *H. armigera* et le taux de la mortalité, utilisant des cibles artificielles (lames porte objets).

1. Distribution des gouttelettes

Le nombre moyen de gouttelettes par cm² de surface de la lame (formulation sans conidies et formulations avec conidies) a varié de $415,7 \pm 60,3 \text{ cm}^{-2}$ à la ligne 1 à $44,8 \pm 36,3 \text{ cm}^{-2}$ à la ligne 3 (Figure 17). Seule la première ligne a reçu le maximum de gouttelettes. Seulement $44,8 \pm 36,3$ gouttelettes/cm² ont atteint la dernière ligne située à 5 m de la ligne d'application.

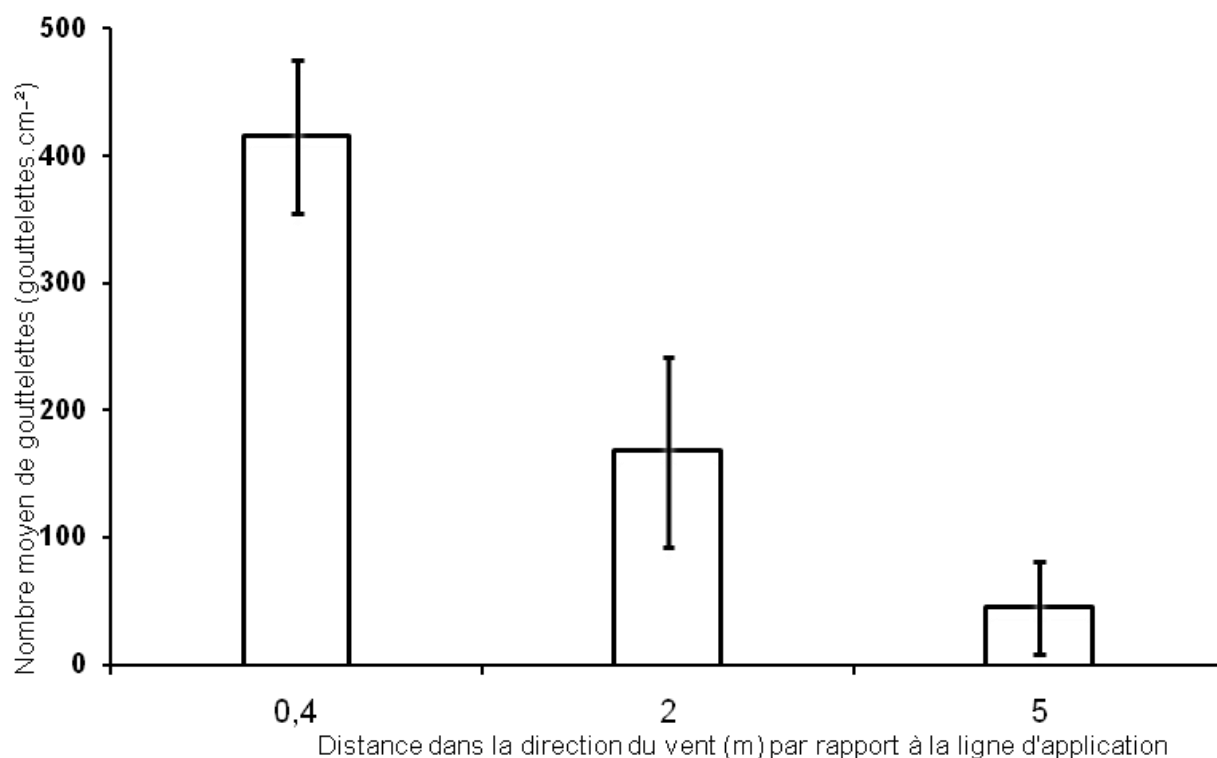


Figure 17 : Distribution des gouttelettes dans la parcelle expérimentale.

2. Taux moyens de mortalité des stades immatures de *H. armigera* et sporulation des larves mortes

La figure 18 montre le taux de mortalité des larves de *H. armigera* après l'application des deux doses de Met 31 : $2,5 \times 10^{12}$ conidies/litre (50 g/ha) et $3,75 \times 10^{12}$ conidies/litre (75 g/ha) dans les arènes (surface occupée par une plante de cotonnier). Vingt un jours après inoculation, les taux de mortalité étaient de 65%, 60% et 29% pour 75 g/ha, 50 g/ha et le témoin respectivement. Pour atteindre 50% de mortalité, 11 jours et plus de 12 jours ont été nécessaires pour 75 g/ha et 50 g/ha respectivement. A partir du 15^e jour, la différence dans les taux de mortalité a été significative entre les deux traitements au seuil de 5% ($F_{2,8} = 241.59$; $P < 0.0001$).

Contrairement à nos attentes, le taux de sporulation des larves mortes issues des 50 g/ha étaient plus élevés que pour ceux des 75 g/ha. Ils ont varié de 44,4% (75 g/ha) à 57,5% (50 g/ha) (Figure 19), mais aucune différence significative au seuil de 5% n'a été notée entre les deux doses. Cependant, les deux doses étaient significativement différentes des témoins dont les morts n'ont extériorisé aucune mycose ($F_{2,8} = 25.22$; $P = 0.0054$).

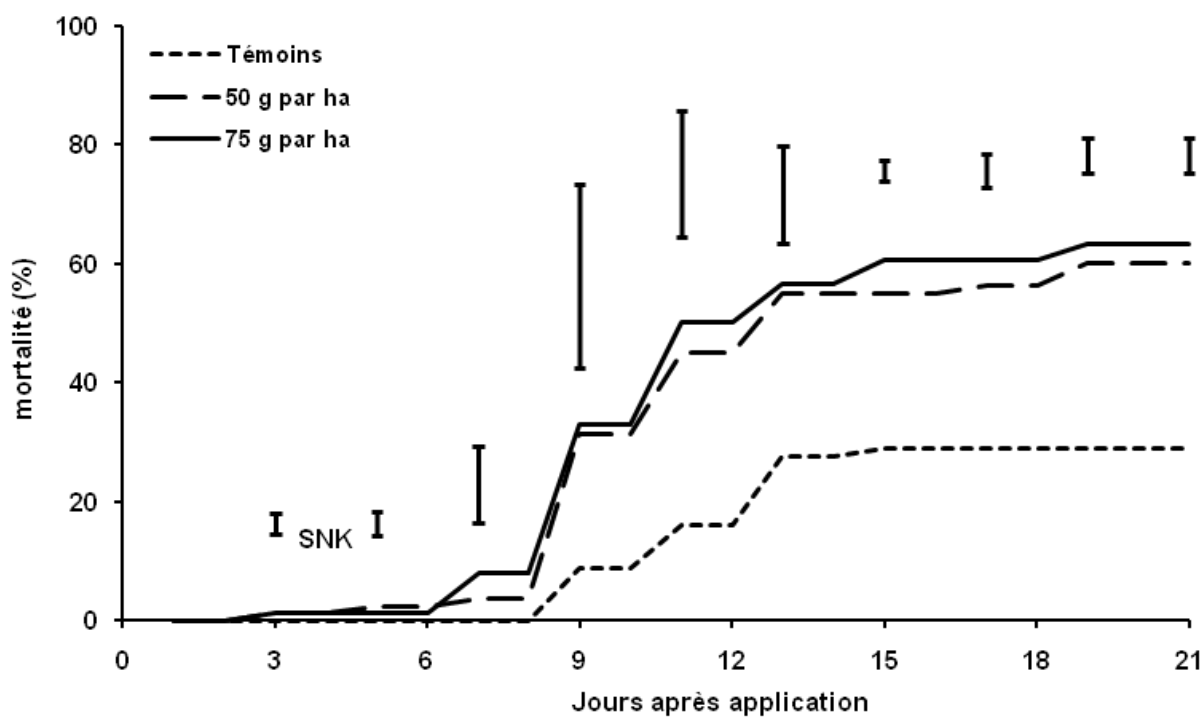


Figure 18 : Taux moyens de mortalité des larves de *H. armigera* après application de différentes doses de Met 31 dans le champ expérimental.

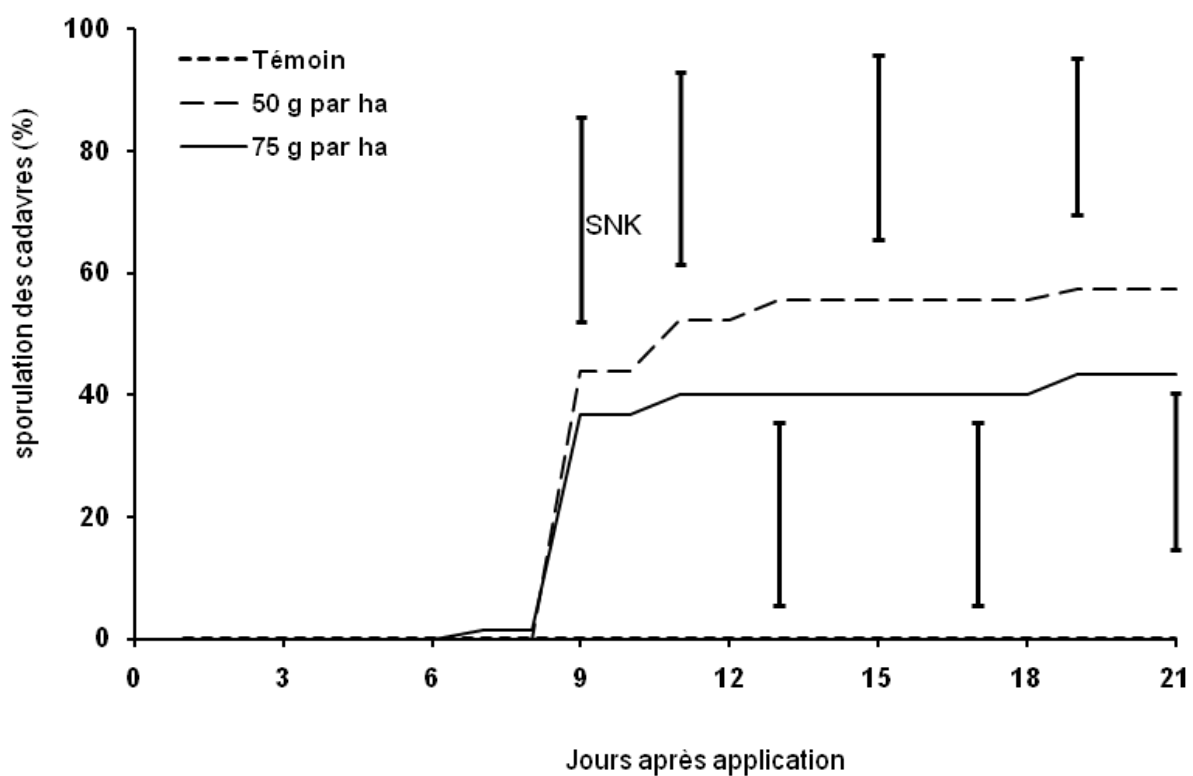


Figure 19 : Essai champ expérimental : Taux moyens de sporulation des insectes morts de *H. armigera* après incubation

3. Taux moyens de mortalité des stades immatures de *H. armigera* entre les lignes

Les résultats de mortalité des larves qui ont été exposées sur les différentes lignes (0,4m ; 2 m et 5 m) sont montrés par les figures 20 et 21. Pour la dose de 50 g/ha, les taux moyens de mortalité ont été plus faibles pour la dernière ligne (5 m) que pour ceux de la première ligne (0,4 m) la plus proche de la ligne d'application. Malgré cet écart existant entre les distances séparant les lignes, aucune différence significative au seuil de 5% n'a été notée (Figure 21). Lorsque la dose de 75 g/ha a été appliquée, les taux de mortalité des larves au niveau des différentes lignes ont été plus proches comparativement à la dose de 50 g/ha. Toutes les populations de chenilles traitées au champignon ont eu leur taux de mortalité significativement supérieurs à celles des non traitées ($F_{3,11} = 13.64$; $P = 0.0043$). Cinquante pour cent de mortalité ont été atteints en 10 jours (ligne 1 et 2) et 14 jours (ligne 3) après application de 75 g/ha. Pour la dose de 50 g/ha, seules les populations de chenilles de la première ligne (0,4 m) ont eu un taux de mortalité significativement différent de celles dans les témoins ($F_{3,11} = 6.10$; $P = 0.0297$). Cinquante pour cent de mortalité a été atteint à moins de 9 jours (ligne 1), moins de 13 jours (ligne 2) et 19 jours (ligne 3) après application de 50 g/ha (Figure 21).

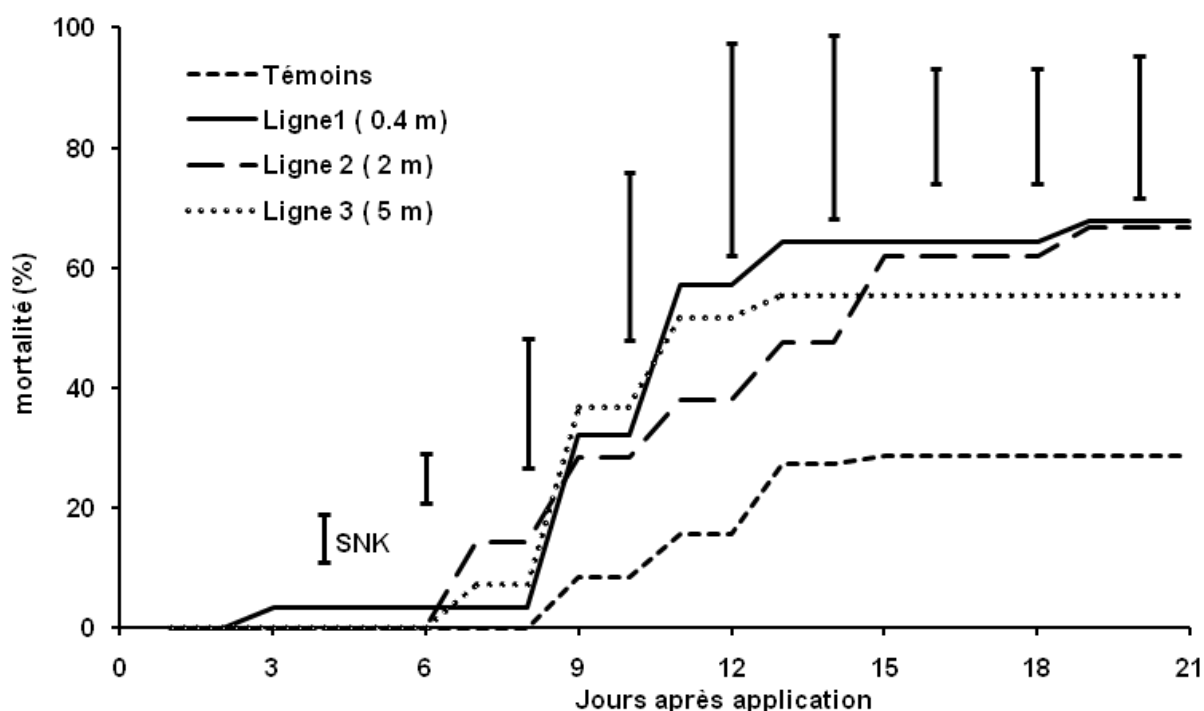


Figure 20 : Taux moyens de mortalité des larves de *H. armigera* à différentes distances après application de $3,75 \times 10^{12}$ conidies/litre (75 g/ha).

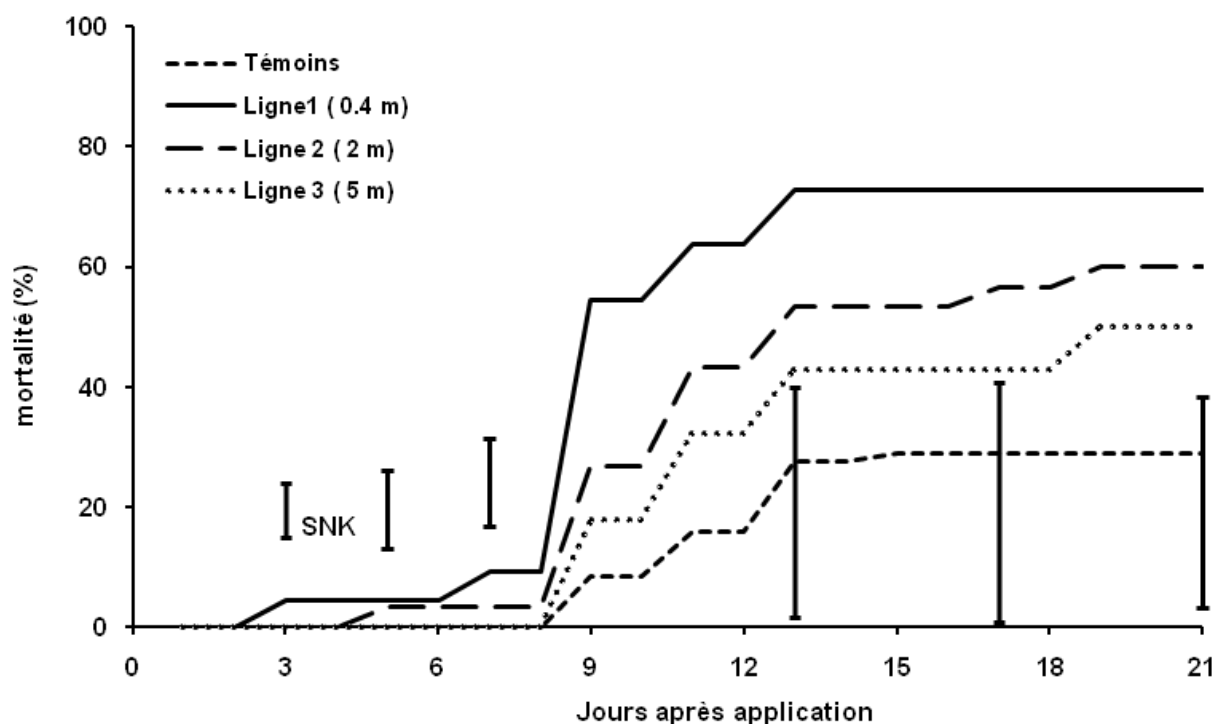


Figure 21 : Taux moyens de mortalité des larves de *H. armigera* à différentes distances après application de $2,5 \times 10^{12}$ conidies/litre (50 g/ha).

4. Formation des chrysalides, émergence des adultes et oviposition

Les taux moyens de chrysalides formées ont varié de $36,2 \pm 3,4\%$ (50 g/ha) à $71,2 \pm 3,2\%$ (Témoins) (Figure 22). Les taux moyens d'émergence d'adultes mâles et femelles ont été similaires pour les deux doses appliquées. Tout comme pour les expérimentations au laboratoire, l'émergence des femelles a été nettement inférieure comparativement à celle des mâles et surtout pour les deux doses du biopesticide appliqué. Le nombre moyen de larves par femelle a diminué de 24 larves/femelle (Témoins) à 17 larves/femelle (75 g/ha) (Tableau XVII).

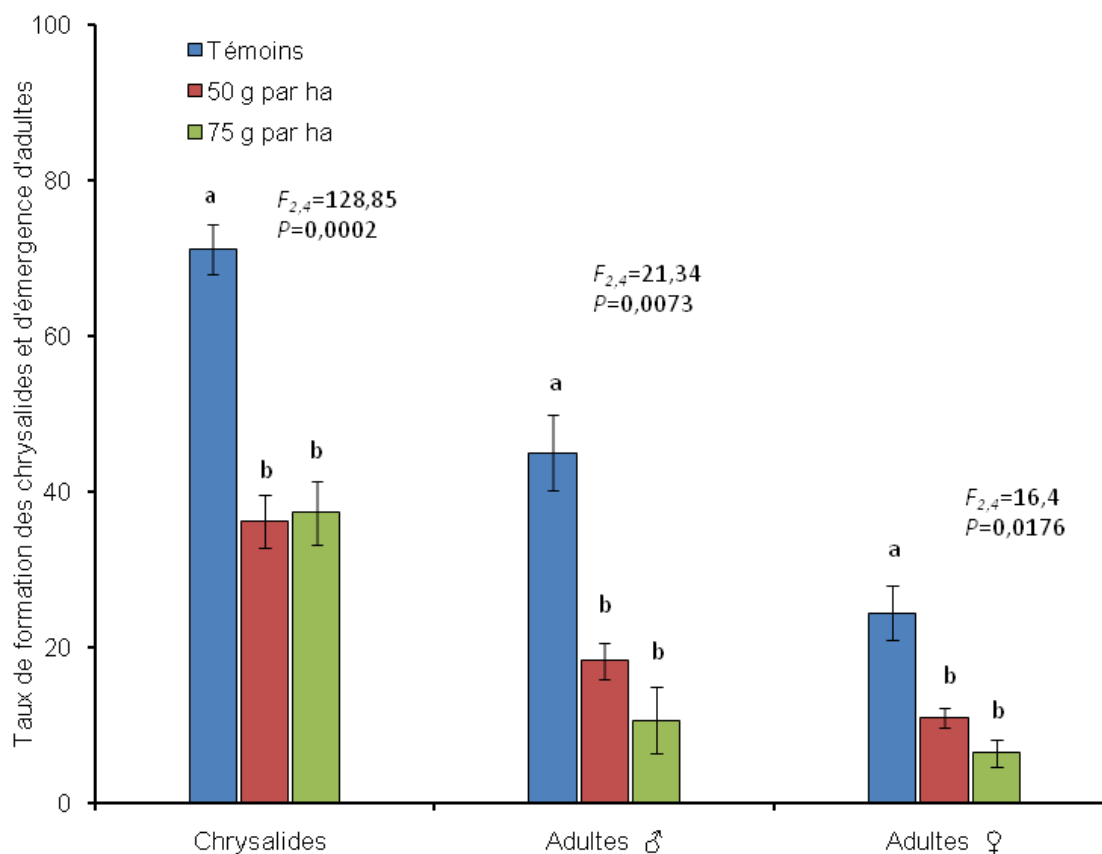


Figure 22 : Taux moyens de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes (♂, ♀) trois semaines après application des larves L3 et L4 de *H. armigera* au Met 31 dans le champ expérimental.

Les histogrammes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (Analyse de Variance suivie de SNK)

Tableau XVII : Nombre d'adultes émergés et de larves écloses par femelle après application de différentes doses de Met 31 aux larves L3 et L4 de *H. armigera* dans un champ expérimental.

Traitements (Conidies/insecte)	Nombre d'adultes	Nombre de ♂	Nombre de ♀	Nombre de larves écloses par ♀
Témoins (0 g/ha)	48	31	17	23,9
$2,5 \times 10^5$ (50 g/ha)	26	16	10	18,0
$3,75 \times 10^5$ (75 g/ha)	13	8	5	16,8

5. Discussion

Le nombre moyen de gouttelettes a considérablement diminué de la première ligne (0,4 m) à la troisième (5 m), contrairement à ce que Bateman *et al.*, (1998) ont obtenu en utilisant une zone dégagée. Nos résultats ont été clairement influencés par la présence de plantes de cotonnier interférant avec la dispersion des gouttelettes. Aucune différence significative n'a été enregistrée entre les lignes, quant à la mortalité des insectes. Ceci pourrait s'expliquer par la petitesse des insectes par rapport à la surface des lames porte-objets réceptrices des gouttelettes. Peut être aussi que les insectes dans les différentes lignes n'ont pas reçu différemment les gouttelettes. Néanmoins, on note une tendance à une diminution de la mortalité a été notée au niveau des lignes les plus éloignées de la ligne d'application des biopesticides. Cette tendance entre les lignes a été plus prononcée pour la faible dose. En effet, Bateman *et al.* (1998) ont démontré que la mortalité des insectes traités avec des champignons entomopathogènes est fonction du nombre de conidies reçu : par conséquent, à nombre égal de gouttelettes, celles qui contiennent plus de conidies induisent une plus forte mortalité. La taille des gouttelettes diminue également avec la distance (Bateman, 1993). Ainsi, les premières lignes ont reçu, non seulement, plus de gouttelettes, mais aussi de grosses gouttelettes : donc, plus de conidies avec une plus grande probabilité d'atteindre les insectes et d'induire un taux de mortalité plus élevé. Selon nos résultats de laboratoire dans le chapitre précédent, les taux de mortalité sont doses dépendantes. En conséquence, à nombre égal de gouttelettes, celles contenant plus grand nombre de conidies pourront provoquer plus de mortalité que celles qui en contiennent moins. Ainsi, la probabilité d'obtenir un taux de mortalité plus élevé dans les lignes de coton plus éloignées de la ligne d'application (pulvérisation) devient plus élevée pour les doses élevées que pour les faibles doses.

Les taux de mortalité sont ceux obtenus à partir de contacts directs des conidies avec les insectes. A cela s'ajoutera, probablement, la mortalité due à la rémanence. En effet, Lomer *et al.* (1997b) ont montré des taux de mortalité due à la persistance jusqu'à 55% lorsque le sauteriau du riz, *Hieroglyphus daganensis*, Krauss (Orthoptera : Acrididae), a été traité avec *M. anisopliae* dans le nord du Bénin.

Les agriculteurs laissent 3 lignes (0,8 x 3 = 2,4 m) entre les lignes d'application, car ils utilisent des formulations aqueuses de pesticides chimiques avec des volumes d'application élevés, jusqu'à 10 litres par hectare. Pour les formulations huileuses, les chercheurs recommandent un à deux litres par hectare car les gouttelettes sont petites (60-70 μm) facilement emportées par le vent (Bateman, 1993; Bateman, 1997). Avec un espacement de 5 m, donc 6 lignes entre les passages d'application, lorsque le débit de l'appareil de traitement est d'environ 60 ml.s^{-2} et une

vitesse de marche de 1 m.cm⁻², il est sûr d'avoir une bonne couverture avec un volume d'application de 2 litres par hectare.

Les taux de sporulation ont été plus élevés à la dose la plus faible. Cela est dû au calcul du taux de sporulation des insectes morts. A nombre égal d'insectes morts en sporulation, le pourcentage de sporulation devient supérieur pour la dose qui a le moins d'insectes morts (Douro Kpindou *et al.*, 2005). Néanmoins, pour ces résultats, aucune différence significative au seuil de 5% n'a été observée entre les deux doses.

D'une manière générale, l'évolution de l'hôte a été affectée par l'application du biopesticide. Une différence significative a été notée entre les témoins et les deux doses appliquées dans la formation des chrysalides et l'émergence des adultes, les femelles plus particulièrement.

Les résultats de ces travaux montrent que les efforts pour optimiser le transfert de la dose et le rythme de travail ont été récompensés par une meilleure efficacité du biopesticide. La taille des gouttelettes et de la distribution ont été expérimentées par Symmons *et al.* (1991) qui a observé une différence marquée de la mortalité des sauteriaux sahéliens avec des pulvérisations de deux tailles médianes de gouttelettes contenant du bendiocarp (une formulation UBV de l'insecticide carbamate). Les gouttelettes d'une taille d'environ 77 µm étaient plus efficaces.

6. Conclusion

Les résultats obtenus de cette expérimentation permettent de conclure que même à 5 mètres de la ligne d'application, il est possible, non seulement d'atteindre la cible, mais également de d'enregistrer 43% de mortalité en 13 jours pour la dose de 50 g/ha avec un volume d'application de 1 litre/ha ; ceci sans compter l'éventuelle mortalité due à la contamination par la végétation (plantes de cotonnier et mauvaises herbes) et le sol. Cinq mètres représentent, ici, plus de 6 lignes de cotonniers soit un peu plus de 6 intervalles de 0,8 m. Les appareils ULV permettant, selon leurs caractéristiques, d'avoir des débits de 60 ml.s⁻¹, lorsque la formulation est de 70 :30 (huile d'arachide : pétrole). Ainsi, 2 litres de volume d'application à l'ha et une distance entre les passes d'application de 5 m sont suffisants pour une bonne couverture d'un ha. Cette méthode est celle qui a été appliquée en milieux semi-réel et paysan dans un essai comparatif en vue de tester l'efficacité des deux isolats de champignon retenus.

CHAPITRE V : ETUDE COMPARATIVE DE L'EFFICACITE DES CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGENES, DES PESTICIDES CHIMIQUES ET BOTANIQUES DANS LA GESTIONS DES RAVAGEURS DU COTONNIER ET DE LEURS ENNEMIS NATURELS AU BENIN³

³ Ce chapitre est en préparation pour être soumis à *BIOTECHNOLOGIE AGRONOMIE ET ENVIRONNEMENT* comme O.K. Douro Kpindou, D. Djegui, I. A. Glitho, K. Amenvoin et Manuele Tamo (2011). Utilisation de champignons entomopathogènes, de pesticides chimique et botanique dans la gestion des ravageurs du cotonnier et de leurs ennemis naturels au Bénin

Introduction

L'utilisation aveugle des pesticides de synthèse dans la stratégie de gestion des ravageurs des cultures cause des conséquences fâcheuses telles que la pollution de l'environnement, la résistance aux ravageurs et la toxicité pour les autres organismes non-cibles, y compris l'être humain. Pour pallier à la crainte de l'effet des résidus chimiques dangereux pour la santé humaine et animale, plusieurs études ont été menées afin de déterminer les méthodes de contrôle plus efficaces sans l'aide d'insecticides. Certaines de ces méthodes consistent en l'utilisation des ennemis naturels des insectes tels que les bactéries, les virus et les champignons (Ferron, 1985 ; Sabbour et Sahab, 2005 ; Reddy *et al.*, 2008).

Les champignons entomopathogènes hyphomycètes sont des agents potentiels de lutte biologique contre les insectes et constituent une composante importante au sein de systèmes de gestion intégrée des ravageurs (Coates *et al.*, 2002 ; McGurire *et al.*, 2005). Ils ont été développés à travers le monde pour le contrôle de nombreux ravageurs d'importance agricole. Cependant, peu de rapports sont disponibles sur l'utilisation de ces champignons contre *H. armigera* sur le terrain. C'est pour cette raison qu'il est important de tester en milieu réel (milieu paysan) les deux isolats de champignon entomopathogènes, *M. anisopliae* et *B. bassiana* dont l'efficacité a été démontrée au laboratoire et dans une parcelle expérimentale. Ainsi, des essais comparatifs ont été mis en place dans les parcelles expérimentales de l'INRAB (CRA-CF) et en milieu paysan utilisant ces champignons entomopathogènes. L'effet de ces champignons a été comparé avec celui de pesticides chimiques utilisés dans le traitement du coton conventionnel et de l'huile de neem utilisée dans le coton biologique.

1. Conditions météorologiques

Les données pluviométriques sont enregistrées dans la figure 23. La répartition pluviométrique a été bonne avec des écarts peu importants. Le mois d'août a été le plus pluvieux avec 204,4 mm. La température moyenne maximale ($29,9 \pm 2,2^{\circ}\text{C}$) a été enregistrée à l'installation des expérimentations au mois de juin pour décroître et se stabiliser de juillet à septembre avant de remonter en octobre, période de maturité du cotonnier. Contrairement à la température, l'humidité relative qui était faible au mois de juin a augmenté de juillet à septembre avant de décroître en octobre, période d'ouverture des capsules (Figure 24).

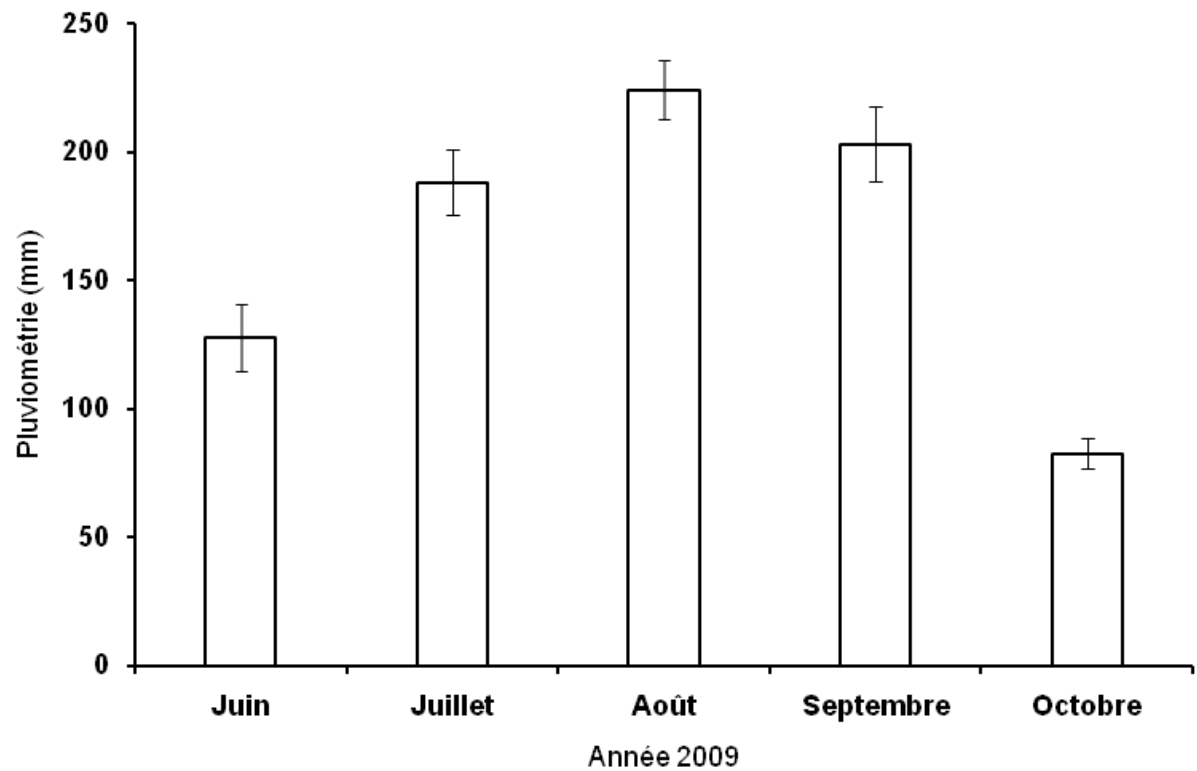


Figure 23 : Pluviométrie moyenne lors de la conduite des essais en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi) de juin à octobre 2009.

