

RÉPUBLIQUE DE CÔTE D'IVOIRE

Union - Discipline – Travail

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Institut National Polytechnique
Félix HOUPHOUËT-BOIGNY de Yamoussoukro

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE FÉLIX HOUPHOUËT-BOIGNY

Mention : Sciences Agronomiques et Génie rural

Spécialité : Protection des Végétaux et Biotechnologie Microbienne

Thème :

**DÉVELOPPEMENT ET ÉVALUATION D'UN BIOPESTICIDE À BASE
DE *METARHIZIUM* SP. POUR LA LUTTE CONTRE LE CHARANÇON
NOIR DU BANANIER (*COSMOPOLITES SORDIDUS* GERMAR 1824)**

Présentée et soutenue publiquement le 06 Décembre 2019 par

KOUADIO Demby Laetitia Muriel Epse OUATTARA

JURY :

| | | |
|---------------------|-------------------------------|-----------------------|
| M. ZÉZÉ Adolphe, | Professeur Titulaire, INP-HB | Président |
| M. KONÉ Daouda, | Professeur Titulaire, UFHB | Rapporteur |
| M. KONÉ Mongomaké, | Professeur Titulaire, UNA | Rapporteur |
| M. CAMARA Brahimia, | Maître de Conférences, UFHB | Examineur |
| M. ABO Kouabenan, | Maître de Conférences, INP-HB | Co-Directeur de thèse |
| M. KOBENAN Kouman, | Directeur de Recherche, CNRA | Co-Directeur de thèse |

DÉDICACE

A Mon époux, OUATTARA Sié Donald

A Mes parents, M. et Mme KOUADIO

REMERCIEMENTS

Ce manuscrit de thèse de l'Ecole Doctorale Polytechnique (EDP) de l'Institut National Polytechnique Félix HOUPHOUËT-BOIGNY (INP-HB) est l'aboutissement d'un travail qui n'aurait pas été possible sans la participation de nombreuses personnes physiques et morales à qui je tiens à adresser mes sincères remerciements et exprimer ma profonde gratitude.

Je remercie Docteur KOFFI N'Guessan, Directeur Général de l'INP-HB de Yamoussoukro, Professeur YAO Kouassi Benjamin, Directeur de l'Ecole Doctorale Polytechnique (EDP) et le Conseil scientifique de l'EDP, de m'avoir accordé l'inscription en thèse de doctorat, me permettant de faire ainsi partie des docteurs formés à l'INP-HB.

Je remercie Docteur YTÉ Wongbé, Directeur Général du Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), pour le soutien financier, l'encadrement et la formation reçus au sein du centre.

Je remercie particulièrement Docteur KOBENAN Kouman, Directeur de recherche au CNRA et Docteur ABO Kouabenan, Maître de Conférences à l'INP-HB, mes directeurs de thèse qui ont tout mis en œuvre pour la réalisation effective du travail au laboratoire et sur le terrain. Leurs remarques et orientations pertinentes, dans le cadre du travail, ont été incontournables. Leur rigueur, leurs encouragements, et leurs conseils avisés m'ont permis, non seulement, d'être formée sur le plan académique, mais aussi sur les plans social et humain.

Je remercie Professeur ZÉZÉ Adolphe, Enseignant-Chercheur à l'INP-HB, pour son aide au cours de ce travail, pour ses remarques, ses critiques pertinentes et pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse, malgré son emploi du temps chargé.

Je remercie Professeur KONÉ Daouda, Enseignant-Chercheur à l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY et Professeur KONÉ Mongomaké, Enseignant-Chercheur à l'Université NANGUY ABROGOUA, pour avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse en qualité de rapporteurs. Je les remercie pour leurs remarques pertinentes, leurs suggestions, leurs conseils et pour avoir accepté de participer au jury.

Je remercie également Docteur CAMARA Brahima, Maître de Conférences à l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, pour avoir accepté de prendre part au jury en tant qu'examineur.

Je voudrais remercier le Fonds Interprofessionnel pour la Recherche et le Conseil Agricole (FIRCA) et le CNRA, pour le financement de cette thèse.

Mes remerciements vont, également à l'endroit de Docteur BROU Yao Casimir, Directeur de l'Unité Mixte de Recherche et d'Innovation en Sciences Agronomiques et Génie Rural de l'EDP, pour, d'une part, l'organisation des différents Comités de thèses, une occasion de remise en cause perpétuelle et d'amélioration de nos travaux de recherche et d'autre part, le contrôle administratif.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur GNONHOURI Philippe, Directeur de la station de Bimbresso du CNRA, Docteur ABY N'Goran, Attaché de recherche au CNRA, Docteur TRAORÉ Siaka, Chargé de Recherche au CNRA, Docteur ZÉZÉ-KOUADJO Claude, Attachée de recherche au CNRA, Docteur ATSIN, Attaché de recherche au CNRA et Docteur DELESS, Enseignant Chercheur à l'Université Peleforo GON COULIBALY, Merci pour votre disponibilité, l'ensemble des connaissances et des compétences transmises et vos conseils tout au long du travail effectué.

Je remercie également, Docteur KOUADIO Kouakou Théodore et monsieur TIENÉBO Eric Olivier, au Laboratoire de Phytopathologie et de Biologie Végétale, à l'INP-HB, pour leurs conseils et appui à la rédaction du mémoire de thèse. Je remercie Professeur Sorho FATOGOMA, de l'Université Félix HOUPHOUËT-BOIGNY, pour l'appui à l'analyse et l'interprétation des données moléculaires.

Je tiens aussi à remercier mesdames KADJO Pierrette et YAO Jorgina, messieurs TAH Rodrigue, KOFFI Ghyslain, TRAORÉ Alassane, N'GORAN Konan, N'DRI Elvis, WAYORO Bity et les techniciens de recherche au CNRA qui ont aidé de façon active, aussi bien à la réalisation des manipulations de laboratoire qu'aux activités de terrain.

J'exprime ma profonde gratitude à mes amis doctorants, Docteur YAO Alban, Mademoiselle DARAMCOUM Marie-Pierre, Monsieur KOUAMÉ James pour leurs soutiens et aides académiques et l'atmosphère conviviale de travail.

Je salue également la présence à nos côtés des stagiaires du programme Plantain, Banane et Ananas (PBA) du CNRA durant ces années de thèse. Il s'agit de messieurs SOM Ferdinand et AMANI Bienvenu. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

J'exprime ma profonde gratitude à mes parents et toute ma famille, pour leur soutien et tous leurs encouragements tout au long de ces années d'études.

Je ne saurais terminer la section des remerciements sans avoir une pensée toute spéciale pour mon époux, OUATTARA Sié Donald, pour sa foi constante en moi, ses encouragements, et ses conseils chaque fois que j'en ai eu besoin.

Que tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce travail trouvent ici l'expression de ma profonde gratitude.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| DÉDICACE..... | ii |
| REMERCIEMENTS | iii |
| RÉSUMÉ..... | x |
| ABSTRACT | xi |
| LISTE DES FIGURES | xii |
| LISTE DES TABLEAUX..... | xiv |
| LISTE DES ABREVIATIONS , SIGLES ET ACRONYMES | xv |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE BANANIER..... | 5 |
| 1.1 Origine et distribution du bananier | 5 |
| 1.2 Description du bananier | 6 |
| 1.2.1 Appareil végétatif | 6 |
| 1.2.2 Appareil reproducteur du bananier..... | 10 |
| 1.3. Ecologie | 12 |
| 1.4. Culture du bananier..... | 12 |
| 1.5 Intérêt économique..... | 13 |
| 1.6 Importance nutritionnelle et thérapeutique | 15 |
| CHAPITRE II : PRINCIPALES CONTRAINTES BIOTIQUES A LA PRODUCTION DE LA BANANE EN COTE D'IVOIRE | 16 |
| 2.1 Bactérioses | 16 |
| 2.1.1 Maladie de Moko | 16 |
| 2.1.2 Maladie du sang du bananier | 16 |
| 2.2 Mycoses..... | 17 |
| 2.2.1 Champignons parasites des feuilles..... | 17 |
| 2.2.2 Champignons telluriques | 17 |
| 2.3 Viroses | 18 |
| 2.3.1 Mosaique en plages du bananier | 18 |
| 2.3.2 Maladie de Bunchy Top du bananier ou maladie du sommet touffu du bananier..... | 18 |
| 2.3.3 Mosaique des bractées du bananier..... | 19 |
| 2.3.4 Striure du bananier ou mosaïque en tiret..... | 19 |
| 2.3.5 Mosaique modérée du bananier | 20 |
| 2.4 Nématodes | 20 |

| | |
|--|----|
| 2.4.1 <i>Radopholus similis</i> | 20 |
| 2.4.2 <i>Pratylenchus coffeae</i> | 21 |
| 2.4.3 <i>Meloidogyne incognita</i> et <i>M. javanica</i> | 21 |
| 2.5 Arthropodes..... | 21 |
| 2.5.1 <i>Oidoporus longicollis</i> | 21 |
| 2.5.2 <i>Heteroligus meles</i> | 22 |
| 2.5.3 <i>Hanseniella ivorensis</i> | 22 |

CHAPITRE III : DESCRIPTION, ECOLOGIE, IMPORTANCE ECONOMIQUE DU CHARANCON NOIR DU BANANIER ET APPROCHES DE LUTTE 23

| | |
|--|----|
| 3.1 Morphologie | 23 |
| 3.2 Origine et dispersion | 23 |
| 3.3 Spectre d'hôte | 23 |
| 3.4 Biologie | 24 |
| 3.4.1 Longévité, tropisme, nutrition et distribution | 24 |
| 3.4.2 Dimorphisme sexuel et sex-ratio | 24 |
| 3.4.3 Dispersion et mobilité..... | 25 |
| 3.4.4 Maturité sexuelle et oviposition | 25 |
| 3.4.5 Stades de développement | 25 |
| 3.5 Méthodes de lutte contre le charançon noir du bananier | 31 |
| 3.5.1 Lutte culturale..... | 31 |
| 3.5.2 Lutte chimique | 35 |
| 3.5.3 Lutte biologique..... | 35 |

CHAPITRE IV : DESCRIPTION, ECOLOGIE ET INTERÊT DES ESPECES DE *METARHIZIUM* EN LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES INSECTES 37

| | |
|--|----|
| 4.1 Classification, description, modes d'infection et d'action de <i>Metarhizium spp</i> | 37 |
| 4.1.1 Taxonomie | 37 |
| 4.1.2 Morphologie | 40 |
| 4.2 Mode d'infection | 42 |
| 4.2.1 Mode d'action physique du champignon entomopathogène <i>Metarhizium spp</i> | 42 |
| 4.2.2 Mode d'action chimiques du champignon entomopathogène <i>Metarhizium sp.</i> | 44 |
| 4.3 Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes..... | 44 |
| 4.3.1 Facteurs liés aux pathogènes..... | 44 |
| 4.3.2 Facteurs dépendant de l'hôte..... | 45 |
| 4.3.3 Facteurs de l'environnement..... | 45 |
| 4.3.4 Effet du sol..... | 45 |
| 4.4 Production en masse du champignon | 46 |
| 4.5 Utilisation de <i>Metarhizium spp</i> comme agent de lutte biologique | 46 |

| | |
|---|-----------|
| CHAPITRE V: MATERIELS | 49 |
| 5.1 Matériels biologiques | 49 |
| 5.1.1 Champignons entomopathogènes..... | 49 |
| 5.1.2 Insectes | 49 |
| 5.2 Matériels techniques..... | 51 |
| 5.2.1 Milieux de culture | 51 |
| 5.2.2 Matériels de caractérisation biologique | 51 |
| 5.2.3 Matériels de caractérisation moléculaire | 51 |
| CHAPITRE VI : METHODES..... | 53 |
| 6.1 Caractérisation biologique..... | 53 |
| 6.1.1 Caractérisation macroscopique | 53 |
| 6.1.2 Caractérisation microscopique | 54 |
| 6.2 Caractérisation moléculaire..... | 54 |
| 6.2.1 Extraction de l'ADN génomique..... | 54 |
| 6.2.2. Réaction en chaîne par polymérase de l'ADN fongique (PCR)..... | 55 |
| 6.2.3 Analyse et comparaison des séquences | 55 |
| 6.2.4 Analyse phylogénétique | 55 |
| 6.3 Optimisation de la capacité de sporulation des isolats par la composition de milieu de cultures organiques..... | 55 |
| 6.3.1 Obtention des poudres de téguments de cacao et parches de café | 58 |
| 6.3.2 Préparation des milieux de culture à base de téguments de cacao, de parches de café et de mélasse | 58 |
| 6.3.3 Préparation du milieu de culture PDA | 58 |
| 6.3.4 Préparation du milieu de culture à base de riz..... | 58 |
| 6.3.5 Etude de la composition chimique du milieu de culture sur la capacité de sporulation | 58 |
| 6.4 Activation du pouvoir entomopathogène de <i>Metarhizium</i> sp. | 59 |
| 6.4.1 Collecte des charançons au champ..... | 60 |
| 6.4.2 Inoculation des charançons | 60 |
| 6.4.3 Isolement des spores à partir de charançons infectés | 61 |
| 6.4.4 Test de pathogénicité des isolats activés..... | 62 |
| 6.5 Influence de différents traitements pesticides dans la lutte contre le charançon noir du bananier | 64 |
| 6.5.1 Sites expérimentaux | 64 |
| 6.5.2 Evaluation de l'efficacité des traitements dans les parcelles en production et en jachère..... | 66 |
| 6.5.3 Mesure de l'efficacité des traitements | 71 |
| 6.6 Analyse statistique..... | 71 |
| CHAPITRE VII: RESULTATS | 74 |
| 7.1 Principaux caractères biologiques des dix isolats de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 74 |

| | | |
|---|--|------------|
| 7.1.1 | Caractères macroscopiques..... | 74 |
| 7.1.2 | Caractères microscopiques des isolats locaux de <i>Metarhizium</i> sp..... | 77 |
| 7.1.3 | Potentiel de sporulation des différents isolats des isolats locaux de <i>Metarhizium</i> sp..... | 77 |
| 7.2 | Identification moléculaire des isolats par l'étude de la région ITS1-5.8S-ITS2..... | 79 |
| 7.2.1 | Taille des fragments de gène..... | 79 |
| 7.2.2 | Analyse des séquences..... | 79 |
| 7.2.3 | Analyse phylogénétique..... | 82 |
| 7.3 | Efficacité de la composition du milieu de culture sur la capacité de sporulation des isolats..... | 84 |
| 7.3.1 | Efficacité de la composition chimique du milieu de culture sur la sporulation de l'isolat BME2.. | 87 |
| 7.4 | Efficacité de l'activation des isolats locaux de <i>M. anisopliae</i> sur les caractères pathogéniques..... | 91 |
| 7.4.1 | Effet de l'activation des isolats locaux de <i>M. anisopliae</i> sur le taux de mortalité des adultes de <i>Cosmopolites sordidus</i> | 91 |
| 7.4.2 | Effet de l'activation sur le délai d'apparition du duvet mycélien des isolats de <i>Metarhizium</i> sp. sur les adultes de <i>C. sordidus</i> morts..... | 96 |
| 7.4.3 | Effet de l'activation sur la croissance radiale isolats de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 98 |
| 7.4.4 | Effet de l'activation sur la sporulation des isolats de <i>Metarhizium</i> sp..... | 100 |
| 7.5 | Restauration des capacités pathogéniques des isolats et choix de l'isolat d'intérêt..... | 102 |
| 7.5.1 | Regroupement des isolats activés et non-activés selon leurs caractéristiques pathogéniques.. | 105 |
| 7.6 | Efficacité des traitements pesticides contre le charançon noir du bananier..... | 107 |
| 7.6.1 | Efficacité des traitements pesticides dans les parcelles en jachère..... | 107 |
| 7.6.2 | Efficacité des traitements pesticides sur les parcelles en production..... | 109 |
| CHAPITRE VIII : DISCUSSION..... | | 114 |
| 8.1 | Caractères morphologiques et microscopiques des isolats de <i>Metarhizium</i> sp..... | 114 |
| 8.2 | Identification moléculaire des isolats de <i>Metarhizium</i> sp..... | 114 |
| 8.3 | Influence de la composition du milieu de culture sur la capacité de sporulation des isolats..... | 115 |
| 8.4 | Influence de l'activation des isolats sur leurs caractères pathogéniques..... | 117 |
| 8.5 | Influence des traitements pesticides à base de <i>Metarhizium anisopliae</i> dans la lutte intégrée contre le charançon noir du bananier..... | 119 |
| CONCLUSION GENERALE ET PESPCTIVES..... | | 121 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | | 124 |
| ANNEXES..... | | 147 |

RÉSUMÉ

Le charançon noir du bananier, *Cosmopolites sordidus* Germar 1824, occasionne d'importantes pertes économiques dans les bananeraies. Pour réduire les pertes causées par ce ravageur, la lutte biologique par l'utilisation de divers champignons entomopathogènes, notamment des espèces de *Metarhizium* a été adoptée. Les caractéristiques biologiques et moléculaires de dix isolats de *Metarhizium* sp., isolées de charançons morts, collectés dans les aires de culture bananière en Côte d'Ivoire ont été étudiées. L'étude a également recherché des milieux de culture à base de résidus agricoles (café, cacao), de coproduit de l'industrie (mélasse de la canne à sucre) et de sucre de canne pour la production en masse des isolats de *M. anisopliae*. Les caractéristiques pathogéniques des dix isolats ont été évaluées sur trois (3) activations. L'isolat BME2, qui répondait le mieux, a été utilisé pour la mise au point d'une méthode de lutte intégrée contre *C. sordidus*, important ravageur des bananiers dans les plantations des entreprises SPDCIE, SCB BANCOMOÉ et SAKJ. Les analyses biologiques puis moléculaire des dix (10) isolats, ont montré une correspondance maximale avec différentes souches de *M. anisopliae* et *M. pinghaense*. Les milieux composés de café, de cacao et de mélasse peuvent être utilisés comme milieu de culture de *Metarhizium anisopliae* pour la formulation d'un biopesticide contre le charançon noir du bananier. Mis à part les milieux riz et PDA, les milieux à forte concentration en cacao sont les plus adaptés à la culture des isolats de ce champignon. Les résultats obtenus sur les différentes parcelles montrent l'efficacité des méthodes de lutte intégrée incluant le *M. anisopliae*. Sur les parcelles mises en jachère, la méthode de lutte employant le champignon et la phéromone permet une réduction de 60 % des paramètres d'infestation en replantation. Sur les parcelles en production, la méthode de lutte employant l'insecticide systémique et le champignon, et celle employant les pièges à faux tronc et l'inoculum ont induit une réduction de plus de 50 % des paramètres d'infestation. Les milieux composés de téguments de cacao et de mélasse peuvent être utilisés comme milieu de culture de *M. anisopliae* pour la formulation d'un biopesticide. L'intégration d'un biopesticide à base du champignon dans les méthodes de lutte actuelles permettrait de réduire les infestations des charançons et le niveau d'application des insecticides chimiques contre ce ravageur.

Mots clés : Biopesticide, *Metarhizium* sp., milieux de culture, *Cosmopolites sordidus*, bananier, lutte intégrée.

ABSTRACT

The banana weevil, *Cosmopolites sordidus* Germar 1824, causes significant economic losses in banana plantations. To reduce losses due to this pest, biological control was adopted, with various entomopathogenic fungi, including *Metarhizium* species. The biological and molecular characteristics of ten isolates of *Metarhizium* sp., isolated from dead weevils, collected from banana growing areas in Côte d'Ivoire were studied. The study also looked for growing media based on crop (coffee, cocoa) and coproduct of industry (sugar cane molasses) residues and sugar cane for the mass production of isolates. The pathogenic characteristics of the ten isolates were assessed over three (3) activations. The BME2 isolate that best responded to these activations was used to develop an integrated pest management for *C. sordidus*, a very damaging pest of banana plant in the plantations of SPDCIE, SCB BANCOMOÉ and SAKJ companies. The biological and molecular characteristics of the ten (10) isolates showed maximum correspondence with different strains of *M. anisopliae* and *M. pinghaense*. Media composed of coffee, cocoa residues and molasses can be used as a media for the growing of *Metarhizium anisopliae* for the formulation of a biopesticide against black banana weevil. The results from plots showed efficacy of integrated pest management using *Metarhizium anisopliae*. In Banana fields, systemic insecticide + application of *Metarhizium anisopliae* treatment and the trap + application of *Metarhizium anisopliae* treatment reduced infestation parameters more than 50 %. After fallow replanting, the combination of pheromone + *Metarhizium anisopliae* induced a decrease in the infestation levels (60 %). Media composed of cocoa and molasses residues can be used as *M. anisopliae* growth medium for the formulation of a biopesticide. The integration of a fungus-based mycopesticide into current control methods can reduce weevil infestations and the level of chemical insecticide application against this pest.

Keywords: Biopesticide, *Metarhizium* sp., culture media, *Cosmopolites sordidus*, banana, integrated pest management

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Représentation de l'organisation du bananier et de ses rejets | 9 |
| Figure 2 : Fleurs de bananier | 11 |
| Figure 3 : Production moyenne de 2007 à 2017 des quatre premiers producteurs mondiaux de bananes plantain | 14 |
| Figure 4 : Production moyenne de 2007 à 2017 des cinq premiers producteurs mondiaux de bananes desserts | 14 |
| Figure 5 : Stades larve-adulte du charançon noir du bananier | 27 |
| Figure 6 : Décorticage tangentiel d'une souche de bananier montrant les galeries larvaires, indiquées par les flèches..... | 29 |
| Figure 7 : Pièges à pseudo-tronc utilisés contre les charançons dans les plantations industrielles de bananiers dessert | 34 |
| Figure 8 : Classifications historiques de <i>Metarhizium</i> sp. | 39 |
| Figure 9 : Conidies et phialides de <i>Metarhizium</i> sp. observés au microscope électronique... | 41 |
| Figure 10 : Détermination du temps létal pour 50 % de la population de charançon noir..... | 63 |
| Figure 11 : Zones de production des bananes et bananes plantain en Côte d'Ivoire | 65 |
| Figure 12 : Piège à phéromone inoculé avec <i>Metarhizium anisopliae</i> cultivé sur substrat parches de café | 67 |
| Figure 13 : Pose du piège à phéromone avec l'eau savonneuse | 67 |
| Figure 14 : Étapes de la pose du piège à faux troncs contenant le champignon | 69 |
| Figure 15 : Pièges utilisés dans les sites d'essai pour la capture des charançons | 70 |
| Figure 16 : Caractères cultureux des isolats de <i>Metarhizium</i> sp. sur un milieu de culture PDA | 75 |
| Figure 17 : Spores d'un isolat de <i>Metarhizium</i> sp. observées au microscope optique au (GX400) | 78 |
| Figure 18 : Capacité de sporulation sur milieu PDA des dix isolats de <i>Metarhizium</i> sp. récoltés dans les aires de culture bananière..... | 78 |
| Figure 19 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1,2 %) montrant des amplifications PCR de ITS à partir d'ADN de <i>Metarhizium</i> sp. des différents isolats collectés sur les plantations industrielles de bananier..... | 80 |
| Figure 20 : Arbre phylogénétique selon la méthode des distances (Neighbor -Joining) | 83 |
| Figure 21 : Aspects macroscopiques des isolats de <i>Metarhizium anisopliae</i> âgés 21 jours sur les milieux de culture | 85 |

| | |
|---|-----|
| Figure 22 : Effet de la concentration en carbone et en calcium des milieux de culture sur la quantité de spore produite par <i>Metarhizium anisopliae</i> | 90 |
| Figure 23 : Variation du taux de mortalité des adultes de <i>Cosmopolites sordidus</i> inoculés par marche sur les colonies de cultures des dix isolats locaux de <i>Metarhizium anisopliae</i> activés et non-activés | 94 |
| Figure 24 : Effet de l'activation sur le délai d'apparition du duvet mycélien des isolats de <i>Metarhizium anisopliae</i> sur les adultes de <i>Cosmopolites sordidus</i> morts..... | 97 |
| Figure 25 : Effet de l'activation sur la croissance radiale des isolats de <i>Metarhizium anisopliae</i> sur les adultes de <i>Cosmopolites sordidus</i> morts | 99 |
| Figure 26 : Effet de l'activation sur la sporulation des isolats de <i>Metarhizium anisopliae</i> . sur les adultes de <i>Cosmopolites sordidus</i> morts..... | 101 |
| Figure 27 : Carte factorielle des isolats locaux de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 103 |
| Figure 28 : Dendrogramme de classification hiérarchique des isolats de <i>Metarhizium anisopliae</i> activés et non-activés..... | 106 |
| Figure 29 : Effet des traitements sur le coefficient et sur le taux d'infestation des charançons noirs avant et après la mise en jachère des parcelles à SAKJ | 108 |
| Figure 30 : Efficacité des traitements sur le coefficient d'infestation des plantations par le charançon noir | 111 |
| Figure 31 : Efficacité des traitements sur le taux d'infestation des plantations par le charançon noir | 112 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|-----|
| Tableau I : Classification et répartition géographique des principales variétés de bananier | 7 |
| Tableau II : Note d'infestation pour l'estimation du niveau d'attaque des charançons d'une parcelle dans une plantation bananière..... | 30 |
| Tableau III : Origine et codes des isolats de <i>Metarhizium</i> spp. | 50 |
| Tableau IV : Composition des milieux de culture utilisés..... | 52 |
| Tableau V : Composition des milieux de culture de <i>Metarhizium</i> sp. pour 1 litre d'eau distillée | 58 |
| Tableau VI : Regroupement par morphotypes selon les caractères macroscopiques des isolats..... | 76 |
| Tableau VII : Espèces identifiées à l'issue de l'analyse Blast..... | 81 |
| Tableau VIII : Classement de Student Newman et Skeuls du log de la concentration en spores des isolats de <i>Metarhizium anisopliae</i> sur les milieux de culture..... | 86 |
| Tableau IX : Efficacité des trois meilleurs milieux de culture pour la sporulation des isolats <i>Metarhizium anisopliae</i> | 88 |
| Tableau X : Composition chimique des milieux de culture..... | 89 |
| Tableau XI : Caractéristiques de l'ACP appliquée aux données relevés sur les différents isolats activés et non activés après rotation Varimax..... | 103 |
| Tableau XII : Matrice de corrélation entre les variables étudiées | 104 |

LISTE DES ABREVIATIONS , SIGLES ET ACRONYMES

A : Un génome de *Musa acuminata*

AA : Bananiers diploïdes à deux génomes de *Musa acuminata*.