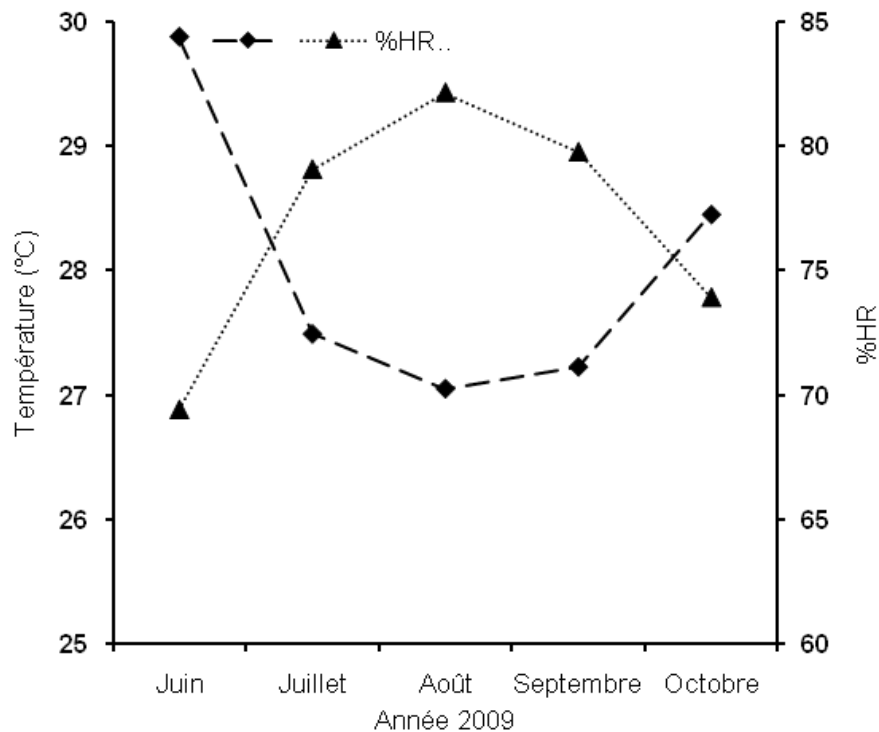


Figure 24 : Température et humidité relative moyennes lors de la conduite des essais en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi) de juin à octobre 2009.

2. Densité de population de *H. armigera* en milieu semi-réel

Le nombre moyen de *H. armigera* a varié de $0,06 \pm 0,03$ /plante (coton conventionnel) à $0,63 \pm 0,37$ /plante (Témoins). Les pesticides chimiques ont mieux contrôlé le ravageur, néanmoins aucune différence significative n'a été observée entre les traitements au seuil de 5% (Tableau XVIII). Comparativement aux parcelles témoins, tous les pesticides utilisés (chimiques et biologiques) ont significativement réduit la densité du ravageur.

D'une manière générale, un seul pic a été observé au niveau de chacun des traitements. Seulement, les différents pics se sont produits à des périodes différentes. Le pic au niveau du traitement aux insecticides chimiques est apparu plus tôt (63^e Jour Après Levée (JAL)) comparativement aux biopesticides, pesticide botanique et aux témoins et a été le moins élevé (en moyenne $0,36 \pm 0,05$ *H. armigera*/plante), car les pesticides chimiques, en l'occurrence le tihan, appliqué au 45^e et au 60^e JAL, ont réduit de manière significative la densité de population du ravageur. Dans les parcelles traitées aux biopesticides et au pesticide botanique, le nombre moyen de *H. armigera* a, quant à lui, augmenté pour atteindre son pic au 77^e JAL. Ceci pourrait s'expliquer par le fait non seulement de leur action lente, mais également du retard mis pour leur application (50^e JAL). Pour 12 observations effectuées au cours de l'expérimentation, le nombre moyen de larves de *H. armigera* (HA) a varié de $0,06 \pm 0,01$ par plante (conventionnel) à $0,59 \pm 0,38$ par plant (Témoin). De façon générale, les nombres élevés de larves de *H. armigera* étaient situés entre le 56^e et le 84^e jour après la levée. A partir du 91^e JAL, le nombre de larves a commencé par diminuer parce qu'elles sont arrivées, probablement, au dernier stade de leur développement et sont devenues des chrysalides. Comparativement au Témoin, les pesticides biologiques et botaniques ont contrôlé le ravageur avec des pics respectifs de $0,78 \pm 0,21$, $0,78 \pm 0,27$ et $0,64 \pm 0,21$ HA par plante pour Met 31, l'huile de neem et Bb11. La fluctuation de population de *H. armigera* a été presque la même pour les biopesticides et le pesticide botanique (Figure 25). La différence obtenue entre les différents traitements au 63^e JAL ($F_{4,15} = 3,08$, $P=0,0488$) est due au faible nombre de *H. armigera* enregistré au niveau des parcelles traitées au *B. bassiana*. Du 70^e JAL au 84^e JAL, les pesticides chimiques, les biopesticides et le pesticide botanique ont significativement réduit la densité de *H. armigera* ($F_{4,15} = 3,07$, $P = 0,0492$; $F_{4,15} = 19,40$, $P < 0,0001$; $F_{4,15} = 50,37$, $P < 0,0001$) comparativement aux Témoins. En dehors du 63^e JAL, aucune différence significative n'a été observée entre *M. anisopliae*, *B. bassiana* et l'huile de neem.

L'efficacité moyenne des pesticides utilisés, calculée sur la base des observations de la densité des populations de *Helicoverpa*, a été de $56,1 \pm 27,4\%$, $77,9 \pm 9,9\%$, $59,7 \pm 18,6\%$ et $78,21 \pm 8,2\%$ pour respectivement les pesticides chimiques, l'huile de neem, *B. bassiana* et *M. anisopliae* (Tableau XVIII).

Le taux d'efficacité, des produits chimiques utilisés, a évolué de -98%, correspondant à une faible densité dans les témoins au début de l'infestation, à 100%, puis à 33%, correspondant à une ré-infestation des parcelles, car après le 2^e traitement au tihan (60^e JAL) aucun autre traitement n'est destiné à la cible qu'est *H. armigera* (Figure 26). Le chiffre négatif enregistré au niveau de *B. bassiana* est également dû à la faible densité de population de *H. armigera* au début de l'infestation. Pour tous les biopesticides et le pesticide botanique, on note une certaine stabilité de l'efficacité dans le temps due, probablement à l'effet de rémanence connu pour ces biopesticides et l'effet résiduel du pesticide botanique. De plus, les applications de ces pesticides biologiques et botaniques ont continué jusqu'au 85^e JAL. Le taux moyen d'efficacité de *B. bassiana* a été plus bas que celui de *M. anisopliae* dû à une augmentation de la densité de population de *Helicoverpa* dans les parcelles traitées avec ce biopesticide au 70^e JAL (Figure 26).

Tableau XVIII : Milieu semi-réel : Effets des différents pesticides sur le nombre moyen de chenilles

Traitements	Nombre moyen d'insectes par cotonnier		Efficacité sur <i>H. armigera</i> (%)
	<i>H. armigera</i>	Autres carpophages (<i>Earias</i> spp., <i>D. watersi</i>)	
Témoins	0,63 ± 0,37 a	0,17 ± 0,07 a	-
Conventionnel	0,06 ± 0,03 b	0,09 ± 0,02 a	56,1 ± 27,4 a
Huile de neem	0,18 ± 0,08 b	0,10 ± 0,02 a	77,9 ± 9,9 a
<i>B. bassiana</i>	0,13 ± 0,06 b	0,09 ± 0,02 a	59,7 ± 18,6 a
<i>M. anisopliae</i>	0,19 ± 0,08 b	0,12 ± 0,04 a	78,2 ± 8,2 a
$F_{4,15}$ P	25,24 < 0,0001	1,84 0,1734	$F_{3,24} = (0,37)$ $P = 0,7718$

*Nombre moyen par plante ± ES (calculé sur la base de 4 répétitions de 12 observations et sur 18 plantes) ; HA = *H. armigera*.

*Les moyennes d'une même colonne suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Analyse de variance suivie de SNK).

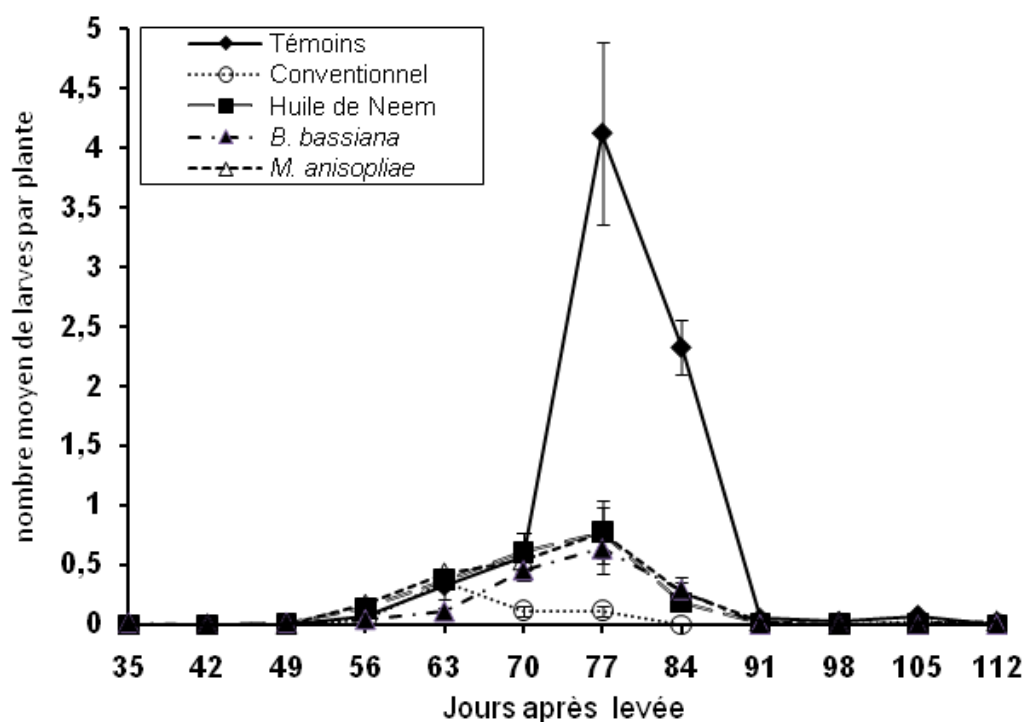


Figure 25 : Fluctuation des effectifs de *H. armigera* sous l'influence des pesticides chimiques biologiques et botanique en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).

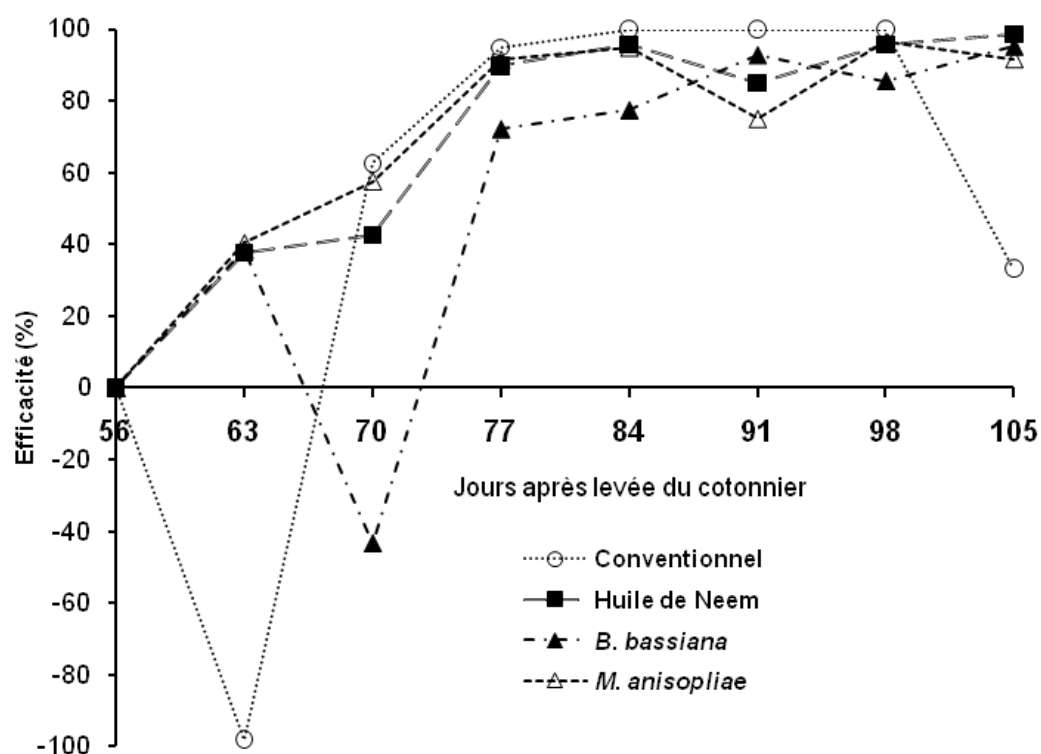


Figure 26 : Variation temporelle du taux d'efficacité des différents produits utilisés dans le contrôle de population de *H. armigera* en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).

3. Densité de population des autres carpophages (*Earias* spp., *D. watersi*) en milieu semi-réel

Le nombre moyen de larves des autres carpophages a varié de $0,09 \pm 0,02$ par plante (conventionnel et *B. bassiana*) à $0,17 \pm 0,07$ par plante de cotonnier (Témoins). Malgré le nombre moyen plus élevé des carpophages dans les parcelles témoins, aucune différence significative n'a été observée entre les différents traitements au seuil de 5% (Tableau XVIII).

Tout comme pour le principal ravageur *H. armigera*, les nombres élevés de ces larves se situent entre le 56^e et le 84^e JAL correspondant à la période de pic. Les effectifs moyens de ces chenilles ont été presque les mêmes pour tous les pesticides utilisés (Figure 27). Malgré le nombre moyen de chenilles relativement plus bas pour le conventionnel, aucune différence significative n'a été enregistrée tout au long des observations entre les pesticides utilisés. Cependant, comparativement au Témoins, on note un contrôle des ravageurs carpophages (*Earias* spp., *D. watersi*) par tous les pesticides utilisés. A partir du 91^e JAL, une diminution de la densité de population de ces ravageurs, marquant, probablement, la fin du développement larvaire.

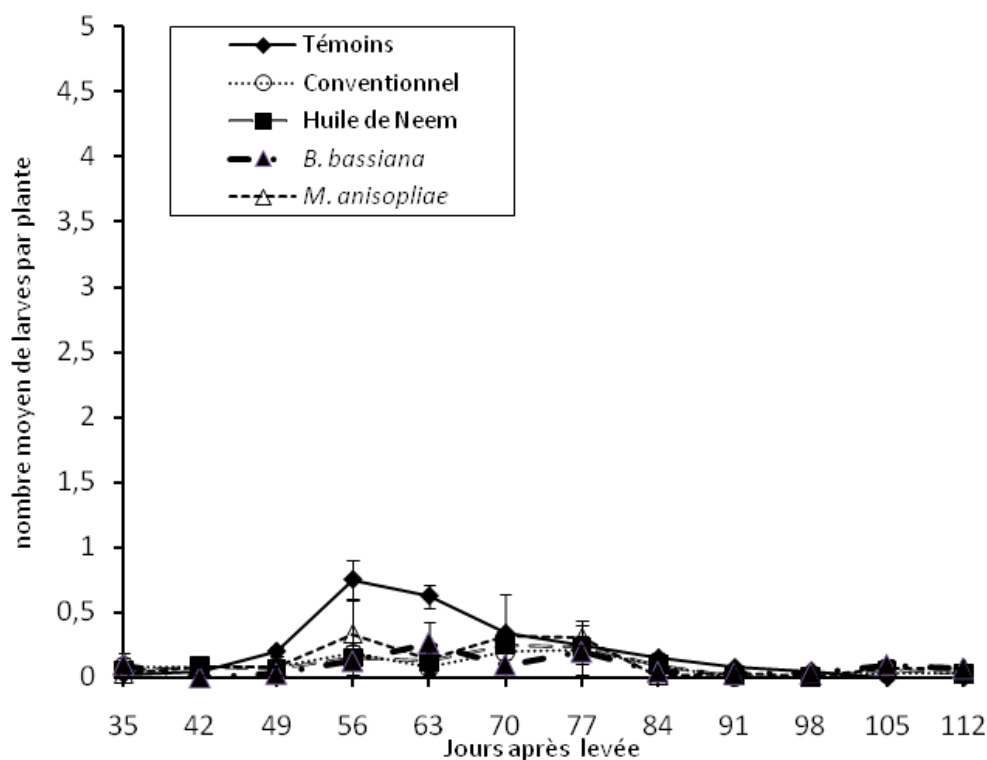


Figure 27 : Fluctuation des effectifs des autres carpophages (*Earias* spp. et *D. watersi*) dans le cotonnier sous l'influence des pesticides chimiques, biologiques et botanique en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).

4. Présence et dégâts des chenilles sur les organes fructifères en milieu semi-réel

Le pourcentage moyen de boutons floraux endommagés (piqués, pourris, troués) a varié de $9,7 \pm 1,4\%$ pour le conventionnel à $46,9 \pm 2,8 \%$ pour les parcelles non traitées, tandis que celui des capsules endommagées (piquées, pourries, trouées) a évolué de $18,3 \pm 0,7\%$ pour le conventionnel à $70,5 \pm 3,4 \%$ pour les parcelles non traitées (Tableau XIX). Le pourcentage moyen de boutons floraux et de capsules endommagés dans les parcelles traitées avec les biopesticides a été significativement supérieur à celui des parcelles traitées avec les produits chimiques ($F_{4,12} = 32,01, P < 0,0001$; $F_{4,12} = 47,01, P < 0,0001$). *M. anisopliae*, *B. bassiana* et l'huile de neem ont protégé les organes fructifères de la même manière.

Pour tous les pesticides utilisés, les organes fructifères du cotonnier ont abrité *H. armigera* et les autres carpophages de la même manière (Tableau XIX). Comparativement aux témoins, tous les pesticides utilisés ont réduit de manière significative la présence de ces larves de lépidoptères dans les organes fructifères ($F_{4,12} = 28,00 P < 0,0001$; $F_{4,12} = 20,29, P = 0,0001$; $F_{4,12} = 9,00, P = 0,0013$; $F_{4,12} = 8,09, P = 0,0021$). Cette réduction a été beaucoup plus prononcée au niveau des parcelles traitées avec les insecticides chimiques.

5. Impact des pesticides sur les ennemis naturels en milieu semi-réel

5.1. Les coccinelles

Les coccinelles ont été sensibles à tous les pesticides utilisés. Le nombre moyen de coccinelles a varié de $0,04 \pm 0,02$ par plante de cotonnier dans les parcelles traitées au *B. bassiana* à $0,21 \pm 0,03$ par plante de cotonnier dans les parcelles non traitées (Tableau XX). Le conventionnel, *B. bassiana* et l'huile de neem ont des nombres moyens de coccinelles similaires.

De façon générale, les nombres élevés de coccinelles ont été observés au 67^e JAL, date à laquelle la densité dans les parcelles traitées au *M. anisopliae* a été significativement supérieure à celle dans les parcelles traitées aux autres produits phytosanitaires ($F_{4,12} = 6,16 P = 0,0062$) (Figure 28). A la fin des observations, aucune différence significative n'a été observée entre les traitements au *Metarhizium* et les Témoins. La fluctuation des effectifs des coccinelles a été presque la même pour tous les pesticides utilisés. La diminution de densité observée au 52^e JAL serait due à l'effet des applications, car même les biopesticides chassent d'abord les insectes à cause de l'odeur du pétrole contenu dans la formulation. Aussi, le pesticide botanique est-il connu pour son effet insectifuge.

Tableau XIX : Milieu semi-réel : Effets les pesticides sur la présence des chenilles et leurs dégâts (%) sur les organes fructifères

Traitements	Boutons floraux (bf)			Capsules (cap)		
	(%)** moyens de bf endommagés	Ha* (Nb/5 bf/plante)	Autres* (Nb/5 bf/plante)	(%)** moyens de cap endommagés	Ha* (Nb/5 cap/plante)	Autres* (Nb/5 cap/plante)
Témoins	46,9±2,8 a	1,63±0,20 a	1,16 ± 0,15 a	70,5±3,4 a	1,00±0,33 a	0,53±0,13 a
Conventionnel	9,7±1,4 c	0,09±0,02 b	0,04 ± 0,01 b	18,3±0,7 c	0,04±0,02 b	0,05±0,01 b
Huile de neem	26,6±1,8 b	0,31±0,06 b	0,17 ± 0,02 b	40,6±4,5 b	0,28±0,08 b	0,16±0,04 b
<i>B. bassiana</i>	24,7± 1,2 b	0,31±0,05 b	0,17 ± 0,03 b	33,8±2,6 b	0,26±0,02 b	0,13±0,01 b
<i>M. anisopliae</i>	27,0±1,5 b	0,26±0,05 b	0,17 ± 0,03 b	41,3±2,2 b	0,21±0,08 b	0,24±0,02 ab
$F_{4,15}$ P	32,01 < 0,0001	28,00 < 0,0001	20,29 0,0001	47,01 <0,0001	9,00 0,0013	8,09 0,0021

*Nombre moyen par plante ± ES (calculé sur la base de 4 répétitions de 3 observations et sur 15 organes) ; **Taux moyens de boutons floraux ou de capsules endommagés ± ES (calculé sur la base de 4 répétitions de 3 observations et sur 15 organes) ; Ha = *H. armigera*

Les moyennes d'une même colonne suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Analyse de variance suivie de SNK).

Tableau XX : Milieu semi-réel : Effets les pesticides sur quelques ennemis naturels dans le champ

Traitements	Nombre moyen d'ennemis naturels par cotonnier		
	Coccinelles	Fourmis	Araignées
Témoins	0,21 ± 0,03 a	0,31 ± 0,01 a	0,25 ± 0,04 a
Conventionnel	0,06 ± 0,01 c	0,18 ± 0,07 a	0,13 ± 0,05 a
Huile de neem	0,04 ± 0,02 c	0,16 ± 0,07 a	0,08 ± 0,04 a
<i>B. bassiana</i>	0,04 ± 0,02 c	0,10 ± 0,03 a	0,12 ± 0,02 a
<i>M. anisopliae</i>	0,13 ± 0,02 b	0,13 ± 0,05 a	0,17 ± 0,05 a
$F_{4,15}$ P	12,21 0,0001	2,22 0,1162	2,22 0,1157

Nombre total moyen par plante ± ES (calculé sur la base de 4 répétitions de 3 observations et sur 18 plantes).

Les moyennes d'une même colonne suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Analyse de variance suivie de SNK).

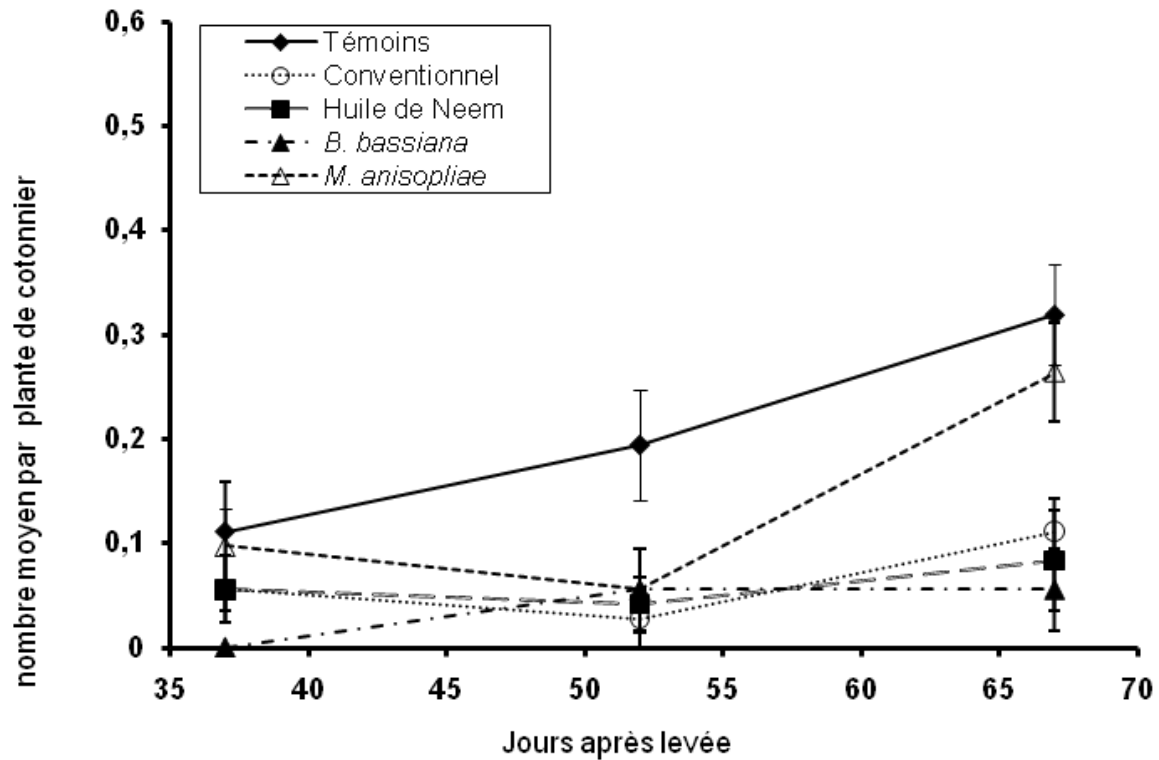


Figure 28 : Fluctuation des effectifs des coccinelles dans les parcelles expérimentales en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).

5.2. Les Fourmis

Le nombre moyen de fourmis par plante était de $0,10 \pm 0,03$, $0,13 \pm 0,05$, $0,16 \pm 0,7$ et $0,18 \pm 0,07$, $0,31 \pm 0,01$ pour, respectivement *B. bassiana*, *M. anisopliae*, l'huile de neem, le conventionnel et les Témoins (Tableau XX). La fluctuation des effectifs des fourmis a été très variable. La présence des fourmis a considérablement baissé pour le conventionnel et *B. bassiana*, tandis qu'elle s'est accrue pour l'huile de neem. Pour les traitements au *Metarhizium*, la présence des fourmis est restée presque constante (Figure 29). Malgré ces différentes fluctuations des effectifs des fourmis observées dans les parcelles traitées avec les différents pesticides utilisés, aucune différence significative au seuil de 5% n'a été observée au niveau des nombres moyens des fourmis pour toutes les observations (Tableau XX).

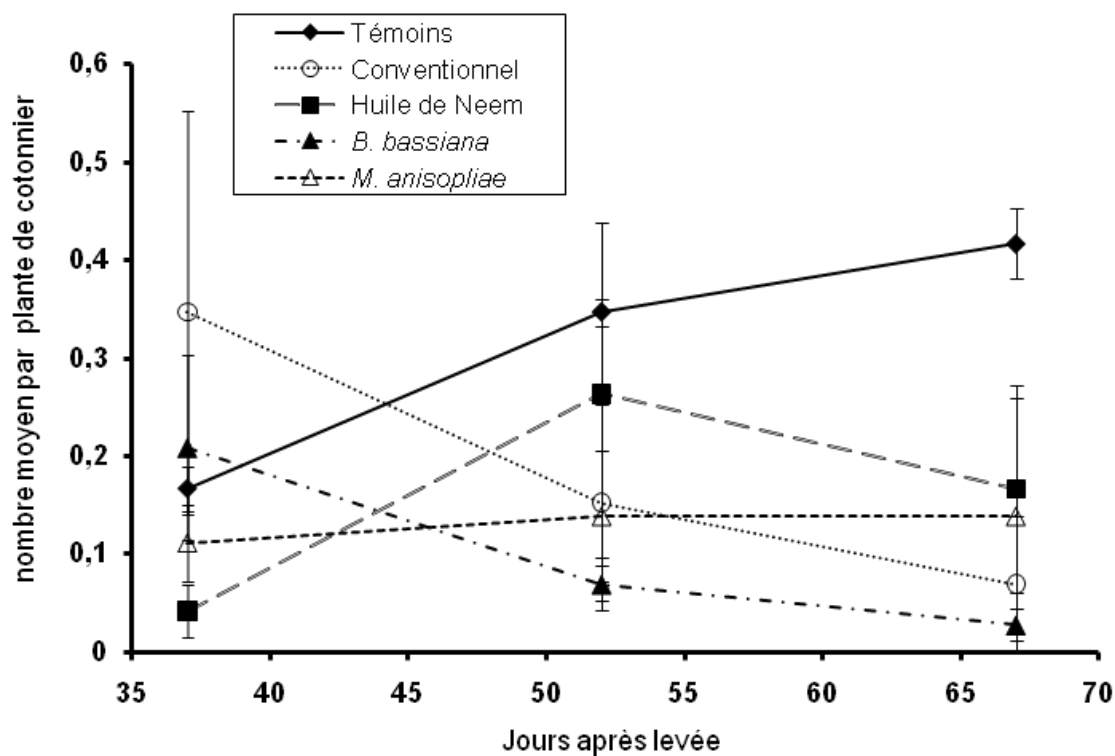


Figure 29 : Fluctuation des effectifs des fourmis dans les parcelles expérimentales en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).

5.3. Les araignées

Le nombre moyen d'araignées par cotonnier a varié de $0,08 \pm 0,04$ (huile de neem) et $0,25 \pm 0,04$ (Témoins) (Tableau XX). De manière générale, le nombre d'araignées dans toutes les parcelles traitées a augmenté du 37^e au 67^e JAL. La fluctuation des effectifs d'araignées a été presque la même pour tous les pesticides utilisés (Figure 30). Au 67^e JAL, la densité d'araignées dans les parcelles traitées au *Metarhizium* a été supérieure à celle dans les parcelles traitées aux autres produits phytosanitaires, néanmoins, aucune différence significative n'a été observée entre eux. Seuls les témoins ont abrité différemment les araignées ($F_{4,15} = 4,04$, $P = 0,0266$).

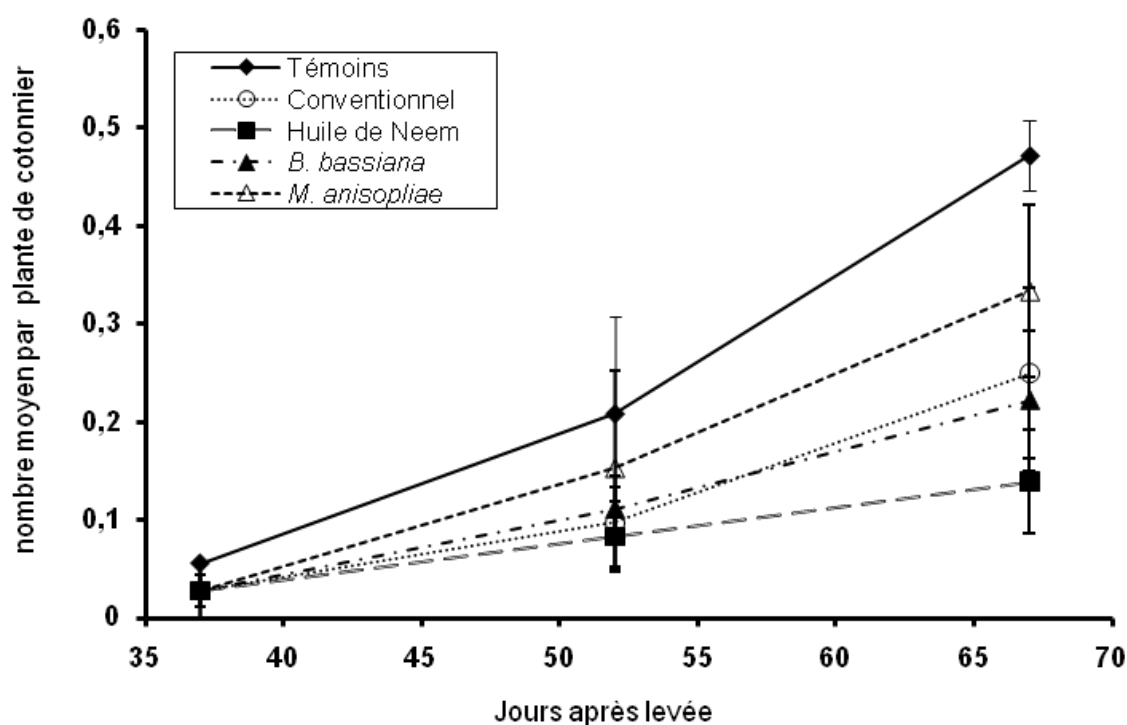


Figure 30 : Fluctuation des effectifs d'araignées dans les parcelles expérimentales en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).

6. Les rendements en milieu semi-réel

Les rendements obtenus étaient compris entre $0,14 \pm 0,03$ t/ha (Témoins) et $1,3 \pm 0,1$ t/ha (conventionnel) (Figure 31). Le rendement du conventionnel a été significativement meilleur à ceux des autres traitements ($F_{4\ 12} = 13,33$, $P = 0,0002$). Les autres pratiques ont eu des rendements similaires. Toutes les pratiques utilisées ont eu des rendements significativement différents de ceux dans les témoins.

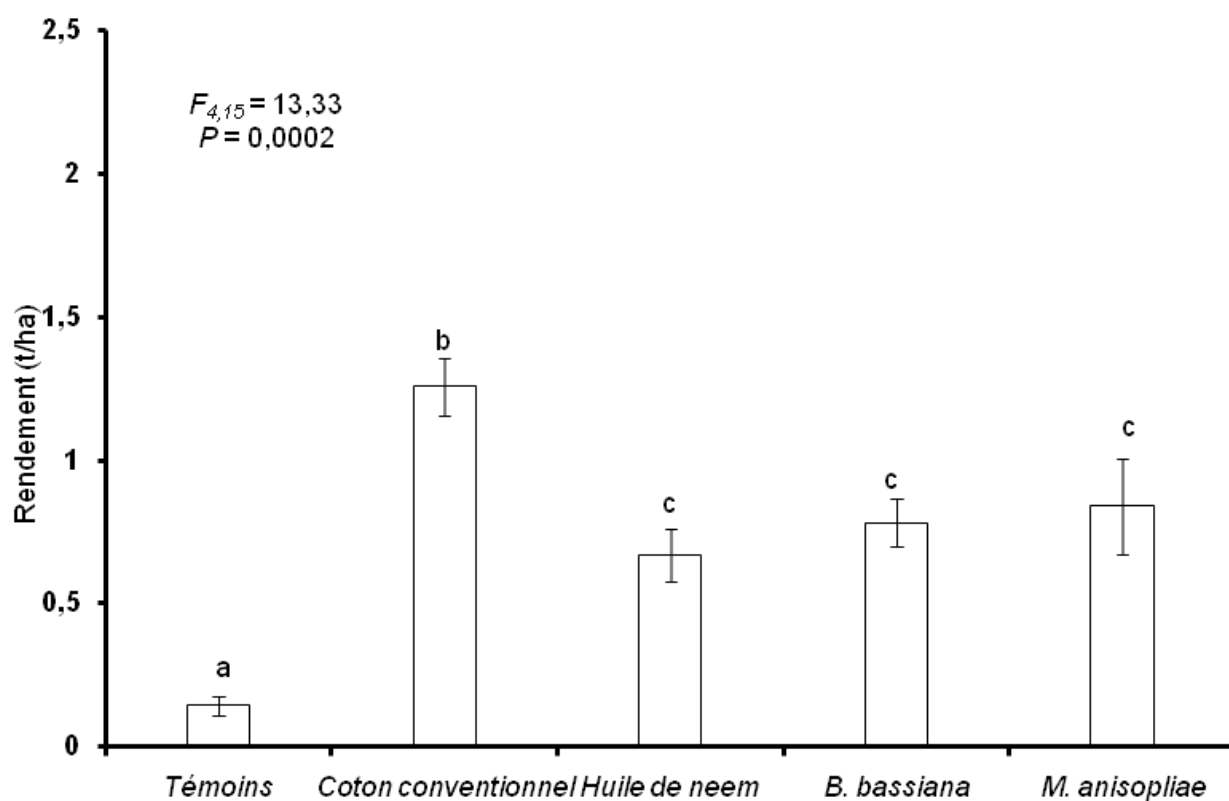


Figure 31 : Effets des traitements sur le rendement du coton en milieu semi-réel à Angaradébou (Kandi).

7. Effet des pesticides sur la population des chenilles en milieu paysan

Les effectifs totaux moyens de *Helicoverpa* observés pour toutes les observations étaient de $0,24 \pm 0,05$; $0,19 \pm 0,04$, $0,22 \pm 0,04$, $0,21 \pm 0,04$ pour le conventionnel, l'huile de neem, *B. bassiana* et *M. anisopliae*, respectivement. Tous ces effectifs sont statistiquement similaires au seuil de 5% (Tableau XXI).

Du 60^e au 80^e JAL, le tihan a mieux contrôlé le ravageur dans les parcelles du conventionnel, comparativement aux biopesticides et au pesticide botanique. Mais, par la suite, nous avons assisté à une ré-infestation des parcelles. Toute fois, tous les pesticides utilisés ont eu des effets similaires sur les populations de chenilles carpophages traitées ; aucune différence significative n'étant observée (Figure 32). Contrairement à l'observation faite à Angaradébou (Kandi) en milieu semi-réel, deux pics s'observent à Banikoara en milieu paysan, le second étant moins élevé que le premier. Pour les autres carpophages, aucun seuil n'a été atteint (0,25 autres/plant) et les différents pesticides utilisés les ont contrôlés de la même manière (Tableau XXI ; Figure 33).

Tableau XXI : Milieu paysan : Effets des différents pesticides sur le nombre moyen de chenilles par cotonnier

Traitements	Nombre moyen de chenilles par cotonnier	
	<i>H. armigera</i>	Autres carpophages (<i>Earias</i> spp., <i>D. watersi</i> , <i>P. gossypiella</i> , <i>S. littoralis</i>)
Conventionnel	0,24 ± 0,05 a	0,03 ± 0,01 a
Huile de neem	0,19 ± 0,04 a	0,03 ± 0,00 a
<i>B. bassiana</i>	0,22 ± 0,04 a	0,05 ± 0,01 a
<i>M. anisopliae</i>	0,21 ± 0,04 a	0,05 ± 0,01 a
$F_{3,16}$ P	0,02 0,9958	0,67 0,5821

Nombre moyen par plante ± ES (calculé sur la base de 5 répétitions de 11 observations et sur 30 plantes).

Les moyennes d'une même colonne suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Analyse de variance suivie de SNK).

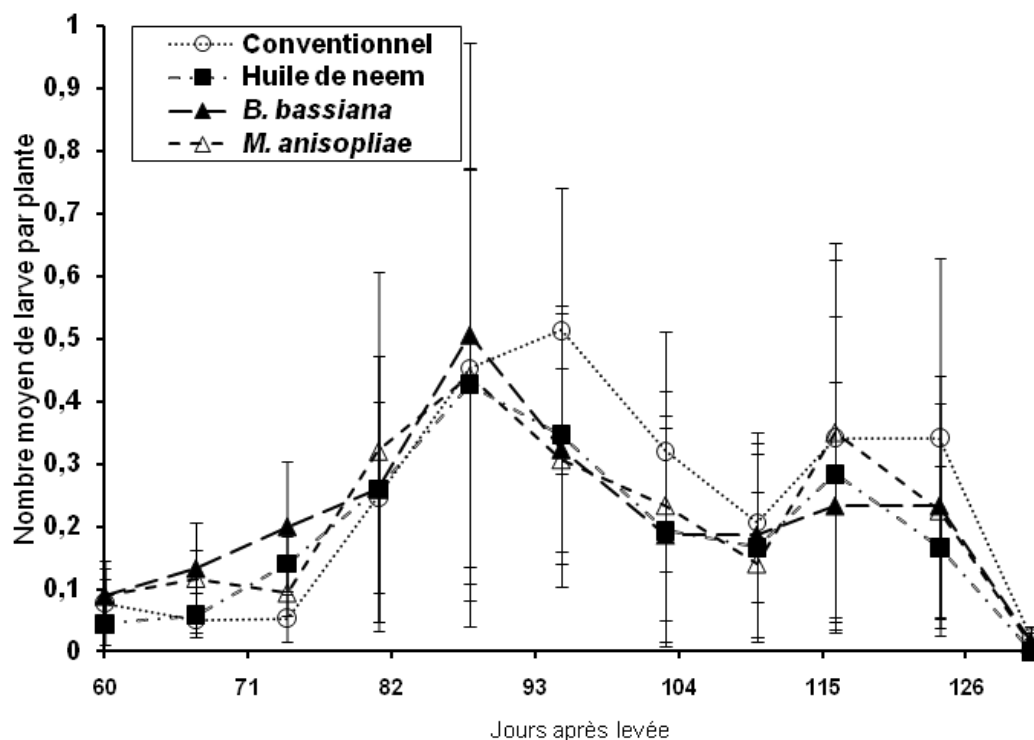


Figure 32 : Fluctuation des effectifs des chenilles de *H. armigera* sous l'influence des pesticides chimiques biologiques et botanique en milieu paysan à Banikoara.

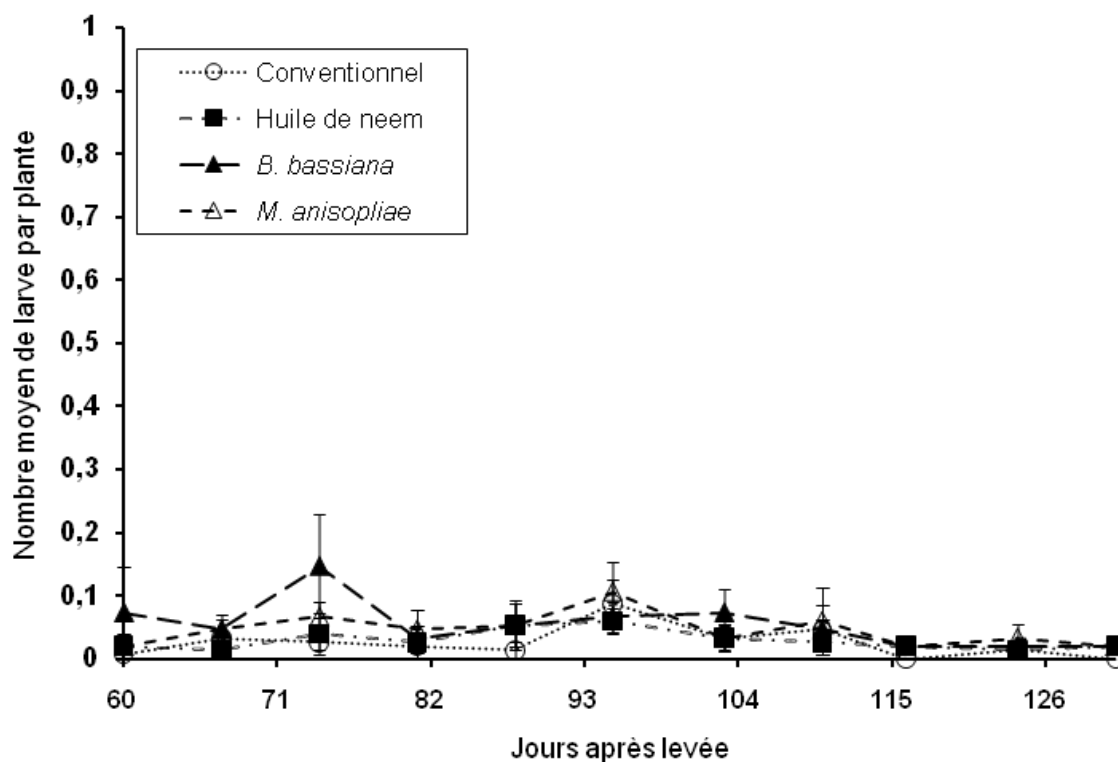


Figure 33 : Fluctuation des effectifs des autres carpophages (*Earias* sp, *D. watersi*, *P. gossypiella*, *S. littoralis*) sous l'influence des pesticides chimiques biologiques et botanique en milieu paysan à Banikoara.

8. Dégâts sur les organes fructifères en milieu paysan

D'une manière générale, pour tous les pesticides utilisés, les dégâts ont été plus importants sur les capsules que sur les boutons floraux. Ceux-ci ont varié de $5,0 \pm 2,3\%$ (huile de neem) à $9,2 \pm 3,5\%$ (*B. bassiana*) pour les boutons floraux et de $11,1 \pm 3,0\%$ (*M. anisopliae*) à $13,8 \pm 4,5\%$ pour les capsules (Tableau XXII). Cependant, aucune différence significative, au seuil de 5%, n'a été observée entre les différents traitements pour chacun des organes fructifères (Tableau XXII). Ce taux de dégâts a été plus élevé au niveau des capsules parce qu'au moment de leur formation, le pesticide tihan n'avait plus d'effet pour le conventionnel et, les biopesticides, n'étant pas systémiques, n'ont pas pu atteindre les insectes à l'intérieur des capsules.

La présence de *H. armigera* et des autres carpophages dans les boutons floraux et les capsules a été très variable (Tableau XXI). Cette présence n'est pas en relation avec les pourcentages de dommages au niveau des organes fructifères. En effet, un organe (une capsule ou un bouton floral) peut contenir une à deux, voire trois chenilles et sera considéré comme un seul organe attaqué.

Tableau XXII : Milieu paysan : Effets des traitements sur le nombre moyen de chenilles et leurs dégâts (%) sur les organes fructifères selon les pesticides.

Traitements	Boutons floraux (bf)			Capsules (cap)		
	(%)** moyens de bf endommagés	Ha* (Nb/5 bf/plante)	Autres* (Nb/5 bf/plante)	(%)** moyens de cap endommagés	Ha* (Nb/5 cap/plante)	Autres* (Nb/5 cap/plante)
Conventionnel	7,6 ± 2,0 a	0,09 ± 0,03 a	0,05 ± 0,05 a	13,8 ± 4,5 a	0,05 ± 0,04 a	0,02 ± 0,01 a
Huile de neem	5,0 ± 2,3 a	0,05 ± 0,04 a	0,04 ± 0,04 a	12,8 ± 3,6 a	0,06 ± 0,04 a	0,07 ± 0,07 a
<i>B. bassiana</i>	9,2 ± 3,5 a	0,10 ± 0,05 a	0,05 ± 0,04 a	12,6 ± 2,5 a	0,04 ± 0,02 a	0,03 ± 0,03 a
<i>M. anisopliae</i>	8,0 ± 2,1 a	0,15 ± 0,06 a	0,04 ± 0,02 a	11,1 ± 3,0 a	0,07 ± 0,04 a	0,03 ± 0,02 a
$F_{3,19}$	3,09	1,05	0,04	0,53	0,39	0,88
<i>P</i>	0,0677	0,4062	0,9893	0,6722	0,7603	0,4808

*Nombre moyen par plante ± ES (calculé sur la base de 4 répétitions de 3 observations et sur 30 organes) ; **Taux moyens de boutons floraux ou de capsules endommagés ± ES (calculé sur la base de 4 répétitions de 3 observations et sur 30 organes) ; Ha = *H. armigera*

Les moyennes d'une même colonne suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% (Analyse de variance suivie de SNK).

9. Les rendements en milieu paysan

Ils ont été de 1,6 ± 0,3 t/ha ; 1,5 ± 0,2 t/ha ; 1,7 ± 0,4 et 1,5 ± 0,3 t/ha respectivement pour respectivement le conventionnel, l'huile de neem, le *Beauveria* et le *Metarhizium*. *B. bassiana* a eu le rendement le plus élevé. Néanmoins, aucune différence significative au seuil de 5% n'a été observée (Figure 34). Ceci serait dû au taux relativement faible de dégâts observé, de manière générale au niveau des organes fructifères.

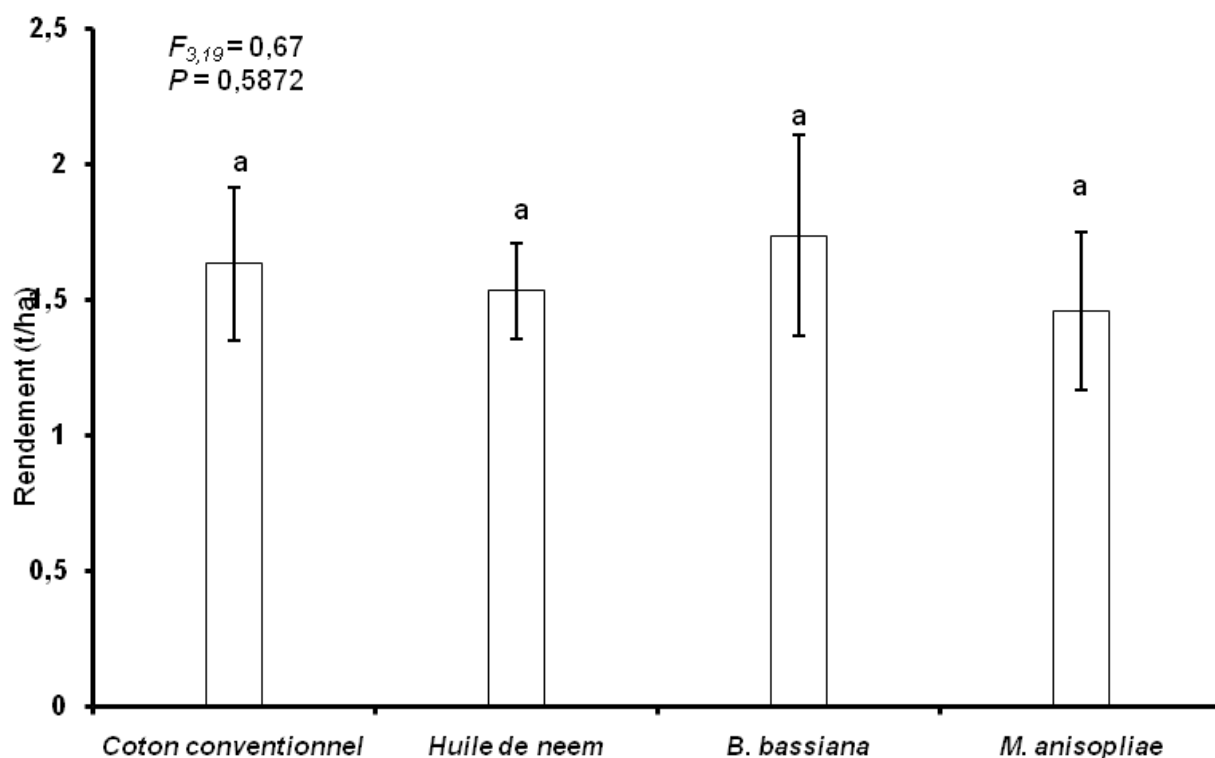


Figure 34 : Rendement du coton de chaque traitement en milieu paysan à Banikoara.

10. Discussion

Les pesticides chimiques ont réduit plus rapidement la densité des larves que les biopesticides. En effet, l'insecticide tihan, du fait de son large spectre d'action, est efficace contre les piqueurs-suceurs, les chenilles phyllophages et carpophages et les acariens (*Polyphagotarsonemus*). L'insecticide tihan, utilisé pour les deux premiers traitements, est composé de la spirotétramate (75 g/l) efficace contre les chenilles et du flubendiamide (100 g/l) efficace contre les piqueurs-suceurs. Contrairement à ces insecticides systémiques classiques, l'insecticide tihan protège les anciennes et les nouvelles feuilles, y compris celles qui n'étaient pas présentes lors de l'application. Dans les conditions d'un bon épandage, la mortalité des larves est observée 3 jours après l'application. Les biopesticides n'ont pas pu réduire de façon significative les densités de populations des principaux ravageurs du cotonnier, car, en plus de leur spécificité, ils ne sont pas systémiques. Certaines chenilles sont souvent à l'intérieur des capsules. Ceci rend difficile le contact des biopesticides avec leurs cibles. L'augmentation du nombre moyen de larves de *H. armigera* dans nos essais peut s'expliquer en partie par le dépassement du seuil de 5 larves de *H. armigera* pour 40 plants préconisé dans la Lutte Etagée Ciblée (LEC) (PADSE, 2003/2004) avant le deuxième traitement, mais aussi et surtout par la lenteur dans le mode d'action des biopesticides. La dose et le volume d'application des biopesticides pourraient aussi être à la base de cette insuffisance. Selon les producteurs, à la fructification, la marche est difficile dans le

champ de coton. Les volumes de 2 litres à l'ha utilisé pour les biopesticides et d'un litre par hectare pour l'insecte botanique deviennent insuffisants comparativement aux pesticides chimiques qui sont appliqués à un volume de 10 litres/ha permettant une bonne couverture à tout stade phénologique du cotonnier.

Pour l'ensemble des traitements effectués à base des biopesticides, le seuil d'application est de cinq larves de *H. armigera* par 40 plants. Ce seuil est contraire à celui utilisé par Nibouche *et al.* (2000) dans le cadre de leurs travaux sur la lutte étagée ciblée. Pour cette protection chimique, le seuil est respectivement moins de trois chenilles par 25 plants pour une demi-dose d'insecticide chimique et plus de trois chenilles par 25 plants pour une dose. Du fait que l'application de l'insecticide soit faite à demi-dose au seuil de moins de trois chenilles par 25 plants (donc tôt), ils ont obtenu une meilleure protection des cotonniers contre les chenilles.

Les biopesticides, à cause de leur lenteur d'action, devraient être répandus tôt (un seuil plus sévère) pour anticiper le contrôle des ravageurs et pour plus d'efficacité contre toutes les chenilles carpophages.

Dans les parcelles expérimentales, quelle que soit la nature du pesticide biologique utilisé, la densité des larves de *H. armigera* a augmenté après l'application. En effet les chutes au niveau des densités des populations larvaires de *H. armigera* ont été observées au 20^e jour après le premier traitement correspondant au 77^e JAL. Nos résultats corroborent ceux de Gowda et Prasad (1992) qui indiquent des taux d'infection de 6 à 12 % dus à *B. bassiana* sur des chenilles de *H. armigera* collectées sur le *Cajanus cajan* en Inde.

L'huile de neem contrôle mieux *Diparopsis watersi* et *Earias* spp. que les autres biopesticides utilisés. Gahukar (1988) a observé que l'effet de l'extrait des amandes de neem est comparable à celui des traitements à base de Diméthoate et de deltaméthrine dans le cadre de la lutte contre les chenilles de *H. armigera* sur les plants d'arachide. Sinzogan *et al.* 2006 rapportent que l'extrait des graines de neem permet une réduction effective des dégâts causés par les larves d'une part et un rendement élevé en coton-graine, d'autre part. Ces avantages conférés à l'huile de neem seraient liés aux propriétés insectifuges de l'azadirachtine, matière active du neem.

Ce rendement en milieu semi-réel était très faible par rapport à ce qui est signalé dans la littérature (1874 kg.ha-1) (INRAB, 1994-1999 ; 2004-2005); ceci serait dû à la pauvreté du sol de la parcelle qui nous a été affectée. En effet, c'est une parcelle qui a fait l'objet de cultures successives de coton. C'est, probablement aussi, la résultante des taux de dégâts enregistrés au niveau des organes fructifères.

Comparativement aux témoins, tous les pesticides utilisés ont montré leur efficacité à partir du 77^e JAL, laquelle efficacité s'est estompée à partir du 98^e JAL pour le conventionnel, l'effet résiduel de tihan devenant quasi nul. Au même moment, les biopesticides, dont l'application a

continué, ont pu maintenir leur efficacité.

Tous les pesticides utilisés ont agi variablement sur les différents ennemis naturels en présence dans les parcelles expérimentales. *M. anisopliae* représente le pesticide le moins nuisible aux ennemis naturels, suivi du conventionnel et de l'huile de neem. Les parcelles traitées au *B. bassiana* ont eu la plus faible densité d'ennemis naturels. En, effet *B. bassiana* est moins spécifique que *M. anisopliae* (Whitten et Oakeshott, 1991). De plus plusieurs auteurs s'accordent à dire que le genre *Beauveria* s'attaque à une gamme variée d'insectes (Greathead et Prior, 1990; Prior, 1992; Whitten et Oakeshott, 1991).

11. Conclusion

Cette étude a permis d'apprécier l'efficacité des champignons entomopathogènes *M. anisopliae* (Met 31) et *B. bassiana* (Bb 11) et de l'huile de neem sur *H. armigera* et les autres chenilles carpophages, ravageurs du cotonnier. Les résultats obtenus montrent que les différents biopesticides utilisés peuvent réduire les densités de différents ravageurs ciblés au cours de notre étude. Une application précoce (un seuil moins élevé) permettrait à ces biopesticides de mieux contrôler les chenilles ravageuses du cotonnier. Bien qu'ils ne soient pas systémiques, les biopesticides et l'huile de neem peuvent efficacement contrôler le ravageur lorsqu'ils sont appliqués à bonne date avec un volume permettant une bonne couverture.

CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE

Parmi les nombreuses espèces d'insectes qui attaquent le cotonnier, la noctuelle *H. armigera* est de loin celle qui lui inflige le plus de dégâts. L'utilisation de quantités importantes de pesticides, avec comme corollaire des problèmes environnementaux, toxicologiques et de résistance, a stimulé des études sur le développement d'alternatives telles que l'utilisation des parasitoïdes, des insecticides botaniques et des biopesticides. Les principaux objectifs de la présente étude étaient d'étudier : (i) la sensibilité de ce ravageur aux champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* en vue de sélectionner les isolats les plus performants et (ii) l'efficacité des isolats potentiels dans des parcelles expérimentales et dans les champs des producteurs de coton.

Les premières étapes de l'élaboration d'une stratégie de lutte contre les ravageurs avec des champignons entomopathogènes est soit la collecte des isolats fongiques et le criblage de leur virulence sur l'organisme nuisible ciblé, soit l'introduction et les essais avec les isolats de champignons non-autochtones, disponibles dans les unités de collection des institutions internationales de recherches comme IITA-Bénin (Milner, 1992). Dans cette étude, plusieurs isolats de *M. anisopliae* et de *B. bassiana* ont été isolés à partir de Lépidoptères infectés, plus particulièrement des noctuelles provenant du Bénin. Des isolats provenant d'autres institutions ont été également utilisés, en comparaison avec ceux du Bénin.

Toutefois, étant donné qu'un nombre limité d'isolats a été obtenu, des prospections pour les champignons entomopathogènes devraient être poursuivies. Un large éventail d'isolats fongiques augmente les chances de sélection d'un isolat hautement efficace et virulente pour les programmes de gestion des ravageurs (Brownbridge *et al.*, 1993).

Prior et Street (1997) préconisent l'utilisation de champignons entomopathogènes indigènes pour la lutte microbiologique contre les ravageurs, car ils sont souvent mieux adaptés pour survivre dans leur environnement naturel et sont donc plus susceptibles d'être efficaces. En outre, le développement d'un mycopesticide à base d'un isolat autochtone de champignon rend le processus d'homologation plus facile.

Dans la présente étude, l'évaluation au laboratoire de la sensibilité relative des stades larvaires de *H. armigera* testés à différentes doses des champignons entomopathogènes *M. anisopliae* et *B. bassiana* a montré que les pathogènes utilisés avaient des effets létaux et sous-létaux sur leurs hôtes. Considérant les effets létaux, tous les stades larvaires traités aux pathogènes ont eu un taux de mortalité significativement supérieur comparativement aux témoins avec une susceptibilité plus prononcée pour les jeunes stades. Les effets sous-létaux comprennent, entre autres, le retard dans le développement de l'hôte traité, la malformation des adultes émergés et la modification du

sex-ratio en faveur des mâles. Ces facteurs ont pour conséquence, la réduction des chances d'ovipositions et de production de descendance. La mortalité et la sporulation des chrysalides ont montré le degré de pathogénie des champignons utilisés. Certains isolats de champignon utilisés n'ont pas sporulé, ce qui les rend inutilisables comme biopesticides au champ, car, la sporulation augmente la quantité de l'inoculum dans le milieu permettant ainsi une augmentation de la mortalité au niveau de la population des insectes à travers une contamination horizontale (Thomas *et al.*, 1995 ; Langewald *et al.*, 1997; Adu-Mensah, 2002; Douro Kpindou *et al.*, 2005). Parmi les isolats de *Metarhizium* utilisés, seul l'isolat Met 31 a eu, en dehors de ses taux de mortalité et de sporulation élevés, un taux de chrysalides formées significativement plus faible comparativement à celui des non traités et des traités avec les autres isolats ; c'est pour cette raison que cet isolat a été choisi pour le reste des tests. Quant aux isolats de *Beauveria*, l'isolat Bb 11 a eu le meilleur taux de mortalité, de sporulation avec un taux plus faible de chrysalides formées et d'émergence d'adultes chez *H. armigera*. Les autres isolats de *Metarhizium* n'ont pas été choisis à cause de leur lenteur dans leur action, malgré des taux de mortalité très élevés dans les chrysalides allant jusqu'à 40% enregistrés chez ces derniers.

Le temps moyen de survie (TMS) de toutes les larves traitées aux champignons entomopathogènes a été affecté comparativement à celui des larves non traitées. Cette réduction du TMS a été beaucoup plus prononcée pour les jeunes larves.

L'évaluation de l'efficacité des différentes doses montre que la mortalité des larves de *H. armigera* est fonction du nombre de conidies reçues par celles-ci. Les deux isolats de champignon retenus ont été tous infectieux. Pour tous les stades larvaires L3 traités, les doses 10^6 et 10^7 conidies par insecte s'équivalent, montrant que 10^6 conidies.insecte⁻¹ soit 5×10^8 conidies/ml est une dose suffisante pour tuer le maximum de ce stade larvaire. A la dose la plus élevée utilisée, les résultats des expérimentations montrent une sensibilité plus importante des plus jeunes larves. En effet, des travaux de Bateman *et al.* (1996) sur les criquets ont montré que la dose était fonction du poids de l'insecte et ce même poids augmentait, toute chose étant égale par ailleurs, avec l'âge des larves. L'émergence des adultes a été affectée par les doses les plus élevées : même sous la forme chrysalide, le champignon est toujours actif, avec une nocivité plus prononcée pour les chrysalides femelles ; les mâles qui ont émergé étaient, dans la plupart des cas, des malformés. Les ailes ont été endommagées ; ce qui est un bon résultat, car le déplacement devient très difficile pour cette catégorie d'insectes. Par conséquent, les rencontres mâles femelles pour l'accouplement seront fortement réduites induisant ainsi, une réduction de la progéniture.

Lorsque le champignon est appliqué au stade plus jeune (jusqu'au L3), l'oviposition devient incertaine pour les adultes femelles qui émergent. Les adultes issus des L4 qui ont survécu après

l'application du biopesticide ont pondu après accouplement. Ceci est dû, probablement, au fait que le champignon n'ait pas pu se multiplier à temps. En effet, de la pénétration des conidies dans la cuticule de l'insecte à sa mort, une semaine peut s'écouler (Lomer *et al.*, 1999). Ce temps n'est probablement pas suffisant pour permettre aux champignons de se développer dans le corps des chenilles traitées, particulièrement quand l'intervalle de temps entre les mues successives est court (Gindin *et al.*, 2001); cette période est d'environ 6 jours entre le 4^e stade et l'adulte à 25°C (IPM, 2000), laquelle température est proche de celle de notre expérimentation (26 ±1°C).

Le modèle de régression Cox prenant en compte les effets de temps et de dose est plus approprié pour évaluer l'efficacité d'un microbe pathogène (car le temps et la vitesse de mortalité sont une fonction du nombre de conidies reçues). Ce modèle a permis de modéliser des liens existant dans le système temps-dose-survie des isolats fongiques infectant les larves de *H. armigera* dans nos expérimentations. Ainsi, le temps mis pour tuer un insecte d'un même stade larvaire est fonction de la dose. De la même manière, à un temps donné, la dose à appliquer est fonction du stade larvaire : plus le stade est évolué, plus la quantité de conidies à appliquer sera plus élevée. En général, l'efficacité des champignons entomopathogènes varie avec des isolats fongiques et les stades de développement de l'hôte et la cuticule d'insecte peut être un facteur de résistance important aux infections fongiques (Vey et Fargues, 1977; Alavo *et al.*, 2002).

Il est donc nécessaire de faire des applications de ce genre de biopesticide de manière précoce sur les jeunes larves (L2 - L3).

L'expérimentation mise en place dans la parcelle expérimentale en station, nous a permis de comprendre ce qui se passe lors des applications des pesticides au champ. On assiste à une diminution drastique du nombre de gouttelettes de la ligne d'application (ligne de passe) vers les autres lignes. Cette diminution est suivie de celle des gouttelettes atteignant la cible. Ainsi, le taux de mortalité des larves décroît, avec la distance. Pour ce cas précis, ce taux a varié de 73% (ligne de passe) à 50% à la 6^e ligne (environ 5 m). Il est alors important de ne pas laisser plus de 6 lignes entre les passes lorsque l'appareil ULVA-plus est utilisé. Quant aux paysans, ils laissent 3 lignes entre les passes, parce qu'ils utilisent des formulations aqueuses avec des gouttelettes plus grosses et une portée moindre (Bateman, 1993). L'avantage des biopesticides à base de champignons entomopathogènes est le processus de rémanence. La contamination des insectes par le sol et la végétation après une application de formulation huileuse à base de champignons entomopathogènes est un facteur important de mortalité (Thomas *et al.*, 1995). De plus, la vitesse de mortalité des insectes traités aux champignons entomopathogènes est fonction du nombre de conidies reçues (Bateman *et al.*, 1998). Par conséquent, une application uniforme permettrait d'optimiser l'efficacité du biopesticide. Cet essai dans la parcelle expérimentale,

avant celui dans le milieu paysan, a permis également d'appréhender la différence de mortalité que l'on pourrait enregistrer entre les travaux au laboratoire avec des quantités précises de conidies inoculées aux larves et celles reçues par les larves au champ (une probabilité moins élevée).

Les isolats de biopesticides testés dans la parcelle expérimentale en station ont été comparés à l'huile de neem et aux pesticides chimiques utilisés pour le coton conventionnel en milieu semi-réel (parcelles d'expérimentation du Programme National) et en milieux paysans.

Dans l'ensemble, les différents biopesticides utilisés au champ ont révélé des potentialités pour une réduction significative des densités de différents ravageurs ciblés au cours de cette étude, et ceci sur les différentes parcelles d'expérimentation du cotonnier surtout en milieu paysan. La période d'apparition de ce ravageur est une période à température relativement basse avec une forte humidité, également propice pour le développement des champignons entomopathogènes (Gillespie, 1988).