AAA : Bananiers triploïdes à trois génomes de *Musa acuminata*.

AAAA : Bananiers tétraploïdes à quatre génomes de *Musa acuminata*.

AAB : Bananiers triploïdes à deux génomes de *Musa acuminata* et un génome de *Musa balbisiana*

AB : bananiers diploïdes à un génome *Musa acuminata* et un génome *Musa balbisiana*

ABB : bananiers triploïdes à deux génomes de *Musa balbisiana* et un génome de *Musa acuminata*

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

B : un génome de *Musa balbisiana*

BBTD: Banana Bunchy Top disease.

BBTV: Banana bunchy top virus.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

BXW : Banana Xanthomonas Wilt.

Camel : cacao mélasse

CARBAP : Centre Africain de Recherches sur les Bananiers et Plantain.

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

Cfmel : café mélasse

CMV : *Cucumber Mosaic Virus* (Virus de la mosaïque du concombre)

CNRA : Centre National de Recherche Agronomique

CRBP : Centre régional de recherches sur les bananiers et Plantain.

DDT: Dichlorodiphényltrichloroéthane

EMBRAPA : Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária

FAO : Food and Agriculture Organization (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)

FHIA : Fundación Hondureña de Investigación Agrícola

FIRCA : Fonds Interprofessionnel pour la Recherche et le Conseil Agricoles

HCH : Hexachlorocyclohexane

IITA : International Institute for Tropical Agriculture

INP-HB : Institut National Polytechnique Félix HOUPHOUËT-BOIGNY

LUBILOSA : Lutte Biologique contre les Locustes et Sauterelles

MEGA : Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Analyse moléculaire de la génétique évolutive)

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction de polymérase en chaîne)

PDA : Potato Dextrose Agar

pH : Potentiel hydrogène

SAKJ : Société Agricole Kablan Joubin

SBMK : Société Bananière Maubert Kabla

SCB : Société de Culture Bananière

SPDCIE : Société des plantations Daval et compagnie

TL100 : Temps Létal pour 100 % d'individus

TL50 : Temps Létal pour 50 % d'individus

UFHB : Université Félix Houphouët-Boigny

UNA : Université Nangui Abrogoua

INTRODUCTION

Les bananes et les bananes plantain sont une ressource alimentaire vitale pour plus de 400 millions d'habitants des zones intertropicales (Lassois *et al.*, 2009). Elles concourent à la sécurité alimentaire en raison de leur haute valeur énergétique (carbohydrates) et nutritionnelle (richesse en minéraux et vitamines). Elles contribuent également au développement économique local et régional en garantissant des revenus réguliers aux producteurs du fait de leur production continue toute l'année. Enfin, la banane est le fruit le plus exporté au monde, avec 19,2 millions de tonnes (FAO, 2018). En Côte d'Ivoire, la production en 2017 est estimée à 400 mille tonnes pour la banane dessert (FAO, 2019) et de 1,6 millions tonnes pour la banane plantain (FAO, 2019). La banane constitue le troisième aliment de base en Côte d'Ivoire selon les statistiques (AIP, 2016).

Cependant, la culture bananière fait face à des contraintes biotiques et abiotiques pouvant entraîner des baisses de rendement. Le charançon noir, *Cosmopolites sordidus* Germar constitue l'une de ces contraintes biotiques. Il est l'un des insectes les plus nuisibles à la culture du bananier. Gold & Messanien (2000) indiquent que les pertes de rendement dues à ses attaques sont supérieures à 40 %.

Plusieurs méthodes de lutte sont employées contre ce ravageur. Ces méthodes de lutte peuvent être d'ordre biologique, physique et chimique. La méthode de lutte classique contre ce bioagresseur consiste en l'utilisation massive des produits phytosanitaires, notamment des pesticides de synthèse (Aby *et al.*, 2010). Compte tenu de la rémanence de ces produits toxiques, de telles pratiques sont à l'origine d'une charge polluante importante au niveau de l'environnement (pollution des sols, des eaux et sédiments des rivières, des nappes phréatiques, disparition de la biodiversité domestique, diminution de la faune édaphique) selon Bonan et Prime (2001), Olvera-Velona *et al.* (2003), et Ganry (2004). Ces pesticides ont également un effet avéré sur la santé humaine (Gowen *et al.*, 2005 ; Polidoro *et al.*, 2008 ; Douglas, 2009).

En conséquence, les méthodes de lutte conventionnelles sont de plus en plus remises en question et soumises à des contraintes réglementaires, notamment européennes, de plus en plus drastiques (Gowen *et al.*, 2005). Ces normes fixent la limite maximale en résidus (LMR) pesticides des fruits importés. Elle est de 0,02 mg/kg pour la chlordécone et de 0,01 mg/kg pour le carbofuran, deux matières actives de synthèse utilisées contre le charançon noir en Côte d'Ivoire.

Par ailleurs, selon l'organisation des nations unies (ONU, 2017), la population mondiale atteindrait neuf milliards d'habitants en 2050. Face à cet enjeu, l'agriculture moderne doit garantir la protection de l'environnement, la confiance des consommateurs ainsi que la durabilité et la résilience des systèmes de culture. Pour y parvenir, les agronomes et les écologues se doivent de développer des méthodes alternatives, de nature agro-écologiques, plus productives et respectueuses de l'environnement. La lutte biologique par l'utilisation d'ennemis naturels à *Cosmopolites sordidus* apparaît comme une méthode alternative (Risède *et al.*, 2010). Les champignons entomopathogènes de l'ordre des Hypocreales sont reconnus comme des agents potentiels de lutte biologique contre les insectes ravageurs des secteurs forestiers et agricoles (Humber *et al.*, 2017). En effet, ce sont des champignons ubiquitaires qui présentent des risques réduits pour la santé humaine, animale et environnementale (Risède *et al.*, 2010). Il a été démontré que ces champignons peuvent être facilement intégrés aux pratiques phytosanitaires conventionnelles, puisqu'ils sont compatibles aux équipements couramment utilisés (Van Der Valk, 2007).

C'est dans ce contexte que des travaux ont été entrepris en Côte d'Ivoire afin de rechercher un ennemi naturel à ce ravageur. L'un d'entre eux a été identifié sur les aires de culture bananière de Côte d'Ivoire. Ainsi, dix isolats de *Metarhizium* sp, ont été récoltés sur les aires de culture bananière (Aby *et al.*, 2010 ; Aby, 2013).

L'utilisation de ce champignon comme biopesticide ne dépend pas seulement de son pouvoir pathogène, mais également de la production en masse de l'agent microbien (Sahayaraj et Namasivayam, 2008). La stratégie de lutte biologique utilisant ce champignon ne pourrait être utile que si des méthodes pratiques et économiques de multiplication en masse sont disponibles (Pham *et al.*, 2009). La méthode la plus utilisée pour la production est la fermentation sur grains de riz décortiqué (Thakre *et al.*, 2011). La fermentation en substrats solides de sous-produits agricoles et industriels à faible coût est une recherche d'intérêt, en particulier dans les pays émergents (Prakash *et al.*, 2008 ; Jaronski, 2014).

Les industries agricoles et alimentaires engendrent des quantités appréciables de sous-produits, qui sont, pour la plupart, peu ou pas valorisés et dont le rejet dans la nature constitue une menace pour l'environnement. Néanmoins, ils peuvent être utilisés à des fins biotechnologiques. Cette étude, pour cela, est basée sur l'utilisation de ces résidus agroindustriels, comme substrat pour la culture du champignon dans le but d'obtenir un rendement important en biomasse. La contribution de la présente étude, en appui à celles déjà

réalisées à ce jour, est de déterminer une formulation de biopesticide à base de *Metarhizium* sp, comme alternative à la lutte chimique classique contre le charançon noir du bananier.

Ce travail a pour objectif global de développer une méthode de lutte intégrée contre le charançon noir du bananier en Côte d'Ivoire, à travers l'utilisation d'isolats de *Metarhizium* sp. Les objectifs spécifiques se définissent comme suit :

- **Os1** : Caractériser les isolats locaux de *Metarhizium* sp.,
- **Os2** : Définir les conditions optimales de sporulation et de pathologie de *Metarhizium* sp.,
- **Os3** : Proposer une formulation d'un biopesticide à base de *Metarhizium* sp.,
- **Os4** : Evaluer l'efficacité au champ du biopesticide.

Les hypothèses de recherche qui sous-tendent la conduite d'un tel travail sont :

- **H1** : Les caractérisations biologique et moléculaire des isolats locaux de *Metarhizium* sp. permettent de les différencier;
- **H2** : Certaines conditions de culture favorisent la sporulation et la pathologie de *Metarhizium* sp.
- **H3** : Une formulation du biopesticide à base de résidus agricoles locaux est efficace contre le charançon noir du bananier
- **H4** : L'application du biopesticide à base d'inoculum de *Metarhizium* sp. au champ réduit le niveau d'infestation du charançon.

Le présent mémoire rend compte des différentes investigations réalisées. Outre l'introduction et la conclusion, il comporte trois grandes parties. La première partie est une revue de littérature dans laquelle sont présentées quelques généralités sur le bananier, le bananier plantain, le charançon noir du bananier et le champignon *Metarhizium* sp.. La deuxième partie présente la méthodologie mise en œuvre pour atteindre l'objectif de ce travail. La troisième partie présente l'ensemble des résultats obtenus ainsi que leur discussion.

PREMIERE PARTIE : REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LE BANANIER

1.1 Origine et distribution du bananier

Le bananier, plante herbacée, est originaire du Sud-Est de l'Asie où il a été l'une des premières plantes à être domestiquée (Simmonds, 1962). Son centre de diversification semble être la Malaisie ou l'Indonésie (Daniells *et al.*, 2001). A partir de cette région, le bananier s'est répandu à l'Est en Amérique du Sud, mais surtout à l'ouest à Madagascar, à travers les migrations indo-malaysiennes. Le bananier a aussi été répandu par les Arabes et les Portugais le long de la côte Est de l'Afrique d'où il a traversé les pays de l'Afrique centrale jusqu'en Afrique de l'Ouest (Dhed'a *et al.*, 2011). Il s'est ensuite répandu vers l'Afrique de l'Ouest il y a au moins 2500 ans (Mbida *et al.*, 2001). Son implantation aux Amériques s'est d'abord faite par la République Dominicaine en 1516 grâce à des plants en provenance des îles Canaries, et s'est poursuivie vers l'Amérique Centrale et du Sud. Ainsi, depuis des millénaires, les migrations humaines et les échanges de matériel végétal ont introduit le bananier dans des zones écologiques très différentes sur tous les continents (Lassoudière, 2010).

Les bananiers et bananiers plantain sont des monocotylédones géantes appartenant à l'ordre des Scitaminales ou Zingibérales et à la Famille des Musaceae. Cette Famille comporte trois genres : *Ensete*, *Musa* et *Musella* présentant une forte variabilité (Lassoudière 2010). L'ordre de Scitaminales renferme six (6) Familles (Dhed'a *et al.*, 2011) : les Strelitziaceae (genres *Strelitzia*, *Heliconia* et *Ravenala*) ; les Lowiaceae (genre *Orchidantha*) ; les Zingiberaceae (genres *Zingiber* et *Hedichium*) ; les Maranthaceae (genre *Marantha*) ; les Cannaceae (genre *Canna*) ; les Musaceae (genres *Musa* et *Ensete*).

Le genre *Musa* est subdivisé, sur la base du nombre de chromosomes et de caractéristiques morphologiques, en trois (3) sections (*Eumusa* et *Rhodochlamus*, *Callimusa* et *Australimusa*, et *Ingentimusa*), parmi lesquelles *Eumusa* (n=11) est la seule section qui a donné des espèces parthénocarpiques (Lamare *et al.*, 2016). Le genre *Musa* comprend, en outre, dix (10) espèces dont deux (2) sont impliquées dans l'évolution des bananiers et des bananiers plantain, *Musa acuminata* Colla et *Musa balbisiana* Colla. Les variétés de bananes sucrées sont issues de la domestication de *M. acuminata*, tandis que les bananes plantain sont originaires des croisements entre les deux espèces du genre *Musa*. La contribution haploïde de *M. acuminata* et de *M. balbisiana* aux bananiers est indiquée respectivement par A et B (Simmonds et Shepherd, 1955 ; Lassois *et al.*, 2009). La majorité des bananes comestibles proviennent des espèces *Musa acuminata* et du croisement *M. acuminata* × *M. balbisiana*. Les classifications des espèces cultivées actuellement utilisées sont celles de Cheesman

(1948) et de Simmonds et Shepherd (1955). Elles sont basées sur la ploïdie et quelques caractères phénotypiques. On distingue : les diploïdes AA, AB, les triploïdes AAA, AAB, ABB et les tétraploïdes AAAA. A ces cultivars, s'ajoutent les hybrides tétraploïdes issus de programmes d'amélioration (CARBAP, EMBRAPA, FHIA, IITA), avec des génotypes AAAA, AAAB, AABB, ABBB.

Bakry *et al.* (2001) ont repris la classification et établi la répartition géographique des principales variétés de bananiers (Tableau I).

1.2 Description du bananier

1.2.1 Appareil végétatif

Le bananier est une plante herbacée des zones tropicales et subtropicales. En conditions de culture, cette plante mesure en général 1,80 à 3,5 m de hauteur à la fin de la phase végétative. Pour certaines espèces sauvages, le pseudo-tronc atteint 9 m (Jenuwein, 1988). La vraie tige est souterraine. Elle est aussi appelée bulbe ou rhizome et émet de nombreux bourgeons latéraux qui assurent le mode asexué de reproduction et la pérennité de la plante.

La reproduction sexuée est également connue chez les bananiers séminifères dits « sauvages ». Le « faux-tronc » ou « pseudo-tronc » est formé par l'emboîtement des gaines foliaires, fortement imbriquées les unes dans les autres (Lassoudière, 2010). La partie supérieure de la gaine se modifie en un pétiole robuste prolongé par une nervure centrale qui sépare le large limbe en deux parties presque symétriques.

Le limbe de la dernière feuille émise est enroulé autour de la nervure principale centrale en « cigare » et se déroule ensuite pour constituer le bouquet foliaire. A maturité, le méristème terminal qui avait un fonctionnement végétatif évolue en méristème floral à l'intérieur du pseudo-tronc.

Le méristème apical qui était aplati au cours de la phase végétative, formant des ébauches foliaires, devient alors convexe et l'activation des divisions cellulaires entraîne une différenciation des spathes et des étages florifères ainsi qu'une croissance de l'axe (Kerbellec, 1996).

Tableau I : Classification et répartition géographique des principales variétés de bananier (Bakry *et al.*, 2001)

| GROUPE | SOUS-GROUPE | CULTIVARS | TYPE DE FRUIT | LOCALISATION |
|---------------|--------------------|---|---------------------------------|---|
| AA | Sucrier | PisangMas/Fraysinette/Figue Sucrée | Dessert sucré | Tous les continents |
| | | Pisang Lilin | Dessert | Indonésie/ Malaisie |
| | | PisangBerangan/ Lakatan | Dessert | Indonésie/Malaisie/Philippines |
| AAA | Cavendish | Lacatan/Poyo/Williams/Grande naine/Petite Naine | Dessert | tous les continents, pays exportateurs |
| | | Gros-michel | Gros-michel/Highgate/Cocos | Dessert |
| | Figue rose | Figue-rose rose/ Figue-rose/verte | Dessert | Tous les continents |
| | Lujugira | Intuntu/Mujuba | A bière/à cuire | Afrique de l'est et centrale, Colombie |
| | Ibota | Yangambikm 5 | Dessert | Indonésie/Afrique |
| AB | Ney Poovan | Safet Velchi/Sukari | Dessert acidulé | Inde/Afrique de l'Est |
| AAB | Figue pomme | Maça/Silk | Dessert acidulé | Tous continents |
| | Pome | Prata | Dessert acidulé | Inde/Malaisie/Australie/Afrique de l'Ouest/Brésil |
| | Mysore | Pisang Ceylan | Dessert acidulé | Inde |
| | Pisanf Kelat | Pisang Kelat | Dessert | Inde/Malaisie |
| | Pisang Rajah | Pisnag Rajah Buhu | A cuire | Malaisie/Indonésie |
| | Plantain | French/Corne/Faux Corne | A cuire | Afrique Centrale et de l'Ouest/Amérique Latine/Caraïbes |
| | Popoulou | Popoulou | A cuire | Pacifique |
| | Laknao | Laknao | A cuire | Phillipines |
| | Pisang Nangka | Pisang Nangka | A cuire | Malaisie |
| | ABB | Blugoe | Blugoe/Matavita/Poteau/Cacambou | A cuire |
| Pelipita | | Pelipita | A cuire | Phillipines/Amérique Latine |
| Pisang Awak | | Fougamou | Dessert | Inde/Thaïlande/Philippines/Afrique de l'Est |
| Saba | | Saba | A cuire | Phillipines/Indonésie/Malaisie |

Cette transition de l'état végétatif vers l'état floral s'opère en général trois mois environ avant l'émergence de l'inflorescence hors de la couronne foliaire. Chaque rejet produit une seule inflorescence dont la partie femelle donne naissance au régime de banane, soit après fécondation, soit par parthénocarpie (développement du fruit sans fécondation préalable de la fleur). La figure 1 présente l'organisation du bananier et de ses rejets (Champion, 1963).

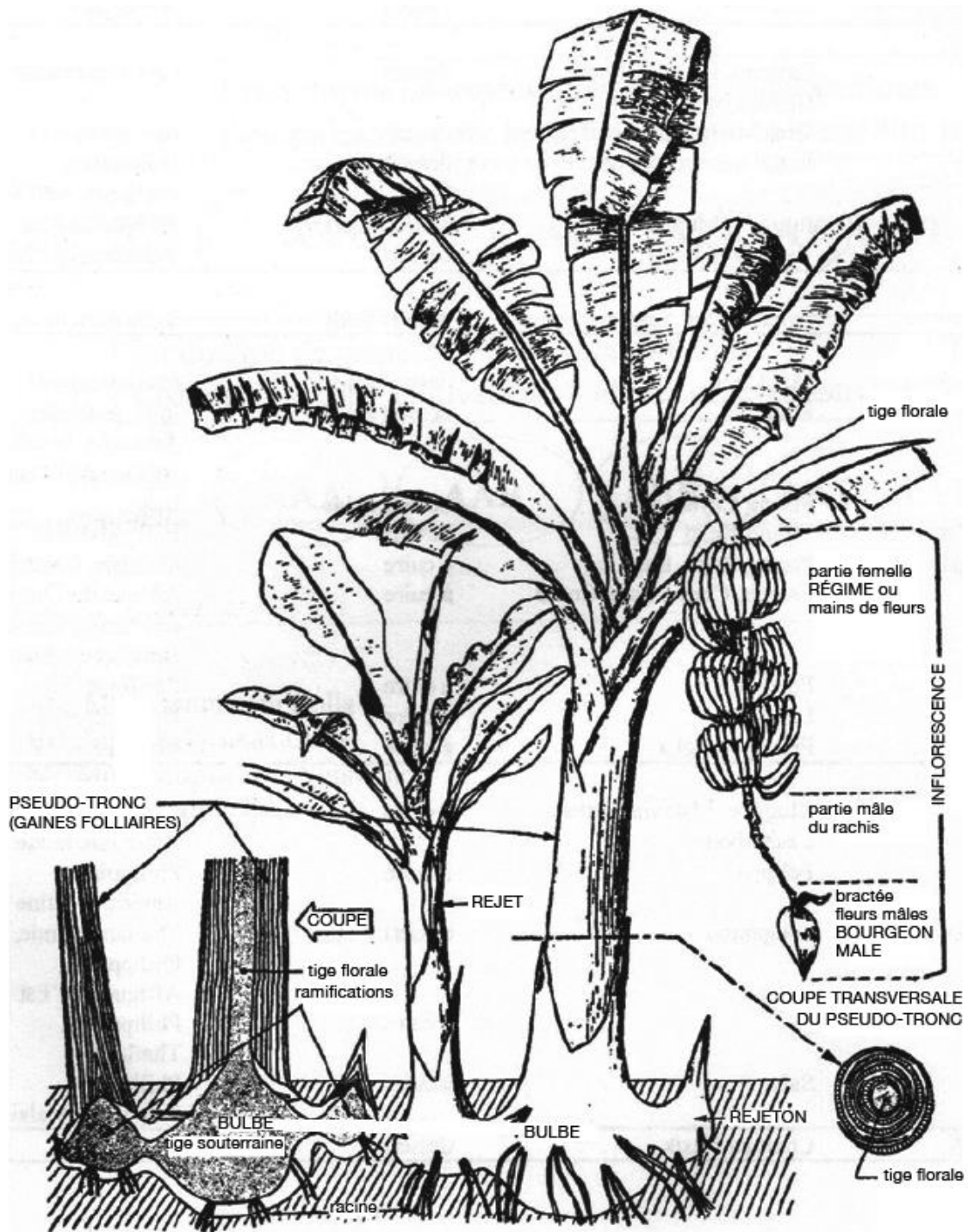


Figure 1 : Représentation de l'organisation du bananier et de ses rejets (Champion, 1963)

1.2.2 Appareil reproducteur du bananier

1.2.2.1 Inflorescence femelle

L'inflorescence complexe, est un épi de cymes (Figure 1). Le long de son axe (appelé aussi rachis ou hampe florale) sont disposées, suivant une hélice analogue à celle du système foliaire, des spathes (ou bractées) qui couvrent chacune un groupe de fleurs (la cyme), dépourvues de bractée individuelle et placées, le plus souvent, en deux rangées serrées et imbriquées (Bakry, 1984). Dès la sortie hors du pseudo-tronc (floraison), l'inflorescence, chez la plupart des cultivars, ainsi que chez quelques espèces sauvages, se recourbe vers le sol pour pendre verticalement. Les spathes, larges et acuminées, se soulèvent de la plus ancienne à la plus récente, puis elles se replient avant de tomber. A l'anthèse, les apex des fleurs (Figure 2) pointent vers le bas (puis se redressent en l'espace de quelques jours) ; c'est le moment propice de la pollinisation. Elle s'effectue à l'état naturel par les chauves-souris, les oiseaux et les insectes pollinisateurs. Au sein des programmes d'amélioration, le pollen, prélevé sur des fleurs mâles, est déposé manuellement sur les stigmates des fleurs femelles. Ces fleurs femelles sont constituées d'un ovaire représentant les deux tiers de la hauteur totale de la fleur ; les styles et stigmates sont bien développés alors que les étamines sont réduites à des staminodes non fonctionnels (Figure 2-A).

Chez les bananiers cultivés, les premiers groupes de fleurs différenciés (cymes) sont constitués uniquement de fleurs femelles dont l'ovaire se développe pour former une banane. Les ovaires se remplissent de pulpe pour former le fruit (ou doigt de banane) sans pollinisation (parthénocarpié), ni formation de graines (aspermie). L'ovaire persiste et se développe alors que le périanthe et le stigmate se détachent, laissant une cicatrice à l'extrémité libre du fruit mature. Ces groupes de fleurs femelles, appelés, le plus souvent, « mains » (ou pattes) de bananes se développent et l'ensemble des « mains » constituent le régime. Le nombre de « mains » et de « doigts » par régime varie selon les variétés et les conditions de culture, mais en général, il se forme 5 à 15 rangées de fleurs femelles possédant 15 à 22 fleurs chacune. Le poids du régime peut atteindre 40 à 80 kg dans le sous-groupe des Cavendish (Lassoudière, 2010). Après les fleurs femelles, apparaissent 2 à 3 mains de fleurs neutres ou pseudo-hermaphrodites avec toutes les pièces florales avortées, suivies par les mains de fleurs mâles constituées d'ovaires réduits, de styles et stigmates abortifs et d'étamines bien développées (Figure 2 - B).

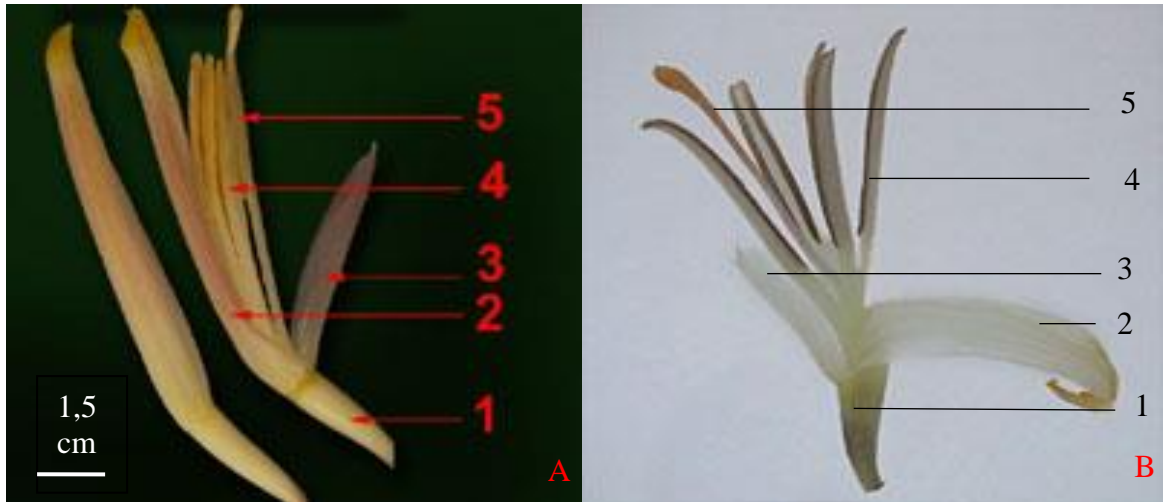


Figure 2 : Fleurs de bananier (Noumbissié, 2014)

A - Fleur « femelle »,

B - Fleur « mâle »

Ovaire (1), tépales (2), tépale libre (3), étamines fertiles (4) et des staminodes et un style (5)

1.2.2.2 Inflorescence mâle

La croissance de l'inflorescence se poursuit indéfiniment pour former à son extrémité le bourgeon mâle ou « popote ». Il est constitué de la superposition des bractées et produit des mains de fleurs mâles qui, généralement, tombent quelques heures après avoir été découvertes en dénudant ainsi la partie inférieure de la hampe (Lassois *et al.*, 2009 ; Lassoudière, 2010). Contrairement aux fleurs femelles, les spathes des fleurs mâles possèdent une zone d'abscission. Chaque jour, une à deux spathes (selon les clones) se soulèvent avant de tomber.

1.3. Ecologie

Le bananier est une plante exigeante en eau, sensible aux basses températures et aux vents. Les sols profonds, limoneux et bien drainés conviennent le mieux pour la culture du bananier. Les éléments N, P, K, Ca et Mg sont indispensables au développement harmonieux de la plante pour atteindre un bon niveau de développement et une production élevée. Le pH du sol peut varier de 4,0 à 8,0 (Swennen et Vuylsteke, 2001). Les besoins en eau sont généralement couverts avec 125 à 150 mm de pluie par mois. La température optimum de développement du bananier est de 28 °C. Au-delà de 35 à 40 °C, des anomalies surviennent. En dessous de 24 °C, la croissance est ralentie. La culture du bananier requiert une durée d'insolation comprise entre 2000 et 2400 h/an. Les vents d'une vitesse de plus de 60 km/h entraînent des chutes et des cassures des faux troncs (Bakry *et al.*, 2001).

1.4. Culture du bananier

La culture des bananiers pour l'exportation est presque exclusivement basée sur les variétés du sous-groupe Cavendish. Cette production est faite en monoculture intensive et nécessite des intrants et investissements importants : irrigation, traitements aériens, station d'emballage. Les productions pour les marchés locaux (bananes à cuire et autres bananes dessert) s'inscrivent dans une gamme très large de système de culture qui va de l'extensif fondé sur le brûlis forestier à des associations complexes avec des cultures pérennes (cacao, café, palmier, ...) vivrières et fruitières et souvent à des monocultures. Ces systèmes, économes en intrants, peuvent être intensifs en travail. Ils concernent une grande diversité d'itinéraires techniques en termes de densité, de gestion de la diversité variétale et de modalités de conduite de la plante : trouaison, tuteurage, buttage, etc, ...

Le site choisi pour la culture du bananier doit être facile d'accès, bien exposé à la lumière et à l'abri des grands vents. Les terrains plats ou à faible pente présentant un bon

drainage sont préférables aux terrains trop en pente qui favorisent l'érosion et la perte de fertilité, et constituent un risque à cause des vents. Un terrain vierge est préférable car il est riche en matière organique. Les jachères peuvent aussi être utilisées. Les anciennes bananeraies où la fertilité du sol peut être plus faible et les conditions phytosanitaires mauvaises sont peu recommandées. La préparation des sols doit non seulement être cohérente avec les aménagements réalisés ou prévus, et avec les caractéristiques de la replantation, mais aussi être planifiée pour être réalisée en une période adéquate (Lassoudière, 2007).

Le travail de préparation de sol doit être adapté à chaque type de sol, à son état et aux conditions d'humidité. Il n'existe pas de règle générale en ce domaine. Certains sols n'ont pas besoin d'être travaillés (Lassoudière, 2007). Les plantations de bananiers, pour l'exportation, sont établies en plantant principalement des vitroplants ou vivoplants. Cette pratique contribue à la lutte phytosanitaire. En effet, elle réduit la population des nématodes et permet d'écarter les rejets infestés par les charançons (dont la présence est signalée par des galeries noir-brun dans les cormus pelés). Avant leur plantation, les rejets ainsi préparés sont plongés dans de l'eau chaude (50 à 55 °C) pendant 20 min environ ou dans un mélange aqueux de nématicide et d'insecticide (Swennen et Vuylsteke, 2001).

1.5 Intérêt économique

Les bananiers et les bananiers plantain comptent parmi les cultures vivrières les plus importantes dans la plupart des pays tropicaux et subtropicaux d'Asie, d'Amérique et d'Afrique. Ils y jouent un rôle essentiel dans l'alimentation quotidienne. Dans ces différents pays, les bananes et les bananes plantain sont la quatrième denrée de base, après le riz, le blé et le maïs, en termes de valeur brute de production (Ganry *et al.*, 2012).

La production mondiale de banane plantain en 2017, s'élève à près de 39,3 millions de tonnes et connaît une croissance globale de 1,7 % par an en moyenne depuis 20 ans, du fait d'une augmentation des surfaces cultivées combinée à une augmentation des rendements. Le continent africain produit 71,8 % de l'offre mondiale, soit plus de 27,5 millions de tonnes en 2013. Sa production suit une évolution similaire à celle de la production mondiale, tant en ce qui concerne les surfaces cultivées que les rendements (FAO, 2019). Les principaux pays producteurs sont l'Ouganda, avec près de 9 millions de tonnes, suivi par le Cameroun, le Ghana, la Colombie et le Rwanda (Figure 3).

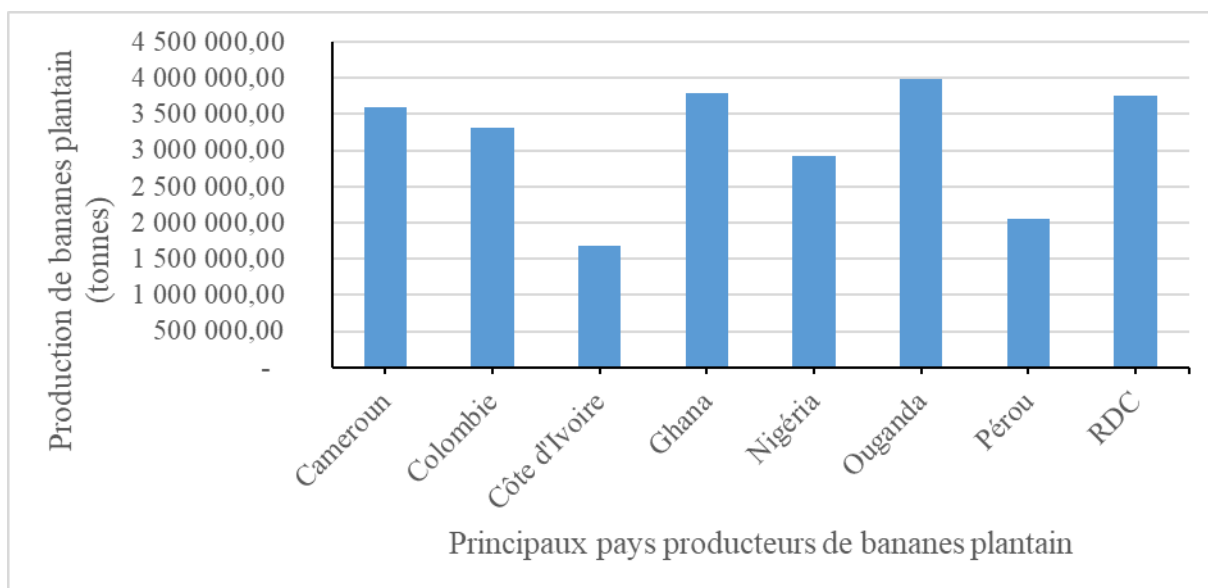


Figure 3 : Production moyenne de 2008 à 2018 des quatre premiers producteurs mondiaux de bananes plantain (FAO, 2020)

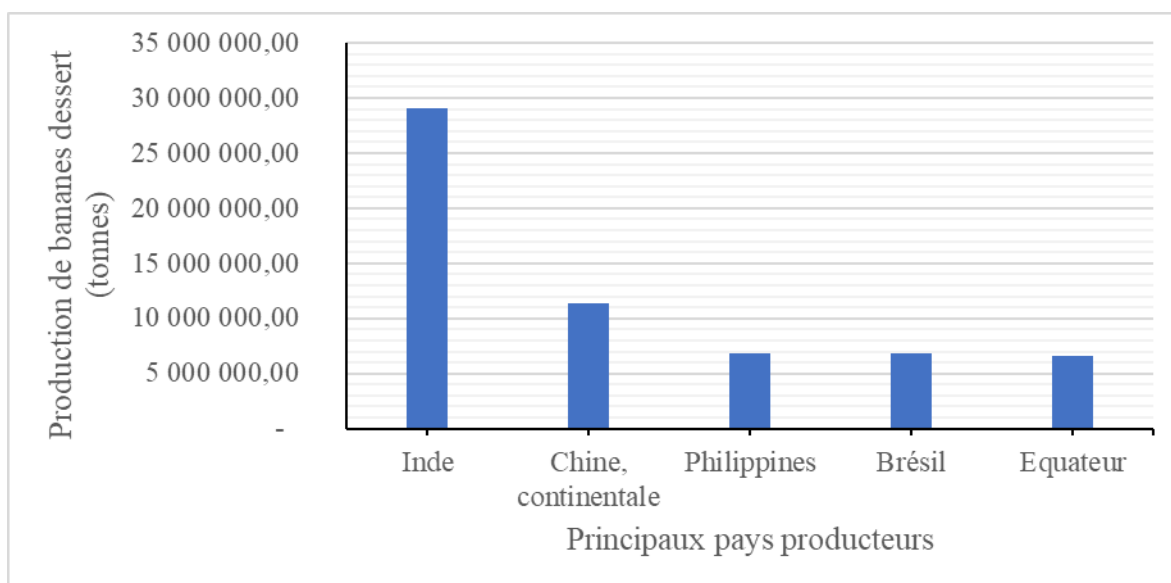


Figure 4 : Production moyenne de 2008 à 2018 des cinq premiers producteurs mondiaux de bananes desserts (FAO, 2020)

La Côte d'Ivoire occupait le 8^{ème} rang mondial en 2013, avec une production estimée à 1,7 millions de tonnes en 2017. La production est, selon Perrin (2015), relativement stable depuis une vingtaine d'années, ainsi que les superficies cultivées. Si la production mondiale est dominée par l'Afrique, les échanges commerciaux internationaux, en revanche, se font majoritairement entre l'Amérique Latine (Equateur, Guatemala, République Dominicaine, Colombie, Nicaragua) et les Etats-Unis. Les autres principaux pays importateurs sont l'Arabie Saoudite, avec près de 114 000 tonnes en 2013, suivie de l'Afrique du Sud, avec près de 95 000 tonnes, et de l'Union Européenne, avec plus de 80 000 tonnes.

Les exportations mondiales de bananes dessert ont atteint un niveau record de 19,2 millions de tonnes en 2018, grâce à une croissance substantielle de l'offre. Une augmentation des expéditions mondiales de 5,7% de 2017 à 2018 a été observée. La forte croissance de l'offre des deux principaux exportateurs, l'Équateur et les Philippines, était principalement à l'origine de cette augmentation. Parallèlement, les conditions météorologiques défavorables ont continué de nuire aux expéditions de plusieurs autres fournisseurs importants, notamment le Costa Rica et la République dominicaine. La Côte d'Ivoire occupait le 33^{ème} rang mondial en 2013, avec une production estimée à 377 mille tonnes.

1.6 Importance nutritionnelle et thérapeutique

Le bananier est généralement cultivé pour ses fruits. Il est rare de le cultiver pour une valorisation prioritaire de ses autres organes. La banane est le fruit le plus consommé par de nombreuses populations en raison de ses propriétés énergétiques (Lassoudière, 2007). Ce fruit est une bonne source de vitamines, A, B1, B2, B6, B9 et C, (Gigleux *et al.*, 2006) et divers autres éléments nutritifs. Sur le plan thérapeutique, la banane peut, grâce à sa capacité anti-oxydante, contribuer à la prévention de certains cancers, des maladies cardiovasculaires et dégénératives attribuables au vieillissement (Proteggente *et al.*, 2002 ; Campanella *et al.*, 2003). Elle est également utilisée pour le traitement d'ulcère d'estomac et de la diarrhée chronique (Rabbani *et al.*, 2004).

CHAPITRE II : PRINCIPALES CONTRAINTES BIOTIQUES A LA PRODUCTION DE LA BANANE EN COTE D'IVOIRE

Le bananier, à l'instar de toutes les cultures, fait l'objet de nombreuses attaques biotiques qui affectent considérablement la production. Cette culture est sujette à diverses maladies fongiques, bactériennes et virales, mais également à l'attaque des ravageurs notamment les arthropodes (Dorel *et al.*, 2011 ; Lassoudière, 2010).

2.1 Bactérioses

Certaines bactéries causent des affections au bananier. Du fait de leur mode de dissémination et de l'absence de variétés résistantes, les maladies bactériennes préoccupent de plus en plus les producteurs

2.1.1 Maladie de Moko

La maladie de Moko de *Musa* spp. est causée par des souches de *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996 appartenant au phylotype II du complexe d'espèces *R. solanacearum* (Fegan et Prior, 2006). Elle est largement répandue chez les cultivars de bananes à cuire des Philippines où elle est appelée maladie de bugtok. Elle est présente dans de nombreux pays tropicaux et tempérés chauds où les hôtes sont des aliments de base ou des plantes ornementales importantes. Elle est transmise par le sol, l'eau, les insectes visitant les fleurs et les outils agricoles (Diekmann et Putter, 1996). Les feuilles les plus anciennes de *Musa* spp. infectées par la maladie de Moko deviennent jaunes, flétrissent, nécrosent et chutent. Les jeunes feuilles deviennent jaunes vifs avant de devenir nécrotiques et sèches. L'agent pathogène colonise rapidement la totalité de la plante et les rejets vont également se faner et mourir (Eden-Green, 1994).

2.1.2 Maladie du sang du bananier

La maladie du sang du bananier est causée par une bactérie Gram négatif appelée *Ralstonia syzygii* Subsp. *Celebesensis* Gäumann 1923. elle a été signalée pour la première fois après l'introduction de la banane dessert au début des années 1900 (Eden-Green, 1994 ; Thwaites *et al.*, 2000). Elle se rencontre communément chez le cultivar Pisang Kepok (ABB/BBB. 'Saba'), mais d'autres groupes sont également affectés. Les symptômes sont similaires à ceux de la maladie de Moko, mais varient selon le stade de croissance de la plante

et selon le mode d'infection. On observe sur les feuilles entièrement déployées des plants de tout âge, un jaunissement transitoire très apparent, une perte de turgescence, une dessiccation et une nécrose. Chez les plants matures, la base du pétiole s'affaisse, et les feuilles flétries pendent alors autour du pseudo-tronc. Les feuilles les plus jeunes cessent d'émerger et des plaques blanchâtres, puis nécrotiques, apparaissent sur leur limbe (Eden-Green, 1994).

2.2 Mycoses

Les infections fongiques sont les maladies les plus fréquemment rencontrées et qui occasionnent d'énormes pertes tant sur le bananier dessert que sur le bananier plantain.

2.2.1 Champignons parasites des feuilles

Les plus redoutables maladies du système foliaire du bananier sont provoquées par *Mycosphaerella* spp. Trois espèces provoquent une nécrose des tissus des feuilles qui entraîne la défoliation, une perte de rendement et une maturation prématurée ou inégale du fruit.

La sigatoka noire, causée par le champignon *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (*Pseudocercospora fijiensis* [Morelet] Deighton), est une menace économique majeure pour la culture de la banane dans le monde entier (Churchill, 2011, Essis *et al.*, 2016).

Mycosphaerella musicola R. Leach de J.L. Mulder (anamorphe *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton) qui est l'agent causal de la cercosporiose jaune et a été le premier agent pathogène foliaire à Sigatoka à être identifié en 1902 (Jones, 2003).

Mycosphaerella eumusae Crous & Mourichon (anamorphe *Pseudocercospora eumusae* Crous & Mourichon) a été signalé en Asie (Carlier *et al.*, 2000), et sa seule répartition connue est en Asie du Sud-Est et certaines régions d'Afrique. Il est l'agent causal de la maladie « Eumusae Leaf Spot Disease » (Crous & Mourichon, 2002 ; Uma *et al.*, 2014). *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, et *Mycosphaerella musicola* Leach, sont des pathogènes quasi présents dans toute l'aire de la culture du bananier.

2.2.2 Champignons telluriques

De nombreux champignons telluriques responsables de diverses affections ont été identifiés de par le monde. La fusariose du bananier (*Musa* spp.), également appelée maladie de Panama, est causée par le champignon *Fusarium oxysporum* sp. *cubense* Snyder et Hansen (FOC) est une maladie fongique grave affectant la banane et limitant sa production dans le monde entier (Getha et Vikineswary, 2002). Ce pathogène bloque le système vasculaire des plantes, induisant de la sorte le flétrissement et la mort de l'hôte. La race 1 de ce pathogène a

détruit le cultivar commercial Gros Michel et a suscité son remplacement dans les années 1960 par des types tolérants du sous-groupe des Cavendish. Les cultivars de ce sous-groupe, qui sont les bananiers d'exploitation actuelle, sont, toutefois, devenus très sensibles à la race 4 du pathogène de la maladie de Panama (Pearce 2003 ; Wang et Ko 2004).

D'autres champignons comme *Cylindrocladium* spp. ont été isolés pour la première fois dans les racines nécrosées de bananiers en Côte d'Ivoire et se sont montrés pathogènes sur les bananiers (Kobenan, 1991)

2.3 Viroses

Cinq principales viroses du bananier ont été identifiées à travers le monde. Elles sont causées par le *Cucumber Mosaic Virus* Doolittle et Jagger (CMV), le *Banana Bunchy Top Virus* Dale (BBTV), le *Banana Bract Mosaic Virus* Magnaye et Espino (BBrMV) et le *Mild Mosaic Virus* (BanMMV) Gambley et Thomas (Lockhart, 2002).

2.3.1 Mosaïque en plages du bananier

Elle est due au *virus de la mosaïque du concombre* (CMV) dont 2 groupes sérologiques sur 3 ont de l'importance. Ce virus a une large gamme d'hôtes. Les attaques étaient sporadiques, localisées. Elles sont devenues fréquentes sur les vitroplants ; l'expression des symptômes est maximale 2 à 3 mois après plantation. La contamination a lieu en pépinière ou au champ. Les causes de la plus grande sensibilité sont inconnues (Sarah *et al.*, 1990). La mosaïque apparaît entre la nervure centrale et les bords des feuilles infectées. La mort de la feuille peut suivre dès l'émergence. Ces symptômes peuvent être forts ou peu prononcés sur certaines feuilles ou totalement absents sur d'autres (Cirad-Gret, 2002).

Les travaux de Kouadio en 2013 ont révélé la présence de ce virus en Côte d'Ivoire dans des départements de production importante de bananes desserts notamment dans les plantations industrielles.

2.3.2 Maladie de Bunchy Top du bananier ou maladie du sommet touffu du bananier

Cette maladie est causée par un virus, appelé *Banana bunchy top virus* (BBTV). Les isolats de ce virus ont été répartis en 2 groupes distincts sur la base des similitudes de leurs séquences nucléotidiques à savoir le groupe « Pacifique Sud » et le groupe « asiatique » (Amin *et al.*, 2008; Vishnoi *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011). Ce dernier a des petites particules isométriques, dont le génome est constitué d'ADN monocaténaire à plusieurs composantes. La maladie se transmet par un Aphidae, le puceron du bananier (*Pentalonia*

nigronevosa) et se propage par multiplication végétative des plants infectés (Lepoivre, 2003). Les plants infectés par le Bunchy top exhibent divers symptômes. Lorsque la maladie est avancée, ils prennent l'apparence de la rosette, avec des feuilles étroites, dressées et progressivement de plus en plus courte, d'où l'appellation de « Bunchy top » (sommet touffu) (Thomas *et al.*, 1999).

2.3.3 Mosaïque des bractées du bananier

L'agent causal de cette maladie est un Potyvirus, le *virus de la mosaïque des bractées du bananier* (BBrMV). Elle se caractérise par l'apparition d'une mosaïque brune sur les bractées des bananiers infectés, et des symptômes très discrets de tirets sur le pseudo tronc des plantes infectées. Les fruits présentent des mosaïques verts/jaune importantes. Des traits colorés en forme de fuseaux sont également observés sur le limbe des jeunes feuilles qui disparaissent très rapidement lorsque la feuille devient mature (Thomas *et al.*, 1999). En Inde, ce virus jusque-là inféodé au genre *Musa* a été rapporté pour la première fois sur des plants de cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton), une monocotylédone herbacée à rhizome de la famille des Zingiberaceae (Siljo *et al.*, 2012).

2.3.4 Striure du bananier ou mosaïque en tiret

Cette maladie est causée par un virus qu'on appelle *Banana streak virus* (BSV). Au moins cinq souches virales différentes sont intégrées au génome de l'espèce *Musa balbisiana* (noté B) (Ndowora *et al.*, 1999 ; Lheureux *et al.*, 2003). La maladie se caractérise par des tirets jaunes sur le limbe des feuilles formant des mosaïques chlorotiques, évoluant en nécroses. Leur présence est révélée par observation en transparence des feuilles vis à vis d'une source de lumière (le soleil). La sévérité des symptômes dépend des souches virales présentes, de la nature du cultivar infecté et des conditions environnementales.

L'apparition des symptômes est la plupart du temps dépendante des conditions de température. Ainsi, des bananiers peuvent être infectés sans qu'il y est apparition de symptômes (Caruana, 2003). La lutte contre cette maladie virale est difficile parce que liée au mode de transmission persistant et circulant. Néanmoins, la prévention comme l'utilisation de matériel sain et la destruction de toutes les plantes présentant les symptômes de virus et des plantes se trouvant autour de plantes infectées diminue la maladie (Lepoivre, 2003).

2.3.5 Mosaïque modérée du bananier

La mosaïque modérée du bananier est provoquée par le virus de la mosaïque modérée du bananier (BanMMV). Ce virus a été détecté dans les échantillons de bananier provenant d'Afrique, d'Amérique, d'Asie du Sud-Est et d'Australie (Thomas et Caruana., 2000). Dans beaucoup de cas, les plantes ne présentent pas de symptômes ou alors de façon très modérée (Thomas et Caruana., 2000). Très peu d'études sont disponibles sur son mode de propagation ; pour l'instant l'unique modalité connue de transmission de ce virus est le matériel végétal (Thomas et Caruana, 2000 ; Teycheney *et al.*, 2005) Les infections mixtes du BanMMV et du BSV sont communes et dans ce cas les symptômes du BanMMV sont cachés par ceux causés par le BSV (Reichel *et al.*, 2003). La présence du BanMMV en co-infection avec le CMV est corrélée à l'expression d'un symptôme additionnel de nécrose foliaire (Thomas et Caruana., 2000). Le BanMMV semble n'avoir aucun impact lorsqu'il est en infection simple mais il est cependant important lors d'une coinfection (Thomas et Caruana, 2000 ; Caruana, 2003).

2.4 Nématodes

Les nématodes sont des vers microscopiques de 0,3 à 5 mm de long et de 0,01 à 0,1 mm de diamètre. Ils sont munis d'un stylet ou "aiguille" qui leur permet de pénétrer dans les organes végétaux. L'incidence des nématodes se traduit par un allongement de la phase végétative. Les pertes de production sont estimées entre 20 et 80% (Sasser et Freckman, 1987 ; Sarah, 1989). Il existe de nombreux genres de nématodes phytoparasites associés au genre *Musa* spp. à travers le monde. Les phytonématodes les plus dévastateurs et les plus largement répandus sont les endoparasites migrants *Radopholus similis* Cobb et *Pratylenchus coffeae* Zimmermann; le semi-endoparasite *Helicotylenchus multicinctus* Cobb (Araya *et al.*, 2002) et le nématode sédentaire *Meloidogyne* spp.

2.4.1 *Radopholus similis*

Le nématode *Radopholus similis* est l'un des plus importants parasites des racines des bananiers dans la zone intertropicale. La pénétration de ce parasite se produit préférentiellement à proximité de l'apex des racines, mais peut avoir lieu sur toute la longueur de la racine. Au fur et à mesure de sa progression inter et intracellulaire, *R. similis* se nourrit aux dépens du cytoplasme des cellules du parenchyme cortical, détruisant ainsi les parois cellulaires et provoquant la formation de tunnels qui évoluent en nécroses. Ces dernières peuvent s'étendre à l'ensemble du cortex mais le cylindre central n'est jamais attaqué bien

que *R. similis* puisse y pénétrer lorsque les tissus sont très jeunes (Sarah *et al.*, 1996 ; Collingborn *et al.*, 2000).

2.4.2 *Pratylenchus coffeae*

L'espèce *Pratylenchus coffeae* connaît une extension récente dans les zones de production de bananes en Côte d'Ivoire (Adiko et N'Guessan, 2001 ; Gnonhourri et Adiko ; 2008). Cette espèce de nématodes, est un ravageur majeur de *Musa*. Les dégâts sont similaires à ceux causés par *Radopholus similis* (Bridge *et al.*, 1993).

2.4.3 *Meloidogyne incognita* et *M. javanica*

Deux autres nématodes, *Meloidogyne incognita* Kofoid et White, et *M. javanica* (Treub, 1885) Chitwood, 1949, appelés aussi nématodes à galle des bananiers, parasitent les racines des bananiers et des bananiers plantain partout où ces plantes sont cultivées (Rahman *et al.*, 2014). *Meloidogyne arenaria* (Neal, 1889) Chitwood, 1949 et occasionnellement d'autres espèces du genre *Meloidogyne* peuvent également être associées aux bananiers et bananiers plantain. Malgré leur large répartition et parfois leur grande abondance, les nématodes à galle ne sont pas considérés comme ayant un pouvoir pathogène important sur les bananiers et bananiers plantain. Ils sont généralement présents en association avec *Radopholus similis* et *Pratylenchus* spp. (Quénéhervé *et al.*, 2009, De Waele *et al.*, 1998).

2.5 Arthropodes

Le bananier est attaqué par une multitude d'insectes. Les plus fréquents et nuisibles sont : *Oidoporus longicollis* Olivier, *Heteroligus meles* Billberg, *Cosmopolites sordidus* Germar et le symphyle *Hanseniella ivorensis* Juberthie-Jupeau et. Kehe.

2.5.1 *Oidoporus longicollis*

Le charançon ou foreur du pseudotrunc du bananier, *Odoiporus longicollis* Oliver (Coleoptera : Curculionidae), est l'un des principaux ravageurs des bananiers et des bananiers plantain. L'adulte, de couleur noire, mesure de 23 à 39 mm (Padmanaban et Sathiamoorthy, 2001). La femelle pond les œufs dans les gaines foliaires et les larves se nourrissent des tissus succulents de celles-ci. Elles peuvent dévorer le bourgeon floral en ascension qui pourrit dans le pseudo tronc.

2.5.2 *Heteroligus meles*

La première mention de la présence du *Dynastinae Heteroligus meles* en Côte d'Ivoire est donnée par Paulian en 1954. *Heteroligus meles* Billberg appartient à la sous-famille des Dynastinae, famille des Scarabaeidae. La description complète a été publiée par Paulian en 1954. De couleur brune ou brun-noir cet insecte atteint généralement 30 mm. Son premier stade larvaire est saprophage. Les deuxième et troisième stades larvaires et les jeunes adultes creusent de nombreuses cavités dans le bulbe. Ils sectionnent et détruisent les jeunes racines (Arleu et Neto, 1984).