Dans les parcelles expérimentales du milieu semi-réel, l'augmentation du nombre moyen de larves de *H. armigera* dans nos essais en milieu semi-réel peut s'expliquer, en partie, par le dépassement du seuil de 5 larves de *H. armigera* pour 40 plants préconisés dans la Lutte Etagée Ciblée (LEC) (PADSE, 2003/2004) avant le deuxième traitement. Plusieurs études ont été faites dans le cadre de l'établissement de différents seuils basés sur la densité de *H. armigera* au champ. Ces seuils concernent l'estimation du nombre d'œufs déposés par la femelle ou encore le nombre de chenilles dans différents organes de la plante (Matthews et Tunstall, 1968). Kabissa *et al.* (1989) ont observé que les traitements sur seuil permettaient de réduire considérablement le nombre d'applications d'insecticides chimiques. Les biopesticides, à cause de leur lenteur d'action, devraient être répandus tôt (à un seuil plus sévère) pour anticiper les ravages et les rendre plus efficace contre toutes les chenilles carpophages. Cette lenteur pourrait s'expliquer, en partie, par l'efficacité négative enregistrée, au début des observations, pour tous les biopesticides utilisés. Au champ, tous les pesticides sont pulvérisés sur les feuilles et ne peuvent entrer en contact direct avec toutes les larves puisque celles-ci sont, souvent, à l'intérieur des capsules. Les biopesticides n'étant pas systémiques, un volume d'application plus important serait indispensable au stade de fructification du cotonnier pour une meilleure couverture, un meilleur effet de rémanence. Aussi, à ce stade végétatif de la plante, le déplacement à l'intérieur du champ de cotonnier devient-il difficile ; alors, le volume utilisé est devenu insuffisant pour couvrir toute la parcelle à traiter. Ceci explique également le contrôle modéré des autres chenilles carpophages (*Earias* sp. et *D. watersi*) par les biopesticides.

Les pesticides chimiques ont réduit plus rapidement la densité des larves que les biopesticides en

milieu semi-réel. En effet, l'insecticide Tihan, du fait de son large spectre d'action est efficace contre les piqueurs-suceurs, les chenilles phyllophages et carpophages et les acariens.

L'huile de neem a mieux contrôlé *Diparopsis watersi* et *Earias* sp que les autres biopesticides utilisés. Gahukar (1988) a observé que l'effet de l'extrait des amandes de neem est comparable à celui des traitements à base de Diméthoate et de deltaméthrine dans le cadre de la lutte contre les chenilles de *H. armigera* sur les plants d'arachide. Sinzogan *et al.* (2006) rapportent que l'extrait des graines de neem permet une réduction effective des dégâts causés par les larves d'une part et un rendement élevé en coton-graine, d'autre part. Ces avantages conférés à l'huile de neem seraient liés aux propriétés insectifuges de l'azadirachtine, matière active du neem. Bah Sacca (2008), a montré qu'après l'utilisation d'extraits aqueux de *Annona squamosa* L. (Annonaceae), de *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) et de *Vernonia* sp. (Asteraceae), une meilleure protection contre les principaux ravageurs du coton, en particulier les chenilles de *H. armigera*, *Sylepta. derogata*, *Earias insulana* et *Dysdercus vöelkeri* était assurée par rapport aux insecticides classiques. Le même auteur montre que les trois extraits de plantes ont réduit très sensiblement les densités des ennemis naturels, avec un moindre effet pour l'extrait aqueux de *O. gratissimum*.

Tous les pesticides utilisés ont agi variablement sur les différents ennemis naturels en présence dans les parcelles expérimentales. Les fourmis ont été les plus touchées par les traitements aux produits chimiques. *M. anisopliae* représente le biopesticide le moins nuisible aux ennemis naturels, suivi de *B. bassiana* eu égard au nombre d'ennemis naturels obtenus dans les parcelles non traitées.

Par ailleurs, l'effet des biopesticides sur les ennemis naturels n'est peut-être pas dû à leurs matières actives, mais plutôt au solvant (pétrole) qui se trouve dans les formulations. Cet effet des solvants se dissipe très rapidement et les ennemis naturels recolonisent les espaces traités.

Comparativement au milieu semi-réel, les biopesticides, en milieu paysan, ont permis de maintenir les taux de dégâts des organes fructifères à un niveau relativement bas démontrant ainsi leur efficacité. En effet, contrairement au milieu semi-réel où le volume a été rigoureusement respecté (même à la fructification où la marche a été difficile) les quantités d'application ont été toujours complétées par les producteurs à chaque fois qu'il en manquait. Donc, en milieu paysan la couverture des parcelles a été toujours complète avec des volumes d'application plus élevés que prévus. Ceci pourrait expliquer, en parti, les faibles taux de dégâts enregistrés au niveau des organes fructifères et par conséquents les rendements élevés observés pour ce milieu.

CONCLUSION

Nous pouvons conclure que les deux isolats de champignons entomopathogènes *B. bassiana* (Bb 11) et *M. anisopliae* (Met 31) sélectionnés et testés ont des potentialités pour être utilisés dans la gestion du ravageur redoutable, qu'est la noctuelle *H. armigera*.

Parmi ces deux isolats, celui de *Metarhizium* est le plus spécifique pour ce ravageur redoutable du cotonnier. Les jeunes larves étant toujours plus vulnérables, il est important d'appliquer les biopesticides plus tôt à un seuil moins que 5 larves par cotonnier recommandé par le Centre de Recherche Coton et Fibre (CRA-CF) de l'Institut national des Recherches Agricoles du Bénin (INRAB). On peut également conclure que les pesticides biologiques ne serviront pas comme la seule alternative pour contrôler les carpophages du cotonnier, en particulier *H. armigera*, mais pourraient devenir une composante d'une stratégie de lutte intégrée contre les ravageurs du cotonnier dans laquelle on combinera les pesticides microbiologiques, les pesticides botaniques, les ennemis naturels.

PERSPECTIVES

Plus de recherches sur l'amélioration des méthodes d'application est nécessaire. A l'avenir, la conception des études et la méthodologie des expérimentations sur le terrain devront être optimisées. En outre, ces essais doivent être répétés sur une longue période, en utilisant différents isolats de *M. anisopliae* et de *B. bassiana* et différentes méthodes d'application qui pourraient déclencher des épizooties à un coût raisonnable.

Ainsi, l'élevage du ravageur au laboratoire doit être poursuivi afin de conduire des tests biologiques avec d'autres isolats de champignons entomopathogènes.

Il faudra par la suite, procéder à:

- 1 des études sur la détermination des doses et des volumes d'application efficaces et efficients ;
- 2 des tests sur les stades larvaires plus jeunes (L1 et L2) afin d'empêcher leur développement en L3 et L4; ce qui limiterait le niveau des dégâts ;
- 3 des tests sur les effets de doses avec l'isolat Bb 11 sur le 3^e stade larvaire de *H. armigera* qui n'ont pu être effectués ; ceci permettrait de déterminer la DL50 ;
- 4 des tests toxicologiques et éco-toxicologiques afin de préserver la santé humaine, animale et environnementale.
- 5 Evaluation des propriétés fongiques telles que la capacité de production des spores, la germination et la croissance des hyphes et les effets des variations des conditions environnementales qui influencent la persistance de ces isolats.
- 6 des tests avec d'autres formulations comme les formulations émulsifiantes pouvant se mélanger à l'eau afin de minimiser les effets de pollution ;
- 7 l'évaluation l'impact de l'application des entomopathogènes dans nos sols, au niveau des eaux de surface et de la nappe fréatique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott W. S. (1925).** A method for computing the effectiveness of an insecticide *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Abdel-Razek A. S., Abbas M. H., M El-Khouly & Abdel-Rahman A. (2006).** Potential of microbial control of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) on two cabbage cultivars under different fertilization treatments. *Journal of Applied Science Research*, 2: 942–948.
- Abebe H. (2002).** Potential of entomopathogenic fungi for the control of *Macrotermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae). Thèse de Doctorat: Université de Hannovre (Allemagne), 162 p.
- Adu-Mensah J. (2002).** Primary and secondary uptake of conidia of entomopathogenic fungi and the effect of oxybenzone as a chemical sunlight protector. *Ghana Journal Science*, 42 : 3-10.
- AFPP (Association Française de Protection des Plantes) (1993).** Ravageurs et auxiliaires : 3ème Conférence internationale sur les Ravageurs en agriculture. (03; 1993/12/07-09; Montpellier (FRA)) / Paris [FRA]
<http://www.afpp.net/apps/accueil/autodefault.asp?d=5155>.
- Agbodjinou A. T. E. (2002).** Impact de semis précoce sur le rendement du cotonnier dans les départements du Centre et du Sud Bénin. Lycée Agricole Mèdji de Sékou T.F.E. 38p.
- AIC (Association Interprofessionnelle du Coton), (2002).** Séminaire atelier sur le programme de lutte intégrée contre les ravageurs du cotonnier au Bénin. Bohicon, les 19 et 20 août. 87p.
- Alaux T. (1994).** Prévention de la résistance aux pyréthrynoïdes chez *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera, Noctuidae), en Côte d'Ivoire. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, Spécialité Agrochimie. 166p.
- Alavo T. B. C, Sermann H. & Bochow H. (2002).** Biocontrol of aphids using *Verticillium lecanii* in greenhouse: Factors reducing the effectiveness of the entomopathogenic fungus. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 34: 407-424.
- Amevoin K. (1998).** Activités reproductrices et réponses comportementales de *Dinarmus basalis* Rond. et *Eupelmus vuilleti* Craw. en présence de leur hôte *Callosobruchus maculatus* F. en zone guinéenne au Togo. Thèse de Doctorat, Université du Bénin, Lomé, 160 p.
- Andreadis T. G. (1987).** Horizontal transmission of *Nosema pyrausta* (Microsporidia: Nosematidae) in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Environmental Entomology*, 16: 1124-1129.

- Arata T. A., Roberts D. W., Shadduck J. A., & Shope R. E. (1978).** Public health considerations for the use of viruses to control vectors of human diseases, in *Viruses and Environment*, Kurstak, E. and Maramorosch, K., Eds., *Academic Press*, New York, 593.
- Atger P. (1969).** Observations sur la polyhédrose nucléaire d'*Héliothis armigera* au Tchad. *Cotons et fibres tropicales*, 24 : 243 – 244.
- Bah Sacca O. (2008).** Etude de l'efficacité d'insecticides chimiques et biologiques sur les principaux ravageurs du cotonnier (*Gossypium hirsutum*) dans la commune de Ouaké. Thèse de fin d'études Thèse d'Ingénieur Agronome. Faculté d'Agronomie, Université de Parakou, Bénin, 95 p.
- Balfour-Browne F. L. (1960).** The green muscardine disease of insects, with special reference to an epidemic in a swarm of locusts in Eritrea. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London (A)* 35: 65-74.
- Bao L. L. & Yendol W. G. (1971).** Infection of the eastern subterranean termite, *Reticulitermes flavipes* Kollar with the fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin *Entomophaga* 16: 342-352.
- Bateman R. P. & Thomas M. (1996).** Pathogen application against locusts and grasshoppers: insecticide or biological control? *Antenna*, 20: 10-15.
- Bateman R. P. (1993).** Simple, standardised methods for recording droplet measurements and estimation of deposits from controlled droplet applications. *Crop Protection*, 12: 201-206.
- Bateman R. P., Carey M., Batt D., Prior C., Abraham Y., Moore D., Jenkins N. & Fenlon J. (1996).** Screening for virulent isolates of entomopathogenic fungi against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Biocontrol Science Technology*, 6: 549 – 560
- Bateman R. P. (1997).** Methods of application of microbial pesticide formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 171: 69-81.
- Bateman R. P. (1998).** Green Muscle Handbook for Central and Southern Africa. Biological Control Products SA (Pty) Limited, South Africa, 12p.
- Bateman R. P., Douro-Kpindu O. K., Kooyman C., Lomer C. & Oambama Z. (1998).** Some observations on the dose transfer of mycoinsecticide sprays to desert locusts. *Crop Protection*, 17 (2): 151-158.
- Benbrook C. M. (2003).** GMOs, "Pesticide Use, and Alternatives Lessons from U.S. Experience," Delivered at the Conference on GMOs and Agriculture, Paris, France, June 20, 2003 : http://www.biotech-info.net/lessons_learned.pdf. 18p.

- Benedict J. H., Leight T. F. & Hyer H. A. (1983).** *Lygus hesperus* (Heteroptera; Miridae) oviposition behavior, growth and survival in relation to cotton trichomes. *Environmental Entomology*, 12: 331-335.
- Berg H. & Cock M. (1993).** Exclusion cage studies on the impact of predation on *Helicoverpa armigera* in cotton, *Biocontrol Science Technology*, 3(4):491-497.
- Berg H. & Cock M. (1995).** Natural control of *Helicoverpa armigera* in cotton : assessment of the role of predation. *Biocontrol Science Technology*, 5: 453-463.
- Berg H., Cock M. & Oduor G. I. (1997).** Natural control of *Helicoverpa armigera* in sunflower : assessment of the role of predation. *Biocontrol Science Technology*, 7: 613-629.
- Bhatnagar V. S., Lateef S. S., Sithanantham S., Pawar C. S. & Reed W. (1982).** Research on *Heliothis* at ICRISAT. In Reed W. (éd.) Proceedings of the international workshop on *Heliothis* management, ICRISAT, Patancheru, Inde, 385-396.
- Bidochka M. J. & Khachatourians G. G. (1990).** Identification of *Beauveria bassiana* extracellular protease as a virulence factor in pathogenicity toward the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 56 : 362-370.
- Boisclair J., Pelletier F., Richard G. & Lucas E. (2010).** Utilisation d'insectes prédateurs pour lutter contre les pucerons dans le poivron. Fiche technique. 1p.
<http://www.agrireseau.qc.ca/agriculturebiologique/documents/INSECTPRED.pdf>.
- Boivin G. (2001).** Parasitoïdes et lutte biologique: Paradigme ou panacée ? Revue en sciences de l'environnement sur le WEB, (2) 2.
- Bournier J. P. & Peyrelongue J. Y. (1973).** Introduction, élevage et lâchers de *Trichogramma brasiliensis* Ashm. (Hym Chalcididae) en vue de lutter contre *Heliothis armigera* Hbn. (Lep. Noctuidae) à Madagascar. *Coton et fibres tropicales*, 28 : 231-236.
- Brader-Breukell M. (1970).** Facteurs de reproduction chez *Heliothis armigera* (Hbn) et *Diparopsis watersi* (Roths). *Coton et fibres tropicales*, 25:509-511.
- Braun L. A., Ewen B. & Gillot C. (1988).** The life cycle and ultrastructure of *Melameba locustae* (King and Taylor) (Amoebidae) in the migratory grasshopper *Melanoplus sanguinipes* (F.) (Acrididae). *Canadian Entomologist*, 120 : 759-772.
- Breniere J. (1981).** La lutte intégrée contre les ravageurs des cultures vivrières tropicales. *Agronomie Tropicale* 36 (1) : 78-81
- Brownbridge M., Humber R. A., Parker B. L., & Skinner M. (1993).** Fungal entomopathogens recovered from Vermont forest soils. *Mycologia*, 85: 358-361.
- Burge M. N. (1988).** The scope of fungi in biological control. Pp. 1-8 in M. N. Burge, ed. Fungi in biological Control Systems. Manchester University Press, Manchester and New York.

- Burges H. D. (1981).** Microbial control of pests and diseases 1970-1980. Academic Press. New York. p. 949.
- CABI & OEPP. (2003).** Fiche informative sur les organismes de quarantaine : *Helicoverpa armigera*. CABI Compendium. (2007). *Crop Protection*.
<http://archives.eppo.org/EPPORreporting/2006/Rsf-0608.pdf>. 24p.
- CABI (2007).** Compendium. *Crop Protection*.
- Canning E. U. (1982).** An evaluation of protozoal characteristics in relation to biological control pests. *Parasitology*, 84 : 119-49.
- Carruthers R. I. & Soper R. S. (1987).** Fungal diseases. In: Fuxa, J. R. and Tanada, Y. (eds), *Epizootiology of Insect Diseases*. Wiley-Interscience, New York, pp. 357-416.
- Cauquil J. (1990).** Nouveaux développements dans la protection contre les ravageurs en Afrique francophone au sud du Sahara. *Coton et Fibres Tropicales*, 65 (1): 45-48
- Cauquil J. (1993).** Maladies et ravageurs du cotonnier en Afrique au sud du Sahara. 2ème édition (CIRAD-CA), 92 p.
- Cauquil S. J. (1986).** Maladies et Ravageurs du cotonnier en Afrique au Sud du Sahara. Supplément à la revue « *Cotons et fibres tropicales* », 40 : 187-194.
- Chamberlain D. J, Brown N. J., Jones O. T & Casagrande E. (2000).** Field evaluation of a slow release pheromone formulation to control the American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Pakistan. *Bulletin of Entomological Research*, 90:183 – 190.
- Cherry A., Jenkins N., Hevief G., Bateman R. P. & Lomer C. (1999.)** A West African pilot scale production plant for aerial conidia of *Metarhizium* sp for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science Technology*, 9: 35-51.
- Chitwood B.G. (1957).** Phylum name. Reprinted from Systematic Zoology in Nematology Newsletter 4(45):1619 (Dec. 1999, Rev: 03/23/2007).
- Clark T. B., Kellen W. R., Fukuda T. & Lindegren J. E. (1968).** Field and Laboratory studies of pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11-17.
- CNUCED (2008).** La culture du Coton.
<http://www.unctad.org/infocomm/francais/coton/culture.htm>., (12/07/10).
- Coaker T. H. (1959).** Investigations on *Heliothis armigera* (Hübner) in Uganda. *Bulletin of Entomological Research*, 50: 487-506.
- Coates B. S., Hellmich R. L. & Lewis L. C. (2002).** Allelic variation of a *Beauveria bassiana* (Ascomycotina: Hyphocreales) minisatellite is independent of host range and geographic origin. *Genome*, 45 (1):125-132.

- Coulibaly A., Samoura M., Diarra S., Jago N.D. & Ratnadass A. (2004).** In : Symposium malien sur les sciences appliquées = Mali Symposium on Applied Sciences, Bamako, 2 au 5 août 2004. s.l. : s.n., 1 p. Symposium malien sur les sciences appliquées, 2004-08-02/2004-08-05, Bamako, Mali.
- CTA (2008).** Les caractéristiques de la lutte intégrée. Fiche technique 08/2.
http://www.anancy.net/documents/file_fr/RRRP_08-2_IPM_French.pdf
- Cuadra R., Cruz X. & Fajardo J. L. (2000).** The use of short cycle crops as trap crops for the control of root-knot nematodes. *Nematropica*, 30 : 241-246.
- Delattre R. (1973).** Parasites et maladies en culture cotonnière. IRCT éd., Paris, France, 146p.
- Delvare G. & Aberlenc P. (1989).** Les insectes d'Afriques et d'Amérique tropicale. Clés pour la reconnaissance des familles. PRIFAS, CIRAD édition. 304p.
- Dempster J. P. (1963).** The population dynamics of grasshoppers and locusts. *Biology. Reviews*, 38 : 490-529.
- Dent D. R. (1991).** Insect pest management, ed. CAB International, UK.v Debach, P. et B. Barlett 1951. Effects of insecticides on biological control of insect pest of citrus. *Journal of Economic Entomology*, 44 : 372-383.
- Devauchelle G. (1993).** Les baculovirus des insectes intérêt et perspectives. La lutte biologique. Dossier de la Cellule environnement de l'INRA, 5 : 97-101.
- Diedhiou M. L. (1987).** Analyse critique du point de vue statistique des différents protocoles expérimentaux des essais mis en place au Centre de Recherche Agricole (C.R.A.) de Djibelor (Sénégal) au cours de campagne agricole 1986. Rapport de titularisation.
<http://www.sist.sn/gsd/collect/publi/index/assoc/HASH015c/10a8dff9.dir/doc.pdf>, 150p
- Djihinto A. C., Katary A., Prudent P. Vassal J. & Vaissayre M. (2009).** Variation in Resistance to Pyrethroids in *Helicoverpa armigera* from Benin Republic, West Africa. *Journal of Economic Entomology* 102(5): 1928-1934. doi: 10.1603/029.102.0525.
- Doberski J. W. (1981).** 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.
- Douro Kpindou O. K., Gbongboui C., Badou R., Paa-Kwessi E., Ackonor J. B. & Langewald J. (2005).** Optimisation de l'application du *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* sur le criquet puant, *Zonocerus variegatus* (Orthoptera: Pyrgomorphidae). *International Journal of Tropical Insect Science*, 25(4): 251-258.

- Douro-Kpindou O. K., Godonou I., Houssou A., Lomer C. J. & Shah P. A. (1995).** Control of *Zonocerus variegatus* with ULV formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology*, 5: 131 - 139.
- Douro-Kpindou O. K., Shah P. A., Langewald J., Lomer C. J., van der Pau H., Sidibé A. & Daffé, C.O. (1997).** Essais sur l'utilisation d'un biopesticide (*Metarhizium flavoviride*) pour le contrôle des sauteriaux au Mali de 1992 à 1994. *Journal of Applied Entomology*, 121: 285-291.
- Duraimurugan P. & Regupathy A. (2005).** Joint action of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and synthetic pyrethroids against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera). *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 3 (3&4): 65-67.
- Eggleton P, Gaston KJ (1990)** "Parasitoid" species and assemblages: convenient definitions or misleading compromises? *Oikos* 59: 417- 421.
- 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.
- Faria M. & Wraight S. P. (2001).** Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection*. 20: 767-778.
- Faulkner P. & Boucias D. G. (1985).** Genetic improvement of insect pathogens: emphasis on the use of baculoviruses. In: Hoy, M. A. and Herzog, D. C. (eds), *Biological Control in Agricultural IPM systems* (pp. 263-281). Orlando, FL: Academic Press.
- Feng M. G., Proprawski T. P. & Khachatourian G. G. (1994).** Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: Current Status. *Biocontrol Science and Technology*, 4: 3-34.
- Ferron P. (1978).** Biological control of insect pests by entomopathogenous fungi. *Annual Review of Entomology*, 23: 409-442.
- Ferron P (1985).** Fungal control. In: Kerkut, G.A. and Gilbert, L.I.,Eds. *Comparative insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Oxford, Pergamon press, pp.313-346.
- Fitt G. P. (1989).** The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. *Annual Review of Entomology*, 34: 17-52.
- Franz J. M. (1971).** Influence of environment and modern trends in crop management on microbial control. In: Burgess, H. D. and Hussey, N. W. (eds), *Microbial control of Insects and Mites*. Academic Press, London, pp. 407-444.
- Fraival A., Fèvre E., Coutin, R., Minost C. & Laporte, V. (1997)** HYPPZ, Encyclopédie des ravageurs européens, <http://www.inra.fr/hyppz/>

- Gahukar R. T. (1988).** Use of neem (*Azadirachta indica*) extracts in the control of insects pests of groundnut. *Insect Science and its application*, G 5: 639-640.
- Gardner W. A., Sutton M. R. & Noblet R. (1977).** Persistence of *Beauveria bassiana*, *Nomuraea necatrix* on soybean foliage. *Environmental Entomology*, 6: 616-618.
- Gaugler R. L. & Lashomb J. (1989).** Stability and efficacy of *Beauveria bassiana* soil inoculations. *Environmental Entomology*, 18: 412-418.
- Gauld I. & Bolton B. (1988).** The hymenoptera. British Museum, 332 pp
- Gillespie A. T. (1988).** Use of fungi to control pest of agricultural importance, pp37-60. In Burge, M. N. Fungi in biological control Systems. *Manchester*, 269p.
- Gilloot C. (1980).** Entomology. Plenum press, N. Y. and London, 729p.
- Gindin G., Samish M., Alekseev E. & Glazer I. (2001).** The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic. *Biocontrol Science and Technology* 11: 111-118.
- Girling D. J. (1992).** Principes et application de la lutte biologique in Manuel de lutte biologique; Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, 217p.
- Glitho I. A. (1990).** Les Bruchidae ravageurs de *Vigna unguiculata* Walp. en zone guinéenne. Analyse de la diapause reproductrice chez les mâles de *Bruchidius atrolineatus* Pic. Thèse de Doctorat ès Science, Univ., Tours, 100 p.
- Glitho I. A. & Monge J. P. (1992),** Biologie des populations des Coléoptères Bruchidae ravageurs des légumineuses alimentaires au Togo. Rapport Projet Campus, Université du Bénin et de Tours, 25 p.
- Godonou I., James B., Atcha-Ahowe C., Vodouhe S., Kooyman C., Ahanchede A. & Korie S. (2009).** Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection*, 28 : 220-224.
- Goettel M. S. (1992).** Des champignons comme agents de lutte biologique. In La lutte biologique contre les acridiens, sous la direction de C.J. Lomer et C. Prior p.122-131. Ibadan, Nigeria: CAB International/IITA.
- Gopalakrishnan C. & Narayanan K. (1989).** Studies of the susceptibility of *Heliothis armigera* hübner (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *anisopliae* Tulloch. *Entomon*, 14: 191-197.
- Gopalakrishnan C., Narayanan K. (1988).** Occurrence of two entomofungal pathogens, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *minor* Tulloch and *Nomuraea rileyi* (Farlow) Samson, on *Heliothis armigera* Hübner (Noctuidae: Lepidoptera). *Current Science*, 57: 867-868.

- Gowda C. L. L. (2005).** *Helicoverpa* – The Global Problem. 1-6p. In *Heliothis/Helicoverpa* Management Emerging trends and Strategies for Future Research. Editor Hari C. Sharma.
- Gowda J. & Prasad T. N. R. (1992).** Occurrence of *Beauveria bassiana* Bals. Vuil. On the redgram podborer *Heliothis armigera* Hüb. *Journal of Biological Control*, 6: 48-49.
- Greathead D. J. & Girling D. J. (1989).** Distribution and economic importance of *Heliothis* spp and of their natural enemies and host plants in southern and western Africa. In King E.G. et Jackson R.D. (éd.) *Proceedings of the workshop on biological control of Heliothis*, Ferr USDA, New Dehli, Inde, 329-346.
- Greathead D. J. (1966).** A brief survey of the effects of biotic factors on populations of the desert locust. *Journal of Applied Ecology*, 3 : 239-250.
- Greathead D. J. (1992).** La lutte biologique, arme prometteuse pour les acridiens. In la lutte biologique contre les acridiens, sous la direction de C. J. Lomer et C. Prior. p. 4-7. Ibadan, Nigeria : CAB International/IITA.
- Greathead D. J., Kooyman, C., Launois-Luong, M. H. & Popov, G. B. (1994).** Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Collection acridologie opérationnelle N CILSS/DFPV, Niamey, Bp 12625. Niger. 86p.
- Greathead D.J. & Prior C. (1990).** The Regulation of Pathogens for Biological Control with Special Reference to Locust Control. In: Somme, L., and Bie, S., eds. *Proceedings of the workshop on health and environmental impact of alternative control agents for desert locust control. NORAGRIC Occasional Papers Series C: Development and Environment*, 5: 65-80.
- Gruela E. A., Burton R. C., Smith R., Mapes, T. L., Cheung P. Y. K., Pekrul S. & Champlin B. (1978).** Biochemical basis for pathogenicity of *Beauveria bassiana* pp192-216. In Ignoffo, C. M. ed. *Proceedings*, First Joint USA/ URSS.
- Gundannavar K. P., Lingappa S. & Giraddi, R. S. (2006).** Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hubner) to *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 19 (4): 952-953.
- Gundannavar K. P., Lingappa S. & Giraddi R. S. (2007).** Study of Dose Mortality Response Between instars of *Helicoverpa armigera* (Hubner) and *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) Sorokin. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 20 (1): 140 – 141.
- Gunther K. & Herter K. (1974).** Ordnung Dermaptera (Ohrwurner), p 1-158 in Kukenthal's Handbuch der Zoologie (2e ed.). Walter de Gruyter, New York 4(2) (2/11).
- Gupta G. P. (2001).** Role of neem in sustainable cotton pest management. *Natural Journal of Plant Improvement*, 3: 37 – 43.

- Hall R. A. & Papierok B. (1982).** Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology*, 84: 205-240.
- Hardwick D. F. (1965).** The corn earworm complex. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 40: 1-247.
- Harry O. G. (1970).** Gregarina: Their effect on the growth of the desert locust (*Schistocerca gregaria*). *Nature (Lond.)*, 225: 964-966.
- Henderson C. F. & Tilton E. W. (1955).** Tests with acaricides against the brown wheat mite. *Journal of Economic Entomology* 48:157-161.
- Henry J. E. & Oma E. A. (1981).** Pest control by *Nosema locustae*, a pathogen of grasshoppers and crickets, p. 573-594 in H. D. Burges, Microbial control of pests and plants diseases, 1970-1980. *Academic Press, New York*.
- Hewitt H. G., Caseley J., Copping L. G., Grayson B. T. & Tyson D. (1994).** Comparing glasshouse and field pesticide performance 11. *British Crop Protection Council Monograph*, 59: 323 pp.
- Hmimina M. (1986).** Stratégies d'occupation des cultures et d'hivernation chez *Helicoverpa armigera* (Hbn) (*Lepidoptera noctuidae*) : essais de modélisation prévisionnelle. Thèse de Doctorat, Université d'AIX- Marseille III, 184p.
- Howarth F. G. (1991).** Environmental impacts of classical biological control. *Annual Review of Entomology*, 36: 485–509.
http://www.irda.qc.ca/_documents/_Results/191.pdf
- Hübner J. (1958).** Untersuchungen Zur Physiologic Insektentotemder Pilze. *Archives Mikrobiology*. 29, 257-265.
- Humber R. A. & Soper, R.S. (1986).** USDA- ARS Collection of EntoOpathogenic Fungal Culture, Catalog of Strains USDA, Ithaca, New York, 56p.
- Ignoffo C. M. & Hostetter D. L. (1977).** Environmental stability of microbial insecticides. *Misc. Journal of the Entomological Society of America*, 10: 1-80.
- INRAB/ CRA-CF. (1994-1999).** Rapport d'expérimentation multi local en milieu contrôlé, 20p.
- INRAB / CRA-CF. (2004-2005).** Rapport de comptage du rendement, 3p.
- IPM (2000).** Understanding *Helicoverpa* ecology and biology in southern Queensland : Know the enemy to manage it better. <http://www2.dpi.qld.gov.au/fieldcrops/17696html>.
- Jimaja R. S. P. (2000).** Sélection de souches locales de champignons entomopathogènes: *Metarhizium* sp (Metchnikoff) en vue d'une lutte microbiologique contre les termites : cas de *Macrotermes subhyalynus* (Rambur). Mémoire d'Ingénieur Travaux en Aménagement et Protection de l'Environnement : CPU/UNB. 67p.

- Johnson D. L. & Goettel M. (1993).** Reduction of grasshopper populations following field application of the fungus *Beauveria bassiana*. *Biocontrol Science and Technology*, 3: 165 - 175.
- Kabissa J. C. B., Selemani E. & Fundi F. (1989).** New records of *Ceratochrysa antica*, *Mallada boninensis* and *Brinckochrysa* sp (Neuroptera: Chrysopidae) from Tanzania. *Tropical Pest Management*, 35 (2): 206-207.
- Kaur G & Padmaja V (2008).** Evaluation of *Beauveria bassiana* isolates for virulence against *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera; Noctuidae) and their characterization by RAPD-PCR, *African journal of Microbiology Research*, 2: 299-307.
- Kevan D. K. McE. (1992).** Les agents de lutte biologique existants et leur potentiel contre les orthopteroïdes nuisibles. In La lutte biologique, sous la direction de C. Vincent et D. Coderre, p107-150. Chicoutimi, Québec, Canada: Gaetan Morin éditeur ltée.
- Khachatourians G. K. (1986).** Production and use of biological pest control agents. *Trends Bio. Tech.*, 4: 120 - 124.
- King E.G., Powell J. E. & Steiner W. M. (1989).** Control of *Heliothis* spp. (Lep : Noctuidae) in the northern hemisphere by propagation and release of predators and parasites, including the use of genetically improved strains. In King E. G. et Jackson R. D . (éd.) *Proceedings of the workshop on biological control of Heliothis*, Ferro USDA, New Delhi, Inde, 415-426.
- Kossou, I. S. S. (2002).** Etude de quelques paramètres d'optimisation de la production du virus de la polyédrose nucléaire (HearNPV), dans les larves de *Helicoverpa armigera* (Hübner) nourries aux feuilles de quelques plantes hôtes. Mémoire de D.I.T en Aménagement et Protection de l'environnement, EPAC/UAC, 49p.
- Kouassi M. (2001).** La lutte biologique : une alternative viable à l'utilisation des pesticides?. *Vertigo - la revue électronique en sciences de l'environnement*, Volume 2 Numéro 2, octobre 2001, <http://vertigo.revues.org/4101.html>.
- Kranz J., Schmutterer H. & Koch W. (1981).** Maladies, ravageurs et mauvaises herbes des cultures tropicales. Ed. Verlag Paul. Eschborn-Berlin ; Hambourg, 719p.
- Kulkarni S. A., Ghormade V., Kulkarni G., Kapoor M.; Chavan S. B., Rajendran A., Patil S. K., Shouche Y. et Deshpande M. V. (2008).** Comparison of *Metarhizium* isolates for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in chickpea. *Biocontrol Science and Technology*, 18 (8): 809 – 828.
- Kumar V & Chowdhry P. N. (2004).** Virulence of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera*. *Indian Phytopathological Society*, 54 (2): 208-212.