2.5.3 *Hanseniella ivorensis*

Le symphyle *Hanseniella ivorensis* est un myriapode répandu sur les sols poreux volcaniques de la Martinique, du Cameroun et les sols tourbeux du Niéky en Côte d'Ivoire (Kéhé, 1983). Il détruit les zones apicales des racines. Ce ravageur est en partie responsable des balais de sorcières observés sur les racines de bananiers (Loridat, 1986).

CHAPITRE III : DESCRIPTION, ECOLOGIE, IMPORTANCE ECONOMIQUE DU CHARANCON NOIR DU BANANIER ET APPROCHES DE LUTTE

3.1 Morphologie

Les adultes, qui mesurent de 9 à 16 mm de long, vivent essentiellement cachés dans les bananeraies, au niveau du sol et des détritiques végétaux. Leur durée de vie a été estimée entre 1 et 2 ans par Froggatt (1925) et par Vilardebo (1973) de 12 à 18 mois (Figure 5). Les femelles pondent leurs œufs au niveau du collet du bananier. L'œuf, blanc nacré, est de forme ovale allongée, d'environ 2 mm de long. Sa durée moyenne d'incubation a été estimée à 6,9 jours par Viswanath (1977). En moyenne, la femelle pond 5 à 8 œufs par mois. Les larves, qui ont une durée de développement d'environ 2 mois, causent des dégâts, par les galeries qu'elles creusent dans le bulbe pour se nourrir. Ces galeries provoquent des perturbations physiologiques et fragilisent la plante vis-à-vis du vent. La nymphose, qui dure de 4 à 22 jours, s'effectue généralement à la périphérie de la souche. La nymphe est blanche et mesure environ 12 mm de long (Treverrow, 1985).

3.2 Origine et dispersion

Cosmopolites sordidus est originaire du Sud-Est asiatique, probablement de Malaisie et d'Indonésie, de Java et de Bornéo (Treverrow, 1985). Cette aire d'origine est similaire à celle du bananier (Stover et Simmonds, 1987). Il a ensuite progressivement envahi les plantations des différentes contrées tropicales. Sa colonisation à travers le monde aurait eu lieu principalement entre 1836 et 1906, période des plus grands transports de souches de bananiers à partir des Indes Néerlandaises, de Malaisie et d'Indochine, en direction des pays dans lesquels l'industrie bananière s'implantait petit à petit, notamment l'Afrique et l'Amérique tropicales (Cuillé *et al.*, 1963). Sa présence est rapportée dans les zones tropicales et sub-tropicales, que ce soit en Amérique, en Afrique, en Australie, en Asie ou en Océanie (Treverrow, 1985).

3.3 Spectre d'hôte

Dans les collections de la Côte d'Ivoire et du Cameroun, les *Ensete* sont de loin les plus attractifs et disparaissent souvent par l'excès d'infestation de larves. Les bananiers

plantain (AAB) sont les plus attaqués, puis les Bluggoe (ABB) et les Cavendish (AAA). Une grande variabilité intragroupe existe cependant ; par exemple Lacknau (AAB) a une certaine résistance au champ, Yangambi km5 (AAA) ainsi que Kayinja (ABB) sont hautement résistants ou peu sensibles (Lassoudière, 2012).

3.4 Biologie

3.4.1 Longévité, tropisme, nutrition et distribution

La longévité moyenne au champ est estimée entre 1 et 2 ans (Vilardebo, 1950). L'insecte présente un phototropisme négatif, un hygrotropisme et un thigmotactisme positifs (Treverrow et Bedding, 1993). *C.sordidus* est très sensible à la sécheresse et meurt au bout de 10 jours sur un substrat sec (Lemaire, 1996 ; Gold *et al.*, 2000). Il résiste à l'immersion et peut survivre une semaine dans un bac rempli d'eau (Cuillé, 1950). En période de repos, il s'accroche au matériau sur lequel il repose et s'immobilise quand il subit une pression dorso-ventrale. En revanche, en période d'activité, cette même pression déclenche une activité locomotrice. Ces réactions thigmotactiques seraient responsables du choix du milieu dans lequel l'insecte séjourne.

Selon Gold *et al.* (2001), L'espèce *C. sordidus* s'alimente principalement sur les souches sauvages et cultivées du genre *Musa* (banane, bananier plantain, abaca). Les adultes sont principalement retrouvés dans les résidus de culture et les environnements humides, comme les troncs coupés ou en décomposition, les bulbes coupés ou abîmés, ou cachés sous le sol (Vilardebo, 1973 ; Treverrow et Bedding, 1993). Vilardebo (1960) et Treverrow et Bedding (1993) indiquent que les adultes sont en majorité associés aux troncs de bananiers, principalement dans les gaines des feuilles, autour des racines, sous les fibres à la base des plantes et occasionnellement dans les galeries larvaires. D'autre part, les adultes sont parfois retrouvés dans des zones ombragées et humides sous des arbustes durant le jour (Silva *et al.*, 2001).

3.4.2 Dimorphisme sexuel et sex-ratio

Les femelles sont généralement plus grosses que les mâles (Mestre, 1995). Le rostre est plus brillant et rouge chez les femelles que chez les mâles ; il porte en outre des punctuations à la base qui n'atteignent pas son milieu alors qu'elles l'atteignent ou le dépassent chez le mâle (Longoria, 1968). La distinction des sexes d'après les microdépressions qui ponctuent le rostre est possible à l'aide d'une loupe binoculaire.

Le sexe ratio observé sur le terrain, à partir de collectes, est de 1 : 1 en Guinée (Cuillé, 1950), au Kenya (Nahif *et al.*, 1994) et aux îles Canaries (Carnero *et al.*, 2002). Dans les conditions de la Côte d'Ivoire, elle est d'un mâle pour une femelle (Toto., 1993). L'adulte mesure de 9 à 16 mm de long. Les femelles sont 20% plus longues (Cuillé, 1950 ; Beccari, 1967) et 11-17% plus lourdes que les mâles (Gold *et al.*, 2001). La cuticule est très dure et le rostre allongé.

3.4.3 Dispersion et mobilité

Bien que l'adulte dispose d'ailes fonctionnelles, il n'a jamais été observé en vol (Sponagel *et al.*, 1995). Lorsqu'il est soumis à des conditions extrêmes où il ne peut s'extraire que par le vol, il préfère la marche, jusqu'à ce que mort s'ensuive (Lemaire, 1996). La dispersion de l'insecte se fait donc principalement par la marche, et semble limitée et lente, de l'ordre de quelques mètres par nuit et avec une tendance à rester à proximité de leur site d'émergence (Delattre, 1980). Ces résultats sont à nuancer car les distances de déplacement ont été estimées par marquage-capture-recapture, où la probabilité de recapture décline en fonction de la distance au point de relâchement.

3.4.4 Maturité sexuelle et oviposition

La première ponte des femelles s'effectue à 33-36 jours (Cuillé 1950). La production d'œufs des femelles est faible, avec un taux estimé à 1-4 œufs/semaine (Arleu et Neto., 1984 ; Aranzazu *et al.*, 2000 ; Aranzazu *et al.*, 2001). Les femelles peuvent également passer de longues périodes sans oviposition et ont la capacité de réabsorber des œufs lorsque les conditions sont défavorables (Gold *et al.*, 2001). L'oviposition est généralement pratiquée à la base des plantes, au niveau du sol (Gold *et al.*, 2001) et est moins fréquente sur les racines (Abera-Kalibata, 1997).

3.4.5 Stades de développement

3.4.5.1 Développement de l'œuf

Les œufs sont de forme ovale allongée, d'environ 2 mm de long et d'un blanc franc (Treverrow, 1985). Ils sont déposés séparément sur les plantes-hôtes dans des petites cavités creusées par la femelle à l'aide de son rostre. De la ponte à l'éclosion, l'œuf met entre 3 jours au minimum et 36 jours au maximum. Selon les conditions climatiques du milieu, la durée moyenne est évaluée à 8-9 jours (Lassoudière, 2012).

3.4.5.2 Développement larvaire

La larve mesure 10 à 12 mm de long à la fin de sa croissance, immédiatement avant la nymphose. Elle est apode et son corps, légèrement recourbé, se dilate progressivement à partir de l'abdomen jusqu'aux segments V et VI, puis se rétrécit à partir de ce niveau ; ce qui donne à la larve un aspect ventru différent des larves classiques de Curculionidae (Figure 5). Elle est de couleur blanc-crème avec une tête brun-rouge foncé et volumineuse, armée de fortes mandibules (Moznette, 1920 ; Treverrow, 1985). Les durées de développement larvaire et post-larvaire varient largement, de 12 à 165 jours pour les larves, de 1 à 4 jours pour les prépupes et de 4 à 30 jours pour les nymphes (Figure 5) car elles sont température-dépendantes (Traore *et al.*, 1993, et Traore *et al.*, 1996). La nymphe donne naissance à un adulte.

Tous les stades larvaires se déroulent à l'intérieur de la souche, à l'exception de l'adulte qui vit dans les débris couvrant le sol, dans les pseudos troncs ou à l'intérieur des vieilles souches en décomposition (Aby, 2010).



Figure 5 : Stades larve-adulte du charançon noir du bananier (Hoaru, 2005)

L1 : larve au stade 1, L4 : stade 4, ij : jeune imagot, Ny : Nymphe, Im : Imagot mature

3.4.5.3 Dégâts et méthodes d'évaluation des infestations

La présence des charançons ne se manifeste pas toujours par des symptômes apparents d'attaque. Souvent même leurs dégâts peuvent se confondre avec l'effet de la pauvreté du sol, l'attaque de taupes ou la destruction des tissus vasculaires par des micro-organismes divers. Ainsi, ce n'est que par des observations minutieuses que l'on peut s'assurer de la présence du charançon (Vanderweyen, 1962).

Les femelles creusent des cavités de ponte dans le bulbe, mais les dégâts les plus importants sont causés par les larves qui font des galeries dans les bulbes et dans les rhizomes (Figure 6). Un étiolement des feuilles périphériques est constaté. Les plantes sévèrement attaquées semblent souffrir de sécheresse et produisent des régimes de petite taille. Puisque le système racinaire est détruit, ces plantes sont facilement déracinées par les vents violents. Les charançons du bananier sont des insectes plutôt sédentaires qui volent très peu, mais se déplacent facilement à la surface du sol (Lema, 2005).

Une mesure du risque que représentent les ravageurs des cultures est constituée par les pertes de rendement qu'ils peuvent occasionner. En effet, les estimations effectuées en Côte d'Ivoire et au Cameroun font état de baisse de rendements pouvant atteindre 20 % en premier cycle de production, 60 % en deuxième cycle et 90 % en troisième cycle (Fogain, 2001).

Vanderweyen (1962) a démontré qu'il existe une relation entre le nombre d'insectes sur pied, le coefficient d'infestation et le taux de pertes. Vilardebo (1973) montra que les populations d'adulte n'étaient pas corrélées aux populations de larve. Il mit au point une méthode d'observation « coefficient de décortilage de Vilardebo ». Le niveau d'infestation d'une parcelle par les charançons peut être évalué par décortilage. Le décortilage se réalise sur des plants récemment récoltés : au moins 50 plants/ha pour obtenir un diagnostic fiable. Il faut décortiquer progressivement le pourtour de la souche du bananier en recensant les galeries de charançons et le nombre de larves trouvées. Les observations permettent d'établir la note d'infestation (Tableau II).

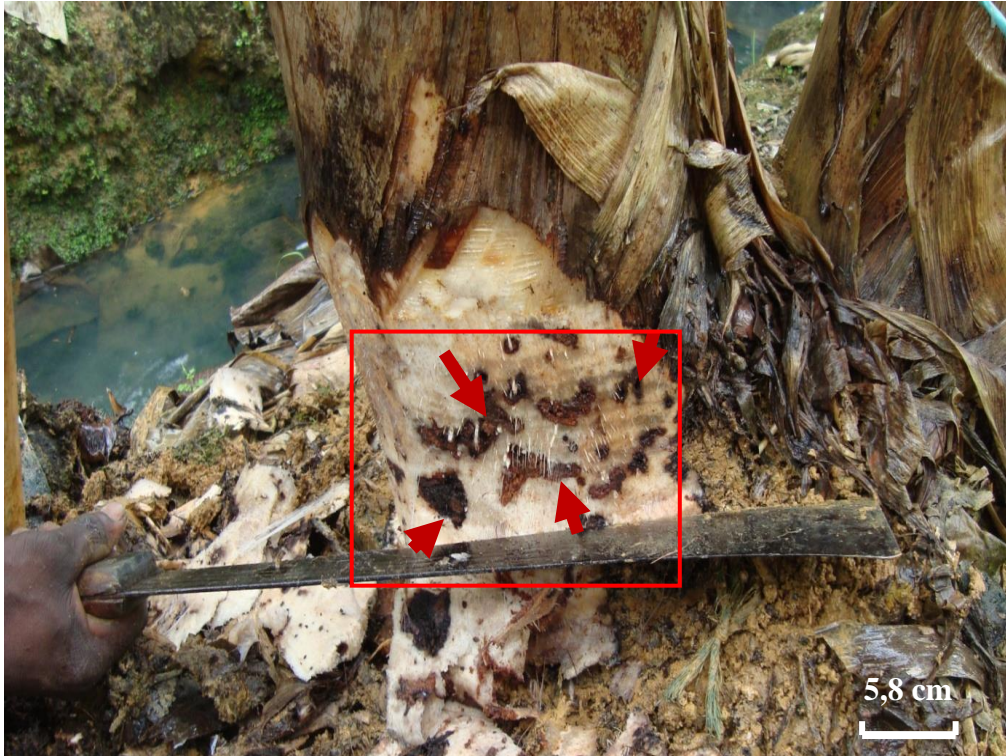


Figure 6 : Décorticage tangentiel d'une souche de bananier montrant les galeries larvaires, indiquées par les flèches (Aby, 2013)

Tableau II : Note d'infestation pour l'estimation du niveau d'attaque des charançons d'une parcelle dans une plantation bananière (Vilardebo, 1973)

| Note d'infestation | Signification de la note d'infestation |
|---------------------------|---|
| 0 | Absence de galeries de charançon |
| 5 | Présence de traces de galeries |
| 10 | infestation intermédiaire entre 5 et 20 |
| 20 | Présence de galeries sur $\frac{1}{4}$ de la souche |
| 30 | ote intermédiaire entre 20 et 40 |
| 40 | Présence de galeries $\frac{1}{2}$ de la souche |
| 60 | Présence de galeries sur $\frac{3}{4}$ de la souche |
| 100 | Présence de galeries sur la totalité de la souche |

3.5 Méthodes de lutte contre le charançon noir du bananier

Plusieurs méthodes de lutte sont utilisées pour lutter contre le charançon noir du bananier. Au nombre de ces méthodes, l'on peut citer la lutte agronomique, la lutte chimique et la lutte biologique.

3.5.1 Lutte culturale

De bonnes pratiques culturales créent un environnement défavorable à la multiplication de l'insecte et bloquent sa migration. Elle consiste en l'utilisation de matériel de plantation sain, de pièges pour capturer et éliminer les adultes ainsi que l'aménagement des résidus de culture. Dans la mesure du possible, il faut établir les nouvelles plantations dans des champs non infestés, en se servant de matériel végétal sain.

3.5.1.1 Pratiques culturales

Les rejets doivent être plantés au moins à 30 cm de profondeur (Chalker 1987). En effet, plusieurs résultats ont révélé une plus grande prédisposition à l'infestation des rejets plantés en surface que ceux plantés en profondeur. Les populations de charançons sont plus présentes dans les 30 premiers centimètres du sol. Les résidus de récolte sont maintenus à l'intérieur des doubles lignes pour limiter la propagation de *C. sordidus* entre les rangs (Mollot *et al.*, 2014). De ce fait, laisser les pieds de bananiers verticaux après récolte au lieu de les couper et de les laisser au sol est une technique couramment utilisée pour limiter les populations (Vinatier, 2010).

Les associations culturales permettent de maintenir à un niveau bas par le manque d'habitats propices et surtout par l'accroissement des ennemis naturels. En Côte d'Ivoire, l'augmentation des ennemis naturels du charançon tels que les fourmis myrmicines dans l'association bananier-caféier, a entraîné une réduction de la population de charançons (Kéhé, 1988).

3.5.1.2 Utilisation de matériel sain

Dans les plantations commerciales, les vitroplants sont utilisés pour prévenir les maladies et les ravageurs. Les producteurs qui ne disposent pas de vitroplants doivent parer les rejets de façon à les débarrasser des larves et des œufs de charançons (Déloné, 2014).

Toute plantation de rejets fortement endommagés est à éviter. La pratique du traitement à l'eau chaude, qui permet d'éliminer les charançons et les nématodes, est aussi

largement pratiquée. Il est recommandé de plonger les rejets parés dans un bain d'eau chauffée à 52-55°C pendant 15-27 minutes. Ce traitement est extrêmement efficace contre les nématodes, mais ne permet de tuer qu'environ un tiers des larves de charançons. Il ne protège donc les plants des charançons que pendant quelques cycles de culture (Gold *et al.*, 2001).

3.5.1.3 Piégeage de masse et piège à phéromone

Le piégeage systématique à l'aide de morceaux de pseudotrunc ou de bulbe est un moyen efficace pour réduire les populations de charançons adultes (Figure 7). Froggatt (1925) en conseillait l'utilisation en vue de réduire la population d'adultes. Cependant, cette méthode exige de la main-d'œuvre et est souvent limitée par la quantité de matériel disponible. Un autre moyen est l'assainissement des plantations (destruction des résidus) qui, en supprimant les habitats et sites de reproduction des charançons, permet de réduire leur nombre.

Dans la mesure du possible, il faut établir les nouvelles plantations dans des champs non infestés, en se servant de matériel végétal sain (Gold et Messiaen, 2000).

Les pièges à phéromones sont efficaces pour lutter contre les populations de *C. sordidus*. La Sordidine est une phéromone spécifique à *C. sordidus*, et attire les insectes mâles et femelles. La bonne disposition spatiale et temporelle des pièges est essentielle pour mener une lutte efficace car les populations du charançon noir sont réparties de façon inégale dans les champs. La stratégie la plus répandue et la plus efficace consiste à :

- surveiller la population grâce à une répartition des pièges sur l'ensemble de l'exploitation (4 pièges par hectare)
- effectuer un piégeage de masse dans les champs fortement infestés (16 pièges par hectare placés à 20 m d'écart) ou à la périphérie des champs pour créer une barrière de protection capable de limiter la colonisation

3.5.1.4 Mise en jachère

La mise en jachère permet aussi de lutter contre les populations de *C. sordidus* en privant ce dernier de ressources vitales (résidus des cultures de bananes). Lorsque ces ressources vitales sont au plus bas, après plusieurs semaines, les populations de *C. sordidus* se mettent à la recherche d'autres bananiers et colonisent les cultures voisines.

Pour éviter que l'ensemble des cultures ne soient contaminées, un certain nombre de moyens doivent être mis en œuvre.

Premièrement, la destruction et élimination précoce des résidus de bulbes de bananier provenant du précédent cultural (à la main, à la machette, ou autre moyen mécanique) doivent être réalisées.

Deuxièmement, le piégeage de masse avec des pièges à phéromones disposés autour des jachères. Il permet de garantir un meilleur assainissement du sol. Les jachères ne doivent pas être proche de nouvelles bananeraies situées afin d'éviter que les jeunes plants soient ravagés.

Troisièmement, l'utilisation comme matériel de plantation de plants sains issus de culture in vitro pour éviter la dissémination de plants déjà contaminés par le charançon noir.

3.5.1.5 Lutte génétique par utilisation de variétés résistantes

Les différents cultivars de bananiers présentent une grande variabilité quant à leur sensibilité aux charançons. Au Cameroun, les cultivars de bananier plantain Kedong et Kekang ont montré des niveaux de résistance acceptables (Fogain et Price, 1994). En Inde, Padmanaban et Sathiamoorthy (2001) ont montré que les cultivars de bananier plantain Karumpoovan et Poozhachendu sont résistants au charançon.

De hauts niveaux de résistance ont été rencontrés chez Yangambi-Km5 (AAA), GrosMichel (AAA), Kayinja (ABB, Pisang Awak subgroup), Ndiizi (AB, Ney Poovan subgroup) et Kisubi (Ney Poovan subgroup). La résistance la plus forte a été observée chez les hybrides TMB2×7197-2 et TMB2×8075-7 et chez le bananier sauvage Calcutta-4 (AA). Ces variétés peuvent être considérées comme des ressources pour un programme d'amélioration génétique (Kiggundu et al., 2003).

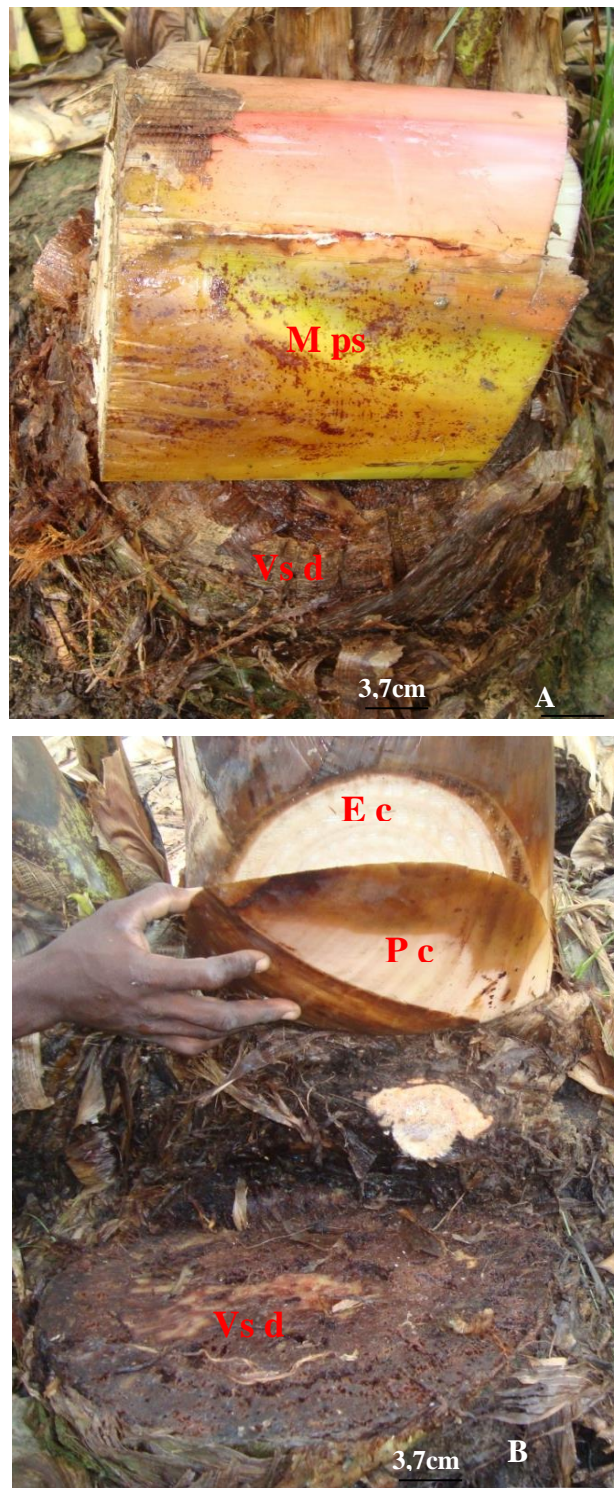


Figure 7 : Pièges à pseudo-tronc utilisés contre les charançons dans les plantations industrielles de bananiers dessert

A : piège avec morceau de pseudo-tronc sur vieille souche en décomposition ; **B :** piège avec entaille conique à la base du pseudo-tronc ; **M ps :** morceau de pseudo-tronc ; **Vs d :** Vieille souche en décomposition ; **Pc :** Plaque conique du pseudo-tronc, **E c :** Entaille conique

3.5.2 Lutte chimique

Dans les plantations commerciales, la lutte contre le charançon se fait principalement à l'aide de pesticides de synthèse. L'utilisation des produits de synthèse repose sur l'emploi systématique d'insecticides spécifiques ou de nématicides à effets insecticides pour protéger le matériel de plantation (immersion des rejets dans la solution d'insecticide) et les bananiers par des applications périodiques à la base de ces derniers. Ces insecticides agissent rapidement et efficacement. Des organochlorés (l'aldicarb, l'aldrine, le chlordane, le DDT, l'HCH, etc) autrefois largement utilisés, ont été abandonnés face au développement de populations de charançons résistantes et du fait de préoccupations environnementales (Gold *et al.*, 2000). Il existe des organophosphorés moins persistants, mais du fait qu'ils sont plus coûteux et plus toxiques pour celui qui les utilise, ils ne conviennent guère aux petits producteurs (Gold *et al.*, 2000).

La lutte chimique par avertissement a fait baisser les traitements systématiques réalisés 4 à 6 fois à 1 ou 2 fois par an, mais elle n'a cependant pas empêché la recrudescence des populations de charançon dans les plantations (Kéhé, 2006). La décision de traitement ou d'intervention chimique est liée au niveau réel et actuel des dégâts sur le bananier spécifiquement, à l'importance et à la nature des galeries larvaires. Elle consiste à n'intervenir que là où cela est réellement nécessaire. Cette méthode repose sur l'estimation actuelle du taux et de l'intensité des attaques pour situer un seuil d'intervention qui, lorsqu'il est atteint, impose de faire des applications d'insecticides.

3.5.3 Lutte biologique

Le charançon du bananier commet le plus de dégâts dans les régions où il s'est introduit (Afrique, Australie et Amériques), ce qui laisse penser qu'une lutte biologique classique doit être possible. Sur son aire d'origine, en Asie du Sud-Est, plusieurs coléoptères prédateurs qui se nourrissent de ses larves ont été identifiés. Toutefois, les tentatives qui ont été faites pour introduire ces ennemis naturels dans d'autres zones bananières se sont en général soldées par un échec. Des essais en champ effectués sur des prédateurs endémiques (coléoptères, perce-oreilles) en Afrique n'ont mis en évidence qu'un potentiel limité pour réduire les populations de charançons.

Les pathogènes des insectes appelés entomopathogènes comprennent : les bactéries (ex : *Bacillus thuringiensis*, *B. sphaericus* Ernst Berliner), les protozoaires (ex : Amœbidea), les virus (ex : Entomopox virus) et les champignons (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*). Parmi les micro-organismes utilisés en lutte biologique, plus de 700 espèces de

microchampignons sont entomopathogènes (Starnes *et al.*, 1993) et jouent un rôle important dans la régulation naturelle des populations d'insectes (Wraight et Roberts, 1987).

3.5.3.1 Nématodes entomopathogènes

Deux genres de nématodes entomopathogènes ont été identifiés *Steinermia* sp. et *Heterorhabditis* spp.. Ils s'attaquent aux adultes et aux larves de charançons dans les champs, mais le coût de la mise en oeuvre et le fait qu'ils ne sont efficaces qu'en présence de fortes densités de population de charançons empêchent pour l'instant de généraliser leur utilisation.

3.5.3.2 Champignons entomopathogènes

Depuis les années 70, des études sont faites sur les champignons entomopathogènes. Elles ont criblé un grand nombre de souches afin de déterminer leur activité vis-à-vis du charançon adulte ; ce qui a permis d'en identifier plusieurs qui induisent une mortalité supérieure à 90% (Gold *et al.*, 2000).

Les champignons entomopathogènes identifiés à ce jour appartiennent au sous-taxon des Mastigiomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina et Deuteuromycotina. Le plus grand nombre de pathogènes se trouve dans la classe des Zygomycètes, mais les plus utilisées en lutte biologique proviennent des Deuteromycètes (Fungi imperfecti). Ces derniers appartiennent aux champignons à hyphes septés, se multipliant de façon non sexuée. Les espèces des genres *Beauveria*, *Metharizium*, sont les plus utilisées en lutte biologique (Goettel *et al.*, 1989). Elles ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte biologique contre les ravageurs de cultures et sont donc l'objet d'études de plus en plus poussées. Le genre *Metharizium*, éprouvé dans le cadre de la présente étude, fait l'objet du chapitre suivant.

CHAPITRE IV : DESCRIPTION, ECOLOGIE ET INTERÊT DES ESPECES DE *METARHIZIUM* EN LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES INSECTES

Les espèces des genres *Metarhizium*, font partie des plus utilisées en lutte biologique et ont un intérêt agronomique considérable dans la lutte contre les ravageurs de cultures et sont donc l'objet d'études de plus en plus poussées (Goettel, 1992).

4.1 Classification, description, modes d'infection et d'action de *Metarhizium* spp.

La dénomination *Metarhizium anisopliae* Sorokin vient du Coléoptère *Anisoplia austriaca* Herbst sur lequel il a été originellement isolé. Il fut connu sous le nom de *Entomophthora anisopliae* Eaton et considéré comme un isolat de l'espèce *Metarhizium anisopliae* (Driver *et al.*, 2000). Ce genre infeste une large gamme d'insectes et provoque la maladie de la "muscardine verte".

4.1.1 Taxonomie

La classification du genre *Metarhizium* a été sujette à plusieurs révisions au cours des dernières années. Il est classé parmi les Hyphomycètes, du phylum des Deutéromycètes appelés aussi champignon imparfait (Cloyd, 1999). Plusieurs espèces de champignons ont été associées avec des membres de la division des Ascomycota, sur une base d'homologie d'ADN, dont le genre *Metarhizium* (Inglis *et al.*, 2001). La position systématique selon Bischoff *et al.* (2009) est la suivante :

Règne : Fungi

Embranchement : Dikarya

Sous-embranchement : Ascomycota

Classe : Pezizomycotina

Ordre : Hypocreales

Famille : Clavicipitaceae

Genre : *Metarhizium*

Espèce : *Metarhizium* spp.

La classification des espèces de ce genre a été d'abord basée sur des caractères morphologiques des cellules et des conidies, et comme ces caractéristiques sont assez limitées elles ont compliqué la taxonomie (Bidochka et Small, 2005).

Une analyse phylogénétique de la région ADNr ITS1-5.8s-ITS2 réalisée par Driver *et al* (2000) a reconnu trois espèces : *Metarhizium anisopliae*, *Metarhizium flavoridae*, *Metarhizium album*. Ils séparèrent l'espèce *Metarhizium anisopliae* en quatre variétés : *M. anisopliae* var. *acridum*, *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *lepidiotae* *M. anisopliae* var. *majus*.

Bischoff *et al.* (2009) réalisèrent une approche phylogénétique multigénique en utilisant des séquences quasi-complètes de EF-1 α nucléaire codé, RPB1, RPB2 et des régions du gène β -tubuline pour évaluer la morphologie de ces taxons. Ils déterminèrent neuf espèces du complexe *Metarhizium anisopliae* : *M. anisopliae* (*M. anisopliae* var. *anisopliae*), *M. guizhouense* (syn. *M. TAI*), *M. pingshaense*, *M. acridum* *stat. nov.* (*M. anisopliae* var. *Acridum*), *M. lepidiotae* *stat. nov.* (*M. anisopliae* var. *Lepidiotae*), *M. majus* *stat. nov.* (*M. anisopliae* var. *Major*), *M. globosum* *nov.*, *M. robertsii* *sp. nov.* et *M. brunneum*.

L'analyse multilocale du genre *Metarhizium*, réalisée par Chen *et al.*, (2017) et Brunner-Mendoza *et al.* (2017) a permis de distinguer 35 espèces (à la fois asexuées et sexuées), y compris la majorité des espèces reconnues dans *Metacordyceps* ainsi que *Nomuraea* et celles du genre plus récemment décrit, *Chamaeleomyces* (Figure 8).

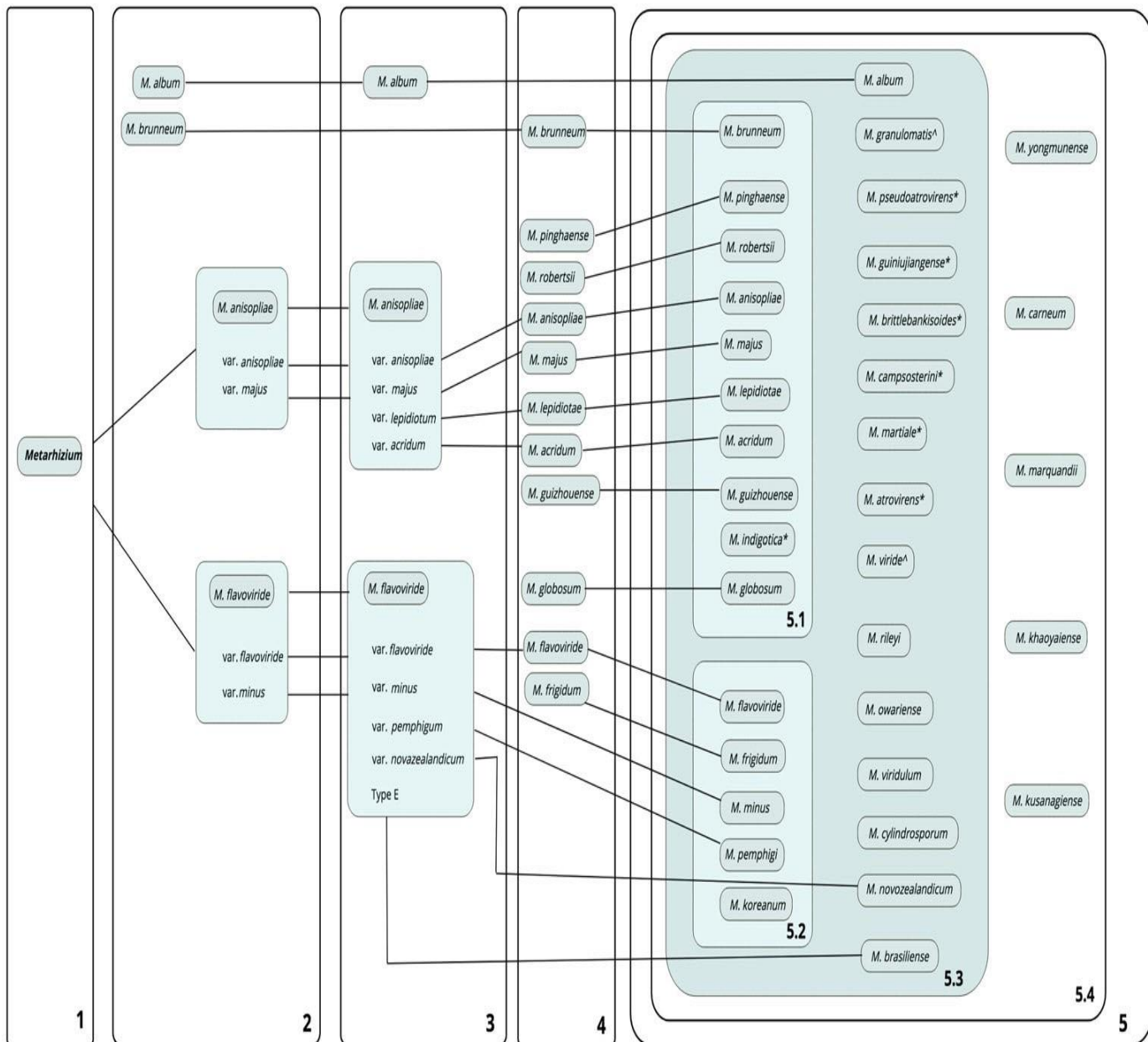


Figure 8 : Classifications historiques de *Metarhizium* sp. depuis Tulloch (1976), Rombach *et al.* (1987) et jusqu'à la classification la plus récente de Kepler *et al.* (2014). (source: Brunner *et al.*, 2019)

1 = Sorokin (1883). 2 = Metschnikov (1879); Petch (1931); Tulloch (1976), Rombach *et al.* (1987) et Samson (1974). 3 = Driver *et al.* (2000). 4 = Bischoff *et al.* (2006) et (2009). 5 = Kepler *et al.* (2014); 5,1 = *Metarhizium anisopliae* complexe; 5,2 = *Metarhizium flavoviride*; 5,3 *Metarhizium* de base; 5,4 = *Metarhizium** Teleomorph. ^ Hôte (*Squamata: Chamaeleonidae*).

4.1.2 Morphologie

Le genre *Metarhizium* comprend des états anamorphosés qui ne produisent pas de synnemata et les états téléomorphes de type *Metarcordyceps* récemment ajoutés (Sung *et al.*, 2007). Les conidiophores sont ramifiés mais sont parfois simples chez certaines espèces, les apex des branches portant une à plusieurs phialides pouvant être tronquées ou allongées. Les conidies peuvent être hyalines, lilas, brunes ou vertes et forment des chaînes (Kepler *et al.*, 2014). Ces structures varient en forme (cylindrique, globuleuse, ellipsoïdale) et en taille (de 4,0–14,5 × 2,0–5,0 µm). *M. majus* est l'espèce avec les plus grandes conidies (8,5–14,5 × 2,5–2,0 µm) et les plus petites conidies (4,0–5,5 × 2,0–3,0 µm) appartiennent à l'espèce *M. acridum* (Driver *et al.*, 2000 ; Bischoff *et al.*, 2009).

Les caractéristiques taxonomiques dominantes sont les traits morphologiques des structures de sporulation. Toutefois, la morphologie des conidies ne permet pas de faire la distinction entre des espèces proches, telles que *M. anisopliae*, *M. brunneum*, *M. pingshaense* et *M. robertsii* (Figure 9). Les caractéristiques morphologiques parmi les espèces de *Metarhizium* sp. peuvent être imprécises, car il peut souvent y avoir un chevauchement des traits entre différentes espèces (Kepler et Rehner, 2013). Sur gélose, les colonies matures de *Metarhizium* sp. (8 à 9 jours) sont décrites comme étant principalement vert foncé, vert clair, blanc ou brunâtre, voire même bicolores au centre. La morphologie des colonies peut varier en fonction du type de milieu de culture (Kamp et Bidochka, 2002), et de l'âge (Wang *et al.*, 2005), ainsi que d'autres facteurs. Les bords peuvent être blancs d'épaisseur variable, tandis que le revers (sur une boîte de Pétri) peut être brunâtre, orange et jaune ou blanc (Fernandes *et al.*, 2010).

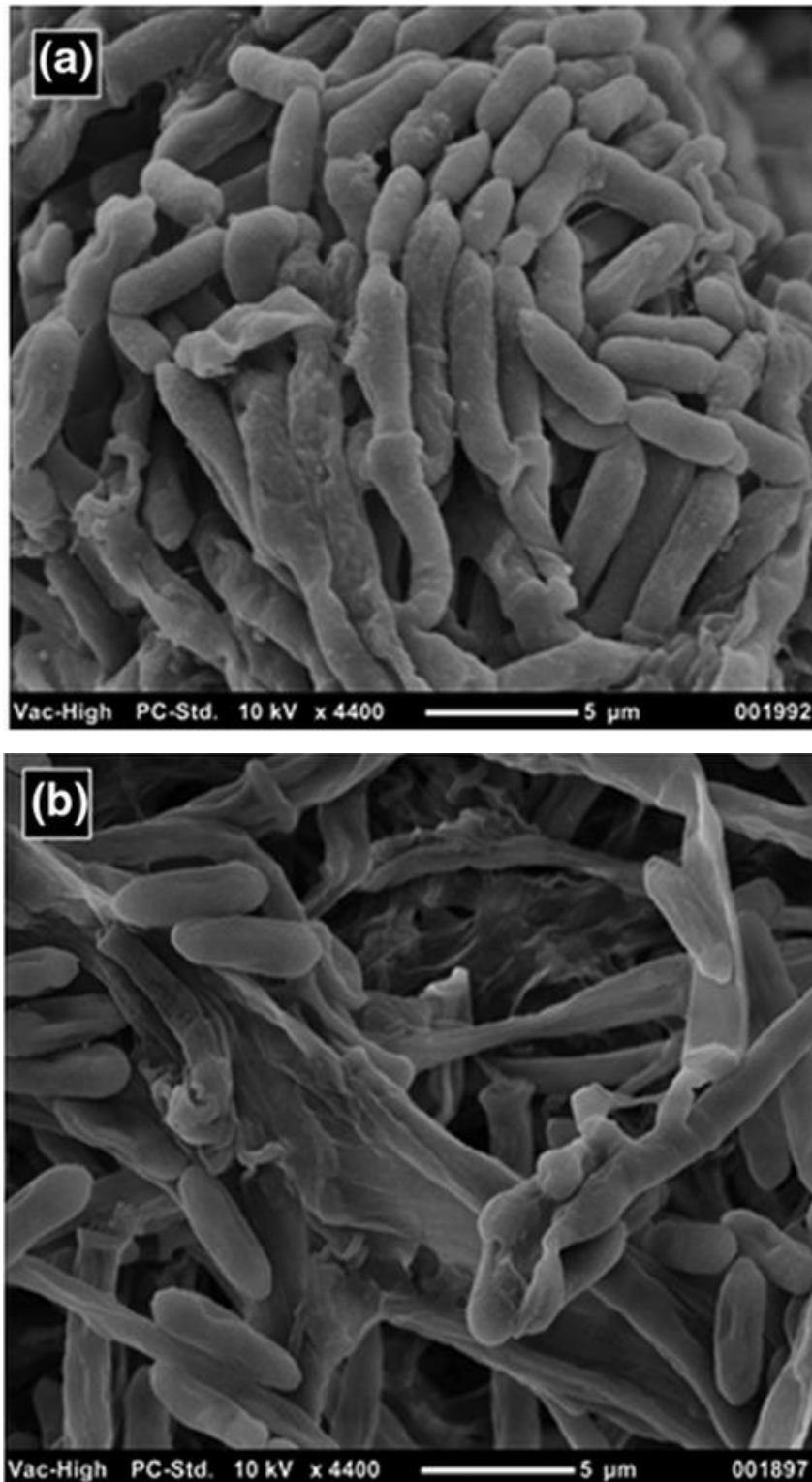


Figure 9 : Conidies et phialides de *Metarhizium* sp. observés au microscope électronique (Cito *et al.*, 2014)

(a) *Metarhizium anisopliae* et *Metarhizium pingshaense* (b)

4.2 Mode d'infection

4.2.1 Mode d'action physique du champignon entomopathogène *Metarhizium spp*

Au contact de la cuticule de l'insecte, la spore, l'unité infectieuse du champignon, germe et pénètre au travers du tégument en combinant des pressions mécaniques et enzymatiques (St Leger, 1993). Le champignon croît rapidement dans l'hémocoel. Les insectes sensibles au champignon meurent généralement dans un délai de 3 à 10 jours. Quand l'insecte meurt, le champignon entre dans un stade hyphal, colonise les organes internes puis sporule à la surface de l'insecte. Le cycle infectieux est généralement le même pour tous les champignons entomopathogènes. Le processus de pénétration est l'étape la plus importante de la pathogénèse (Ferron *et al.*, 1993). Le mode d'infection des champignons entomopathogènes se divise en quatre étapes distinctes : l'adhésion, la germination, la pénétration et la dissémination.

4.2.1.1 Phase d'adhésion

L'adhésion est la première étape du processus d'infection. Les spores entrent en contact passivement avec les insectes à l'aide des agents naturels tels que le vent et l'eau. L'adhésion est déclenchée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec le tégument de l'insecte. L'infection est initiée à travers le tégument de l'insecte-hôte (Tanada et Kaya., 1993), mais les spores peuvent aussi entrer par le système respiratoire (Clark *et al.*, 1968), le tube intestinal (Miranpuri et Khachatourians, 1991) et la cavité buccale (Siebeneicher *et al.*, 1992). L'attachement des spores à la cuticule est donc assujéti aux forces hydrophobiques non spécifiques et aux charges électrostatiques (Butt, 1990).

Cependant, des systèmes de reconnaissance spécifiques, dont des polysaccharides fongiques extracellulaires, des lectines et des enzymes extracellulaires, ont été identifiés sur la surface de la spore et peuvent être impliqués dans l'attachement de celle-ci (Napolitano et Juárez, 1997). Une fois en contact avec la cuticule, la spore produit activement un mucilage hygroscopique qui permet la modification de l'épicuticule de l'insecte, facilitant la germination des spores et peut aussi créer un environnement favorable aux enzymes extracellulaires libérées par ces dernières (Boucias et Pendland., 1991).

4.2.1.2 Phase de germination :

La seconde phase d'infection est la germination. Celle-ci dépend de l'état physiologique de l'hôte et aussi des conditions environnementales, notamment la température

et l'humidité (Butt *et al.*, 1994). La germination aboutit à la production d'appressoria, structures terminales servant à l'ancrage de la cuticule et favorisant la pénétration. La valeur nutritive de la cuticule joue un rôle important pour la production d'appressoria. La germination *in vitro* se produit en réponse aux sources de carbone (ex. glucose, glucosamine, chitine et amidon) et/ou d'azote (St Leger 1986a, b). Cependant, les acides gras et les lipides situés au niveau de l'épicuticule peuvent aussi influencer la germination des spores (Lecuona *et al.*, 1997). Selon St Leger *et al.* (1990), la germination dépend de la tolérance aux composants potentiellement toxiques au niveau de l'épicuticule (ex. acides gras à chaînes courtes, phénols) et de l'antagonisme de la flore saprophyte sur la cuticule de l'insecte (Charnley, 1989).

4.2.1.3 Phase de pénétration :

La pénétration de *Metarhizium* spp. dans l'hôte s'effectue généralement à travers les orifices naturels, la cuticule ou bien par l'ingestion. En présence d'un niveau élevé d'azote et de carbone, le tube germinatif continue de s'allonger et forme un hyphes (St Leger *et al.*, 1992). Comme plusieurs autres champignons filamenteux, la dureté de la surface, l'hydrophobicité, la topographie et les nutriments disponibles influencent la différenciation d'une structure infectieuse ou appressorium. Le développement de l'appressorium implique l'activation de l'adénosine mono-phosphate cyclique (AMPC) et la libération de Calcium (Ca^{2+}) comme signaux moléculaires intracellulaires (St Leger *et al.*, 1990). La pénétration est réalisée par pression mécanique et hydrolyse enzymatique (Goettel *et al.*, 1989). Précisément, l'hyphes fongique sécrète des enzymes extracellulaires telles que les protéases, les lipases et les chitinases, qui attaquent et dissolvent la cuticule, permettant aux spores de pénétrer à travers la cuticule et de se développer dans le corps de l'insecte (Hajek et St Léger, 1994). Ces enzymes correspondent aux différents polymères de la cuticule, des protéines, des chitines et des lipides de l'insecte (Charnley *et al.*, 1991). Les protéases sont les plus importantes enzymes extracellulaires et jouent un rôle primordial dans la pénétration (Campos *et al.*, 2005).

4.2.1.4 Phase de dissémination :

Une fois que le champignon a franchi, avec succès, la cuticule et a percé l'épiderme adjacent de la cuticule, il entre dans le système circulatoire ouvert de l'insecte, l'hémocoèle. Le champignon se multiplie par la suite à l'intérieur de tous les organes de l'insecte hôte et il s'accroît sous forme de blastospores. Ceci peut faciliter la dispersion et la colonisation de

l'hémocoèle et optimise l'assimilation rapide des nutriments. Il semble qu'une utilisation efficace des sucres sanguins est nécessaire pour une croissance optimale du pathogène. Bien que le glucose joue un rôle central dans le métabolisme de l'insecte, il est généralement présent à de très faibles concentrations.

4.2.2 Mode d'action chimiques du champignon entomopathogène *Metarhizium* sp.

Une fois que le champignon atteint l'hémocoèle, il entame la production d'hyphes qui circuleront à travers l'hémolymphe. Pour ce faire, le champignon doit surmonter les mécanismes immunitaires de l'hôte. *Metarhizium* sp. produit des composés toxiques non enzymatiques tels que les destruxines (DTX) et les cytochalasmes qui lui permettent de surmonter les mécanismes de défense de l'hôte et de proliférer (Inglis *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 2012). Les toxines ont des effets divers sur différents tissus d'insectes. Les DTX dépolarisent la membrane du muscle de l'insecte en activant les canaux calcium. En outre, la fonction des hémocytes d'insectes peut être empêchée par les DTX. Sous les conditions optimales, la mort de l'insecte survient normalement entre 3 à 5 jours, à partir de l'infection. Une fois l'insecte mort, l'espèce produit un antibiotique : l'oosporine qui lui permet de surmonter la compétition des bactéries saprophytes dans le tube intestinal de l'insecte.

Le champignon entame alors une phase saprophytique. Les spores sont produites par les conidiophores qui émergent du cadavre, préférentiellement au niveau inter segmentaire si les conditions environnementales sont adéquates. Le cadavre est alors couvert par un feutrage mycélien vert nommé Muscardine constitué d'hyphes et de conidiophores portant des conidies. La phase saprophytique ne dépend pas de l'humidité relative. Par contre, elle est influencée par la température (Ferron, 1977).

4.3 Facteurs affectant l'efficacité des champignons entomopathogènes

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

4.3.1 Facteurs liés aux pathogènes

La virulence et la spécificité de l'hôte sont deux éléments essentiels dans le choix d'un bon candidat à la lutte biologique. Il a été démontré que les insectes d'une même population révèlent une sensibilité qui diffère selon les espèces du genre *Metarhizium* (Todorova *et al.*, 1994). À une échelle industrielle, les tests biologiques standardisés de laboratoire sont

essentielles afin de vérifier le potentiel insecticide des préparations produites et de suivre leur stabilité de conservation (Ferron *et al.*, 1991).

4.3.2 Facteurs dépendant de l'hôte

Il est maintenant reconnu que tous les stades de développement de l'insecte, de l'œuf jusqu'à l'adulte, peuvent être sensibles à l'infection fongique.

4.3.3 Facteurs de l'environnement

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

L'effet des radiations solaires est l'un des paramètres environnementaux les plus importants pour la persistance des spores fongiques entomopathogènes. L'exposition à la lumière du soleil même pour quelques heures, en particulier la partie du spectre de longueur d'ondes comprise entre 285- 315nm, peut complètement inactiver les conidies de *Metarhizium anisopliae* (Braga *et al.*, 2001).

Les températures au-dessus de 35°C empêchent la croissance et le développement des champignons entomopathogènes. Les variations de température (élevées et basses) affectent la vitesse de l'infection des insectes par l'inhibition de la germination des spores, ce qui affecte à son tour la formation du tube germinatif et la pénétration à travers la cuticule de l'insecte (Mitsuaki, 2004). Les conidies de *M anisopliae* ne peuvent pas survivre plus de 15 minutes à 40°C (McCoy *et al.*, 1990).

L'humidité de l'environnement est un paramètre très important pour la germination des conidies dans la nature. Elle affecte aussi la persistance et la survie des champignons entomopathogènes. La plupart de ces champignons exige au moins 95 % d'humidité relative à la surface de l'insecte afin de germer (Hallsworth et Magan, 1999).

Les effets de la température et de l'humidité sont intimement reliés d'où la tolérance de quelques champignons à des températures extrêmes lorsqu'il y a plus d'humidité ou lorsque la condensation se produit aisément et la perte d'eau est réduite au minimum. Le vent peut aussi modifier de manière significative l'humidité microclimatique et considérablement influencer le comportement fongique (McCoy *et al.*, 1990).

4.3.4 Effet du sol

Le sol constitue un réservoir naturel pour les insectes infectés par des mycètes sur le feuillage qui plus tard tombent sur le sol (Keller et Zimmermann, 1989). En effet, les

champignons dans le sol sont protégés contre la dessiccation, le rayonnement ultraviolet et les températures extrêmes (McCoy *et al.*, 1990). En général, la simple présence des microflore dans le sol peut influencer l'efficacité des entomopathogènes (Groden et Lockwood, 1991).

4.4 Production en masse du champignon

Les champignons entomopathogènes peuvent être produits en milieu solide ou en milieu liquide. La fermentation liquide est une méthode plus économique. Elle assure un environnement nutritionnel homogène et les facteurs environnementaux (pH, température, aération) sont facilement contrôlés par rapport à la fermentation solide. Néanmoins, les spores produites ont une durée de vie plus courtes que celles produites en milieu solide lors de l'entreposage (Vega *et al.*, 2003).

La production en milieu solide présente l'avantage d'avoir des conidies plus tolérantes à la dessiccation et plus stables (Kamp et Bidochka, 2002 ; Benserradj, 2014). Cependant, les méthodes de fermentation solide présentent de nombreuses contraintes techniques et économiques (problèmes de stérilisation de substrats, échanges de gaz, contrôle de température, maintien d'une culture pure et récupération du produit à partir du substrat).