- Lançon J., Lewicki S., Viot C., Djaboutou M., Cousiño J. & Sêkloka, E. (2006).** Recréer du lien dans les filières cotonnières : la sélection participative au Bénin et au Paraguay. *Cahiers Agricultures*, 15 (1): 92-99.
- Langewald J., Kooyman C., Douro-Kpindou O. K., Lomer C., Dahmoud A. O. & Mohamed H. O. (1997a).** Field treatment of Desert Locust (*Schistocerca gregaria* Forskål) hoppers in the field in Mauretania with an oil formulation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Science and Technology*, 7: 603-611.
- Langewald J., Thomas M. B., Douro-Kpindou, O-K. & Lomer, C. J. (1997b).** Use of *Metarhizium flavoviride* for control of *Zonocerus variegatus*: A model, linking dispersal and secondary infection from the spray residue with mortality in caged field samples. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 82 : 1 - 8.
- Lawo N. C., Mahon R. J., Milner R. J., Sarmah B. K., Higgins T. J. V. & Romeis J., (2008).** Effectiveness of *Bacillus thuringiensis*-Transgenic Chickpeas and the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae* in Controlling *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (14): 4381–4389.
- Lipa J. J. (1985).** White muscardines (*Beauveria* sp.). In: An Outline Of *Insect Pathology*. *Foreign Sci. Publ.* Dept NCSTEI, Warsaw, Poland, pp. 139-142.
- Lomer C. H. & Lomer C. J. (1997).** LUBILOSA Insect Pathology Manual. CAB International *Journal of Invertebrate Pathology*, Volume 97, Issue 3, March 2008, 203-210.
- Lomer C. J. & Prior C. (1992).** Biological Control of Locusts and Grasshoppers CAB International (eds.), UK. 394p.
- Lomer C. J., Bateman R. P., Dent D., De Groot H., Douro-Kpindou O.-K., Kooyman C., Langewald J., Ouambama Z., Peveling, R., & Thomas M. (1999).** Development of strategies for the incorporation of biological pesticides into the integrated management of locusts and grasshoppers *Agricultural and Forest Entomology*, 1: 71–88.
- Lomer C. J., Bateman R. P., Godonou I., Kpindou D., Shah P. A., Paraiso A. & Prior C., (1993).** Field infection of *Zonocerus variegatus* following application of an oil-based formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology*, 3: 337 – 346.
- Lomer C. J., Prior C. & Kooyman C. (1997a).** Developpement of *Metarhizium* spp. for the control of locusts and grasshoppers. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* , 171: 265-286.

- Lomer, C. J., Thomas M. B., Godonou I., Shah P. A., Douro-Kpindou, O.-K. & Langewald J. (1997b).** Control of grasshoppers, particularly *Hieroglyphus daganensis*, in northern Benin using *Metarhizium flavoviride*. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 171: 301-311.
- Lozano-Gutierrez J & España-Luna M. P. (2008).** Pathogenicity of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina : Hyphomycetes) against the White Grub *Lanlifer a Cyclades* (Lepidoptera: Pylaridae) under field an green house conditions. *Florida Entomologis*, 91(4): 664-668.
- LUBILOSA (1995).** Manuel de Pathologie des isectes, CAB International, 188p.
- Mabbet T., Dareepat P. & Nachapong M. (1980).** Behaviour studies on *Heliothis armigera* and their application to scouting techniques for cotton in Thailand. *Tropical Pest Management*, 26: 268-273.
- Maddox J. V. (1982).** Use of insect pathogens in pest management. Introduction to Insect Pest Management. *R.L. Metealf and W.H. Luckman (eds)*, 2nd , pp 175-216. Wiley, New York.
- Maddox J. V. (1987).** Protozoan diseases. In: Fuxa, J. R. and Tanada, Y. (eds), *Epizootiology of Insect Disease*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 417-52.
- MAEP (2008).** Etude monographique sur le Coton, Février 2008. http://www.cipbenin.org/documents/benin_investisseurs:consulté. 40p.
- Manfield S., Elias N. V. & Lytton-Hitchins J.A. (2003).** Ants as egg predators of *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australian cotton crops. *A Australian Journal of Entomology*, 42: 349-351.
- Martin T., Ochou G. O., Hala-N’Klo F., Vassal J. M., & Vaissayre M. (2000).** Pyrethroid resistance in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner), West Africa. *Pest Management Science*, 56 (6): 549-554.
- Matthews & Tunstall (1968).** Pesticide Research at Silwood Park. www.infomaworld.com.
- McCoy C. W., Samson R. R. A. & Boucias D. G. (1988).** «Entomogeneous fungi», Handbook of Natural Pesticides, Vol. V: Microbial Insecticides, Partie A: *Entemogenous Protozoa and fungi*, (C. M. Ignoffo & N. B. Mandava, éds), CRC Press, Raton, 151-236.
- McCoy CW, WDI Shapiro & LW Ducan (2000).** Application and Evaluation of Entomopathogens .Application and Evaluation of Entomopathogens for Citrus Pest Control. In.;Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology; application and Evaluation of Pathogens for insects and other Invertebrate Pests (Lacy,L.A. and H.K. Kaya, Eds.),Kluwer Academic publishers, Dordrecht, (In Press), pp. 33.

- McGurire R. M., Ulloa M., Young-Hoon P. & Hudson N. (2005).** Biological and molecular characteristic of *Beauveria bassiana* isolates from California *Lygus hesperus* (Hemiptera : Miridae) populations. *Biological Control* 33: 307-314.
- Mckinley D. J. (1971).** Nuclear polyhedrosis virus of the cotton bollworm in Central Africa. *Cotton Growing Review*, 48: 297-303.
- McKinley R. G. (1988).** Insect pest control on potatoes. *Outlook Agric.* 17, 30-34.
- McLaughlin R. E. (1971).** Use of Protozoa for microbial control of insects, p. 151-172 in H. D. Burges et N. W. Hussey, *Microbial control of insects and mites. Academic Press.*, New York, 861p.
- MEF (2010).** Evaluation ex-ante de la mise en œuvre des stratégies de relance du pôle coton-textile au Bénin. Rapport Final. 86 p.
- Mémento de l'Agronome (2002).** Ministère Français des Affaires Etrangères, GRET et CIRAD, Paris, France, 1691 p.
- Metchnikoff E. (1880).** Zur Lehre über Insektenkrankheiten. *Zool. Anz.* 3: 44-7.
- Meyer J. Y. (2002).** La lutte biologique contre les espèces introduites envahissantes : Solution miracle ou méthode risquée ? Fiche technique, 16p.
- Meynadier G., Margier A., Giradie J. & Vago C. (1992).** Une entomopoxvirose chez l'orthoptère *Anacridium aegyptium*. *Entomophaga* 37 : 453-464.
- Michel B. & Bournier J-P. (1997).** Les auxiliaires dans les cultures tropicales. CIRAD ed., Montpellier : 88 pp.
- Michel B., Togola M., Téréta I. & Traoré N. (2000).** La lutte contre les ravageurs du cotonnier au Mali : problématique et évolution récente. *Cahiers Agricultures*, 9(2), 109-15.
- Miller L. K., Lingg A. J., & Bulla, L. A. (1983).** Bacterial, viral and fungal insecticides. *Journal of Science*, 219: 715-721.
- Milner R. J. (1992).** Selection and characterisation of *Metarhizium anisopliae* for control of soil insects in Australia. In: *Biological control of locust and grasshoppers*, Proceedings of a workshop held at the International Institute of Tropical Agriculture, Cotonou, Republic of Benin, C.J. Lomer and C. Prior. (eds). Pp 202-209.
- Mitter C., Poole R. W. & Matthews M. (1993).** Biosystematics on the *Heliothinae* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annual Review of Entomology*, 38 : 207-225.
- Mondedji, A. D. (2010).** Potentiel d'utilisation d'extraits de feuilles de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) et de papayer (*Carica papaya* L.) dans le contrôle des insectes ravageurs du chou (*Brassica oleracea* L.) en zones urbaines et péri-urbaines du sud du Togo. Thèse de doctorat N° . Univ. de Lomé Togo, 193 p + annexes.

- Mosiniak M. & Prat R. (2005).** La culture du Coton. Biologie et Multimédia - Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie, 1p.
- Mourikis P. & Vassilaina-Alexopoulou A. (1970).** The behaviour of adults of *Heliothis armigera* (Hübner) (*Lepidoptera*, *Noctuidae*) under laboratory conditions. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*, 66 : 36-41.
- Moussa A., Cretenet M., Nibouche S. & Gaborel C. (2002).** Impact d'une attaque précoce de chenilles de la capsule sur le rendement en coton graine en fonction de la pluviosité au Nord-Cameroun. *Actes du colloque, 27-31 mai 2002, Garoua, Cameroun*, 6p.
- Musso J. J. (1978).** Recherches sur le développement, la nutrition et l'écologie des Asilidae (Diptera - Brachycera). Thèse à l'université de droit, d'économie et des sciences. Aix-Marseille. 312p.
- Nibouche S. (1999).** *Helicoverpa* = (*Heliothis*) *armigera* (Hübner, 1808) (*Lepidoptera*, *Noctuidae*, *Heliothinae*). Série des prédicateurs du cotonnier en Afrique Tropicale et dans le reste du monde, N°12, ed. CIRAD-CA Paris France. 49p.
- Nyambo B. T. (1990).** Effect of natural enemies on the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in western Tanzania. *Tropical Pest Management*, 36 : 50-58.
- OBEPAB (2001).** Rapport sur les accidents causés par les pesticides chimiques de synthèse utilisés dans la production cotonnière au Bénin. 12p.
- OCDE (2006a).** Le coton en Afrique de l'ouest : un enjeu économique. 52p.
- OCDE (2006b).** Perspectives Economiques en Afrique Pp 156.
- Ochou G. O. (1994).** Decision making for cotton insect pest management in Côte d'Ivoire. PhD thesis, Imperial College, London. 306 P.
- Ochou, O. G., T. Martin, & N. F. Hala. (1998).** Cotton insect pest problems and management strategies in Côte d'Ivoire, W. Africa, pp. 833-837. In World Cotton Research Conference No. 2, 6-12 September 1998 Athens, Greece.
- Ornat C., Sorribas F.J., Verdejo-Lucas S. & Galeano M. (2001).** Effects of planting date on development of *Meloidogyne javanica* on lettuce in northeastern Spain. *Nematropica*, 31 (2) : 148-149.
- PADSE (2003/2004).** Projet d'Amélioration et de Diversification des Systèmes d'Exploitation, volet Lutte Etagée Ciblée. Fiche II : Les ravageurs ciblés et leurs seuils, Fiches Techniques, Lutte Etagée Ciblée, Bénin Campagne 2003/2004. 36p.
- Papierok B. (1996).** Relations insectes - champignons entomopathogènes : La composante écologique dans l'expression de la spécificité parasitaire de ces microorganismes. *Antennae* Numéro Spécial, 46-54.

- Paris S., Ferron P., Fargues J. & Robert O. (1985).** Physiological characteristics and virulence of auxotrophic and morphological mutants of *Beauveria brongniartii* (Sacc.) Petch (*Beauveria tenella*). *Mycopathology*, 91 : 109-116.
- Parry G. (1982).** Le cotonnier et ses produits. Techniques agricoles et productions tropicales. Maisonneuve et Larose, Paris (Ve), France, 502p.
- Partel R.C., Partel R. M. & Madhukar B. V. R. (1974).** Oviposition behaviour of *Heliothis armigera* (Hbn) in cotton, hybrid-4. *Current Science*. 43: 588-589.
- Patel R. C., Singh R., Patel. P. B. (1968).** Nuclear polyhedrosis of the gran pod borer *Heliothis armigera*. *Journal of Economic Entomology*, 61: 191-193.
- Payne C. C. (1982).** Insects virus as control agents. *Parasitology* 84, 35-77.
- PDC-Kandi (Plan de Développement Communal de Kandi) (2009).** Projet de renforcement des capacités d'Adaptation des communes de l'Alibori face aux changements climatiques. Rapport technique d'étape, Kandi, Bénin, pp. 17-18.
- Pekrul S. & Grula E. A. (1979).** Mode of infection of the corn earworm (*Heliothus zea*) by scanning electron microscopy. *Journal of Invertebrate. Pathology*, 34: 238-247.
- Peveling R. & Demba S. A. (1997).** Virulence of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and Toxicity of Diflubenzuron, Fenitrothion-Esfenvalerate and Profenofos-Cypermethrin to Nontarget Arthropods in Mauritania *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32: 69-79.
- Poinar G. O. & Thomas G. M. (1985).** Laboratory guide to insect pathogens and parasites, Plenum Press, New York, P. 329.
- Prasad A. & Syed N. (2009).** Biototoxicity of mycoinsecticide *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, against later larval instars of gram pod borer – *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 3 (2): 79-84.
- Prasad A. & Syed N. (2010).** Evaluating Prospects of Fungal Biopesticide *Beauveria Bassiana* (Balsamo) against *Helicoverpa armigera* (Hübner): an Ecosafe Strategy for Pesticidal Pollution. *Asian Journal of Experimental Biological Science*, 1 (3): 596-601.
- Prasad A., Syed N. & Purohit S. (2010).** *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuimmemin: A successful biopesticide against key pest *Helicoverpa armigera* (Hübner). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1, 2 (April-June).
- Preisler H. K & Robertson, J. L. (1989).** Analysis of time-dose-mortality data. *Journal of Economic Entomology*, 82: 1534-1542.
- Prior C. (1992).** Discovery and characterisation of fungal pathogens for locust and grasshopper control. In Lomer, C.J. and Prior, C., eds. *Biological Control of Locusts and Grasshoppers*. CAB International, Wal lingford. London, 159-180.

- Prior C. (1997).** Susceptibility of target acridoids and non-target organisms to *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride* in Krall, S., Peveling, R. and Ba Starnes, R.L., Liu, C.L. and Marrone, P.G. (1993) History, Use and Future of Microbial Insecticides. *American Entomologist*, 83-91.
- Prior C. & Street D. (1997).** Strategies for use of entomopathogenic agents in the biological control of locusts and grasshoppers. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 171: 5 -25.
- Purrini K., Kohring, G. W. & Seguiini, Z. (1988).** Studies on a new disease in a natural population of Migratory Locust, *Locusta migratoria* sp. Caused by an entomopox virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 51: 281-283.
- Quintela, E. D. and CW McCoy (1997).** Effect of imidacloprid on development locomotory response and survival of first instars of *Diaprepes abbreviatus*. *Journal of Economical Entomology*, 90:988-995.
- Ramoska W. A. (1984).** The influence of relative humidity on *Beauveria bassiana* infectivity and replication in the ching bug, *Blissus leucopterus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 43: 389-394.
- Rao B Rama, Rajasekhar P, Venkataiah M. & Venugopal R. N. (1995).** Bio-efficacy of 'Neem Azal' (azadirachtin 10,000 ppm) against cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* Hubner. *Journal of Entomology Research* (New Delhi), 19 (4) : 329 – 333.
- Réaumur R. A. F. (1726).** Remarques sur la plante appelée a la Chine Hia Tsao Tom Tschom ou plante ver. *Archives de l'Académie royale des Sciences*, Paris. 302–306.
- Reckhaus P. (1997).** Maladies et ravageurs des cultures maraîchères à Madagascar. Margraf Verga (Allemagne), 402p.
- Reddy N. P., Khan A. P. A., Uma Devi K., Victor S. J. & Sharma H. C. (2008).** Assessment of the suitability of Tinopal as an enhancing adjuvant in formulations of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Journal of Pest Management Science*, 3: 15-19.
- Reed W. (1965).** *Heliothis armigera* (Hbn) (*Noctuidae*) in western Tanganyika. I. Biology, with special reference to the pupal stage. *Bulletin Entomology Research*, 56: 117-125.
- Riba G. & Marcandier S. (1984).** Influence de l'humidité relative sur l'agressivité et la variabilité des isolats de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin et de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin, Hyphomycètes pathogènes de la pyrale du maïs. *Ostrinia nubilalis* Hübn. *Agronomie*, 4 : 189-194.
- Robert J. J. & Foster J. E. (1983).** Effect of a leaf pubescence in wheat on the Bird Cherry Oat Aphid (Homoptera; Aphididae). *Journal of Economic Entomology*, 72: 211-214.

- Roberts D. W. & Campbell A. S. (1977).** Stability of entomopathogenic fungi. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America*, 10, 19-76.
- Roberts D. W. (1981).** Toxins of entomopathogenic fungi. In: *Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980*. H. D. Burges (ed.). Academic Press, NY, pp. 441-465.
- Roberts D. W., Fuxa J. R., Gaugler R., Goettel M., Jacques R. & Maddox J. (1991).** Use of pathogens in insect control. In: *Primentel, D. (ed.), CRC Handbook of Pest Management in Agriculture*. CRC Press, Boca Raton, 243-278.
- Robertson, J. L & Preisler, H. K. (1992).** Pesticide Bioassay with Arthropods. CRC Press, London. Boca Raton, Florida, 127 pp.
- Rombach M. C., Aguda R. M., Shepard B. M. et Roberts D. W. (1986).** Infection of the rice brown planthopper *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) by field application of entomopathogenic, *Hyphomycetes* (Deuteromycotina). *Environnemental Entomology*, 15: 1070-1073.
- Sabbour M. M & Sahab A. F. (2005).** Efficacy of some microbial control agents against cabbage pest in Egypt. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8 (10): 1351-1356.
- Sandhu S. S., Rajak R. C., Agarwal G. P. (1993).** Studies of prolonged storage of *Beauveria bassiana* conidia: Effects of temperature and relative humidity on conidial viability and virulence against chickpea borer, *Helicoverpa armigera*. *Biocontrol Sciences and Technology*, 3 (1) : 47 – 53.
- Saour G. & Causse R. (1996).** Comportement alimentaire des chenilles d'*Helicoverpa armigera* Hbn. (Lep., Noctuidae) sur tomate cultivée sous serre. *Journal of Applied Entomology*, 120, 1-5 : 87–92.
- SAS, 2002-2008. SAS® 9.2, Copyright (c) 2002-2008 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.**
- Scholz B. C. G., Monsour C. J., Zalucki M. P. (1998).** An evaluation of selective *Helicoverpa armigera* control options in sweet corn. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 38: 601 – 607.
- Sharma H. C. (2005).** *Heliothis/Helicoverpa* management: emerging trends and strategies for future research. IBH Publishing (ed.) Co., New Delhi, India. pp. 46.
- Silvie P., Deguine J. P., Nibouche S., Michel B. & Vaissayre M. (2001).** Potential of threshold based interventions for cotton pest control by small farmers in West Africa. *Crop Protection*, 20 : 297-301.
- Singh H. & Singh G. (1975).** Biological studies of *Helicoverpa armigera* (Hübner) in the Punjab. *Indian Journal of Entomology*, 37: 154-164.
- Sinzogan A. A. C., Kossou D. K., Atachi P. & van Huis A. (2006).** Participatory evaluation of

- synthetic and botanical pesticide mixtures for cotton bollworm control. *International Journal of Tropical Insect Science*, 26(4): 246–255.
- Sinzogan A. A. C., van Huis A., Kossou D. K., Jiggins J. & Vodouhè S. (2004).** Participatory diagnosis of production constraints and opportunities of cotton farmers in Benin. Netherlands. *Journal of Agricultural Science*, 52(3-4): 285-304.
- Slosson (2007-2008).** Trap Cropping Plus Bionematicides for Management of Root-knot Nematode in Home Gardens . Final Report for Slosson Foundation. Investigator: Becky B. Westerdahl, Professor of Nematology, Department of Nematology, University of California, Davis: 6 pp.
- Smith M. C. (1989).** Plant resistance to insect. New York: John Wiley & Sons, 286p.
- Smith R. J., Pekrul S. & Grular E. A. (1981).** Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of the corn earworm (*Heliothus zea*). *Journal of Invertebrate Pathology*, 38: 335-344.
- SPSS Inc. (1989 – 2003).** Apache Software Foundation, Standard License.
- Srinivasan K., Moorthy P. N. K. & Raviprosad T. N. (1994).** African marigold as a trap crop for the management of the fruit borer *Helicoverpa armigera* on tomato. *International Journal of Pest Management*, 40: 56-63.
- St Leger R. J., Charnley A. K. & Cooper R. M. (1986).** Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48: 85-95.
- St Leger R. J., Charnley A. K. & Cooper R. M. (1987a).** Characterization of cuticle degrading proteases produced by the entomopathogenic *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 253: 221-232.
- St Leger R. J., Charnley A. K. & Cooper R. M. (1987b).** Production of cuticle degrading enzymes by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae* during infection of cuticle from *Calliphora Vomitoria* and *Manduca sexta*. *Journal of General Microbiology*, 1371-1382.
- St Leger R. J.; Butt T. M.; Staples R. C. & Roberts D. M. (1989).** Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Experimental Mycology*, 13, 253–262.
- Starnes R. L., Liu C. L. & Marone 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.
- Steinhaus E. A. (1949).** Principles of insect pathology. McGraw Hill Book. Co. Inc., Toronto.

757p.

- Steinhaus E. A. (1963).** Insect pathology advanced treatise. *Academic Press*. New York, 1: 661-689.
- Street D. A. & McGuire M. R. (1990).** Pathogenic disease of grasshoppers. In *Biology of grasshopper*, sous la direction de Chapman, R. F. et Joern, p.484-516. A. New York: John Wiley & son.
- Symmons P. M., Dobson H. M. & Sissoko M. (1991).** Pesticide droplet size and efficacy: a series of trials on grasshoppers. *Crop Protection*, 10 (2): 136-144.
- Tchamoou K. S. (1995).** Impact des Hyménoptères parasitoïdes, *Dinarmus basalis* Rond. et *Eupelmus vuilleti* Craw. Sur les populations de *Callosobruchus maculatus* F. dans un système de stockage du *Vigna unguiculata* Walp. Mémoire de D.E.A., U.B., Lomé, 38p.
- Teakle R. E. (1973).** Records of virus diseases in insects in Queensland. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Sciences*, 30: 1991- 1994.
- Teakle R. E. & Jensen J. M. (1985).** *Heliothis punctigera*. In *Handbook of Insect Rearing* (eds P Singh & RF Moore), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 313–322,
- Théodoridès J., Ormières R. & Jolivet P. (1958).** Eugrégarines parasites d'orthoptéroïdes, p. 44 in *Explor. Parc Nat. Albert*, série 2, vol. 7. Inst. des Parcs nationaux du Congo Belge, Bruxelles.
- Thomas M. B., Blanford S. & Lomer C. J. (1997).** Reduction of feeding by the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*, following infection by the fungal pathogen, *Metarhizium flavoviride*. *Biocontrol Science and Technology*, 7: 327 - 334.
- Thomas M. B., Wood S. N. & Lomer C. J. (1995).** Biological control of locusts and grasshoppers using a fungal pathogen: the importance of secondary cycling. *Proceedings of the Royal Society London*, B, 259: 265 – 270.
- Thungrabeab M. & Tongma S (2007).** Effect of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana* (Balsam) and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) KMITL *Science technology* Vol.7 No. S1.
- Toguebaye B. S. & Couilloud. R. (1982).** Etude descriptive de l'œuf et des stades larvaires de *Heliothis armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera, Noctuidae) en microscopie électronique à balayage. *Coton et fibres tropicales*, 372 : 197-209.
- Ton P. (2004).** Production du coton au Bénin : Projet d'analyse d'une spéculation agricole par pays, financé par le programme "Renforcement des capacités commerciales" de la F.I.P.A. (Fédération Internationale des Producteurs Agricoles) Février - mars 2004, Cotonou et Amsterdam 5, 21 p.
- Ton, P. (2002).** Organic cotton production in Sub-Saharan Africa: the need for scaling-up. A report for PAN UK's Pesticides Poverty and Livelihoods project. London: Pan UK [en

- ligne]. [http://www.pan-uk.org/Cotton/ Production.pdf](http://www.pan-uk.org/Cotton/Production.pdf). Consultation mai 2006.
- Topper C. P. (1987).** Nocturnal behaviour of adults of *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in the Sudan Gesira and pest control implications. *Bulletin of Entomological Research*, 77: 541-554.
- Traoré O. (2008).** Les succès de la lutte intégrée contre les ravageurs du cotonnier en Afrique de l'Ouest, 67^e réunion plénière de l'ICAC. Ouagadougou (Burkina Faso), 16-21 novembre 2008, 11p.
- Twine P. H. (1978).** Effect of temperature on the developpement of larvae and pupae of the corn earworm, *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science*, 35: 23-28.
- Urs N. V. R. R. & Govindu H. C. (1971).** *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin and its host range. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, 44: 317-320.
- Vaissayre M. & Cauquil J. (2000).** Main pests and diseases of cotton in Sub-saharan Africa. CIRAD Service des éditions, Montpellier, France, ISBN 2-87614-416-6. 60 p.
- Vaissayre M. (1978).** Contribution à l'étude méthodologique de l'échantillonnage des populations d'insectes.,Thèse 3^{ème} cycle, Université Paris-Sud Orsay, 61p.
- Van Den Berg H., Waage J. K. & Cook M. J. W. (1988).** Natural enemies of *Helicoverpa armigera* in Africa. *Annual Review*, CAB, IIBC, Ascot, 81p.
- Van Emden, H. F. (1987).** Cultural methods: the plant. In Integrated pest management sous la direction de A. J. Burn, T.H. Coacker et P.C. Jepson, p.28-68. *London: Academic Press*.
- Vassal J.-M., Vaissayre M. & Martin T. (1997).** Decrease in susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to pyrethroïd insecticides in Côte d'Ivoir. *Resistant Pest Management*, 9: 11-15.
- Veen K. H. (1968).** Liste d'hôtes. *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen*, 68: 19-24.
- Vey A. & Fargues J. (1977).** Histological and ultrastructural studies of *Beauveria bassiana*. Infection in *Leptinotarsa decenlineta* larvae during ecdysis. *Journal of Invertebrate Pathology* 30: 207-215.
- Vincent C. & Panneton, B. (2001).** Les méthodes de lutte physique comme alternatives aux pesticides. *Revue en sciences de l'environnement sur le WEB*, Vol 2 No 2, octobre 2001. 8p.
- Wender J. F. & Albert U. A. (1992).** Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium*): Character – state weighted parsimony analysis of chloroplast – DNA restriction Site data and its systematic and biogeographic implications. *Systematic Botany*, 17: 115–143.

- Whitten M. J. & Oakeshott J. G. (1991).** Opportunities for modern biotechnology in control of insect pests and weeds, with special reference to developing countries, *FAO Plant Protection Bulletin*, 39(4): 155-181.
- Wilson A. G. L. (1983).** Abundance and mortality of overwintering and spring emergence of *Heliothis* spp. *Journal of the Australian Entomological Society*, 22: 191-199.
- Wraight R. J. & Roberts D. W. (1987).** Insect control effort with fungi. *Developments in Industrial Microbiology*, 28: 77-87.
- Youdeovei A. (2001).** Cotton sector reform program (CSRP). Pest management plans for cotton production in Benin. World Bank/FAO, 61 p.

ANNEXES

ANNEXE I : Liste des Publications

A. Journaux Scientifiques

1. **Douro Kpindou O. K.**, Djegui D. A., Glitho I. A. & Tamò, M. (2011). Dose transfer of an oil-based formulation of *Metarhizium anisopliae* sprays to cotton bollworm in an arena trial. *International Journal of Tropical Insect Science*, 31 (4) 262-268.
2. **Douro Kpindou O. K.**, Djegui D. A., Glitho I. A. & Tamò, M. (2011). Réponse des stades larvaires de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) à différentes doses d'application des champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, accepté.
3. **Douro Kpindou O. K.**, Djegui D. A., Glitho I. A. & Tamò, M. (2011) Sensitivity of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, *Journal of Applied BioSciences*. En preparation.
4. **Douro Kpindou O. K.**, Djegui D. A., Glitho I. A. & Tamò, M. (2011). Utilisation de champignons entomopathogènes, de pesticides chimique et botanique dans la gestion des ravageurs du cotonnier et de leurs ennemis naturels au Benin. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. En préparation.
5. **Douro Kpindou O. K.**, Niassy A., Badji K. & Kooyman C. (2008). Application of mixtures of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and cyhalothrin against the Senegalese grasshopper in Senegal; *International Journal of Tropical Insect Science* 28 (3): 136-143.
6. **Douro Kpindou O. K.**, Sinsin B. & Kooyman C. (2007). Impact de *Metarhizium anisopliae* var *acridum*, sur les hyménoptères: cas de *Apoanagyrus lopezi* De Santis et de *Cotesia plutellae* (Kurdjumov) ; *Annales des Sciences Agronomiques du Bénin*, 9 (1) : 57-73.
7. **Douro Kpindou O. K.**, Gbongboui, C., Badou, R., Paa-Kwessi E., Ackonor J. B., & Langewald J. (2005). Optimisation de l'application du *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* Driver & Milner, 2001 sur le criquet puant (*Zonocerus variegatus* L. 1758) : Réduction de doses et Traitement de barrière ; *International Journal of Tropical Insect Science*, 25 (4) : 251-258.
8. **Douro-Kpindou O. K.**, Lomer C. J., Langewald J., Togo T. & Sagara D. (2001). Effet de l'application d'un mélange lambda-cyhalothrin (pesticide chimique) et de spores de *Metarhizium anisopliae* (*flavoviride*) var. *acridum* Driver and Milner (biopesticide) appliqué sur les larves de sauteriaux au Mali. *Journal of Applied Entomology*, 125: 249-253.

9. **Douro-Kpindou O. K.**, Lomer C. J., Langewald J. & Bocco Y. (2000). Cycle biologique et durée des stades du criquet puant, *Zonocerus variegatus* (LINNE, 1758) (Orthoptera: Pyrgomorphidae) au Sud du Bénin. *Insect Science & its application*, 20 (2): 09-116.
10. **Douro-Kpindou O. K.**, Shah P. A., Langewald J., Lomer C. J., van der Paauw H., Sidibé A. & Daffé C. O. (1997). Essais sur l'utilisation d'un biopesticide (*Metarhizium flavoviride*) pour le contrôle des sauteriaux au Mali de 1992 à 1994. *Journal of Applied Entomology*, 121: 285-291.
11. **Douro-Kpindou O. K.**, Godonou I., Houssou A., Lomer C. J. & Shah, P. A. (1995). Control of *Zonocerus variegatus* with ULV formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology*, 5: 131 - 139.
12. Agbeko K., T., Kooyman C., **Douro-Kpindou, O. K.**, Gumedzoe Y. M. & Poehling H., M. (2011). Laboratory assessment of the potential of *Paranosema locustae* to control immature stages of *Schistocerca gregaria* and *Oedaleus senegalensis* and vertical transmission of the pathogen in host populations. *Biocontrol Science and Technology*. 21, 5: 605-617.
13. Agbeko K., T., Kooyman C., **Douro-Kpindou, O. K.** & Poehling H., M. (2008). Interaction between *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, two pathogens of the desert locust, *Schistocerca gregaria* under laboratory conditions. *Journal of invertebrate pathology*, 97, 3: 203-210.
14. Agbeko K., T., Kooyman C., **Douro-Kpindou, O. K.** & Poehling H., M. (2008) Combined field efficacy of *Paranosema locustae* and *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* for the control of sahelian grasshoppers, *BioControl*, 53, 5: 813-838.
15. De Groote H., **Douro-Kpindou O. K.**, Ouambama Z., Gbongboui C., Müller D., Attignon S. & Lomer C. (2001). Assessing the feasibility of biological control of locusts and grasshoppers in West Africa: Incorporating the farmers' perspective. *Agriculture and Human Values* 18: 413-428.
16. Maiga I. H., **Douro-Kpindou O. K.**, Lomer C. J. & Langewald J. (1999). Pratiques paysannes et utilisation potentielle de *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypial en lutte anti-acridienne au Niger. *Insect Science & its application*, 19 2/3: 163-171.
17. Lomer C. J., Bateman R. P., Dent D., De Groote H., **Douro-Kpindou O. K.**, Kooyman C., Langewald J., Ouambama Z., Pevelling R. & Thomas M. (1999). Development of strategies for the incorporation of biological pesticides into the integrated management of locusts and grasshoppers. *Agricultura and Forest Entomology*, 1: 71-88.
18. Bateman R. P., **Douro-Kpindou O. K.**, Kooyman C., Lomer C. & Ouambama Z. (1998). Some observations on the dose transfer of mycoinsecticide sprays to desert locusts. *Crop Protection*, 17 2: 151 – 158.

19. Maiga I. H., **Douro-Kpindou O. K.**, Lomer C. J. & Langewald J. (1998). Utilisation de *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypial contre les sauteriaux dans les essais participatifs en milieu paysan au Niger. *Insect Science & its application*, 18, 4 : 279-294.
20. Shah P. A., **Douro-Kpindou O. K.**, Sidibé A., Daffé C. O., Van der Paauw & Lomer C. J. (1998). Effect of the Sunscreen Oxybenzone on field Efficacy and Persistence of *Metarhizium flavoviride* Conidia against *Kraussella amabile* (Orthoptera: Acrididae) in Mali, West Africa. *Biocontrol Science and Technology*, 8: 357 - 364
21. Langewald J., Kooyman C., **Douro-Kpindou O. K.**, Lomer C., Dahoud O. A. & Mohamed H. O. (1997). Field treatment of Desert Locust (*Schistocerca gregaria* Forkäl) hoppers in the field in Mauritania with an oil formulation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium flavoviride*. *Biological Science and Technology* 7 (4): 000-000.
22. Langewald J., Thomas M. B., **Douro-Kpindou O. K.** & Lomer C. J. (1997). Use of *Metarhizium flavoviride* for control of *Zonocerus variegatus*: A model, linking dispersal and secondary infection from the spray residue with mortality in caged field samples. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 82: 1 – 8
23. Lomer C. J., Thomas M. B., Godonou I., Shah P. A., **Douro-Kpindou O. K.** & Langewald J., (1997). Control of grasshoppers, particularly *Hieroglyphus daganensis*, in northern Benin using *Metarhizium flavoviride*. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, 171: 301-311.
24. Moore D., **Douro-Kpindou O. K.**, Jenkins N. E. & Lomer C. J. (1996). Effects of moisture content and temperature on storage of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 51 - 61.
25. Lomer C. J., Bateman R. P., Godonou I., **Kpindou D.**, Shah P. A., Paraiso A. & Prior, C. (1993). Field infection of *Zonocerus variegatus* following application of an oil based formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology*, 3: 337 - 346.

B. Conférences & autres articles scientifiques publiés

1. **Douro Kpindou O. K.**, Langewald J., Lomer C. J., van der Paauw, H., Shah, P. A. & Sidibé A. (1996). Field trials on a biopesticide (*Metarhizium flavoviride*) for grasshopper control in Mali from 1992 to 1994. *New strategies in locust control*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. p. 231 - 232
2. Bateman R. P., Godonou I., **Kpindu D.**, Lomer C. J. & Paraiso A. (1992) . Development of a novel "field bioassay" technique for assessing mycopesticide U.L.V. formulations. In *Biological Control of Locusts and Grasshoppers* (C.J. Lomer and C. Prior, eds.). CAB International, UK. p. 255 - 262.