La production en masse peut être réalisée de plusieurs manières : par méthode simple en sacs plastiques en utilisant comme milieu de culture, du riz stérile, des grains concassés de maïs, de l'orge ou d'autres produits, en fermentation liquide ou en fermenteurs semi-solides.

4.5 Utilisation de *Metarhizium* spp comme agent de lutte biologique

Les spores des espèces du genre *Metarhizium* sont utilisées sous diverses formulations.

Le premier biopesticide fabriqué et enregistré en Australie par BioCare Ltd., est BioGreen (maintenant appelé « Chafer Guard »), à base de *Metarhizium flavoviride*. C'est une formulation granulée constituée de brisures de riz. Ce biopesticide est utilisé contre *Adoryphorus couloni* (Milner, 2000).

Une formulation liquide à base de spores et de fragments mycéliens de *Metarhizium anisopliae*, Bio magic, homologuée en Inde est employée contre les cicadelles, les larves de racines, les boreurs, les termites et les charançons des palmiers (Chinniah *et al.*, 2016).

Une formulation granulée, à base de riz stérile, contenant la souche Met 52 du champignon *Metarhizium anisopliae*, a été utilisée dans la lutte contre otiorhynque de la vigne et le charançon de la racine du fraisier en France.

Une formulation, à base de *Metarhizium anisopliae*, est utilisée en Afrique de l'Est et au Ghana pour le contrôle des cochenilles sur plusieurs cultures, notamment sur le papayer (Fotio et Temwa, 2012).

Dans le cadre de la lutte contre les sauteriaux, le projet LUBILOSA (IITA-Benin) a développé une formulation huileuse de spores du champignon *Metarhizium acridum*. Elle a été développée en un produit « Green muscle » et homologuée en Afrique du Sud. Elle dispose d'un permis provisoire dans plusieurs pays sahélien (Douro *et al.*, 2009). Des résultats concluants de tests réalisés en Algérie, dans la région d'El-Oued, ont été obtenus sur le criquet pèlerin (Arkam *et al.*, 2017).

En Côte d'Ivoire, onze isolats de *Metarhizium*, isolés à la suite d'infection naturelle des charançons ont été obtenus dans les plantations SAKJ, BATIA et EGLIN Agboville. Les tests d'inoculation passive en boîte de Pétri par marche sur les cultures de champignons et l'inoculation active avec les suspensions de spores ont montré leurs capacités d'agents biologiques pour le contrôle du charançon noir du bananier. Leur susceptibilité à certains fongicides utilisés contre la cercosporiose noire qui, perturbent la croissance et la vigueur du tube germinatif et stimulation de la sporulation par le Glyphosate (Aby, 2013).

Au total, l'état de connaissances montre que les bananes sont un élément de base essentiel de l'alimentation, surtout dans les pays en développement, au même titre que le blé, le riz ou le maïs, d'où leur importance pour la sécurité alimentaire. La culture fait face dans les zones de production à de nombreuses menaces parasitaires dont celle due au charançon noir du bananier, *Cosmopolites sordidus*

Plusieurs méthodes existent pour le contrôle du charançon noir du bananier. Les mesures prophylactiques apparaissent moins onéreuses mais fastidieuses. La lutte chimique jusque-là la plus efficace, présente aujourd'hui des limites par sa toxicité vis-à-vis de la santé humaine et sur l'environnement. La lutte biologique présente des résultats encourageants qui méritent d'être poursuivis et améliorés. Les résultats des travaux réalisés par Aby (2013) ont démontré que des isolats locaux de *Metarhizium* spp représentent de potentiels agents de lutte biologique contre le charançon noir du bananier. La production en masse de l'inoculum, la formulation de l'inoculum et les méthodes efficaces d'application constituent les préoccupations majeures pour l'utilisation de ces champignons au champ. La section qui suit est consacrée à la méthodologie qui a permis d'atteindre les objectifs de ce travail.

DEUXIEME PARTIE : MATERIELS ET METHODES

CHAPITRE V: MATÉRIELS

Dans ce chapitre, les différentes approches méthodologiques des expérimentations qui ont permis d'obtenir les résultats rapportés dans ce mémoire ont été décrites. Il a montré aussi, les tests statistiques utilisés pour exploiter les données recueillies de ces études.

5.1 Matériels biologiques

5.1.1 Champignons entomopathogènes

Dix isolats du champignon entomopathogène du genre *Metarhizium* ont fait l'objet de cette étude. Ils sont récoltés en 2008 par le Centre National de Recherche Agronomique (CNRA) dans les plantations des trois grandes régions de production bananière en Côte d'Ivoire : les régions des Grands Ponts, de l'Agnéby-Tiassa et du Sud Comoé (Aby, 2013). La collection de travail est composée des dix isolats de *Metarhizium* spp auxquels des noms de code ont été attribués selon la région de provenance. Ces isolats sont conservés durant cinq (5) ans à température ambiante sur milieu PDA dans la mycothèque de la station de recherche de Bimbresso. Les isolats : BAS6, BME2, et BME5 sont récoltés dans la région des Grands Ponts, dans la plantation Batia. Deux autres isolats D23 et D24 sont issus de la plantation SAKJ Diby, dans la région du Sud Comoé. Les isolats DME1, ELIMA A7 et METE sont issus de la plantation Elima, dans la région du Sud Comoé. Les isolats EGL1, EGL2 sont issus respectivement des plantations d'Eglin Azaguié et d'Eglin Agboville (Tableau III).

5.1.2 Insectes

Des adultes *C. sordidus* Germar 1824 sont utilisés pour cette étude. Tous les individus qui ont servi dans cette étude ont été collectés sur les plantations villageoises de la station de recherche du CNRA de Bimbresso. Les charançons colletés sont élevés en laboratoire dans des bocaux perforés en plastique transparents. Ils sont nourris avec des morceaux de bulbe et de pseudo-tronc de bananier. L'aliment est renouvelé deux (2) fois par semaine.

Tableau III : Origine et codes des isolats de *Metarhizium* spp.

| N° | Code | Plantation d'origine | Région administrative d'appartenance |
|-----------|-------------|-----------------------------|---|
| 1 | BAS6 | Batia | Région de l'Agnéby Tiassa |
| 2 | BME2 | Batia | Région de l'Agnéby Tiassa |
| 3 | BME5 | Batia | Région de l'Agnéby Tiassa |
| 4 | D23 | SAKJ Diby | Région du Sud Comoé |
| 5 | D24 | SAKJ Diby | Région du Sud Comoé |
| 6 | DME1 | Elima | Région du Sud Comoé |
| 7 | EGL1 | Eglin Azaguié | Région de l'Agnéby Tiassa |
| 8 | EGL2 | Eglin Agboville | Région de l'Agnéby Tiassa |
| 9 | ELIMA A7 | Elima | Région du Sud Comoé |
| 10 | METE | Elima | Région du Sud Comoé |

5.2 Matériels techniques

5.2.1 Milieux de culture

Cinq types de milieux de culture sont utilisés au cours de cette étude (Tableau IV). Ils sont utilisés pour la caractérisation biologique des isolats et pour l'évaluation du potentiel sporulant sur différents milieux de culture.

5.2.2 Matériels de caractérisation biologique

Les caractères biologiques sont observés sur milieu synthétique Potato Dextrose Agar (PDA). L'appareillage technique utilisé est composé entre autres de :

- autoclave (SMI-AVX-1375) ;
- hotte à flux laminaire (Beccassine, 1015) ;
- étuve (Mettler, 854 Schwabach) ;
- agitateur électrique (Brunswick scientific disoni) ;
- hématimètre de Malassez (prof=1/5m/m) ;
- micropipette (AHN-biot.Gmbh) ;
- microscope à caméra de marque Optika,
- broyeuse IKA A11 basic.

Le reste du matériel technique est composé du matériel usuel de laboratoire.

5.2.3 Matériels de caractérisation moléculaire

Plusieurs appareils sont utilisés pour l'analyse moléculaire des isolats. Ils sont composés essentiellement de :

- broyeur (MP) permettant de broyer le thalle ;
- centrifugeuse (Mikro 220r) qui a permis de séparer les différentes phases liquide et solide des mélanges ;
- thermocycleur (Applied Biosystems) au sein duquel s'est déroulée l'amplification en chaîne ;
- spectrophotomètre (Nanodrop) qui a permis de quantifier la concentration en ADN ;
- lampe UV qui a permis de révéler les bandes d'ADN sur gel d'agarose à 1,2 % ;
- kit d'extraction d'ADN pour champignon et bactérie (Zymo Research).

Le reste du matériel technique se compose du matériel usuel de laboratoire.

Tableau IV : Composition des milieux de culture utilisés

| Type de milieux de culture | Composition |
|-----------------------------------|--|
| PDA | Semoule de pomme de terre+ Glucose+ Agar |
| Riz | Riz+ Agar |
| Cacao | Téguments de cacao+Sucre de canne/Mélasses+ Agar |
| Café | Parches de café+Sucre de canne/Mélasses+ Agar |
| Mélasses | Mélasses+ Agar |

CHAPITRE VI : METHODES

Le principe de la démarche a été de proposer la formulation d'un biopesticide à base de *Metarhizium*, comme alternative à l'utilisation systématique des insecticides de synthèse dans le contrôle de *Cosmopolites sordidus* dans les bananeraies de la Côte d'Ivoire.

Dans cette démarche, la première étape a été de purifier sélectivement des souches fongiques de *Metarhizium* sp. de la collection de travail. Les caractères cultureux et microscopiques sont analysés. Ces caractères étant insuffisants pour une identification spécifique, dans une deuxième étape, leur identification est affinée par des outils moléculaires. Les autres étapes ont ainsi pu être réalisées conséquemment, connaissant désormais les espèces constituant la collection de travail.

Dans les paragraphes qui suivent, les méthodes mises en œuvre en relation avec les questions fondamentales posées plus haut, sont présentées dans les détails.

6.1 Caractérisation biologique

6.1.1 Caractérisation macroscopique

Les caractères morphologiques et cultureux sont déterminés après ensemencement des souches pures sur le milieu Potato Dextrose Agar (PDA). Ce milieu est composé de flocons de pomme de terre (20 g/l), de D-glucose (20 g/l) et d'Agar-Agar (20 g/l). La purification des isolats développés est effectuée par des repiquages successifs sur le milieu d'isolement jusqu'à l'obtention d'une culture pure. Le milieu est coulé, sous une hôte à flux laminaire munie d'une lampe à ultra-violet, dans des boîtes de Pétri. Il estensemencé par un explant mycélien prélevé à l'aide d'une anse de platine stérile et déposé au centre de la boîte. L'incubation est réalisée dans une étuve à une température de 28 ± 2 °C.

L'évaluation de la vitesse de croissance radiale et du développement sont faits tous les deux jours jusqu'à confluence de la boîte. Ce suivi qui est réalisé à l'œil nu, mais aussi grâce à une loupe binoculaire a permis ainsi de rassembler des indices révélateurs sur l'identité des souches : couleur du thalle aérien et sa variation au cours du temps, couleur du revers de la boîte, production de pigments diffusibles, présence ou absence de gouttelettes sur le revers de la boîte, etc.

Pour chacun des isolats, trois boîtes de Pétri sont utilisées.

6.1.2 Caractérisation microscopique

Les préparations microscopiques sont faites à l'état frais en milieu liquide, entre lame et lamelle. La manipulation a consisté à mettre un fragment mycélien sur une lame placée près d'un bec Bunsen en présence d'une goutte d'eau stérile. Les conidies sont prises en photo à l'aide du microscope à caméra de marque Optika. La longueur et la largeur des conidies sont ensuite déterminées à l'aide du logiciel Optika.

Les spores obtenues sur milieu PDA sont collectées en raclant le contenu d'une boîte de Pétri. Le contenu est raclé à l'aide d'une spatule stérile et placé dans un tube contenant 100 ml d'eau distillée. Après agitation à 150 tr/min, pendant 30 minutes, les spores sont comptées à l'aide d'un hématimètre de Malassez, à raison de dix comptages par suspension telle que décrit par Aby (2013). Trois répétitions sont réalisées par isolat.

6.2 Caractérisation moléculaire

L'identification des champignons entomopathogènes a reposé principalement sur l'étude de plusieurs caractères morphologiques correspondant à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium aérien, la présence de spores et leur forme. Ces méthodes d'identification sont abandonnées par plusieurs chercheurs pour les remplacer par les techniques moléculaires car peu discriminantes. Ces approches moléculaires sont souvent utilisées pour leur rapidité et leur efficacité (St Leger *et al.*, 1992, Bridge *et al.*, 1993, Dong *et al.*, 2007). Parmi les méthodologies employées, la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est largement pratiquée. La séquence ITS, comprenant le gène ADNr 5.8S et les régions internes transcrites, est l'un des outils principalement utilisé pour l'identification moléculaire des champignons. Il a été un bon marqueur spécifique (Nasraoui et Lepoivre, 2003 ; Chaboud, 2013).

6.2.1 Extraction de l'ADN génomique

L'extraction de l'ADN est réalisée selon la méthode décrite par Tangthirasunun *et al.* (2010). Les isolats de *Metarhizium* sont cultivés initialement sur milieu de culture PDA et mis en incubation à température ambiante. L'extraction est réalisée au sein de l'unité de pathologie moléculaire du Laboratoire Central de Biotechnologie, du Centre National de Recherche Agronomique à l'aide d'un kit de marque **Zymo Research**. Elle est réalisée avec une masse de 60 mg de matériel fongique en suivant minutieusement les instructions du kit. L'ADN est repris dans 100µl du tampon d'élution.

La concentration de l'ADN obtenu est mesurée au spectrophotomètre.

6.2.2. Réaction en chaîne par polymérase de l'ADN fongique (PCR)

L'amplification s'est effectuée sur un fragment d'ADN à partir de deux amorces spécifiques des champignons (White *et al.*, 1990) ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') et ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La réaction d'amplification de l'ADN est effectuée dans un thermocycleur. Elle a permis d'amplifier en 45 cycles 10 µl d'ADN dans un volume réactionnel de 50µl composé de : 1µl ITS1 (10µM), 1µl ITS4 (10µM), 10µl ADN, 25µL One Taq master Mix, 13µL H₂O. Le programme utilisé a été : une dénaturation initiale à 95 °C pendant 10 minutes suivie de 45 cycles de dénaturation à 95 °C (10 secondes), l'hybridation à 58 °C (10 secondes) et l'élongation à 72 °C (40 secondes). Une élongation supplémentaire à 72°C (5 minutes) est réalisée.

6.2.3 Analyse et comparaison des séquences

Les produits PCR sont séquencés à l'Unité Mixte de Recherche d'Agroécologie de Dijon (France). Les fragments amplifiés sont séquencés selon la méthode de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Les résultats du séquençage des souches fongiques sont obtenus sous la forme d'électrophorégrammes bruts. Les séquences d'ADN obtenues sont soumises à une recherche d'homologie de séquences en utilisant par le BLAST (Blast Local Alignment Search Tool) sur le site NCBI (National Center For Biotechnology Information) pour rechercher les séquences les plus proches déposées dans Genbank.

6.2.4 Analyse phylogénétique

Après avoir aligné les séquences locales de *Metarhizium anisopliae* et celles de souches provenant de différents continents, les arbres phylogénétiques sont construits avec le programme Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 7 (Kumar *et al.* 1994 ; Tamura *et al.* 2013). La méthode utilisée pour la construction d'arbres a été la méthode du « Neighbor Joining » mise au point par Saitou et Nei (1987). La robustesse des arbres est testée par la méthode du bootstrap (Felsenstein, 1985).

6.3 Optimisation de la capacité de sporulation des isolats par la composition de milieu de cultures organiques

La connaissance des besoins nutritionnels a été un aspect fondamental dans la culture de microorganismes quelle que soit la technique de culture utilisée.

Les industries agricoles et alimentaires produisent des quantités appréciables de sous-produits, qui sont, pour la plupart, peu ou pas valorisés et dont le rejet dans la nature constitue

une menace pour l'environnement. Néanmoins, ils peuvent être utilisés à des fins biotechnologiques. Pour cette raison, l'étude est basée sur l'utilisation de certains résidus agroindustriels, comme substrat pour la culture du champignon dans le but d'obtenir un rendement important en biomasse.

Les substrats des différents milieux organiques sont constitués des sous-produits de café, de cacao et de sucre de canne ou de mélasse de la canne à sucre. Leur efficacité en tant que substrat de base pour la production en masse de *Metarhizium* sp. est comparée à celle du milieu à base de grain de riz couramment utilisé (Latifian *et al*, 2014 ; Mendoza *et al.*, 2019). Les milieux sont stérilisés à l'autoclave, à 121 °C à 1 bar pendant 30 minutes. Couler dans des boîtes de Pétri, les substrats sontensemencés avec des fragments de 0,5 cm de diamètre de culture pure de *Metarhizium*. Ils sont, ensuite, mis en incubation à l'étuve (28 ± 2 °C).

Les parches de café et les téguments de cacao, réduits en poudre pour leur utilisation, sont évalués en tant que source principale d'azote. Le sucre de canne et la mélasse de la canne à sucre sont évalués en tant que source de carbone (Tableau V). La capacité de sporulation de chaque milieu est évaluée à l'hématimètre de Malassez. Ces milieux, complétés avec l'antibiotique chloramphénicol à 0,5g/litre, sont répartis dans des boîtes de Pétri de 11 cm de diamètre.

Tableau V : Composition des milieux de culture de *Metarhizium* sp. pour 1 litre d'eau distillée

| Types de milieu | Composition |
|--|---|
| Cacao, mélasse, Agar (1) | 100 % Ca + 100% M + 20g A+ 0,5g Ant |
| Cacao, mélasse, Agar (2) | 100 % Ca + 40 % M + 20 g A+ 0,5 g Ant |
| Cacao, mélasse, Agar (3) | 100 % Ca + 10% M + 20 g A+ 0,5 g Ant |
| Cacao, mélasse, Agar (4) | 100 % Ca+ 5 % M + 20g A+ 0,5 g Ant |
| Cacao/Café, Agar | 100 % Ca/Cf + 20 g A+ 0,5 g Ant |
| Cacao/Café, Sucre/Mélasse, Agar (2) | 75 % Ca/Cf + 25 % S/M + 20g A+ 0,5g Ant |
| Cacao/Café, Sucre/Mélasse, Agar (3) | 50 % Ca/Cf + 50 % S/M + 20 g A+ 0,5g Ant |
| Cacao/Café, Sucre/Mélasse, Agar (4) | 25 % Ca/Cf + 75 % S/M + 20 g A+ 0,5 g Ant |
| Cacao/Café, Sucre/Mélasse, Agar (5) | 10 % Ca/Cf + 90 % S/M + 20 g A+ 0,5 g Ant |
| Cacao/Café, Sucre/Mélasse, Agar(1) | 90 % Ca/Cf + 10 % S/M+ 20 g A+ 0,5 g Ant |
| PDA | 20 g P + 20 g G + 20 g A+ 0,5g Ant |
| RIZ | 20 g riz + 20 g A+ 0,5 g Ant |
| Sucre de canne/ Mélasse, Agar | 100 % S/M + 20 g A+ 0,5 g Ant |

Ca : cacao, Cf : café, S : sucre, A : agar, R : riz, P: semoule de pomme de terre, G : glucose, M : mélasse ; Ant : Antibiotique

6.3.1 Obtention des poudres de téguments de cacao et parches de café

Un diagramme technologique pour la réduction en poudre des substrats est suivi. Les parches et téguments reçus, sont séchés à la température ambiante. Ils sont, par la suite, broyés à l'aide d'une broyeuse IKA A11 basic. Les broyats sont passés sur un tamis de mailles 0,5 mm.

6.3.2 Préparation des milieux de culture à base de téguments de cacao, de parches de café et de mélasse

Les compositions et les proportions de chaque traitement (T) sont prélevées et renversées dans un erlenmeyer ; le volume est ajusté à 1 (un) litre avec de l'eau distillée. Le tout, hermétiquement fermé, est porté à l'autoclave pendant 30 min à 121 °C sous une pression de 1 bar pour stérilisation. Le milieu est retiré, puis agité avec un agitateur magnétique avant d'être distribué dans des boîtes de pétri sous une hotte stérile.

6.3.3 Préparation du milieu de culture PDA

Le milieu est composé de 20 g de flocons de pomme de terre, 20 g de glucose et 20 g d'agar, pour un volume de 1 (un) litre. Le mélange est autoclavé pendant 30 min à 121 °C sous une pression de 1 bar pour stérilisation. Le milieu est par la suite agité avec un agitateur magnétique avant d'être distribué dans des boîtes de pétri sous une hotte stérile.

6.3.4 Préparation du milieu de culture à base de riz

Le milieu riz est composé de 20 g de poudre de grain de riz et de 20 g d'agar ajusté à 1 (un) litre avec de l'eau distillée. Il est porté à l'autoclave pendant 30 min à 121 °C sous une pression de 1 bar pour stérilisation.

6.3.5 Etude de la composition chimique du milieu de culture sur la capacité de sporulation

L'effet des sources de nutriments sur la croissance et le développement de micro-organismes est étudié dans le cas de l'isolat BME2. L'isolat BME2 est choisi pour sa capacité à allier sporulation et pouvoir pathogène (cf 7.4). Le champignon utilisé et les composants du milieu utilisés sont responsables de la croissance du mycélium et du rendement en spores. Les milieux doivent répondre aux besoins nutritionnels nécessaires à la croissance des microorganismes. Pour étudier cet effet, les milieux à base de parches de café ou de téguments de cacao, de mélasse et de riz sont considérés. L'effet du rapport C/N, de la

concentration en carbone, en azote et en calcium est étudié par une regression linéaire. La composition des différents milieux est obtenue par la formule :

$$\alpha = \sum C_m = \sum(m)/V$$

avec :

α : concentration massique de l'élément chimique considéré,

C_m : concentration massique de l'élément contenu dans les parches de café ou de téguments de cacao, ou de riz, ou de mélasse

m : masse de parches de café ou de téguments de cacao, ou de riz, ou de mélasse ajoutée au milieu,

V : volume total

$$R_m = [(n1 \times R1) + (n2 \times R2)] / (n1 + n2)$$

Selon : <http://enviroval.ca/enviroval/index.php?p=11>

Avec :

R_m = rapport C/N du mélange

R_1 = rapport C/N du composant 1

R_2 = rapport C/N du composant 2

n_1 = quantité de composant 1

n_2 = quantité de composant 2

6.4 Activation du pouvoir entomopathogène de *Metarhizium* sp.

Les tests de virulence sont réalisés selon la méthode décrite par Dong *et al.* (2007). L'effet de l'activation des isolats sur la pathogénicité est évalué. L'activation a été un processus qui a consisté à ré-isoler le champignon à partir des insectes dont la mort a été provoqué par l'infection fongique.

Les isolats activés une, deux, trois fois et les isolats non-activés sont testés. Les insectes morts sont éliminés avant la sporulation du pathogène pour éviter la transmission horizontale de l'infection dans une même boîte. Les cadavres des insectes sont incubés dans des chambres humides puis repiqués sur milieu PDA afin de ré-isoler le pathogène et vérifier si la mortalité est réellement due à l'infection par des champignons entomopathogènes.

Différents paramètres de la pathogénicité sont relevés : temps léthal suffisant pour tuer 100 % des individus (TL100), temps léthal suffisant pour tuer 50 % des individus (TL50), délai d'apparition du duvet mycélien.

L'activation a compris plusieurs phases : la collecte des charançons au champ, la contamination des charançons par marche sur les colonies fongiques, le réisolement du champignon à partir des charançons morts.

6.4.1 Collecte des charançons au champ

6.4.1.1 Pose des pièges

Les charançons sont collectés dans des pièges faits de morceaux de pseudo-troncs posés au pied du bananier selon la méthode de piégeage de masse de Vilardebo (1950). Un piège est constitué par deux demi-cylindres fendus de pseudo-tronc fraîchement récolté d'environ 30 à 40 cm de longueur. Ils sont placés de part et d'autre, au pied du bananier, les faces contre le sol préalablement dégagés des débris végétaux. Des pièges à phéromones sont également associés aux pièges faits de morceaux de pseudo-troncs afin d'être plus imparable dans la capture des charançons. Ainsi, 20 pièges de morceaux de pseudo-troncs et 5 pièges à phéromones sont posés au total.

6.4.1.2 Visite et entretien des pièges

Les pièges sont visités quotidiennement. Les charançons capturés sont transportés au laboratoire pour élevage. Les pseudo-troncs et la phéromone sont renouvelés par semaine en vue de maintenir leur efficacité.

6.4.1.3 Elevage des charançons

Les charançons collectés sont élevés dans des bocaux en plastique transparents. Ils sont nourris avec des morceaux de bulbe et de pseudo-tronc de bananier. Le suivi est réalisé tous les jours et leur aliment renouvelé deux fois par semaine.

6.4.2 Inoculation des charançons

La méthode d'inoculation choisie a été l'inoculation par marche sur culture fongique. Pour chaque isolat, 5 charançons adultes sont préalablement désinfectés à l'hypochlorite de sodium (7 600 ppm) pendant 30 secondes, rincés 3 fois avec de l'eau distillée stérile afin d'éliminer les germes. Ils sont ensuite essorés avec du papier buvard stérile, puis déposés dans les boîtes de pétri de 9 cm de diamètre contenant les spores des champignons. Les observations relatives aux taux de mortalité sont quotidiennement notées jusqu'à la mort de l'ensemble des individus de l'essai. Le charançon mort est encore désinfecté à l'hypochlorite de sodium (3 800 ppm) pendant 30 secondes et rincé 3 fois avec de l'eau distillée stérile pour

s'assurer d'une élimination maximale des germes. Il est ensuite déposé sur du papier filtre stérile imbibé d'eau distillée stérile dans des boîtes de Pétri stériles et mis en incubation à l'obscurité à la température ambiante. Le délai d'apparition du duvet mycélien est noté. Le champignon est ensuite identifié au microscope optique (Optika).

6.4.3 Isolement des spores à partir de charançons infectés

L'isolement des spores est réalisé selon la méthode de Zimmerman (1998). L'isolement des spores est précédé de deux étapes qui sont la désinfection des charançons morts et leur incubation. Après apparition du duvet mycélien, l'ensemencement de celui-ci est réalisé. Le tout est incubé à température ambiante.

6.4.3.1 Désinfection des charançons morts

Les charançons morts sont désinfectés avec de l'hypochlorite de sodium à 3 800 ppm pendant 30 secondes puis rincés trois (3) fois à l'eau distillée stérile. Ils sont ensuite séchés sur du papier buvard.