3. Paraíso A., Lomer C. J., Godonou I. & **Kpindou D.** (1992). Preliminary studies on the ecology of *Zonocerus variegatus* in the Republic of Benin. In *Biological Control of Locusts and Grasshoppers* (C.J. Lomer and C. Prior, eds.). CAB International, UK. Pp. 133 - 141.
4. Lomer C.J., **Douro-Kpindou O. K.**, Godonou I., Paraíso A., Shah P. A. & Thomas M. B. (1993). Biological control of grasshoppers in Benin by the fungus *Metarhizium flavoviride*. ANPP 3rd International Conference on Pests in Agriculture, Montpellier 7 - 9 December 1993.
5. Bateman R. P. Batt D. Carey M., **Douro-Kpindou O. K.**, Godonou I., Jenkins N. E., Kooyman C., Lomer C. (1994). Progress with the development of *Metarhizium flavoviride* for control of locusts and grasshoppers. *Microbial Control of Pests IOBC wprs Bulletin*, 17 (3) : 222 - 225.
6. Paraíso A., Lomer C., **Douro-Kpindou O.** & Kooyman C. (1995). LUBILOSA : un projet collaboratif de lutte biologique contre les locustes et les sauteriaux au Sahel. *Microbial control agents in sustainable agriculture : field experience, industrial production and registration. October 18, 19 1995, Aosta, Italy*, p. 195.
7. Paraíso A., Beye A., Djiba S., Check S., Abdoulaye N., Diop O., Gan Bobo S., Oteïdobiga, C. L., Nadié A. K., Kooyman C., Lomer C. & **Douro-Kpindou O.** (1995). Application d'une formulation huileuse contenant des spores du champignon pathogène d'insectes *Metharizium flavoviride* contre les criquets et les sauteriaux au Sahel. *Microbial control agents in sustainable agriculture field experience, industrial production and registration. October 18, 19 1995, Aosta, Italy*. p 194.
8. Paraíso A., Beye A., Djiba S., Check S., Abdoulaye N., Diop O., Gan Bobo S., Oteïdobiga, C. L., Nadié A. K., Kooyman C., Lomer, C. & **Douro-Kpindou O.** (1995). Application of an oil-based formulation containing spores of an entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride*, against grasshoppers in the Sahel. *New strategies in locust control*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. p. 235 – 236.
9. Paraíso A., Lomer C., **Douro-Kpindou O.** & Kooyman C. (1995). LUBILOSA: a joint project for the biological control of locusts and grasshoppers in the Sahel. *New strategies in locust control*, Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. p. 233 – 234.

ANNEXE II : Réponse des stades larvaires de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) à différentes doses d'application des champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*

Titre abrégé : Réponse de *H. armigera* aux champignons entomopathogènes

O. K. Douro Kpindou^{1*}, D. A. Djegui¹, I. A. Glitho², M. Tamò¹

¹ Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA), 08 B.P. 0932, Tri Postal, Cotonou, Bénin.

² Laboratoire d'Entomologie Appliquée, Faculté des Sciences, Université de Lomé, B.P. 1515, Lomé, Togo.

* Corresponding author

Email: d.kpindou@cgiar.org

REMERCIEMENTS

Nous remercions l'Ambassade Royale des Pays-Bas près le Bénin qui a financé ce travail. Nous remercions également les autres membres du Projet « Méthodes Alternatives de Lutte contre les Ravageurs du Cotonnier au Bénin ».

Title: Response of the nymphs of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) at different doses of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*

RESUME

Deux expérimentations ont été mises en place pour étudier la réponse effet/dose de deux souches de champignons entomopathogènes, *Metarhizium anisopliae*, Met 31 et *Beauveria bassiana*, Bb 11 sur les stades larvaires de *Helicoverpa armigera*. Dans la première expérimentation, la souche Met 31 de *M. anisopliae* a été testée sur les stades L3 de *H. armigera*, tandis qu'à la deuxième, les deux souches Met 31 et Bb 11 ont été testées sur les stades L4 du même insecte. Pour toutes les deux expérimentations les doses de 0, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 conidies/insecte ont été utilisées. Les observations ont porté sur la mortalité des larves, la sporulation des larves mortes, la formation des chrysalides et l'éclosion des adultes. La formule d'Abbott a été utilisée pour corriger les taux de mortalité au niveau des traitements. La régression de Cox a été utilisée pour déterminer la DL50. Pour la première expérimentation, les taux de mortalité des larves L3 de *H. armigera* n'étaient pas significativement différentes entre les doses 10^6 et 10^7 conidies/insecte d'application de Met 31. Lors de la deuxième expérimentation, le taux de mortalité des larves L4 (74%) soumises à la dose d'application de 10^7 conidies/insecte de Met 31 a été significativement le plus élevé. Pour la souche Bb 11, malgré l'écart observé entre les taux de mortalité causés par 10^6 (58%) et ceux causés par 10^7 conidies/insecte (90%), aucune différence significative n'a été enregistrée au seuil de 5%. Les chenilles mortes parmi les chenilles de stade L4 traitées aux plus faibles doses n'ont pas sporulé. Les témoins ont enregistré le plus fort taux de chrysalides et d'adultes. Ces deux paramètres ont été fonction de la dose : plus la dose est élevée, moins sont les taux de chrysalides et d'adultes. Pour toutes les souches de champignons utilisées, quel que soit le stade larvaire de *H. armigera*, la réponse effet/dose a été significative.

Mots clés : *Helicoverpa armigera*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, Lutte microbiologique, Réponse effet/dose

ABSTRACT

Two experiments on dose mortality response between instars of *Helicoverpa armigera* and two strains of entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* (Met 31) and *Beauveria bassiana* (Bb 11) were carried out in laboratory conditions. In the first experiment, *M. anisopliae* Met 31 was tested on the third instars of *H. armigera*, while in the second experiment, both Met 31 and Bb 11 were tested on the 4th instars. For all experiments, 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 conidia /insect were the different doses used. Mortality and sporulation rates, rates of pupa formed and rates of adults emerged were the parameters measured. Abbott formula was used to correct treated mortality rates. LD50 was determined using Cox-regression. For the 3rd instars in experiment one, no significance difference was observed between high doses (10^6 and 10^7 conidia /insect). As for the instars L4, only the dose 10^7 conidia /insect had high mortality rates (74.3%). For the strain Bb 11, in spite of the variation observed between the mortality rates of high doses (10^6 and 10^7 conidia /insect), no significant difference was recorded at 5% level. No mycosis was observed from cadavers resulting from lower doses when tested on L4. The control has recorded the highest rate of pupa and adults. These two parameters were function of the dose: more doses were high, less was the rates of pupa and adults emerged. For all the strains of fungi used whatever the larval stage of *H. armigera*, dose mortality response was significant.

Key words: *Helicoverpa armigera*, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, Microbial control, Dose Mortality Response.

1. INTRODUCTION

Helicoverpa armigera (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) est signalé comme provoquant de sérieux dégâts, en particulier sur le cotonnier, la tomate et le maïs. Sur le cotonnier, deux ou trois larves sur une plante peuvent détruire toutes les capsules en 15 jours (CABI & OEPP, 2003). De même, selon Parry (1982), une seule chenille de troisième ou de quatrième stade de *H. armigera* peut dévorer cinq à six boutons floraux en une nuit. La lutte chimique est la méthode la plus souvent utilisée contre les larves des lépidoptères ravageurs des plantes. Elle a été, en général, très efficace pour détruire les ravageurs sur un grand nombre de cultures. Ainsi, de nombreux produits chimiques, notamment les pyréthrinoides, les organochlorés (dont le DDT), les carbamates et les régulateurs de croissance, ont été utilisés dans la lutte contre ces ravageurs (Vandamme *et al.*, 1966 ; Rao *et al.*, 1992 ; Ascher *et al.*, 1991). Malheureusement, l'utilisation de ces produits chimiques a entraîné des effets néfastes, tels que: l'apparition de nouveaux ravageurs, la pollution de l'environnement et la détérioration de la santé humaine et animale (Anonyme., 2002). Face à ces inconvénients, les espoirs se sont portés sur des alternatives.

Divers biopesticides à base de champignons entomopathogènes, *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana* sont disponibles dans le commerce pour la gestion des insectes ravageurs d'importance agricole comme le foreur de caféier *Hypothenemus hampei* Ferrari et diverses espèces de Curculionidae (Adane *et al.*, 1996 ; De la Rosa *et al.*, 1997), les locustes et les sauteriaux (Johnson *et al.*, 1993 ; Bateman, 1997 ; Lomer *et al.*, 1999 ; 2001), les lépidoptères (Deshpande *et al.*, 2001 ; Abdel-Razek *et al.*, 2006 ; James *et al.*, 2009 ; Godonou *et al.*, 2009).

Les espèces les plus utilisées dans cette lutte sont *M. anisopliae* et *M. flavoviride*. Kulkarnia *et al.*, (2008) ont réalisé des essais avec plusieurs souches de ce champignon sur les larves de *H. armigera* au laboratoire. Toutes les souches utilisées étaient infestives et les plus virulentes ont causé des mortalités allant de 50% à 92,5%. Gopalakrishnan *et al.*, (1989) précisent que tous les stades de l'insecte, hormis l'œuf, peuvent être touchés. Les adultes mis en contact avec une suspension de conidies ne meurent pas, mais les femelles pondent des œufs stériles.

La pathogénie de *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, a été démontrée pour la première fois par Bassi (1835). Ce champignon a été utilisé dans le monde entier contre plusieurs insectes nuisibles : en ex- URSS pour la gestion du doryphore de la pomme de terre (*Leptinotarsa decemlineata* (Say)) (Coleoptera: Chrysomelidae) ; en Chine contre le Bombyx du pin (*Dendrolimus punctata* (Walker) (Lepidoptera: Lasiocampidae). Dans le Nord de l'Amérique, des essais à base de *B. bassiana* ont été réalisés en laboratoire (aux Etats-Unis dans le comté d'Arlington et dans l'Etat de Massachusetts) contre la pyrale du maïs *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lefebvre, 1931a ; 1931b). D'autres études, menées par Gowda *et al.*, (1992) indiquent des taux d'infection de 6 à 12% par *B. bassiana* pour des chenilles de *H. armigera* collectées sur

du pois d'Angole en Inde. Wilson (1983), a noté en Australie une mortalité naturelle due à *B. bassiana* touchant 15 à 20% des chrysalides hivernantes. La pathogénie de *B. bassiana* vis-à-vis de *H. armigera* a été étudiée au laboratoire dans différentes conditions d'humidité et de température. Lujuan *et al.*, (2001) ont montré qu'à 25°C, avec une humidité relative élevée (95%), la mortalité des larves de l'insecte traitées avec différentes concentrations de *B. bassiana* était très rapide et très élevée.

Les travaux préliminaires effectués sur les larves de troisième stade de *H. armigera* avec les souches de champignons entomopathogènes *M. anisopliae* et *B. bassiana* au laboratoire de l'Institut International d'Agriculture Tropicale (IITA-Bénin) ont montré que ces dernières sont pathogènes au ravageur (Douro Kpindou *et al.*, 2010, en préparation). La présente investigation a été réalisée pour évaluer l'efficacité de ces pathogènes à diverses doses sur certains stades de *H. armigera*.

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Milieu d'étude

Les expérimentations ont été conduites dans les laboratoires de l'IITA-Bénin de mars à mai 2009. Les conditions ambiantes de la salle étaient de $26 \pm 0,5$ °C et de $65,5 \pm 5\%$ RH.

2.2. Provenance des larves de *H. armigera* utilisées.

Les larves de *H. armigera* utilisées ont été fournies par le laboratoire d'élevage de l'IITA-Bénin. Ce sont des insectes ramenés de prospections. Ils ont été élevés sous un régime alimentaire artificiel composé de haricots, de l'agar, de maïs, de levure de brasserie, de l'acide ascorbique, de l'acide sorbique, de miel, de formaldéhyde et de Metyl p-hydroxy benzoate (Teakle et Jensen, 1985).

2.3. Provenance des champignons entomopathogènes

Les souches de champignon entomopathogènes, *M. anisopliae* et *B. bassiana* utilisées proviennent de l'unité de collection de l'IITA-Bénin et avaient été déjà testées pour leur pathogénie (Douro Kpindou *et al.*, 2010). Les conidies de ces champignons ont été produites par l'unité de production de IITA par un procédé diphasique (liquide, solide) (Cherry *et al.*, 1999). Le taux de germination après 24 heures d'incubation à 26°C était de $93,06 \pm 0,04\%$.

2.4. Protocole expérimental

Deux expérimentations ont été mises en place. Dans la première, pour raison de disponibilité de l'hôte, seule une souche de *M. anisopliae* (Met 31) a été utilisée pour inoculer les larves de 3^{ème}

stade de *H. armigera*. Lors de la deuxième expérimentation, deux souches, l'une de *M. anisopliae* (Met 31) et l'autre de *B. bassiana* (Bb 11) ont été utilisées pour inoculer les larves de 4^e stade de *H. armigera*.

Chaque expérimentation a consisté en cinq traitements constitués d'une formulation blanche (uniquement de l'huile d'arachide) et de quatre différentes concentrations des conidies de chaque souche de champignon utilisée (Tableau 1). Ces traitements ont été répétés, chacun, dans trois blocs aléatoires complets. Dix larves de *H. armigera* de même stade ont été utilisées par répétition. L'application topique a été la méthode utilisée pour inoculer les larves (Bateman *et al.*, 1996 ; Peveling et Demba, 1997). Les larves ont été mises individuellement dans des boîtes (3.8 cm x 2.9 cm x 4.0 cm, avec des couvercles perforés pour l'aération) et soumis au même régime alimentaire que celui du laboratoire d'élevage.

Le prélèvement des larves mortes a été fait de manière quotidienne. Ces larves mortes prélevées ont été séchées pendant 24 heures, puis incubées dans des boîtes de Pétri contenant du papier buvard légèrement imbibé pour l'observation d'éventuelles sporulations.

Le nombre de chrysalides mortes et le nombre d'adultes émergés ont été enregistrés. Pour les traitements où les deux sexes ont émergés, les adultes ont été mis en accouplement et les œufs pondus ont été comptés.

2.5. Analyse des données

Les taux moyens de mortalité des larves et des chrysalides, de sporulation, de formation et d'émergence des chrysalides, obtenus à la fin des observations, ont été utilisés pour tracer les histogrammes. Les taux de mortalité des traités ont été corrigés utilisant la formule d'Abbott (1925):

$$\%mortalité = \left(1 - \frac{nTa}{nCa}\right) \times 100$$

Où nTa est le nombre d'individus survivants dans les insectes traités après inoculation et nCa est le nombre d'individus survivants dans les témoins après inoculation.

Les taux de sporulation ont été calculés sur la base des individus (larves ou chrysalides) morts dans chaque traitement. Le taux d'émergence a été calculé sur la base du nombre de chrysalides formées dans chaque traitement.

Après une transformation arc-sinus, une analyse de variance a été faite. Lorsque l'ANOVA a révélé des différences significatives entre traitements, le test SNK (Student-Newman, Keuls), au seuil de 5%, a été conduit afin de séparer les moyennes des différents traitements. Les valeurs des SNK ont été représentées par des traits verticaux au niveau des figures de manière à faciliter la comparaison. Lorsque les valeurs successives sont égales, pour

éviter l'encombrement des figures, une seule de ces valeurs a été représentée. Pour toutes ces analyses, le logiciel SAS version 9.1 (2003) a été utilisé.

Estimation de la DL50 (Dose Létale 50)

L'analyse et la modélisation des données temps-dose-mortalité ont été effectuées en utilisant le modèle « cox-régression » (SPSS, 1989-2003). Les modèles de régression de Cox utilisent la fonction de risque pour estimer le risque d'échec relatif. La fonction de risque, $h(t)$ est une évaluation de la mort potentielle d'un individu par unité de temps à un moment donné, étant donné que l'individu a survécu jusqu'à ce moment. Les modèles de Cox-régression sont exprimés en termes de fonction de risque comme suit :

$$h(t) = [h_0(t)]e^{(BX)} \quad (1)$$

où X représente log (dose), B le coefficient de régression qui est le risque relatif (ici risque instantané de décès) associé à un traitement B (par exemple) par rapport à un autre traitement A (par exemple), e la base du logarithme népérien, et $h_0(t)$ est la fonction de risque lorsque X est égal à 0.

La fonction cumulative de risque, $H(t)$, est liée à la fonction de survie et peut être dérivée de la fonction de survie comme suit :

$$H(t) = -\ln S(t) \quad (2)$$

La fonction de risque et la fonction de survie sont étroitement liées, et toutes les deux ont été calculées en utilisant le procédé de Cox-régression (SPSS, 1989-2003).

La DL50 est définie comme la dose d'un agent (chimique ou biologique) nécessaire pour produire la mort de la moitié des organismes testés à un moment donné après application (Maddox, 1982). La DL 50 peut être dérivée des équations (1) et (2) comme suit:

$$X = 10^{\ln(\ln(0.5) - \ln(h_0(t))) / B}$$

Les intervalles de confiance pour la DL50 ont été calculés sur la base des mêmes équations, utilisant les informations suivantes : Ecart type (SE) de B et Ecart type (SE) de $h_0(t)$.

3. RESULTATS

3.1. Mortalité et sporulation des insectes morts

Expérimentation I

L'évolution des taux de mortalité enregistré pour toutes les doses de Met 31 utilisées avait suivi la même allure (Figure 1). La dose 10^7 conidies par insecte a significativement tué plus de larves

L3 de *H. armigera* que les doses 10^4 et 10^5 conidies par insecte. Entre les doses 10^7 conidies/insecte et 10^6 conidies/insecte, la différence a été significative du 4^e au 10^e jour après inoculation pour s'estomper à partir du 11^e jour après inoculation (Figure 1). Les taux de mortalité corrigés obtenus au bout de 16 jours étaient de $17,7 \pm 19,4\%$, $20,6 \pm 10,4\%$, $65,0 \pm 6,5\%$, $74,5 \pm 7,6\%$ respectivement pour les doses de 10^4 , 10^5 , 10^6 et 10^7 conidies par insecte. La dose de 10^6 conidies par insecte ne s'est démarquée des plus faibles doses qu'à partir du 9^e jour après inoculation. Les doses 10^4 conidies/insecte et 10^5 conidies/insecte ont eu des taux de mortalité similaires.

La tendance a été la même pour les taux de sporulation observés au niveau des insectes morts issus des différentes doses (Figure 2). Le taux de sporulation observé au niveau des insectes morts engendrés par la dose 10^5 conidies/insecte a été plus élevé et significativement différent de ceux de la dose 10^4 conidies/insecte. Malgré ces taux de sporulation relativement plus élevés observés au niveau de fortes doses, aucune différence significative n'a été enregistrée entre elles et 10^5 conidies/insecte.

Expérimentation II

Application de M. anisopliae (Met 31)

A la dose de 10^7 conidies/insecte, les taux de mortalité corrigés enregistrés pour les larves du 4^e stade de *H. armigera* étaient similaires à ceux obtenus pour les larves du 3^e stade (74 %). Les taux de mortalité au niveau des autres doses étaient faibles. Dix huit jours après inoculation des larves, ils étaient de 25% et 10% pour 10^6 conidies/insecte et 10^5 conidies/insecte respectivement. Ces taux étaient significativement plus faibles au seuil de 5% par rapport à ceux de la forte dose, 10^7 conidies/insecte; il y en a qui s'étaient d'ailleurs annulés (0,5%) (10^4 conidies/insecte) (Figure 3).

Le plus fort taux de sporulation obtenu était de 54%. Seuls les larves mortes issues des doses les plus élevées (10^7 et 10^6 conidies/insecte) avaient sporulé (Figure 4).

Application de B. bassiana (Bb 11)

Les taux de mortalité corrigés enregistrés au niveau du 4^e stade larvaire de *H. armigera* étaient de $13,3 \pm 14,9\%$; $18,1 \pm 4,1\%$; $57,8 \pm 11,0\%$ et de $90,0 \pm 10,0\%$ pour les doses 10^4 conidies/insecte, 10^5 conidies/insectes, 10^6 conidies/insecte et 10^7 conidies/insecte, respectivement. Malgré le grand écart observé entre les doses les plus élevées, les taux moyens finaux de mortalité n'étaient pas significativement différents au seuil de 5% (Figure 5).

Tout comme pour la souche de *Metarhizium* Met 31, seuls les insectes morts issus des doses les plus élevées (10^7 et 10^6 conidies/insecte) avaient sporulé, avec 77,8% pour 10^7 conidies/insecte

et 4,8% pour 10^6 conidies/insecte (Figure 6).

3.2. Formation des chrysalides, émergence des adultes et oviposition

Expérimentation I

Les taux moyens de chrysalides formées ont varié de $13,3 \pm 6,7\%$ (10^7 conidies/insecte) à $66,7 \pm 14,5\%$ (Témoins). Les plus faibles taux de formation de chrysalides avaient été enregistrés au niveau des doses les plus élevées (10^7 et 10^6 conidies par insecte) avec les plus faibles taux d'émergence des adultes (Figure 7). En dehors des témoins, les adultes issus des larves traitées à la souche Met 31 étaient presque tous des mâles malformés (ailes endommagées). Aucune des femelles issues de l'expérimentation I n'avait pondu d'œuf (Tableau 2).

Expérimentation II

*Application de *M. anisopliae* (Met 31)*

Avec les larves de stade 4 de *H. armigera*, les taux de chrysalides formées avaient été plus élevés comparativement à ceux obtenus avec le 3^e stade larvaire. Ces taux étaient de $90,0 \pm 10\%$, $80,0 \pm 5,8\%$, $76,7 \pm 8,8\%$, $63,3 \pm 8,8\%$ et $20,0 \pm 10\%$ respectivement pour le témoin, les doses 10^4 , 10^5 , 10^6 et 10^7 conidies/insecte. Seule la plus forte dose, 10^7 conidies/insecte, a eu un taux significativement inférieur aux autres (SNK = 30,2%) (Figure 8). En dehors des témoins, les taux d'émergence étaient similaires pour tous les autres traitements. Le nombre de mâles, de femelles et le nombre d'œufs pondus sont présentes dans le tableau 2. Lorsque les larves du stade 4 avaient été traitées, le nombre d'adultes émergés était plus élevé, mais aussi avec une plus forte proportion de mâles. La dose de 10^7 conidies par insecte n'a enregistré aucune émergence femelle. Tous les adultes émergés au niveau des témoins étaient tous sains et les femelles avaient pondu toutes ensemble jusqu'à 590 œufs (Tableau 2).

*Application de *B. bassiana* (Bb 11)*

Tout comme pour le *Metarhizium*, les taux de chrysalides formées ont été élevés pour le 4^e stade comparativement à ceux obtenus avec le 3^e stade exposé à Met 31. Ils ont varié entre $13,3 \pm 3,3\%$ (10^7 conidies/insecte) et $90 \pm 0,0\%$ (Témoins). La formation des chrysalides et l'émergence des adultes ont été doses dépendantes. Néanmoins, aucune différence significative n'a été observée entre les témoins et les plus faibles doses (10^4 et 10^5 conidies par insecte). Toutes les chrysalides formées au niveau des témoins sont devenues adultes (Figure 9). Les mâles étaient en nombre plus importants que les femelles (Tableau 2). Tout comme pour la souche de *Metarhizium* Met 31, aucune femelle n'a émergé pour la dose de 10^7 conidies /insecte de la souche de *Beauveria* Bb 11.

Estimation de la DL50

L'analyse de régression de Cox a indiqué que les différentes doses des champignons utilisés étaient un prédicateur significatif et indépendant de la survie des larves de *H. armigera* testées ($P < 0.05$) (tableau 3) et que le modèle a fourni une bonne régression.

Les valeurs de B

Les valeurs de B ont montré l'existence d'une relation de dose-réponse. Cette relation a été forte pour la souche de *B. bassiana*, Bb 11 qui a eu une valeur de B plus élevée ($B = 0,440$).

3.3. Evolution de la DL 50 après l'application des champignons

Application du Metarhizium sur les stades 3 et 4 de H. armigera

Les courbes de DL50 des stades 3 et 4 de *H. armigera* sont représentées dans les Figures 10 et 11 respectivement. L'effet dose-réponse a été significatif pour toutes les souches utilisées et était fonction de la valeur de B. Plus B était élevé, moins larges étaient les intervalles de confiance. Il fallait $3,47 \times 10^{18}$ conidies/insecte, $7,40 \times 10^{10}$ conidies/insecte, $1,60 \times 10^{10}$ conidies/insecte et $3,72 \times 10^8$ conidies/insecte pour tuer 50% des larves de 4^e stade, en respectivement, 3 jours, 5 jours, 7 jours et 9 jours, tandis qu'il fallait $3,85 \times 10^{17}$ conidies/insecte, $4,67 \times 10^{10}$ conidies/insecte, $4,23 \times 10^8$ conidies/insecte et $3,19 \times 10^6$ conidies/insecte pour tuer 50% des larves de 3^e stade, en respectivement 2 jours, 5 jours, 7 jours et 9 jours (Figure 10 & 11).

Application du Beauveria sur les larves de stade 4 de H. armigera

La souche de *Beauveria* donnée la valeur B (0,440) la plus élevée et par conséquent des valeurs de DL50 les moins élevées. La dose-réponse a été une relation très forte pour Bb 11 (Figure 12). Ainsi, il faut $4,6 \times 10^7$ conidies/insecte pour tuer 50% des larves de 4^e stade en 5 jours, alors qu'il en faut $7,40 \times 10^{10}$ conidies/insecte pour la souche de *Metarhizium*, Met 31. Ceci se remarque également par la diminution de la largeur des intervalles de confiance, comparativement à celle des intervalles de confiance de Met 31.

4. DISCUSSION

Mortalité et sporulation des larves mortes

Les différents résultats obtenus montrent que la mortalité des larves de *H. armigera* est fonction de la quantité de conidies qu'elles reçoivent. Les deux souches de champignons ont été infectieuses pour tous les stades utilisés en adéquation avec les résultats de Kulkarnia *et al.*, (2008). Au stade L3, les doses 10^6 et 10^7 conidies/insecte pour le *Metarhizium* s'équivalent

statistiquement, malgré le taux de mortalité plus élevé enregistré avec la dose de 10^7 conidies/insecte. Ce taux de mortalité a été nettement supérieur pour 10^7 lorsque ces mêmes doses ont été appliquées sur les stades L4 ; ceci, à cause probablement de la taille plus élevée des larves L4 comparativement à celle des L3. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Bateman *et al.* (1996) qui ont trouvé que l'infection des criquets par les champignons est fonction de leur poids. De même, Gundannavar *et al.* (2006) ont observé que, après application de différentes concentrations (10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^7 et 10^8 conidies par ml) de *B. bassiana* sur les larves de *H. armigera*, les jeunes étaient plus susceptibles que les plus âgées.

Au-delà de 10^6 conidies/insecte, la réponse effet/dose n'est plus perceptible sur les larves L3 et L4 avec, respectivement le *Metarhizium* et le *Beauveria* due probablement à la grande variabilité dans la mortalité d'une répétition à l'autre. Le nombre de chenilles L3 mortes après inoculation du *Metarhizium* et qui ont sporulé est également fonction de la dose. Il ressort qu'une dose de 10^6 conidies par insecte, soit une concentration de 5×10^8 conidies/ml permettra d'atteindre les mêmes taux de mortalité que 10^7 conidies/insecte en deux semaines, bien entendu que l'insecte déjà infecté n'arrive plus à s'alimenter correctement (Thomas *et al.*, 1997). Les chenilles mortes suite à l'inoculation des stades L4 avec des faibles doses (10^4 , 10^5 conidies/insecte) n'ont pas sporulé, ce qui serait dû probablement à la faible quantité de conidies reçue par rapport à leur poids.

Formation des chrysalides et émergence des adultes

D'une manière générale, la formation des chrysalides et l'émergence des adultes ont été doses dépendantes, aussi bien pour tous les stades larvaires de *H. armigera* utilisées que pour les champignons testés. Le nombre de chrysalides formées et celui des adultes émergés sont de loin plus faibles pour le stade 3 que pour le stade 4. Ceci serait dû aux forts taux de mortalité enregistrés au niveau des larves de stade 3 et de leurs chrysalides. En effet, au stade 3, les conidies ont beaucoup plus le temps de se développer dans l'organisme de la larve avant sa chrysalidation. De ce fait, même au stade chrysalide, l'infection continue, tel que l'ont souligné Gopalakrishan *et al.*, (1989). Wilson (1983) a noté en Australie, des mortalités naturelles de chrysalides de *Heliothis* spp. allant de 15 à 20% due au *B. bassiana*. De nos résultats obtenus, il ressort que les chrysalides femelles sont beaucoup plus vulnérables que les chrysalides mâles. Plus la dose est élevée, moins nombreuses sont les femelles qui émergent. De plus les mâles qui émergent sont malformés (ailes endommagées) limitant ainsi leur déplacement. Ces résultats corroborent ceux de Prasad et Syed (2010) qui, après avoir appliqué différentes concentrations (0,1 ; 0,125 ; 0,2 et $0,25 \times 10^8$ conidies par ml) de *B. bassiana* sur les 3^e stades larvaires de *H. armigera*, on observé, en dehors des taux élevés de mortalité, des larves à corps gonflé, des

larves léthargiques couvertes de mycélium fongique. Ces larves anormales ont été incapables de muer en quatrième stade. Ce qui est un résultat intéressant pour la gestion du ravageur avec les biopesticides à base de champignons entomopathogènes.

Modèle de régression de Cox et la DL50

Le modèle de régression de Cox est plus flexible dans l'analyse des essais biologiques de biopesticides que les modèles précédents tels que des analyses de Probit et de Logit. L'analyse de Probit et l'analyse de régression Logit ont trouvé leur large utilisation en modélisant la probabilité d'une réponse par rapport à la dose (Finney, 1971 ; Robertson et Preisler, 1992). Preisler et Robertson (1989) ont discuté des problèmes liés à l'analyse des données des expériences de temps-dose-réponse et ont conclu que : la manière classique de procéder à une analyse des données indépendantes sur le temps ou la dose est de séparer soit l'effet de la dose ou l'effet du temps des données temps-dose-mortalité utilisées dans les essais biologiques. Ces modèles qui considèrent des effets de temps et de dose semblent être plus appropriés pour évaluer l'efficacité d'un microbe pathogène ou d'un pesticide sur la cible (Robertson et Preisler, 1992). Les modèles de régression de Cox ont bien fonctionné en modélisant des liens existant dans temps-dose-survie des isolats fongiques infectant les larves de *H. armigera* dans ces expérimentations.

Toutes les régressions de Cox adaptées aux données de survie obtenues à partir des larves L3-L4 traitées avec différentes doses des différents isolats, ont eu des valeurs relativement élevées de B. Les ajustements des valeurs de B étaient tous significatifs, indiquant que les données montrent une réponse effet/dose significative. Pour la même raison, les courbes de DL 50 ne sont pas très raides et leurs intervalles de confiance sont relativement moins grands. Nos résultats sont conformes à ceux de Abebe (2002) qui a utilisé certaines souches de *M. anisopliae* et de *B. bassiana* virulentes contre les termites.

Nos résultats montrent également que pour un même stade larvaire, le temps mis pour mourir est fonction de la dose appliquée. De même, à un temps donné, la dose à appliquer est fonction du stade larvaire : plus le stade est évolué, plus la quantité de conidies à appliquer sera élevée (i.e. à 5 jours, il faut $4,67 \times 10^{10}$ conidies pour L3 contre $7,40 \times 10^{10}$ conidies pour L4).

5. CONCLUSION

De ces expérimentations, on peut conclure que :

1. La réponse effet/dose a été significative pour tous les stades larvaires de *H. armigera* utilisés et pour tous les champignons entomopathogènes utilisés.

2. Des deux stades larvaires de *H. armigera* utilisés, le stade L3 est le plus vulnérable. Les doses 10^6 et 10^7 conidies/insecte (concentrations de 5×10^8 et de 5×10^9 conidies/ml) ont donné des résultats similaires permettant de choisir la moins élevée.
3. Des résultats obtenus, les concentrations de 10^9 , 10^{10} conidies/ml peuvent être testées en milieu semi-champ et champ afin de déterminer la dose et le volume d'application pour la gestion de *H. armigera* ; en milieu semi-champ et au champ la probabilité d'atteindre une larve est plus faible compte tenu des barrières (plantes de cotonnier) pour une bonne couverture de l'application.

Bibliographie

- Abbott W. S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide *J. Eco. Ento.*, **18**, 265-267.
- Abdel-Razek A. S., Abbas M. H., El-Khouly M., & Abdel-Rahman A., 2006. Potential of microbial control of diamondback moth, *Plutella xylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Plutellidae) on two cabbage cultivars under different fertilization treatments. *J. Appl. Sci. Res.*, **2**, 942-948.
- Abebe H., 2002. Potential of entomopathogenic fungi for the control of *Macrotermes subhyalinus* (Isoptera: Termitidae). Thèse de Doctorat: Univeristé de Hannovre (Allemagne).
- Adane K., Moore D. & Archer S. A. 1996. Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *J. Stored Prod. Res.*, **32**, 105-113.
- Anonyme, 2002. Projet d'appui à la réforme de la filière coton. Séminaire atelier sur le Programme de lutte intégrée contre les ravageurs du cotonnier au Bénin. Bohicon, les 19 et 20 août 2002.
- Ascher K. R. S., Eliyahu M. & Nemmy N. E. 1991. Inherent toxicity of the acylureas hexaflumuron and clorfluazuron against larvae of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae). *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **98**, 391-397.
- Bassi A., 1835. Del mal del segno, calcinaccio o moscardino, malattia che affligge I bachi da seta. Lodi: Tipografia Orcesi [English translation by PJ Yarrow: 1958. On the mark disease, calcinaccio or muscardine, a disease that affects silk worms. Ainsworth GC, Yarrow PJ, eds. APS Phytopathol. Classics, **10**, 1-49.