6.4.3.2 Incubation des charançons

Les charançons désinfectés sont déposés sur du papier filtre imbibé d'eau distillée stérile dans des boîtes de Pétri stériles et mis en incubation à l'obscurité, à la température ambiante jusqu'à apparition du duvet mycélien.

6.4.3.3 Ensemencement des duvets mycéliens

A l'apparition du duvet mycélien, les charançons sont individuellement plongés dans de l'acide citrique (5 %) pendant 10 min et rincés trois (3) fois à l'eau distillée stérile puis essorés avec du papier buvard stérile. L'acide citrique est utilisé pour empêcher tout développement bactérien. Le duvet mycélien apparaissant sur le charançon est repiqué sur milieu PDA.

6.4.3.4 Incubation et purification des champignons

Les boîtes de Pétri sont placées en incubation, à l'obscurité, à la température ambiante (23-30 °C). Les colonies mycéliennes obtenues sont purifiées sur milieu PDA. Un isolat est constitué par une colonie mycélienne obtenue sur un charançon mort. La sporulation caractéristique de la muscardine verte est observée et enregistrée. La couleur et l'aspect du

thalle sont notés. Des fragments du thalle sont ensuite observés au microscope photonique pour identifier le champignon à l'aide de la clé d'identification de Barnett et Barry (1972).

6.4.4 Test de pathogénicité des isolats activés

Plusieurs paramètres de la pathogénicité sont observés : le délai d'apparition du duvet mycélien, les temps létaux (TL50 et TL100), la croissance radiale de la colonie mycélienne et la capacité de sporulation.

6.4.4.1 Étude des temps létaux moyens, pour 50 % et 100 % de la population

Dans la présente étude, la courbe de variation du taux de mortalité cumulé en fonction du temps ou courbe de survie est conçue pour chaque isolat.

Le temps léthal pour 50 % de la population est définie par le temps à partir duquel 50 % des insectes sont morts. Autrement dit, c'est le temps léthal pour 50 % des individus (TL 50) ou le délai t pour lequel l'indice de survie, $I_s(t) = 0,5$. Elle est obtenue à partir des courbes de survie par projection de l'indice de survie 0,5 sur la courbe et sur l'axe des abscisses (Aby, 2013, Sawadogo, 2015). Le TL100 est déterminé par la même méthode (Figure 10).

6.4.4.2 Étude du délai d'apparition du duvet mycélien

Les charançons mis en incubation sont quotidiennement observés à la loupe binoculaire. Le délai d'apparition du thalle est ainsi relevé.

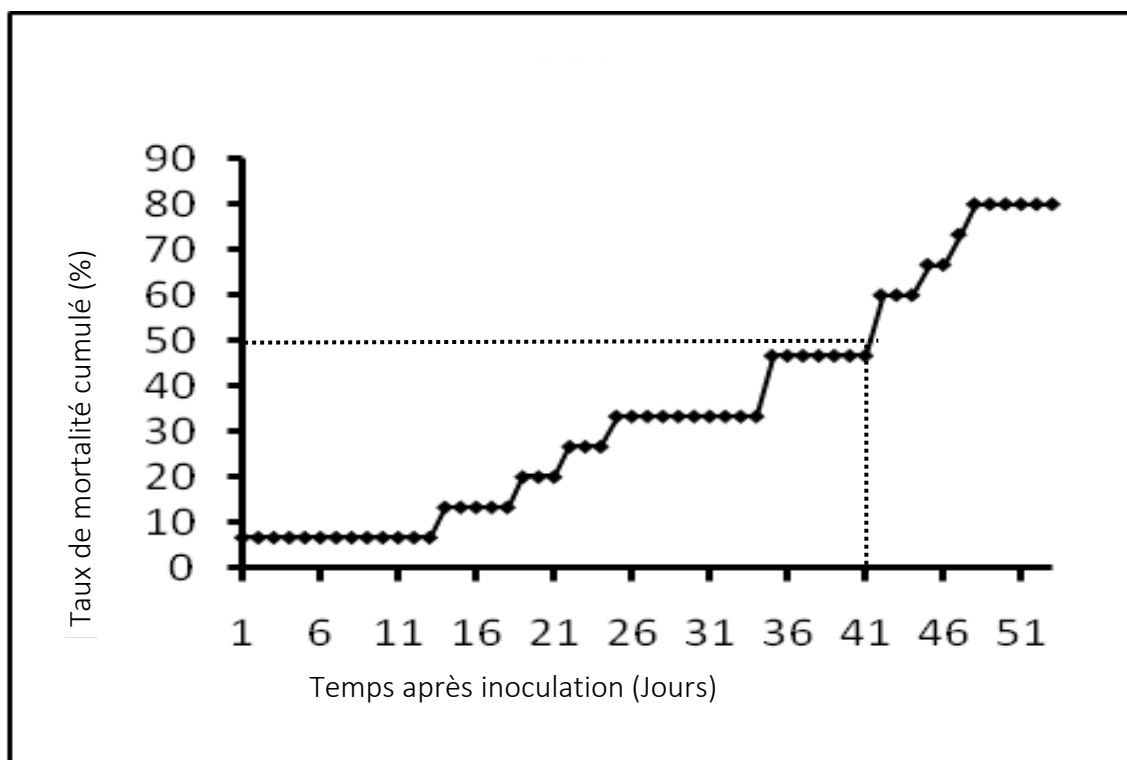


Figure 10 : Détermination du temps létal pour 50 % de la population de charançon noir

6.4.4.3 Étude de la croissance radiale des isolats activés et non activés

La croissance radiale des isolats est réalisée sur milieu PDA. Une rondelle de 5 mm de diamètre de culture pure de l'isolat est déposée à l'aide d'une anse de platine stérile au centre de la boîte de Pétri. Elle est prélevée sur le front de croissance. Les isolats sont mis en incubation à l'obscurité, à l'étuve. Les fronts de croissance du thalle sur deux axes perpendiculaires, dont le point séquent est le centre de la rondelle, sont mesurés tous les deux jours pendant 21 jours. Trois répétitions sont réalisées par isolat.

6.4.4.4 Etude de la sporulation des isolats activés et non-activés

Les isolats sont cultivés sur le milieu PDA dans des boîtes de Pétri pendant 21 jours. La colonie formée dans chaque boîte de Pétri est ensuite raclée avec une spatule stérile et agitée à 150 Tr/min pendant 30 min dans 10 mL d'eau distillée stérile. La suspension obtenue est filtrée deux fois sur de la mousseline et sa concentration déterminée à l'hématimètre de Malassez (Profondeur=1/5m/m). Trois répétitions sont réalisées par isolat. Trois activations sont réalisées par isolat : Activation 1 (Act1), Activation 2 (Act2), Activation 3 (Act3). Les isolats non-activés sont issus de culture pure et notés Activation 0 (Act 0). L'activation 1 est le résultat de la contamination des charançons par des isolats non-activés. L'activation 2 est le résultat de la contamination par des isolats issus de l'activation 1. L'activation 3 est le résultat de la contamination des charançons par des isolats issus de l'activation 2.

6.5 Influence de différents traitements pesticides dans la lutte contre le charançon noir du bananier

6.5.1 Sites expérimentaux

L'étude est réalisée au cours de la période allant de 2012 à 2014. Les expérimentations sont conduites dans les plantations : la plantation SPDCIE à Dabou, la plantation SCB BANACOMOE à Akoupé et la plantation SAKJ à Ayamé (Figure 11). Sur ces plantations, c'est le cultivar Grande Naine qui est cultivé. Avant la mise en place des essais, les niveaux d'infestation des parcelles sont évalués à travers des piégeages. Les essais sont mis en place en blocs aléatoires complets. Le facteur étudié a été l'efficacité des traitements insecticides. Dans chaque site, quatre traitements sont confrontés sur les plantations en production et trois autres en assainissement des jachères. Trois répétitions sont réalisées par traitement. Une superficie de 1/2 ha est retenue pour chaque parcelle élémentaire.

A



B

Figure 11 : Zones de production des bananes et bananes plantain en Côte d'Ivoire (Aby, 2013)

— Limite septentrionale de la zone de production de banane plantain

— Limite septentrionale d'exploitation de la banane dessert

A : limites septentrionales, B : position des plantations de banane dessert dans les régions productrices.

6.5.2 Evaluation de l'efficacité des traitements dans les parcelles en production et en jachère

L'évaluation de différents traitements est réalisée sur les parcelles en jachère et sur les parcelles en production. Les différents traitements sont comparés par cas d'espèce en vue de réduire le taux d'infestation des charançons sur les différentes parcelles. L'isolat BME2 est utilisé pour les traitements incluant le champignon entomopathogène. Il est choisi dans cette expérimentation pour sa capacité de sporulation et pour ses caractères pathologiques *in vitro*.

6.5.2.1 Traitements des parcelles en jachère

Les essais sont mis en place sur la plantation de SAKJ. Les traitements pour l'assainissement des jachères ont débuté trois (3) mois avant la mise en jachère des parcelles. La jachère est composée d'adventices dont : *Phyllanthus urinaria* L. (Euphorbiaceae), *Cleome ciliata* Schum. & Thonn. (Capparidaceae), *Spermacoce latifolia* Aubl. (Rubiaceae), *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae), *Mariscus cylindristachyus* Steudel (Cyperaceae), *Cyperus sphacelathus* Rottb. (Cyperaceae) et *Digitaria horizontalis* Willdenow, (Poaceae).

Sur les parcelles en jachère, trois traitements sont comparés avec des combinaisons différentes : T_{0J}, T_{1J} et T_{2J}.

- ❖ T_{0J} a été le témoin blanc sans mise en œuvre de méthodes de gestion des populations de charançons.
- ❖ T_{1J} a correspondu à l'application mensuelle de phéromone avec le champignon entomopathogène *Metarhizium* sp. La souche de *Metarhizium* sp. est multipliée sur substrat parches de café en laboratoire dans des bocaux de 700 mL après une mise en culture sur milieu PDA dans des boîtes de Pétri. En pratique, 60 g de l'inoculum est épandu autour de la phéromone, la sordidine de synthèse (2,8-dioxa-1-éthyl-3,5,7-triméthylbicyclo [3.2.1] octane) sur un kilogramme de sable préalablement stérilisé, le tout recouvert par la seconde valve du piège à phéromone. Les pièges sont disposés autour de la parcelle qui abrite le traitement en raison de 20 pièges/ha (Figure 12).
- ❖ T_{2J} a été le traitement avec piégeage mensuel de masse à la phéromone à 90 mg/diffuseur. Dans ce traitement, l'inoculum est remplacé par l'eau savonneuse (Figure 13) qui a empêché les charançons de ressortir de la valve mise en terre. Les charançons sont collectés chaque semaine.



Phéromone

Inoculum (champignon)

Figure 12 : Piège à phéromone inoculé avec *Metarhizium anisopliae* cultivé sur substrat parches de café



Contenant de l'eau savonneuse

Couvercle du piège

Eau savonneuse

Figure 13 : Pose du piège à phéromone avec l'eau savonneuse

6.5.2.2 Traitements sur des parcelles en production

Sur les parcelles en production, quatre traitements sont comparés. Les combinaisons de traitements suivants sont évaluées : T_{1P}, T_{2P}, T_{3P} et T_{4P}.

- ❖ T_{1P} a correspondu à l'application mensuelle puis trimestrielle du champignon entomopathogène, *Metarhizium* sp. dans les pièges à faux troncs (Figure 14). Dans ce traitement, l'inoculum est déposé entre deux planches rectangulaire de contre plaqué autour d'un fragment de phéromone le tout recouvert d'une tranche de pseudo-tronc.
- ❖ T_{2P} a correspondu à l'application d'insecticide systémique (temps T₀ ; assainissement) suivie d'application mensuelle du champignon entomopathogène *Metarhizium* sp. en cas de remontée des infestations. La matière active choisie pour le traitement a été le thiamethoxam appliqué à 30 mL/bananier.
- ❖ T_{3P} a consisté en l'application de l'insecticide sur avertissement biologique. Il est considéré comme le traitement témoin. Les matières actives utilisées usuellement sur chaque parcelle sont conservées. Ainsi, le thiamethoxam (Actara 25 wg) est appliqué à 240 g/L dans les plantations SAKJ et SPDCIE et l'imidacoprid à 350 g/L (Insector) à SCB BANACOMOE.
- ❖ T_{4P}. a été l'application mensuelle du champignon dans les pièges à faux troncs avec la phéromone (20 pièges/ha) et le piégeage des adultes selon la méthode utilisée par la plantation (20 pièges/ha) : les pièges colombiens utilisés dans la plantation SAKJ (Figure 14A), les pièges encoches (Figure 15B) dans la plantation SCB BANACOMOE et les pièges Vilardébo (Figure 15C) utilisés par la plantation SPDCIE.



Figure 14 : Étapes de la pose du piège à faux troncs contenant le champignon (Aby, 2012)

A : Inoculum et fragment de contreplaqué sur un rectangle de contreplaqué,

B : Rectangle de contreplaqué recouvrant l'inoculum et la phéromone,

C : Morceaux de faux troncs recouvrant le rectangle de contreplaqué.



Morceau de pseudo tronc

A



Entaille cônique

Morceau de pseudo tronc

Vieille souche de bananier

B



Bananier

Morceaux de pseudo-troncs

C

Figure 15 : Pièges utilisés dans les sites d'essai pour la capture des charançons

A : piège colombien, B : piège encoche, C : piège Vilardebo

6.5.3 Mesure de l'efficacité des traitements

L'évolution des niveaux d'infestation est évaluée trimestriellement par des décorticages en notant le coefficient et les pourcentages d'infestation. Quarante bananiers sont décortiqués par parcelle élémentaire. L'opération avait pour but, la recherche et l'estimation des dommages ou galeries causés par la larve du charançon sur la partie souterraine du bananier (souche ou rhizome). En pratique, il a consisté à dégager la terre qui entourait le bananier sur une couronne de 15 à 20 cm de large et sur une profondeur de 20 à 25 cm. Le bulbe est taillé avec une machette, de manière tangentielle et superficiellement sur environ 1 cm d'épaisseur du cortex, ce qui a mis à nu les galeries larvaires.

Un Coefficient d'Infestation (CI) est attribué à ces dommages. Il a représenté une estimation de la proportion de la surface du rhizome présentant des galeries. Le coefficient est établi en suivant le barème défini par Vilardebo en 1973 (Cf tableau II). Les moyennes des coefficients d'infestation sont définies par décorticage, par traitement et par plantation. Le Coefficient d'Infestation a permis de comparer l'efficacité des produits insecticides et de suivre l'évolution des attaques en fonction des traitements. Le seuil d'intervention a été de 5 (cinq).

Le Pourcentage de Coefficient d'Infestation (PCI) ou pourcentage d'infestation développé par Mitchell (1978 et 1980) est déterminé. Le PCI est représenté par le nombre de bananiers présentant des galeries larvaires. La présence ou l'absence de galerie dans chaque tranche est notée. Le pourcentage d'infestation indique l'importance relative des bananiers attaqués par rapport à l'ensemble des bananiers observés (décortiqués). Il a indiqué le taux de propagation du charançon dans la parcelle. Il a consisté à décortiquer un bulbe en 10 tranches ou bandes de 7 cm de largeur. Le seuil d'intervention a été de 10 %.

Avant la mise en place des essais, les niveaux d'infestation des parcelles sont évalués à travers des piégeages et décorticages préliminaires.

L'efficacité des traitements est mesurée en déterminant la variation du paramètre étudié (ΔP) et sa capacité à faire passer le paramètre en dessous du seuil d'intervention.

$$R = (\Delta P / P_i) \times 100$$

6.6 Analyse statistique

Les données obtenues ont d'abord subi un test de normalité. Les valeurs des paramètres évalués sont soumises à des analyses de variance en utilisant les modèles linéaires généralisés. Certaines données ont nécessité une transformation préalable afin de suivre la loi normale. La concentration a subi une transformation logarithmique Népérien. Le TL50 a été

transformé par le facteur cosinus. Le TL100 a quant à lui subi une transformation par le facteur sinus. Un test post hoc de Fisher, de Duncan et de Student Newman et Keuls (SNK) est réalisé en cas de différence statistique établie au seuil de 5 %. Une analyse en composantes principales suivie d'une classification hiérarchique ascendante des isolats activés et non-activés sont réalisées afin de regrouper les isolats en classe et observer ceux qui se sont distingués. Le logiciel SPSS version 20 est utilisé pour traiter statistiquement les données.

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE VII: RESULTATS

7.1 Principaux caractères biologiques des dix isolats de *Metarhizium anisopliae*

7.1.1 Caractères macroscopiques

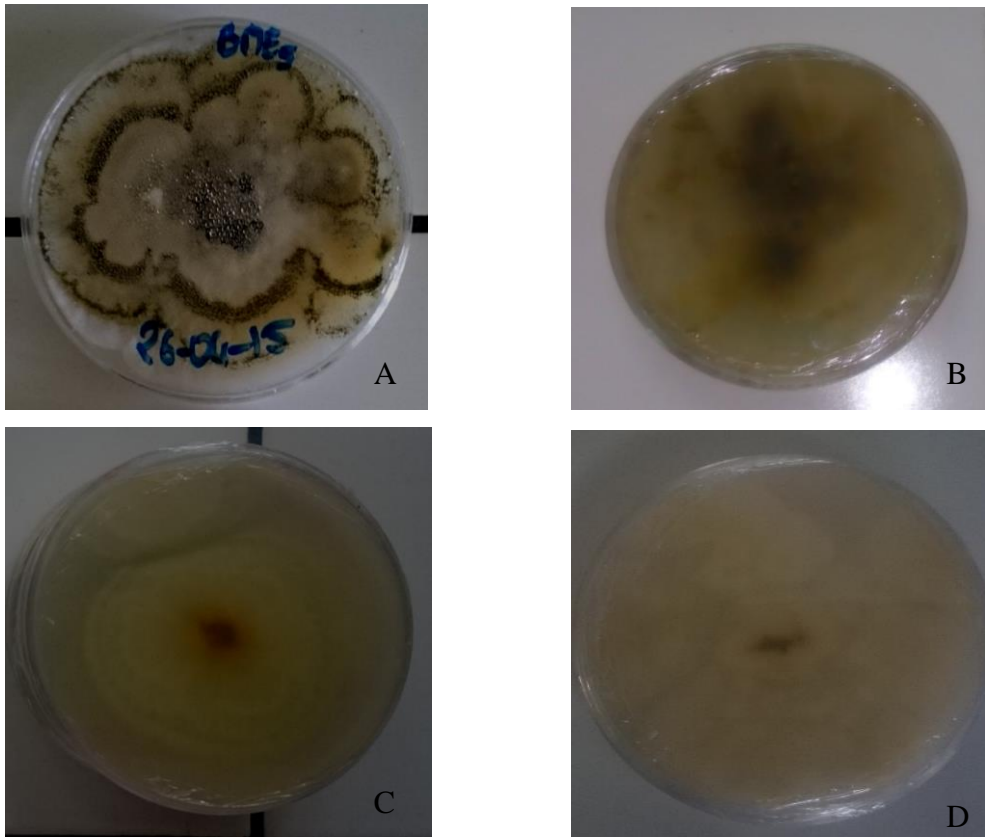
Les colonies ont présenté, en début de croissance, une couleur blanche plat d'aspect cotonneux pour EGL1 et EGL2 et floconneux pour les isolats BAS6, BME2, BME5, D23, D24, DME1, ELIMA A7 et METE. La colonie présente, à la périphérie, une coloration verdâtre, avec un aspect poudreux formant des ilots (Figure 16).

En revanche, la souche EGL1 présente, jusqu'au 21^e jour, une colonie avec une quasi absence de coloration verdâtre. Le relief est plat. Le revers est blanc ou jaune pour les isolats EGL1, EGL2, BAS6, D23, DME1 et brun orangé pour les isolats BME2, BME5, D24, ELIMA A7, METE.

A l'issue du croisement des caractères morphologiques, il se dégage quatre (04) morphotypes que sont (Tableau VI) :

- Morphotype 1, regroupant les isolats BAS6 et D23. Ce sont des isolats à colonie blanche et à texture aérienne et floconneuse. Ils ont un relief, plat et sont abondants. Le revers est blanc sur milieu de culture PDA (Figure 16 C).
- Morphotype 2, regroupant les isolats BME2 et BME5. Ce sont des isolats à colonie blanche et à texture aérienne et floconneuse. Ils ont un relief plat et sont abondant. Le revers est brun orangé sur milieu de culture PDA (Figure 16 A).
- Morphotype 3, regroupant les isolats D24, DME1, ELIMA A7 et METE. Ce sont des isolats à colonie blanche et à texture aérienne et floconneuse. Ils ont un relief plat et sont abondants. Le revers est brun sur milieu de culture PDA (Figure 16 B).
- Morphotype 4, regroupant les isolats EGL1 et EGL2. Ce sont des isolats à colonie blanche et à texture aérienne et cotonneuse. Ils ont un relief plat et sont peu abondants. Le revers est blanc sur milieu PDA (Figure 16 D).

Les morphotypes 2, 3 et 4 regroupent des isolats appartenant à la même région. Seul le morphotype 1 est composé d'isolat appartenant à des régions différentes.



2,2 cm

Figure 16 : Caractères cultureux des isolats de *Metarhizium* sp. sur un milieu de culture PDA

- A : isolat BME5 vue de face colonie blanche et sporulation vert ,
- B : isolat de D24 vue de revers avec une coloration brun ;
- C : isolat BME5 vue de revers avec coloration brune orangée ;
- D : vue de revers avec coloration blanche.

Tableau VI : Regroupement par morphotypes selon les caractères macroscopiques des isolats

| Isolats | Couleur de la colonie | Coloration à maturité | Texture | Relief | Abondance | Couleurs du revers | Morphotypes obtenus |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------------|--------|-----------|--------------------|---------------------|
| BAS6 | Blanc | Vert | Aérienne, Floconneuse | Plat | ++ | Blanc | Morphotype 1 |
| D23 | Blanc | Vert | Aérienne, Floconneuse | Plat | ++ | Blanc | |
| BME2 | Blanc | Vert | Aérienne, Floconneuse | Plat | ++ | Brun Orange | Morphotype 2 |
| BME5 | Blanc | Vert | Aérienne, Floconneuse | Plat | ++ | Brun Orange | |
| D24 | Blanc | Vert | Aérienne, Floconneuse | Plat | ++ | Brun | Morphotype 3 |
| DME1 | Blanc | Vert | Aérienne, Floconneuse | Plat | ++ | Brun | |
| ELIMA A7 | Blanc | Vert | Aérienne, Floconneuse | Plat | ++ | Brun | |
| METE | Blanc | Vert | Aérienne, Floconneuse | Plat | ++ | Brun | Morphotype 4 |
| EGL1 | Blanc | Vert | Aérienne, Cotonneuse | Plat | + | Blanc | |
| EGL2 | Blanc | Vert | Aérienne, Cotonneuse | Plat | + | Blanc | |

Très abondant : +++

Abondant : ++

Peu abondant : +

7.1.2 Caractères microscopiques des isolats locaux de *Metarhizium* sp.

Les isolats n'ont présenté aucune différence sur le plan microscopique. Ils sont caractérisés par un mycélium hyalin, cloisonné et ramifié. Les conidiophores qui se sont formés sur le mycélium sont ramifiés irrégulièrement vers le bas. Les phialides ont une forme cylindrique ou légèrement gonflés sur le côté où les spores ont été formées. Les conidies de forme ellipsoïdale sont unicellulaires. Elles sont hyalines et ont une longueur moyenne de 3 μm et une largeur moyenne 1 μm (Figure 17). Ces observations caractérisent exclusivement le genre *Metarhizium*.

7.1.3 Potentiel de sporulation des différents isolats des isolats locaux de *Metarhizium* sp.

Les dix isolats ont présenté des capacités de sporulation différentes (Figure 18). Les taux de sporulation les plus élevés sont obtenus avec les isolats D24 et METE.

L'isolat METE est celui qui a le plus sporulé sur le milieu de culture PDA avec $4,60.10^7$ spores/ml. Il est suivi de l'isolat D24 avec $3,24.10^7$ spores/mL. Quant aux isolats BME5, DME1, EGL2 et ELIMA A7, ont eu statistiquement les mêmes concentrations en spores. Les isolats qui ont peu sporulé sur le milieu de culture PDA ont été les isolats : BAS6, BME2, D23, EGL1 avec des concentrations inférieures à $3,24.10^7$ spores/mL.

L'analyse de variance au seuil de 5% montre une différence hautement significative de la concentration en spores des différents isolats sur le milieu PDA 5 (Annexe 1.1).