- Bateman R. P., Carey, M., Batt D., Prior C., Abraham Y., Moore D., Jenkins N. & Fenlon J., 1996. Screening for virulent isolates of entomopathogenic fungi against the desert locust, *Schistocerca gregaria* (Forskål). *Bio. Sci. Tech.* **6**, 549 – 560
- Bateman, R.P., 1997. The development of a mycoinsecticide for the control of locusts and grasshoppers. *Outlook on Agriculture*, **26**, 13-18.
- CABI & OEPP, 2003. Fiche informative sur les organismes de quarantaine : *Helicoverpa armigera* ; http://www.eppo.org/QUARANTINE/insects/Helicoverpa_armigera/F-heliar.pdf (06/10/2009).
- Cherry A., Jenkins N., Heviefo G., Bateman R. P. & Lomer C., 1999. A West African pilot scale production plant for aerial conidia of *Metarhizium* sp for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Bio. Sci. Tech.*, **9**, 35-51.
- De la Rosa W., Alatorre R., Trujillo J., & Barrera J. F., 1997. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee borer (Coleoptera: Scolytidae) *J. Econ. Entomol.*, **90**, 1534-1538.
- Deshpande M.V., Chandele A.G., Nahar P., Hadapad A., Patil G., Keller S., Hassani M. & Tuor U., 2001. Entomopathogenic fungi as Myco- insecticides. National Symposium on "Plant Protection Strategies for Sustainable Agri-Horticulture, at Jammu", India, October 12-13, 2001.
- Douro Kpindou O. K., Djegui D. A., Glitho I. A., Tamo M., 2011. Sensitivity of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic fungi, *Inter. J. Trop. Insect Sci.*, en préparation.
- Finney D. J., 1971. Probit Analysis 3rd ed. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Godonou I., James B., Atcha-Ahowe, C., Vodouhe S., Kooyman C., Ahanchede A. & Korie S., 2009. Potential of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates from Benin to control *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). *Crop Protection*, **28**, 220-224.
- Gopalakrishnan C. & Narayanan K., 1989. Studies of the susceptibility of *Heliothis armigera* hübner (Lepidoptera: Noctuidae) to the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin var. *anisopliae* Tulloch. *Entomon.*, **14**, 191-197.
- Gowda J. & Prasad T. N. R., 1992. Occurrence of *Beauveria bassiana* Bals. Vuil. On the redgram podborer *Heliothis armigera* Hüb. *Journal of Biological Control*, **6**, 48-49.
- Gundannavar K. P., Lingappa S. & Giraddi R. S., 2006. Susceptibility of *Helicoverpa armigera* (Hubner) to *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuill. Karnataka *J. of Agricultural Sciences*, **19** (4): 952-953.

- James, B., Godonou, I. & Atcha-Ahowe C., 2009. Promoting biopesticide candidates from experimental to commercial level for sustainable vegetable production. *Pesticides Management in West Africa* n° 7, mars 2009, 62 p.
- Johnson D.L. & Goettel M., 1993. Reduction of grasshopper populations following field application of the fungus *Beauveria bassiana*. *Bioc. Sci. and Techn.*, **3**, 165 - 175.
- Kulkarnia S. A., Ghormadeb V., Kulkarnic G., Kapoora M., Chavana S., B., Rajendrana A., Patild S., K., Shouchec Y. & Deshpandea M., V. 2008. Comparison of *Metarhizium* isolates for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in chickpea. *Bio. Sci. Tech.*, **18**, 809-828.
- Lefebvre C. L., 1931a. Preliminary observations on two species of *Beauveria* attacking the corn borer, *Pyrausta nubilalis* Hüber. *Phytopathol.*, **21**, 1115-1128.
- Lefebvre C. L., 1931b. A destructive fungus disease of the corn borer. *Phytopathology*, **21**, 124-125.
- Lomer C. J., Bateman R. P., Dent, D., De Groot H., Douro-Kpindou O.-K., Kooyman C., Langewald J., Ouambama Z., Peveling, R., & Thomas M., 1999. Development of strategies for the incorporation of biological pesticides into the integrated management of locusts and grasshoppers *Agric. and Forest Entomo.*, **1**, 71–88.
- Lomer C. J., Bateman R. P., Johnson D.L., Langewald J., Thomas, M., 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annual Review of Entomology*, **46**, 667 -702.
- Lujan S. & Wu Kongniming, Yu Yuan. G., 2001. The pathogenicity of *Beauveria bassiana* to *Helicoverpa armigera* under different temperatures and humidities. *Acta Entomol. Sinica* **44**(4), 501-506.
- Maddox J. V., 1982. Use of insect pathogens in pest management. Introduction to Insect Pest Management. *R.L. Metcalf and W.H. Luckman (eds)*, 2nd , pp 175-216. Wiley, New York.
- Parry G., 1982. Le cotonnier et ses produits. Techniques agricoles et productions tropicales. Maisonneuve et Larose, Paris, France, 502p.
- Peveling R., Demba S. A., 1997. Virulence of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal and Toxicity of Diflubenzuron, Fenitrothion-Esfenvalerate and Profenofos-Cypermethrin to Nontarget Arthropods in Mauritania Arch. *Environ. Contam. Toxicol.*, **32**, 69-79.
- Prasad A. & Syed N., 2010. Evaluating Prospects of Fungal Biopesticide *Beauveria Bassiana* (Balsamo) Against *Helicoverpa Armigera* (Hubner): An Ecosafe Strategy for Pesticidal Pollution. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* **1**(3):596-601.
- Preisler H. K. & Robertson, J. L., 1989. Analysis of time-dose-mortality data. *J. Econo. Entomol.*, **82**, 1534-1542.

- Rao N. V., Rao K. T. & Reddy A. S., 1992. A note on the efficacy of insect growth regulators to manage gram caterpillar, *Helicoverpa armigera* (Hüb). *J. Ins. Sci.*, **5**, 169-171.
- Robertson J. L & Preisler H. K., 1992. Pesticide Bioassay with Arthropods. *CRC Press*, London.
- SAS, 2002-2008. SAS® 9.2, Copyright (c) 2002-2008 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- SPSS Inc., 1989 – 2003. Apache Software Foundation, Standard License.
- Teakle R. E. & Jensen J. M., 1985. *Heliothis punctigera*. In *Handbook of Insect Rearing* (eds P Singh & RF Moore), Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 313–322,
- Thomas M. B., Blanford S. & Lomer C. J., 1997. Reduction of feeding by the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*, following infection by the fungal pathogen, *Metarhizium flavoviride*. *Bio. Sci. Tech.*, **7**, 327 - 334.
- Vandamme P. & Angelini A., 1966. Complexe pathogène chez *Helicoverpa armigera* (Hüb.). *Coton et fibres tropicales*, **21**, 333-338.
- Wilson A. G. L., 1983. Abundance and mortality of overwintering and spring emergence of *Heliothis* spp. *J Aust Entomol Soc.*, **22**, 191-199.

Tableaux

Tableau 1 : Stades larvaires de *H. armigera* utilisés, souches de champignons et doses appliquées

Expérimentation	Stade larvaire	Souche	Concentration (conidies/ml)	Volume d'application	Dose (conidies/ insecte)
I	3 ^e	Met 31	0; 5x10 ⁶ ; 5x10 ⁷ ; 5x10 ⁸ ; 5x10 ⁹	2 µl	0 ; 10 ⁴ ; 10 ⁵ ; 10 ⁶ ; 10 ⁷
II	4 ^e	Met 31, Bb 11	0 ; 10 ⁷ ; 10 ⁸ ; 10 ⁹ ; 10 ¹⁰	1 µl	0 ; 10 ⁴ ; 10 ⁵ ; 10 ⁶ ; 10 ⁷

Tableau 2 : Nombre d'adultes émergés et d'œufs pondus après inoculation des larves aux champignons entomopathogènes

Expérimentation	Traitements (Conidies/insecte)	Nombre d'adultes	Nombre de ♂	Nombre de ♀	♂ malformés	♀ malformées	Nombre d'œufs pondus
I	Met 31	15	8	7	0	0	13
	sur L3	6	5	1	5	1	0
	10 ⁴	4	3	1	0	0	0
	10 ⁵	1	1	0	1	0	0
	10 ⁶	3	2	1	1	1	0
II	10 ⁷	27	17	10	0	0	590
	Met 31	16	11	5	9	4	285
	sur L4	13	10	3	7	2	220
	10 ⁴	9	8	1	1	1	62
	10 ⁵	6	6	0	6	0	0
	10 ⁶	27	16	11	0	0	563
	Bb 11	17	13	4	11	1	310
	sur L4	13	9	4	7	2	180
	10 ⁴	8	7	1	5	1	130
	10 ⁵	4	4	0	4	0	0
	10 ⁶						
	10 ⁷						

Tableau 3 : Modèle d'estimation de la valeur B résultant de la régression Cox pour les souches de *M. anisopliae* et de *B. bassiana* et les stades larvaires de *H. armigera* testés, y inclus les coefficients de Wald.

Souches de champignons	Stade de <i>H. armigera</i>	B	SE	Wald	ddl	Prob.
Met 31	L3	0,312	0,087	12,844	1	0,000
Met 31	L4	0,344	0,091	14,296	1	0,000
Bb 11	L4	0,440	0,093	22,132	1	0,000

B = Valeur B de la régression Cox ; SE = Erreur Standard ; Wald = coefficient de Wald ; ddl = degré de liberté ; Prob. = Probabilité

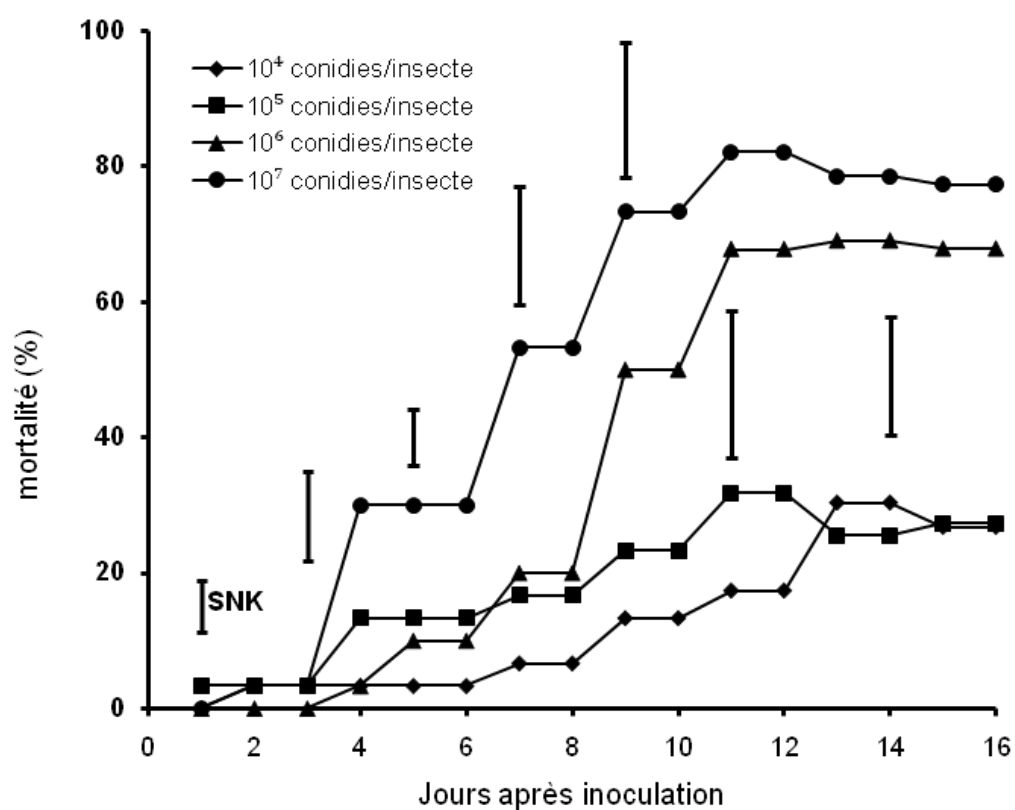


Figure 1 : Evolution temporelle des taux moyens de mortalité corrigés après inoculation des larves 3^e stade de *H. armigera* au Met 31

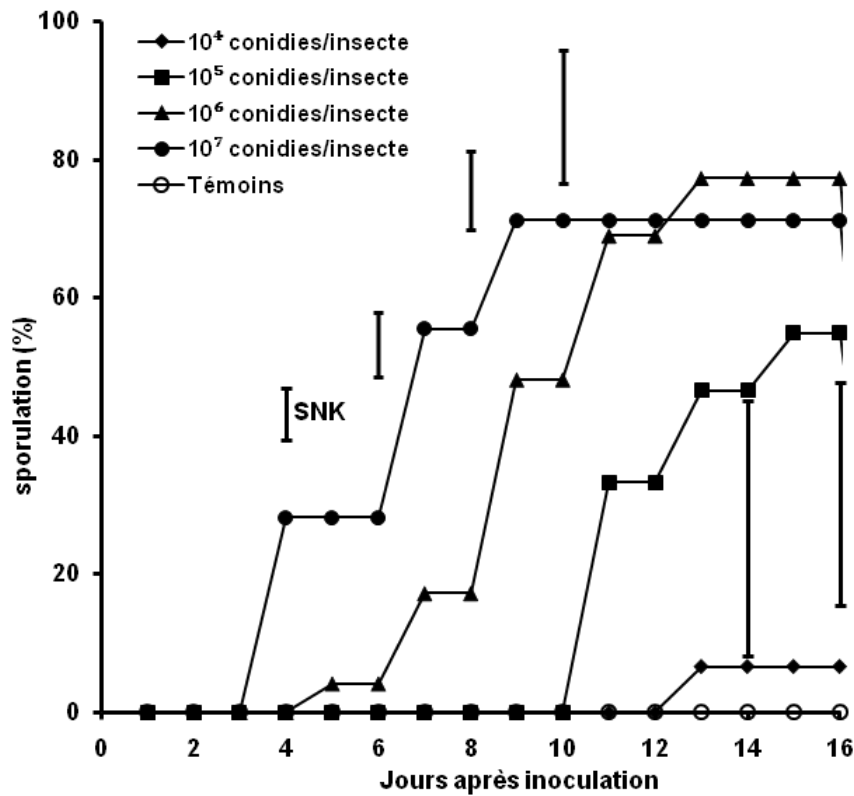


Figure 2 : Evolution temporelle des taux moyens de sporulation des insectes morts après inoculation des larves de 3^e stade de *H. armigera* au Met 31

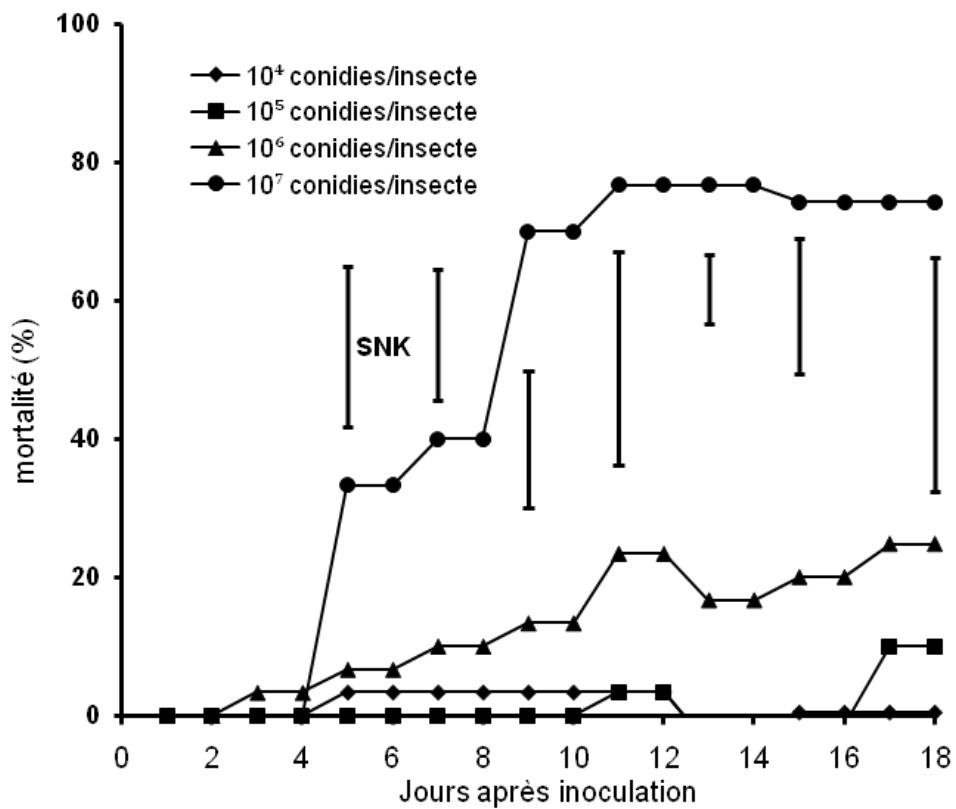


Figure 3 : Evolution temporelle des taux moyens de mortalité corrigés des larves L4 de *H. armigera* après inoculation au Met 31.

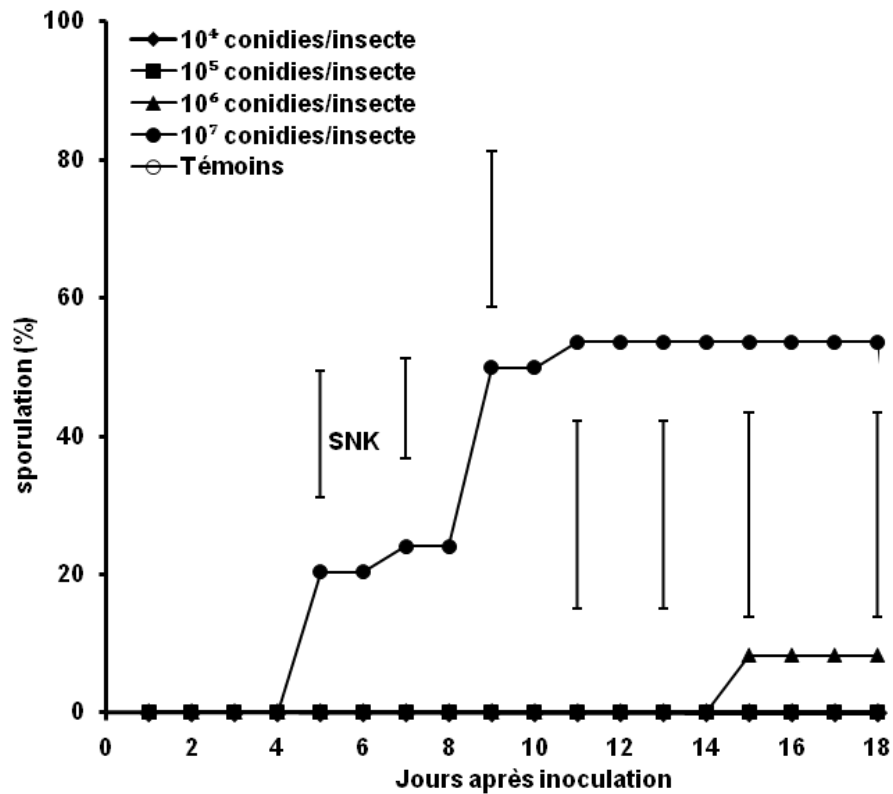


Figure 4 : Evolution temporelle des taux de sporulation des larves mortes après inoculation des stades L4 de *H. armigera* au Met 31

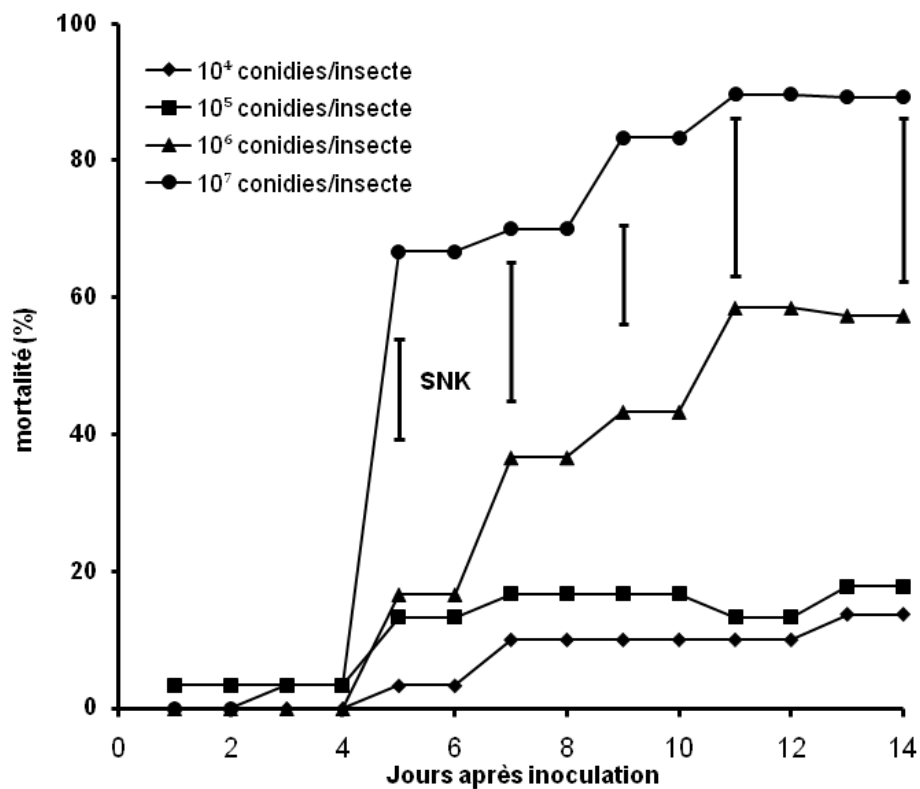


Figure 5 : Evolution temporelle des taux de mortalité corrigés des larves L4 de *H. armigera* après inoculation au Bb 11

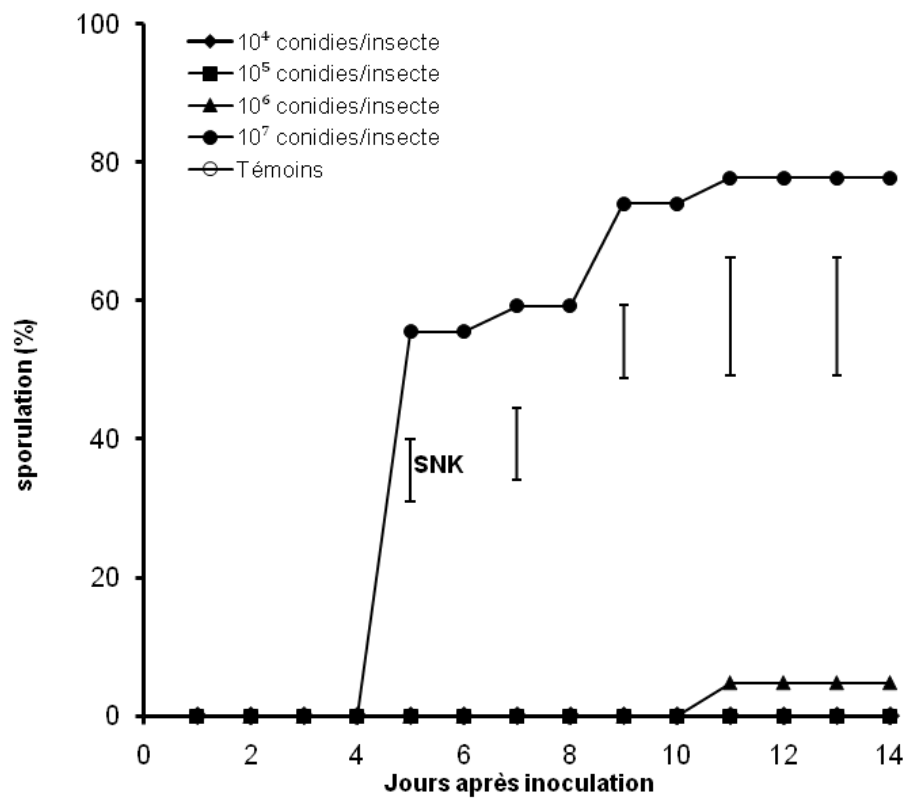


Figure 6 : Evolution temporelle des taux de sporulation des larves mortes après inoculation des stades L4 de *H. armigera* au Bb 11.

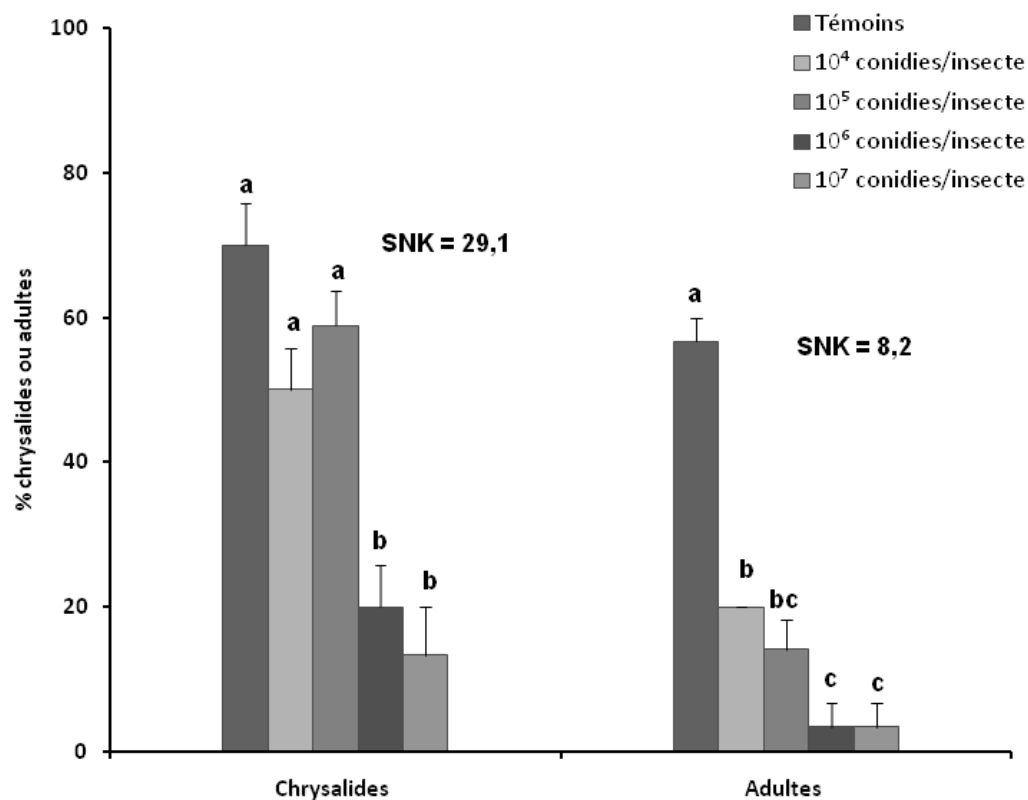


Figure 7 : Taux de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes deux semaines après inoculation des larves L3 de *H. armigera* au Met 31.

Les histogrammes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (Analyse de variance suivie de SNK).

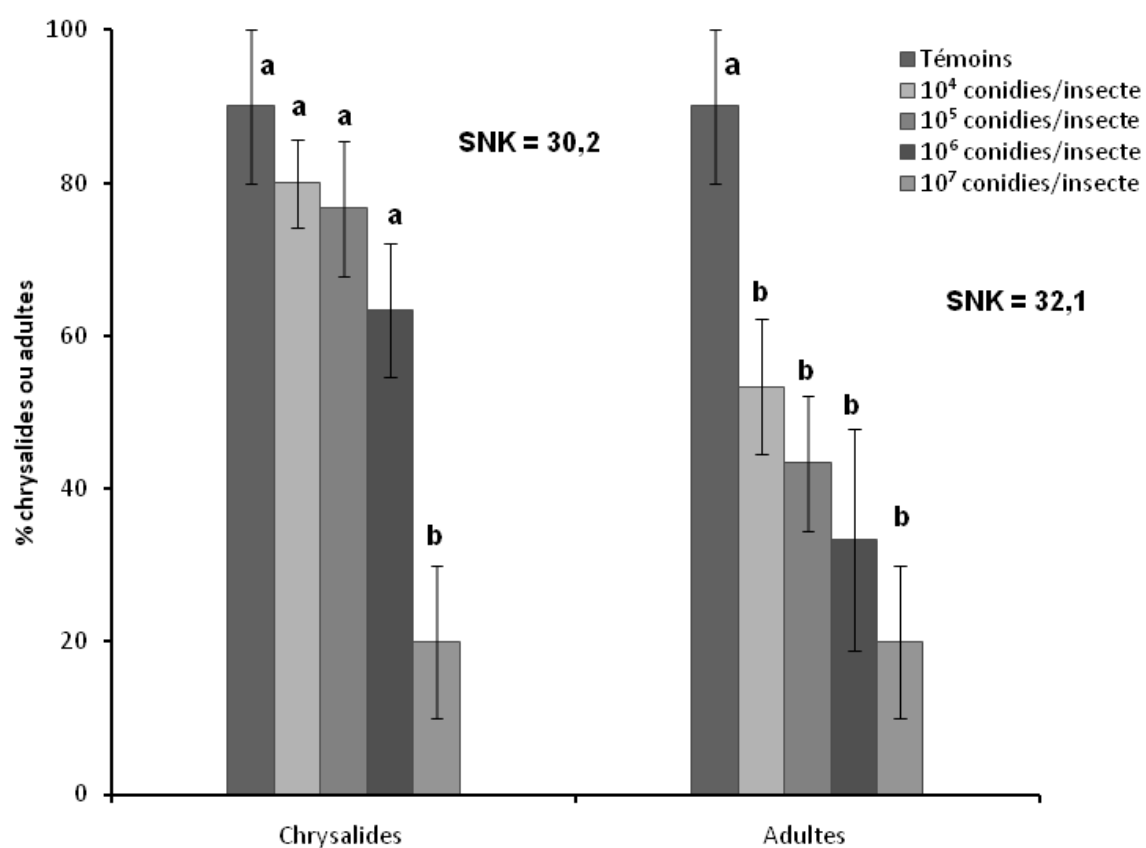


Figure 8 : Taux moyen de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes deux semaines après inoculation des larves L4 de *H. armigera* au Met 31.
Les histogrammes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (Analyse de Variance suivie de SNK).

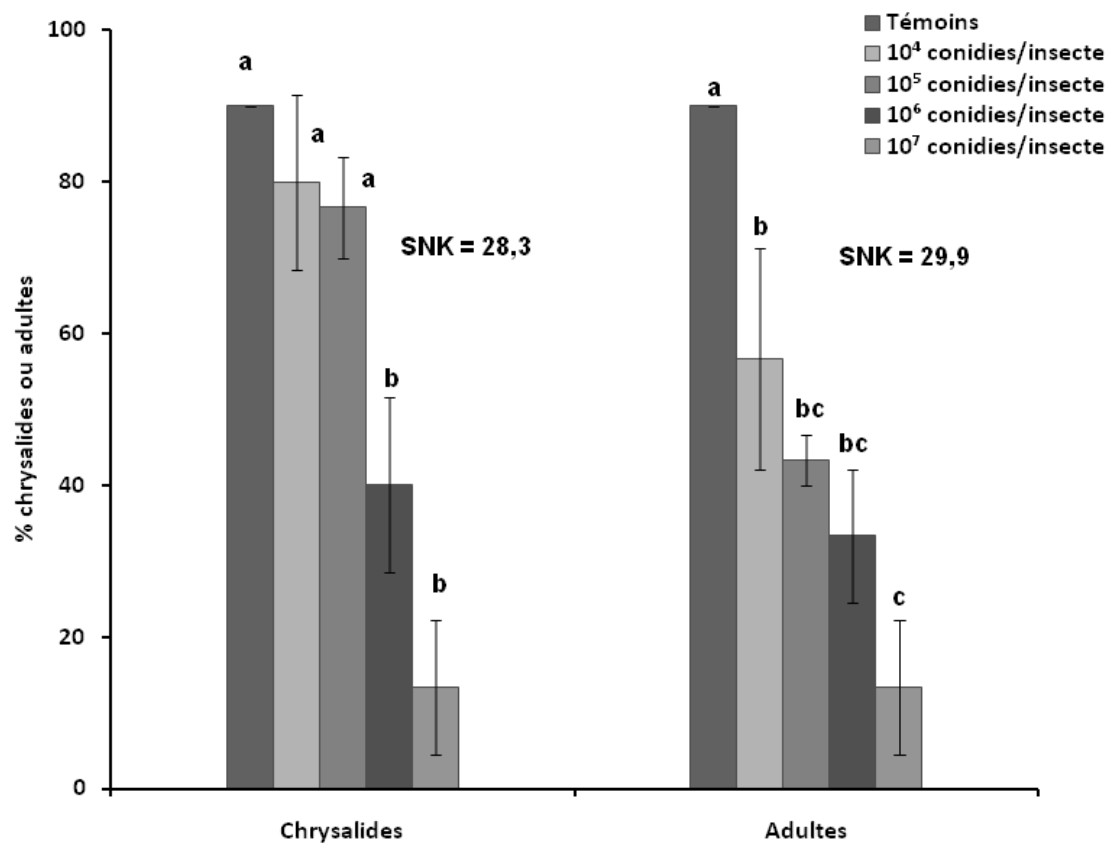


Figure 9 : Taux moyen de formation des chrysalides et d'émergence d'adultes deux semaines après inoculation des larves L4 de *H. armigera* au Bb 11. Les histogrammes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différents au seuil de 5% (Analyse de Variance suivie de SNK).

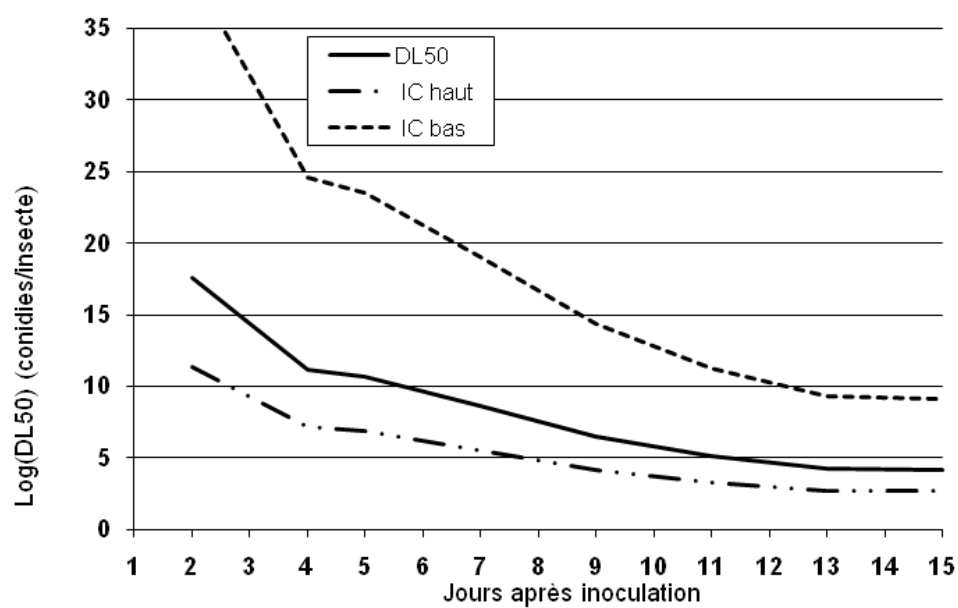


Figure 10: Valeurs de DL50, après inoculation des larves L3 de *H. armigera* à différentes doses de Met 31

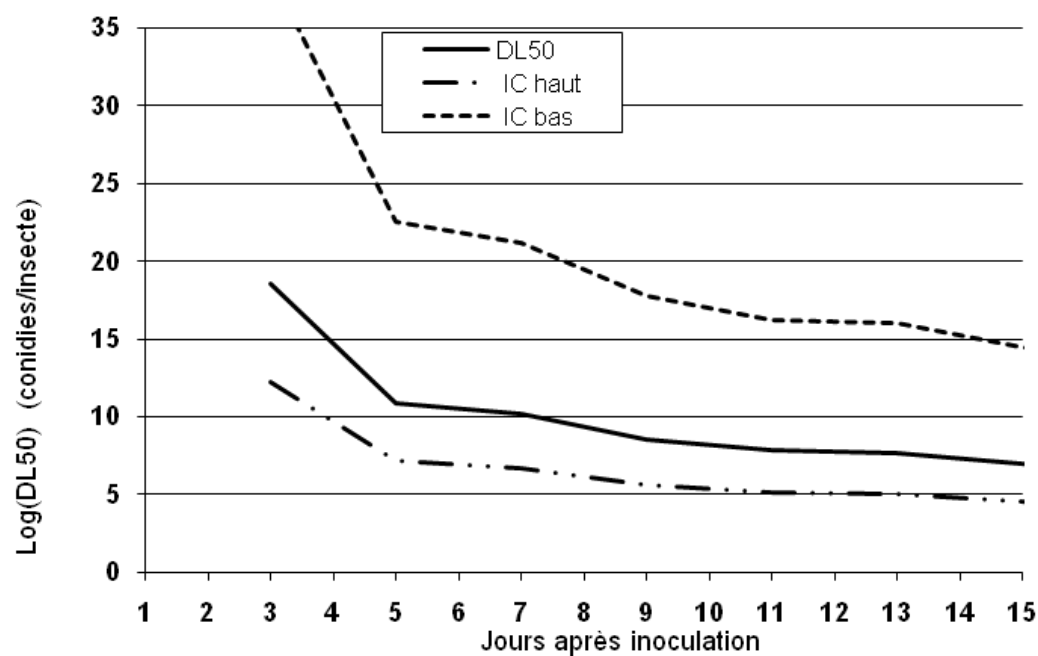


Figure 11: Valeurs de DL50, après inoculation des larves L4 de *H. armigera* à différentes doses de Met 31

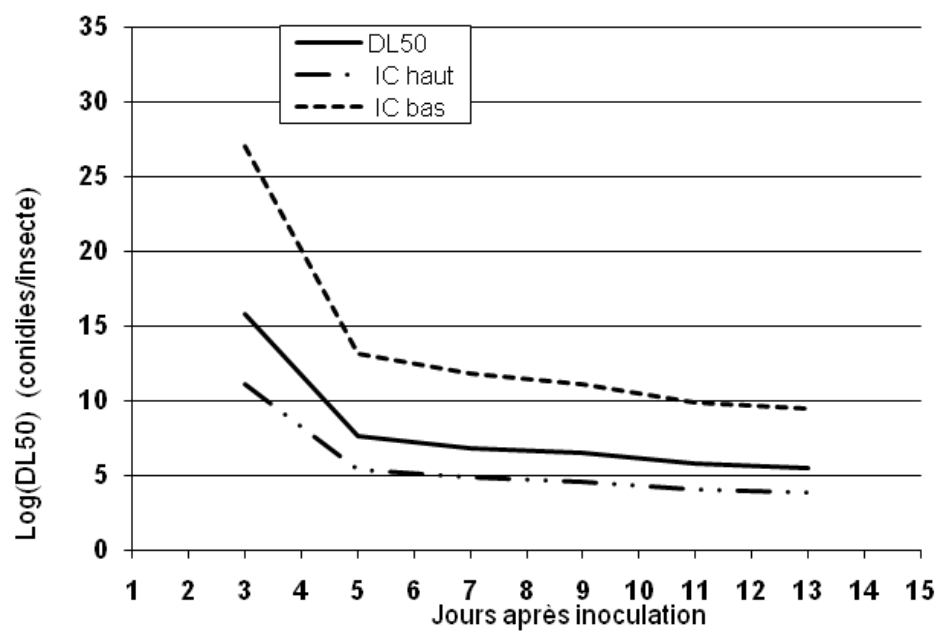


Figure 12: Valeurs de DL50, après inoculation des larves L4 de *H. armigera* à différentes doses de

Dose transfer of an oil-based formulation of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) sprays to cotton bollworm in an arena trial

O.K. Douro Kpindou^{1*}, D.A. Djegui¹, I.A. Glitho²
and M. Tamò¹

¹International Institute of Tropical Agriculture, 08 BP 0932, Tri Postal, Cotonou, Benin and ²Laboratoire d'Entomologie Appliquée, Faculté des Sciences, Université de Lomé, BP 1515, Lomé, Togo

(Accepted 8 November 2011)

Abstract. A cotton field was used to set up an arena trial for investigating the dose transfer of oil-based ultra-low-volume sprays of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin to the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Hübner). Two doses of conidia (75 and 50 g/ha, being 3.75×10^{12} and 2.5×10^{12} conidia/ha, respectively) formulated in 2 litres (70:30, kerosene–peanut oil) were applied using a Berthoud 'Micro Ulva' to three groups of larvae of cotton bollworms positioned in three rows downwind of a single spray line. Both the distribution of the droplets and the effect of direct contact with spray droplets were quantified. The mean number of droplets decreased from 416 (± 60) droplets per cm² (line 1; 0.4 m) to 45 (± 36) droplets per cm² (line 3; 5 m). To achieve 50% mortality, > 10 and > 13 days were necessary for 75 and 50 g/ha, respectively. From day 15, the difference in mortality rates was significant between the two treatments. At line 3 (5 m), at 12 days after application, the mortality rate reached 52% for 75 g/ha and 47% for 50 g/ha. The results are discussed in view of optimizing the application of the biopesticides.

Key words: *Helicoverpa armigera*, *Metarhizium anisopliae*, biopesticide, dose transfer, cotton field, ultra-low-volume application

Introduction

Recently, a new promising isolate of *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Met 31) has been identified for the control of *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) (O.K. Douro Kpindou, unpublished results). Met 31 was originally isolated from *Sesamia calamistis* Hampson (Lepidoptera: Noctuidae) in Benin (Douro Kpindou *et al.*, 2010). Laboratory assays have shown that an oil-based formulation of *M. anisopliae* conidia was efficacious in killing larvae of the bollworm (Kumar and

Chowdhry, 2004; Kulkarni *et al.*, 2008). However, few reports are available on the use of the entomopathogenic fungus (EPF) against *H. armigera* in the field. Applying the EPF as a biopesticide formulation in the field results in a slower killing effect than in laboratory experiments, mainly because of different environmental conditions (Bateman and Thomas, 1996). Percentage mortality resulting from direct spray is related to application techniques and physical environmental factors (temperature, wind speed, vegetation structure, etc.). Even in trials against *Zonocerus variegatus* (L.) (Orthoptera: Pyrgomorphidae) where application was satisfactory (> 95% of insects directly impacted with droplets), the speed of kill in the field was

*E-mail: d.kpindou@cgiar.org

1–2 days slower than expected from laboratory data (Douro Kpindou *et al.*, 1995). Bateman and Thomas (1996), discussing the problem associated with the slower speed of kill observed by using Green Muscle® against locusts in the field, described three principal modes of myco-insecticide dose transfer to target insects: (i) direct impact by spray droplets, (ii) secondary pickup of spray residues on vegetation or soil, and (iii) horizontal transmission from sporulated cadavers. According to the same authors, among these different modes of dose transfer to target insects, direct impact is the most important.

For contact synthetic insecticides, secondary pick-up is often more important than direct contact, but in the case of biopesticides, this way of infection may be influenced by environmental factors, such as sunlight (ultra-violet). This necessitates an application technique to obtain acceptable mortality in the field. However, field trials carried out with the EPF *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal against *Z. variegatus* (Lomer *et al.*, 1993; Bateman *et al.*, 1994; Langewald *et al.*, 1997) have indicated that secondary infections occur widely. Thomas *et al.* (1995) have documented the effects of secondary cycling on surviving populations of locusts and grasshoppers.

Also, it is well known that in the field, the number of large droplets that directly reach insects is less than what is observed in the laboratory. This has been documented in studies carried out with a fluorescent tracer by counting droplets on the cuticle of insects (Staniland, 1959). Hence, it appears that increasing the chance to kill insects using portable ultra-low-volume (ULV) sprayers can be achieved by regulating them in such a manner as to produce droplets of average size rather than fine ones (Symmons *et al.*, 1991). In our approach for developing large-scale field tests, we followed recommendations by Matthews (1992), which emphasized the need for carrying out small-scale (arena) trials first. This was important because non-evaporative diluents such as oils are required to exploit the advantages of ULV spraying. Moreover, as with novel pesticides, it is necessary to develop formulations compatible with standard practices similar to the control of locusts and grasshoppers (Bateman *et al.*, 1992; Bateman, 1997).

Materials and methods

Fungal isolate

The fungus used was *M. anisopliae* isolate Met 31 produced in biphasic culture (Cherry *et al.*, 1999) at the Benin station of the International Institute of Tropical Agriculture (IITA).

Insect colonies

The IITA-Benin laboratory provided the insects used in this study. Larvae of *H. armigera* were previously collected from cotton and tomato fields at different localities in Benin and maintained on an artificial diet (Teakle and Jensen, 1985) after their initial identification by the IITA-Benin Biodiversity Centre. They were maintained at $70 \pm 5\%$ relative humidity, $26 \pm 1^\circ\text{C}$ with a photoperiod of 12 h light:12 h dark. Third larval instars from the seventh generation were used in the trials.

Arena trial

A trial in a small cotton field at the IITA-Benin station in Cotonou ($06^\circ25'\text{N}$; $02^\circ19'\text{E}$) was conducted to quantify direct contact with spray droplets. The test was carried out using three replicated plots (each measuring $50 \times 50\text{ m}$) as shown in Fig. 1. The average size of the plants was about 1.5 m. Cotton was planted at a spacing of $0.80 \times 0.40\text{ m}$. At emergence, cotton plants were thinned, leaving up to two plants per hill. Two cotton plants occupying a space of 0.32 m^2 ($0.8 \times 0.4\text{ m}$) were defined as the arena.

Nine 0.32 m^2 ($0.8 \times 0.40\text{ m}$) arenas, three each, were marked on three lines (L1, L2 and L3) of cotton at 0.4, 2 and 5 m, respectively, to form three rows crossing cotton lines according to the wind direction (Fig. 1). Distances between the rows were about 10 m. The test was set up when the cotton crop was 3 months old. In each arena, 10 third and fourth *H. armigera* instars were released on a cotton plant for a few minutes to allow them to settle or to acclimatize on the plant before spraying. One microscope slide ($7.6 \times 2.6\text{ cm}$) was attached, the flat side facing to the prevailing wind direction, to the posts at approximately 0.5 m in height (Fig. 1) on the same plant.

The test consisted of three treatments replicated three times: the control (formulation without fungal conidia), a formulation containing 2.5×10^{12} conidia/l and a formulation containing 3.75×10^{12} conidia/l. The formulation was composed of 30% peanut oil and 70% kerosene. The volume of application was 2000 ml/ha. All formulations were applied using a Berthoud 'Micro Ulva' (Belleville, France) ULV sprayer fitted with a red restrictor and five batteries. The area supposed to be covered by the spraying treatment was 50 m^2 ($5 \times 10\text{ m}$), hence 100 ml, a quantity of each formulation enough to treat this area, were measured before application and subsequently fully applied. The flow rate was about 60 ml/s, and the walking speed was 1 m/s. During the application, the temperature was $29 \pm 1^\circ\text{C}$ and the wind speed ranged between 2.5 and 4 m/s.

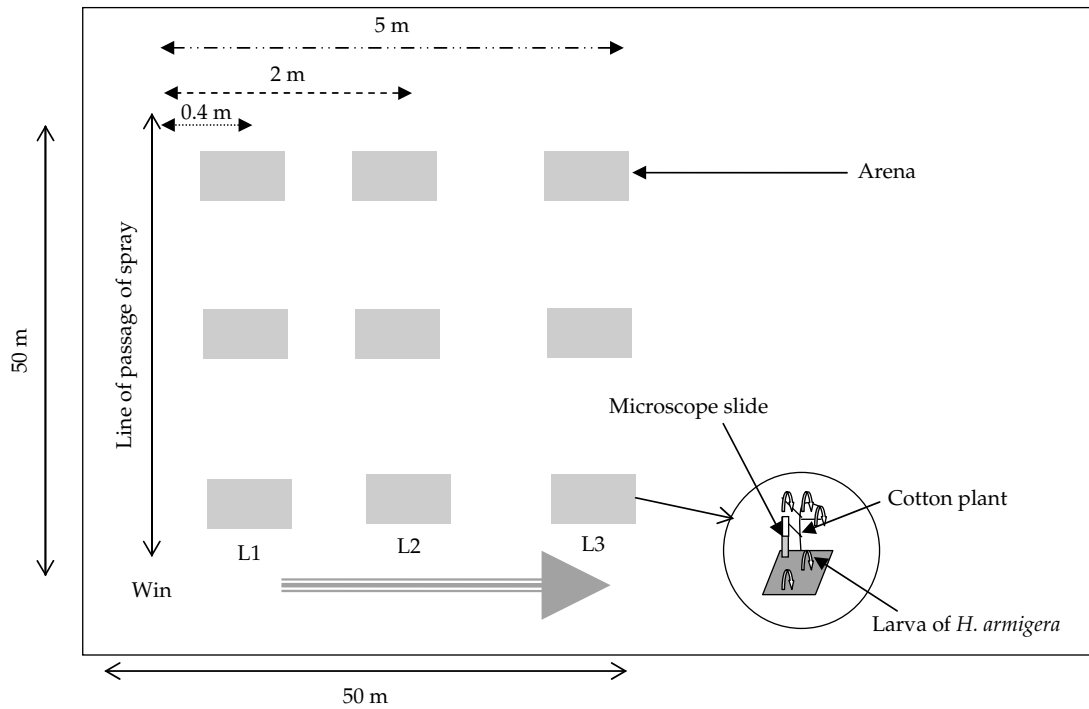


Fig. 1. Arena test design: individual arenas containing spray targets (microscope slides and larvae of *Helicoverpa armigera*) on a cotton plant

After spraying, the slides were removed and the droplets were counted using Bateman's method (1993). As many larvae as possible of *H. armigera* were recaptured and placed individually in plastic boxes ($3.8 \times 2.9 \times 4.0$ cm), equipped with a perforated cover for ventilation. They were labelled and transported to the laboratory for incubation. Larvae were fed using the artificial diet (Teakle and Jensen, 1985) when necessary, and mortality was checked daily. The number of pupae formed, died and sporulated, and the emergence of the adults was recorded. Emerged male and female adults were kept together for mating and the number of larvae derived from the incubated eggs was recorded.

Data analysis

Survival rates of the treated and control larvae were calculated as follows:

$$\% \text{ Survival} = \left(1 - \frac{nTa}{N} \right) \times 100,$$

where nTa is the cumulative number of dead larvae after treatment and N is the total number of larvae recaptured from each arena for incubation.

The infection rates were calculated on the basis of the percentage of cadavers with sporulating fungus:

$$\% \text{ Sporulation} = \frac{NCF}{NC} \times 100.$$

NCF stands for the number of cadavers with sporulating fungus and NC for the total number of cadavers.

Percentages of emergence were calculated on the basis of the number of pupae formed:

$$\% \text{ Emergence} = \frac{NAE}{NPF} \times 100.$$

NAE stands for the number of adults emerged and NPF for the total number of pupae formed.

Differences in survival and sporulation rates, percentages of pupae formed, and adult emergence rates were subjected to ANOVA, using the general linear model procedure of SAS (SAS, 2002–2008).

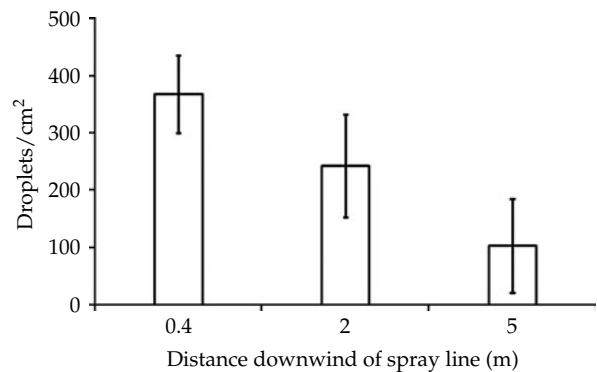


Fig. 2. Droplet distribution

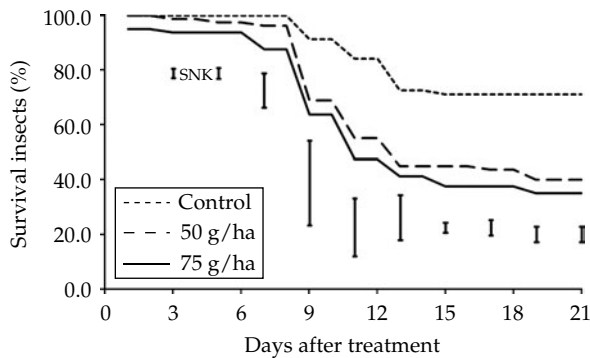


Fig. 3. Survival of the larvae of *Helicoverpa armigera* after application of different doses

In the case of significant F values, means were compared using the Student–Newman–Keuls (SNK) test at the 5% level. Percentages were arcsine-transformed before being subjected to ANOVA. The distribution of the droplets from line 1 (0.4 m) to line 3 (5 m) was visualized by means of histograms. Mean droplets were compared using standard errors ($\pm$ SE).

Results

Droplet distribution

The mean number of droplets (blank formulation and conidia formulated in oil) decreased from 415.7 per cm^2 (± 60.3) (line 1) to 44.8 per cm^2 (± 36.3) (line 3) (Fig. 2). Only the first line received the maximum number of droplets. Few droplets reached the sixth line (line 3, 5 m).

Immature survival and cadaver sporulation

Figure 3 shows the survival of *H. armigera* after Met 31 application at two doses: 50 and 75 g/ha in an arena trial. Twenty-one days after incubation, survival rates were 35, 40 and 71% for 75 g/ha,

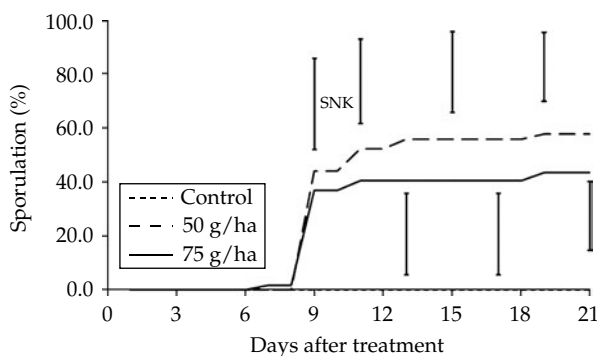


Fig. 4. Sporulation of the cadavers of *Helicoverpa armigera* after incubation

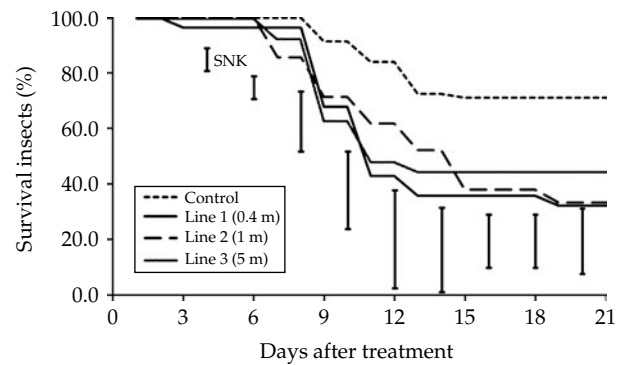


Fig. 5. Survival of the larvae of *Helicoverpa armigera* at different distances after the application of 75 g/ha

50 g/ha and the control, respectively. To achieve 50% mortality, >10 and >13 days were necessary for 75 and 50 g/ha, respectively. From day 15 onwards, the difference in mortality rates was significant between the two treatments at 5% ($F_{2,8} = 241.59$; $P < 0.0001$). Contrary to the mortality rates, the percentages of sporulated cadavers were higher for 50 g/ha than for 75 g/ha. They varied from 44.4% (75 g/ha) to 57.5% (50 g/ha) (Fig. 4), but no significant difference was noted between the two doses. However, both were significantly different from the controls where no mycosis was observed ($F_{2,8} = 25.22$; $P = 0.0054$).

Immature survival between marked lines

The results of immature survival between the lines are shown in Figs 5 and 6. For 50 g/ha, the mean survival rates were higher for the last line (5 m) than those of the first line (0.4 m) nearest to the line of application. In spite of the varying distances between the lines, there was no significant difference in the survival rates between them (Fig. 6). Only treated populations of the first line (0.4 m) had an average survival rate significantly

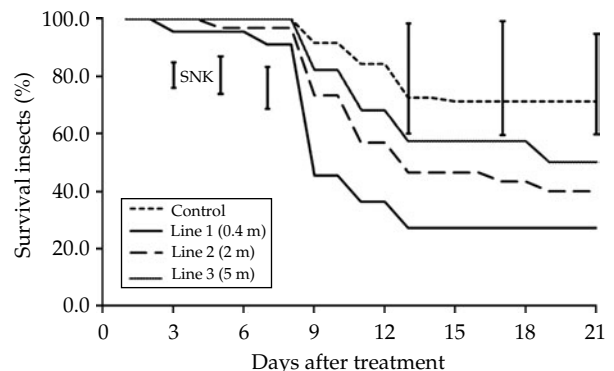


Fig. 6. Survival of the larvae of *Helicoverpa armigera* at different distances after the application of 50 g/ha

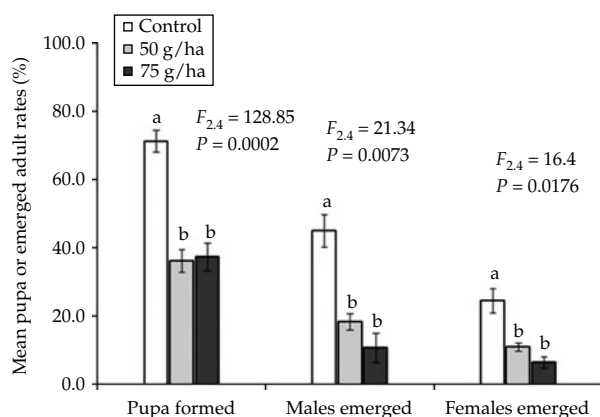


Fig. 7. Rates of pupa formed and adults emerged. Histograms with the same letters are not significantly different at the 5% level (SNK)

different from the controls ($F_{3,11} = 6.10$; $P = 0.0297$). Fifty per cent mortality was achieved by < day 10 (line 1), < day 13 (line 2) and day 19 (line 3). When sprayed with 75 g/ha, the gap between the different distances was narrower (Fig. 5). Both treated populations had average survival rates significantly different from the controls ($F_{3,11} = 13.64$; $P = 0.0043$). Fifty per cent mortality was achieved by day 10 (lines 1 and 2) and day 14 (line 3).

Pupae formed, adults emerged and oviposition

The rate of pupae formed varied between 36.2% (± 3.4) (50 g/ha) and 71.2% (± 3.2) (control) (Fig. 7). The emergence ratio of male and female adults was not influenced by the two doses of the biopesticide; however, adult emergence rates were significantly higher in the control treatment than in the biopesticide treatment. The mean number of larvae per female decreased from 24 larvae/female (control) to 17 larvae/female (75 g/ha) and 18 larvae/female (50 g/ha) (Table 1). Almost all the males that emerged were malformed.

Discussion

Semi-fields, similar to the one used in this study, are useful for establishing a relationship between laboratory bioassays and field performance (Hewitt

et al., 1994). They are also valuable for assessing pesticide efficacy on targets hiding in thick vegetation such as cotton fields. Moreover, we used the cotton field to assess droplet distribution inside the vegetation (using artificial targets/microscope slides), dose transfer to *H. armigera* larvae and the rate of mortality.

The mean number of droplets drastically decreased from the first (0.4 m) to the third line (5 m), contrary to what Bateman *et al.* (1998) obtained in a clear area. Our results were evidently influenced by the presence of cotton plants interfering with the dispersal of the droplets at all doses applied. Larvae of *H. armigera* survived more in line 3 (5 m), followed by lines 2 (2 m) and 1 (0.4 m). The difference in mortality between the lines was more important for the lower dose, mainly because the mortality of insects treated with EPF is a function of the number of conidia received (Bateman *et al.*, 1998). Therefore, at an equal number of droplets, droplets with more conidia induce more mortality. Droplet size also decreases with distance (Bateman, 1993). Thus the first lines received not only more droplets, but also larger droplets, therefore increasing the probability of reaching the larvae. Therefore, the chances of obtaining a higher mortality rate in cotton lines farthest from the line of application increase for the higher dose.

The observed mortality rates, ranging from 50% (line 3, 50 g/ha) to 73% (line 1, 50 g/ha), were induced from direct contact with conidia. Mortality rates observed in the laboratory under optimal experimental conditions during preliminary stages of this study were up to 1.3 times higher than those obtained in the field, indicating a good potential as a biopesticide for this isolate.

Farmers observe three lines ($0.8 \times 3 = 2.4$ m) between lines of passes because they use water-based formulations with high application volumes of up to 10 l/ha. As for oil formulations, researchers recommend 1–2 l/ha because of the droplet size and wind effects (Bateman, 1993, 1997). For this arena trial, up to 45 droplets/cm² were recorded on the artificial targets in line 3 (5 m), with mortality rates ranging from 50% (line 3, 50 g/ha) to 56% (line 3, 75 g/ha). Our results indicate that, with an application volume of 2 l/ha, a spacing of 5 m

Table 1. Number of emerged adults and hatched larvae after application of different doses of the isolate Met 31 on the third and fourth larval stage of *Helicoverpa armigera* in an arena trial

Treatments (conidia/insect)	Number of adults	Number of males	Number of females	Number of larvae hatched/female
0	48	31	17	23.9
2.5×10^5 (50 g/ha)	26	16	10	18.0
3.75×10^5 (75 g/ha)	13	8	5	16.8

(six cotton lines) between the spray passes, at a flow rate of about 60 ml/s and walking speed of 1 m/s, we are sure to achieve good spraying coverage.

The droplet size and distribution were partly investigated by Symmons *et al.* (1991) who observed a marked difference in Sahelian grasshopper mortality with sprays of two median droplet sizes containing bendiocarb (a carbamate ULV insecticide formulation), whereby larger droplets were more effective.

In general, the development of *H. armigera* was substantially affected by the application of the biopesticide. A significant difference was noted between the control and the two biopesticide doses with regard to the formation of pupae, adult emergence and particularly that of females.

In this paper, we assumed that efforts to optimize conidia dose transfer and work efficiency would be rewarded by improved killing efficacy of the selected biopesticide. In fact, the presented results, coupled with the laboratory observations, have demonstrated that the isolate Met 31 has the required characteristics for controlling the cotton bollworm *H. armigera*. However, other fungal properties such as spore production capacity, germination and hyphal growth rates, and effects of varying environmental conditions that influence persistence must also be evaluated for a more comprehensive assessment of the biological control potential of this isolate. Also, additional studies will be needed to confirm its performance under large-scale field conditions in a variety of agro-ecological and farming situations.

Acknowledgements

We thank the members of the project 'Méthodes Alternatives de Lutte contre les Ravageurs du Cotonnier au Bénin' and the partners CRA-CF, OBEPAB, UAC and UL. The Dutch Embassy in Benin is thanked for funding this project.

References

- Bateman R. P. (1993) Simple, standardised methods for recording droplet measurements and estimation of deposits from controlled droplet applications. *Crop Protection* 12, 201–206.
- Bateman R. P. (1997) Methods of application of microbial pesticide formulations for the control of locusts and grasshoppers. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171, 69–81.
- Bateman R. P., Douro-Kpindou O. K., Kooyman C., Lomer C. and Ouambama Z. (1998) Some observations on the dose transfer of mycoinsecticide sprays to desert locusts. *Crop Protection* 17, 151–158.
- Bateman R. P., Godonou I., Douro Kpindou O. K., Lomer C. J. and Paraiso A. (1992) Development of a novel "field bioassay" technique for assessing mycopesticide U.L.V. formulations, pp. 255–262. In *Biological Control of Locusts and Grasshoppers* (edited by C. J. Lomer and C. Prior). CAB International, Wallingford.
- Bateman R. P., Price R. F., Müller E. J. and Brown H. D. (1994) Controlling brown locust hopper bands in South Africa with a myco-insecticide spray, pp. 609–616. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases*, 16–19 November 1994, Brighton, UK.
- Bateman R. P. and Thomas M. (1996) Pathogen application against locusts and grasshoppers: insecticide or biological control? *Antenna* 20, 10–15.
- Cherry A., Jenkins N., Heviefo G., Bateman R. P. and Lomer C. (1999) A West African pilot scale production plant for aerial conidia of *Metarhizium* sp. for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology* 9, 35–51.
- Douro Kpindou O. K., Djegui D. A., Glitho I. A. and Tamò M. (2010) Réponse des stades larvaires de *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) à différentes doses d'application des champignons entomopathogènes *Metarhizium anisopliae* et *Beauveria bassiana*. *Biotechnologie Agronomie et Environnement*.
- Douro-Kpindou O.-K., Godonou I., Houssou A., Lomer C. J. and Shah P. A. (1995) Control of *Zonocerus variegatus* with ULV formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology* 5, 131–139.
- Hewitt H. G., Caseley J., Copping L. G., Grayson B. T. and Tyson D. (eds) (1994) Comparing glasshouse and field pesticide performance 11, *British Crop Protection Council Monograph No. 59*. 323 pp.
- Kulkarni S. A., Ghormade V., Kulkarni G., Kapoor M., Chavan S. B., Rajendran A., Patil S. K., Shouche Y. and Deshpande M. V. (2008) Comparison of *Metarhizium* isolates for biocontrol of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in chickpea. *Biocontrol Science and Technology* 18, 809–828.
- Kumar V. and Chowdhry P. N. (2004) Virulence of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against tomato fruit borer, *Helicoverpa armigera*. *Indian Phytopathological Society* 54, 208–212.
- Langewald J., Thomas M. B., Douro Kpindou O. K. and Lomer C. J. (1997) Use of *Metarhizium flavoviride* for control of *Zonocerus variegatus*: a model, linking dispersal and secondary infection from the spray residue with mortality in caged field samples. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 82, 1–8.
- Lomer C. J., Bateman R. P., Godonou I., Douro Kpindou O. K., Shah P. A., Paraiso A. and Prior C. (1993) Field infection of *Zonocerus variegatus* following application of an oil-based formulation of *Metarhizium flavoviride* conidia. *Biocontrol Science and Technology* 3, 337–346.
- Matthews G. A. (1992) *Pesticide Application Methods*, 2nd edn. Longmans, Harlow. 405 pp.
- SAS (2002–2008). SAS® 9.2, Copyright © 2002–2008 by SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

- Staniland L. N. (1959) Fluorescent tracer for the study of spray and dust deposits. *Journal of Agricultural Engineering Research* 4, 42–81.
- Symmons P. M., Dobson H. M. and Sissoko M. (1991) Pesticide droplet size and efficacy: a series of trials on grasshoppers. *Crop Protection* 10, 136–144.
- Teakle R. E. and Jensen J. M. (1985) *Heliothis punctigera*, pp. 313–322. In *Handbook of Insect Rearing* (edited by P. Singh and R. F. Moore). Elsevier, Amsterdam.
- Thomas M. B., Wood S. N. and Lomer C. J. (1995) Biological control of locusts and grasshoppers using a fungal pathogen: the importance of secondary cycling. *Proceedings of the Royal Society London (B)* 259, 265–270.