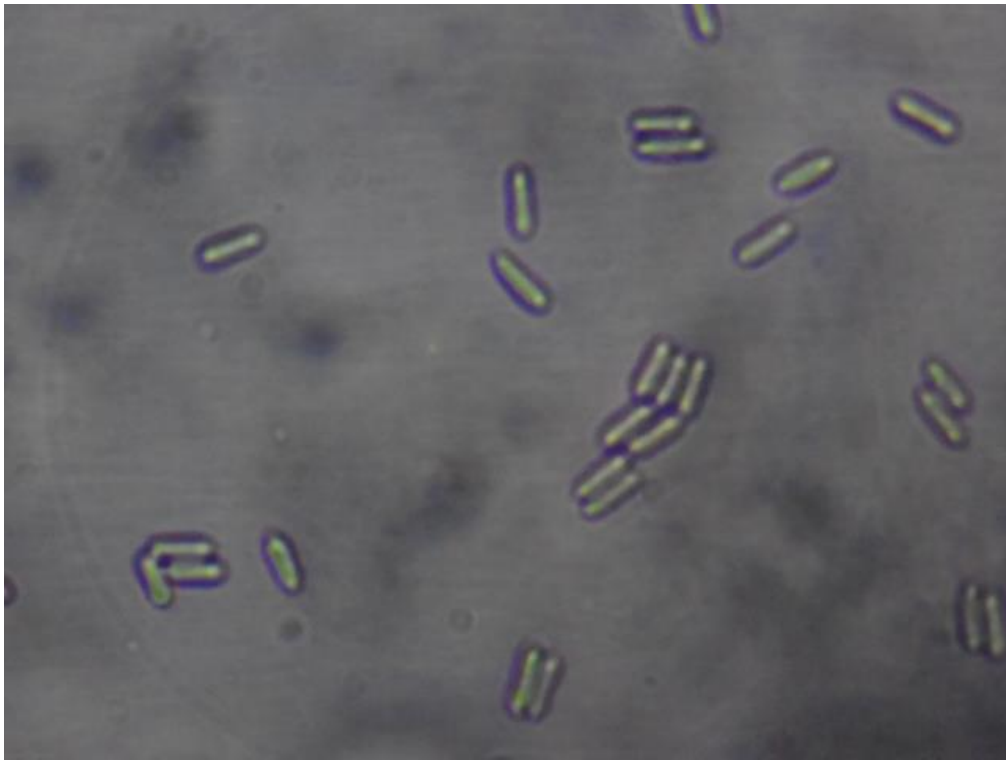


Figure 17 : Spores d'un isolat de *Metarhizium* sp. observées au microscope optique au (GX400)

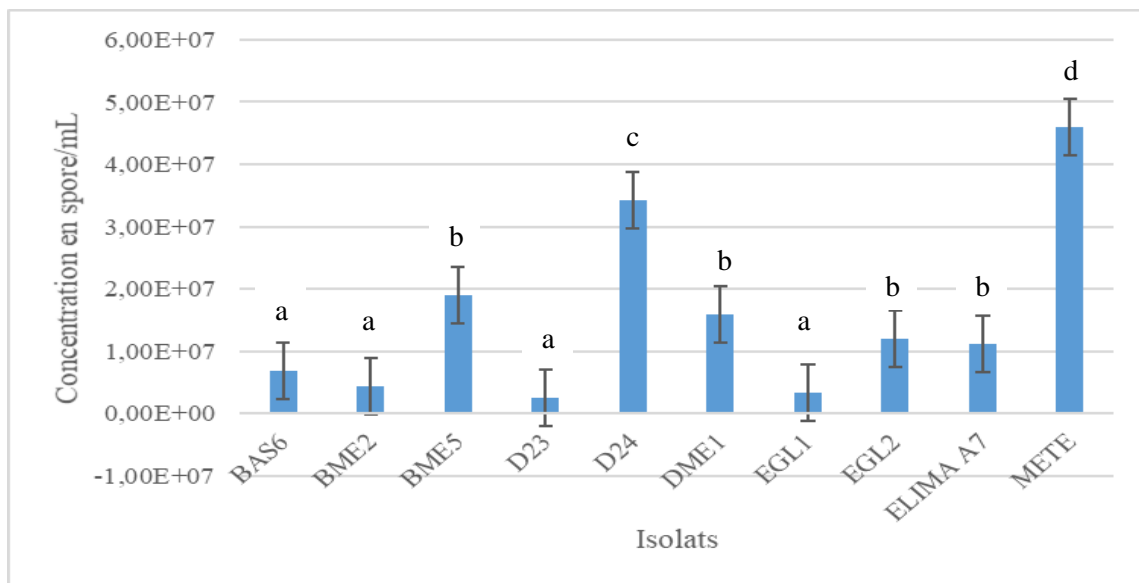


Figure 18 : Capacité de sporulation sur milieu PDA des dix isolats de *Metarhizium* sp. récoltés dans les aires de culture bananière

Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon la classification de Duncan

7.2 Identification moléculaire des isolats par l'étude de la région ITS1-5.8S-ITS2

L'évaluation de la diversité fongique et de la structure de la communauté dépend fortement des critères d'identification des espèces. Avec quelques caractéristiques morphologiques distinctes, les espèces du genre *Metarhizium* sp. pourraient appartenir à plusieurs espèces différentes si aucune identification explicite à base moléculaire n'est réalisée.

7.2.1 Taille des fragments de gène

Parallèlement aux caractères biologiques, les caractéristiques moléculaires ont également été étudiées. La concentration moyenne en ADN est de 60 ng/μL et le rapport 260/280 a une valeur moyenne de 1,86. La PCR a permis l'obtention de fragments de gènes d'une longueur moyenne de 550 pb pour tous les isolats étudiés (Figure 19).

7.2.2 Analyse des séquences

Les produits de la PCR ont été séquencés et les séquences obtenues ont été comparées avec celles d'autres organismes de la base de données Genbank (Tableau 7). L'analyse des dix (10) séquences d'ADN montre qu'elles présentent 98 à 100 % d'identité à l'espèce *Metarhizium anisopliae*.

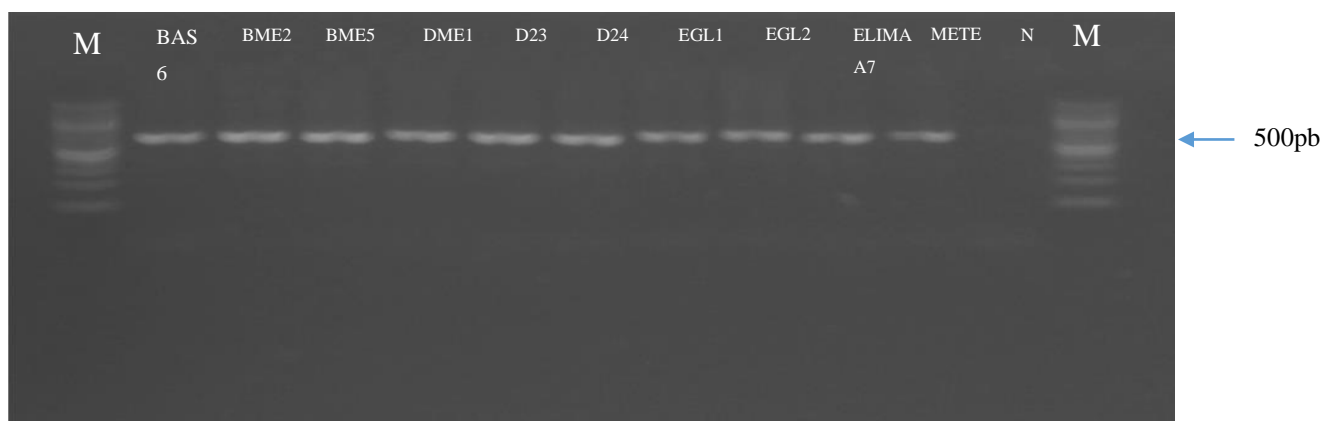


Figure 19 : Electrophorèse sur gel d'agarose (1,2 %) montrant des amplifications PCR de ITS à partir d'ADN de *Metarhizium* sp. des différents isolats collectés sur les plantations industrielles de bananier

M : marqueur, N : témoin négatif

Tableau VII : Espèces identifiées de *Metarhizium* spp. à l'issue de l'analyse Blast

| Souches | Identité | Espèces Proches | Numéro D'accession |
|----------|----------|--|-----------------------|
| BAS6 | 100% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma-62 | KU170588 |
| | 100% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain MAZL6 | KF913493 |
| BME2 | 99% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma-62 | KU170588 |
| | 99% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain MAZL6 | KF913493 |
| BME5 | 100% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain MAZL6 | KF913493 |
| | 99% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma-62 | KU170588 |
| DME1 | 99% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain MAZL6 | KF913493 |
| | 99% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma-62 | KU170588 |
| D23 | 99% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma-64 | KU170589 |
| | 99% | Uncultured <i>Metarhizium</i> clone Ma-m1 | KP739826 |
| D24 | 100% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain MAZL6 | KF913493 |
| | 99% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma-62 | KU170588 |
| EGL1 | 99% | <i>Metarhizium anisopliae</i> isolate KTU-32 | FJ177479 |
| | 99% | <i>Metarhizium pinghaense</i> strain GKVK | KM091861 |
| EGL2 | 100% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma-62 | KU170588 |
| | 100% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain MAZL6 | KF913493 |
| ELIMA A7 | 100% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma-64 | KU170589 |
| | 99% | Uncultured <i>Metarhizium</i> clone Ma-m1 | KP739826 |
| METE | 99% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain TK37 | KU170589 |
| | 99% | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma-62 | KP739826 |

7.2.3 Analyse phylogénétique

A partir des séquences obtenues après amplification, une analyse phylogénétique a été réalisée. Les alignements des séquences ont été réalisés avec ClustalW. L'arbre a été construit par la méthode de Neighbor-joining, en utilisant le test de bootstrap (nombre sur les branches) de 1000 répliques du programme MEGA 7.0.14 (Figure 20).

Les résultats de l'analyse moléculaire confirment l'appartenance de ces souches au genre *Metarhizium*. Les séquences de l'étude comparées à celles de la Genbank ont montré que les isolats à l'exception de l'isolat EGL1, dérivés du même hôte, *Cosmopolites sordidus*, présentaient une identité avec *Metarhizium anisopliae*. Bien que ne provenant pas de la même région, ils appartiennent tous à la même espèce. L'isolat EGL1, en raison de la taille de la séquence, n'a pu être déterminé avec précision. Cependant il appartient au genre *Metarhizium*.

Les isolats africains ARSEF 6421, ARSEF 3391, ARSEF 5734, et ARSEF 7486 sont regroupés en un seul groupe et sont étroitement apparentés à la souche Indienne ARSEF 2596 de la base de données NCBI. Ce regroupement de ces souches africaines peut s'expliquer par le fait qu'elles soient des pathogènes d'insectes de l'ordre des Orthoptères.

Les souches ARSEF 5626 (Europe) et ARSEF 2974 (Asie) ont formé un groupe homogène.

Le dendrogramme a été regroupé en 6 classes. L'une des classes contenant les isoats D23 et ELIMA A7 provenant tous deux de la région du Sud Comoé. La distance génétique des souches Ivoiriennes par rapport aux autres espèces du genre *Metarhizium* pourrait suggérer une nouvelle variété ou un nouveau sous-type. Les résultats montrent que la région d'ADNr ITS-5.8S permet l'identification de ces souches d'entomopathogène au niveau de l'espèce. La comparaison par paires des séquences a montré, pour les isolats de cette étude, de grandes zones de synténie. Néanmoins, pour les différencier au niveau variétal, il serait nécessaire de séquencer d'autres gènes conservés ou de construire des amorces spécifiques.

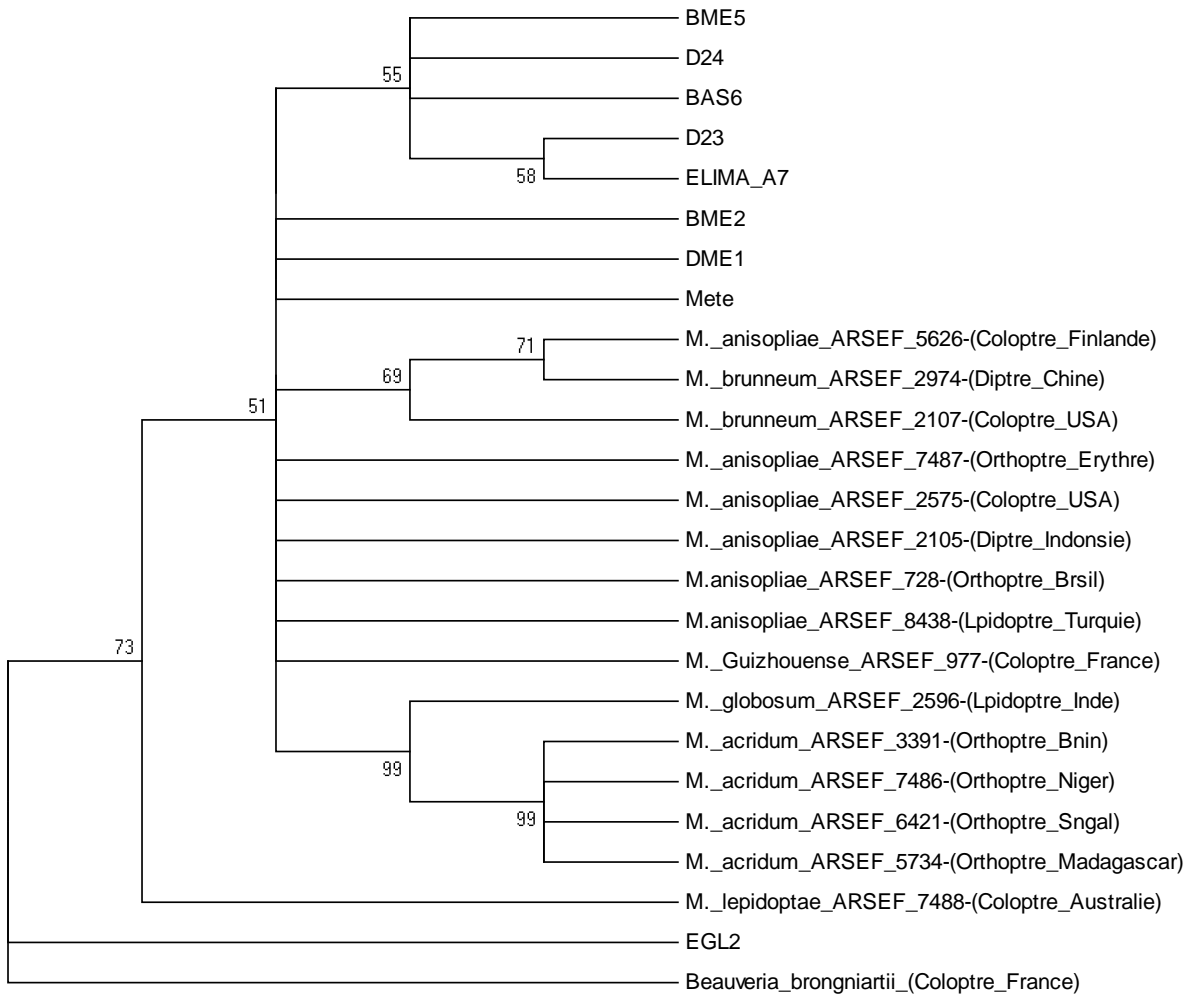


Figure 20 : Arbre phylogénétique selon la méthode des distances (Neighbor -Joining)

7.3 Efficacité de la composition du milieu de culture sur la capacité de sporulation des isolats

Les colonies des dix isolats locaux de *Metarhizium anisopliae* sur les milieux de cultures se développent après repiquage, en moyenne au bout de 10 jours d'incubation (28 ± 2 °C) et à l'obscurité. Les différents milieux de culture favorisent la germination et la sporulation des isolats de *Metarhizium anisopliae*.

Sur les milieux de culture PDA et riz, tous les isolats ont donné des colonies fongiques de couleur blanc cotonneux devenant verdâtre foncée après maturation (Figure 21 C).

Sur les milieux de culture à base de cacao, les isolats ont présenté en début de croissance un thalle d'aspect blanc cotonneux. A maturité, un léger changement, d'aspect jaunâtre apparaît au centre de la colonie tandis que tout le reste de la colonie demeure blanc (Figure 21 A).

Sur les milieux de culture à base de café et de 100 % mélasse, le thalle des isolats est blanc cotonneux et plat en début de croissance et à maturité (Figure 21 B).

La maturation des isolats se manifeste après 21 jours d'incubation. Cela se matérialise par l'apparition d'un nombre important de spores de couleurs vertes sur les milieux de culture. Ces pigments verts ne sont observables que sur les milieux PDA et riz.

La concentration en spores des isolats diffère selon le milieu de culture (de cacao ou de café et/ou de mélasse ou de canne à sucre). La composition du milieu de culture influence hautement ($p < 0,001$) la concentration en spore des isolats (Tableau VIII, Annexe 1.2). Le milieu de culture riz ($2,99 \cdot 10^7$ spores/mL) a été celui qui a permis, de manière générale, une meilleure sporulation. Cinq groupes homogènes se sont dégagés des milieux testés. Deux groupes se sont montrés les plus adaptés, par leur composition, à l'expression de la capacité de sporulation des isolats. Le milieu riz forme le premier groupe. Le deuxième groupe est composé des milieux de culture : PDA ($1,56 \cdot 10^7$ spores/mL), T1Camel ($1,37 \cdot 10^7$ spores/mL), T10Camel ($1,11 \cdot 10^7$ spores/mL), T11Camel ($5,81 \cdot 10^7$ spores/mL), et T9Camel ($7,44 \cdot 10^7$ spores/mL).

Les milieux riches en saccharose commercial ont été les moins sporulants, notamment les milieux T6Cfs ($2,11 \cdot 10^5$ spores/mL), T7s ($2,28 \cdot 10^5$ spores/mL), T5Cfs ($9,51 \cdot 10^5$ spores/mL), et T6Cas ($4,70 \cdot 10^5$ spores/mL).

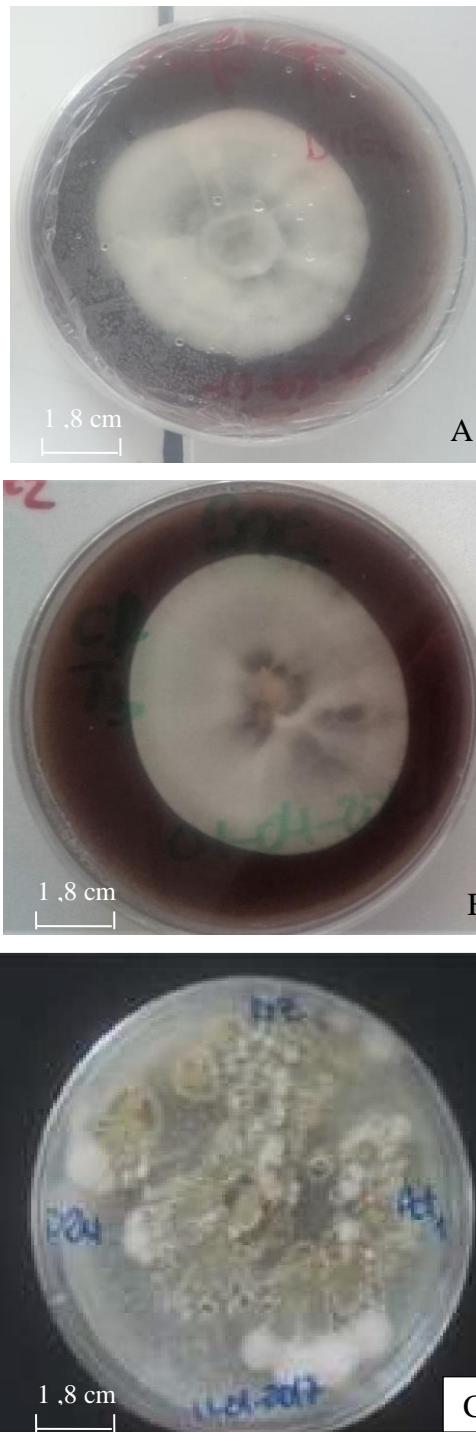


Figure 21 : Aspects macroscopiques des isolats de *Metarhizium anisopliae* âgés 21 jours sur les milieux de culture

A : Milieu à base de cacao et de mélasse présentant un thalle blanc cotonneux,

B : Milieu à base de café présentant un thalle blanc cotonneux,

C : Milieu à base de riz présentant un thalle blanc cotonneux et devenant vert foncé après maturation.

Tableau VIII : Classement de Student Newman et Skeuls du logarithme de la concentration en spores des isolats de *Metarhizium anisopliae* sur les milieux de culture

| Traitements | Logarithme de la concentration |
|-------------|--------------------------------|
| T6Camel | 4,93a |
| T7CaS | 4,97a |
| T6CfS | 5,00a |
| T5CfS | 5,27a |
| T6CaS | 5,27a |
| T4CfS | 5,37b |
| T6Cfmel | 5,53b |
| T3Cfs | 5,60b |
| T2Cfmel | 5,63b |
| T5Camel | 5,67b |
| T5CaS | 5,67b |
| T3Cfmel | 5,69b |
| T4Cfmel | 5,77b |
| T3CfS | 5,90c |
| T5Cfmel | 5,90c |
| T7Camel | 5,90c |
| T4Camel | 5,97c |
| T4CaS | 6,00c |
| T2CfS | 6,03c |
| T3Camel | 6,10c |
| T2CaS | 6,13c |
| T3CaS | 6,13c |
| T2Camel | 6,30d |
| T8Camel | 6,30d |
| T1Cfmel | 6,48d |
| T9Camel | 6,77e |
| T10Camel | 6,83e |
| T11Camel | 6,86e |
| T1Camel | 6,93e |
| PDA | 6,97e |
| RIZ | 7,40f |

Les valeurs suivies d'une même lettre dans une colonne ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon le test de Duncan

Chaque isolat a réagi de manière significativement différente ($p < 0,001$) sur les différents milieux de culture (Annexe 1.3). Les isolats locaux de *Metarhizium anisopliae* ont montré des capacités de sporulation différentes. Trois groupes ont été formés. Ils sont composés de :

- groupe 1 : EGL2 ;
- groupe 2 : DME1, ELIMA A7, EGL2, BAS6, D24, EGL1, BME2 ;
- groupe 3 : BME5, BAS6 ;

La sporulation de chaque isolat varie significativement ($p < 0,001$) en fonction du milieu sur lequel il est mis en culture. En effet, chaque isolat répond, de manière singulière, à un milieu donné. Les isolats BAS6, BME2, BME5, EGL2 et ELIMA A7 ont atteint leur concentration maximale avec le milieu riz. Les isolats D24 et METE se sont montrés plus sporulants sur le milieu PDA. Le milieu T10Camel a permis une meilleure sporulation de l'isolat DME1. L'isolat D23 a, quant à lui, eu la plus forte concentration avec le T1Ca. Le milieu T8Camel a été le milieu le plus sporulant pour l'isolat EGL1. Les milieux T10 Camel et T8 Camel sont ceux qui ont permis d'obtenir les meilleurs rendements sur la majorité des isolats. Les trois meilleurs milieux de sporulation pour chaque isolat sont présentés dans le Tableau IX.

7.3.1 Efficacité de la composition chimique du milieu de culture sur la sporulation de l'isolat BME2

La composition des différents milieux de culture et leur impact sur la concentration du milieu de culture sont étudiés (Tableau X). Le modèle de régression linéaire établi pour la capacité de sporulation de l'isolat BME2 est expliqué à 90% par le carbone et le calcium (Annexe 1.8). La concentration en spore augmente avec la concentration en carbone et celle en calcium (Figure 22). En effet, leur apport au modèle prédit est hautement significatif ($p < 0,0005$). Ce qui nous donne une équation de régression linéaire de la forme :

$$\mathbf{Z = 99x + 2851y - 1,39}$$

Avec :

Z : la concentration en 10^7 spore/ml

X : la concentration massique en carbone

Y : la concentration massique en calcium

Tableau IX : Efficacité des trois meilleurs milieux de culture pour la sporulation des isolats *Metarhizium anisopliae*

| Isolats | Milieux de culture | Concentrations moyennes en spores (10⁷ spores/ml) | Rang par ordre d'efficacité décroissante |
|-----------------|---------------------------|---|---|
| BAS6 | RIZ | 1,71E+07 | 1 |
| | T10Camel | 1,60E+07 | 2 |
| | T3Camel | 1,09E+07 | 3 |
| BME2 | RIZ | 3,54E+07 | 1 |
| | T8Camel | 2,08E+07 | 2 |
| | T9Camel | 1,72E+07 | 3 |
| BME5 | RIZ | 4,32E+07 | 1 |
| | PDA | 1,89E+07 | 2 |
| | T8Camel | 1,06E+07 | 3 |
| D23 | T1Camel | 8,50E+07 | 1 |
| | T10Camel | 2,48E+07 | 2 |
| | RIZ | 2,38E+07 | 3 |
| D24 | PDA | 3,42E+07 | 1 |
| | RIZ | 1,70E+07 | 2 |
| | T10Camel | 4,93E+06 | 3 |
| DME1 | T10Camel | 2,52E+07 | 1 |
| | T9Camel | 2,07E+07 | 2 |
| | T8Camel | 1,63E+07 | 3 |
| EGL1 | T8Camel | 1,12E+07 | 1 |
| | RIZ | 1,03E+07 | 2 |
| | T9Camel | 7,86E+06 | 3 |
| EGL2 | RIZ | 4,76E+07 | 1 |
| | PDA | 1,21E+07 | 2 |
| | T1Camel | 1,14E+07 | 3 |
| ELIMA A7 | RIZ | 6,00E+07 | 1 |
| | T10Camel | 1,14E+07 | 2 |
| | PDA | 1,11E+07 | 3 |
| METE | PDA | 4,60E+07 | 1 |
| | RIZ | 3,82E+07 | 2 |
| | T8Camel | 6,28E+06 | 3 |

Tableau X : Composition chimique des milieux de culture

| Milieux | Azote (g/L) | Carbone (g/L) | Calcium (g/L) | C /N | Concentration en spores (10⁷spore/ml) |
|------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|---|
| Riz | 0,00166 | 0,01500 | 0,00110 | 182,10 | 3,54E+07 |
| T1_Camel | 0,00028 | 0,01582 | 0,00012 | 56,90 | 4,68E+06 |
| T2_Camel | 0,00029 | 0,01554 | 0,00011 | 54,41 | 2,51E+06 |
| T3_Camel | 0,00030 | 0,01512 | 0,00010 | 45,88 | 9,64E+06 |
| T4_Camel | 0,00031 | 0,01441 | 0,00008 | 34,85 | 1,70E+06 |
| T5_Camel | 0,00033 | 0,01371 | 0,00006 | 23,83 | 1,93E+06 |
| T6_Camel | 0,00033 | 0,01328 | 0,00005 | 52,49 | 8,22E+05 |
| T7_Camel | 0,00034 | 0,01300 | 0,00004 | 12,80 | 5,22E+06 |
| T8_Camel | 0,00062 | 0,02882 | 0,00016 | 34,85 | 2,08E+07 |
| T9_Camel | 0,00042 | 0,02102 | 0,00014 | 44,30 | 1,72E+07 |
| T10_Camel | 0,00031 | 0,01712 | 0,00012 | 52,89 | 1,17E+07 |
| T11_Camel | 0,00030 | 0,01647 | 0,00012 | 54,80 | 4,94E+06 |
| T1_Cfmel | 0,00900 | 0,00034 | 0,00022 | 45,30 | 1,31E+06 |
| T2_Cfmel | 0,00813 | 0,00161 | 0,00020 | 42,05 | 3,33E+05 |
| T3_Cfmel | 0,00684 | 0,00351 | 0,00018 | 37,18 | 9,83E+05 |
| T4_Cfmel | 0,00467 | 0,00667 | 0,00013 | 29,05 | 5,12E+06 |
| T5_Cfmel | 0,00251 | 0,00984 | 0,00009 | 20,93 | 4,52E+05 |
| T6_Cfmel | 0,00121 | 0,01173 | 0,00006 | 16,05 | 1,37E+06 |

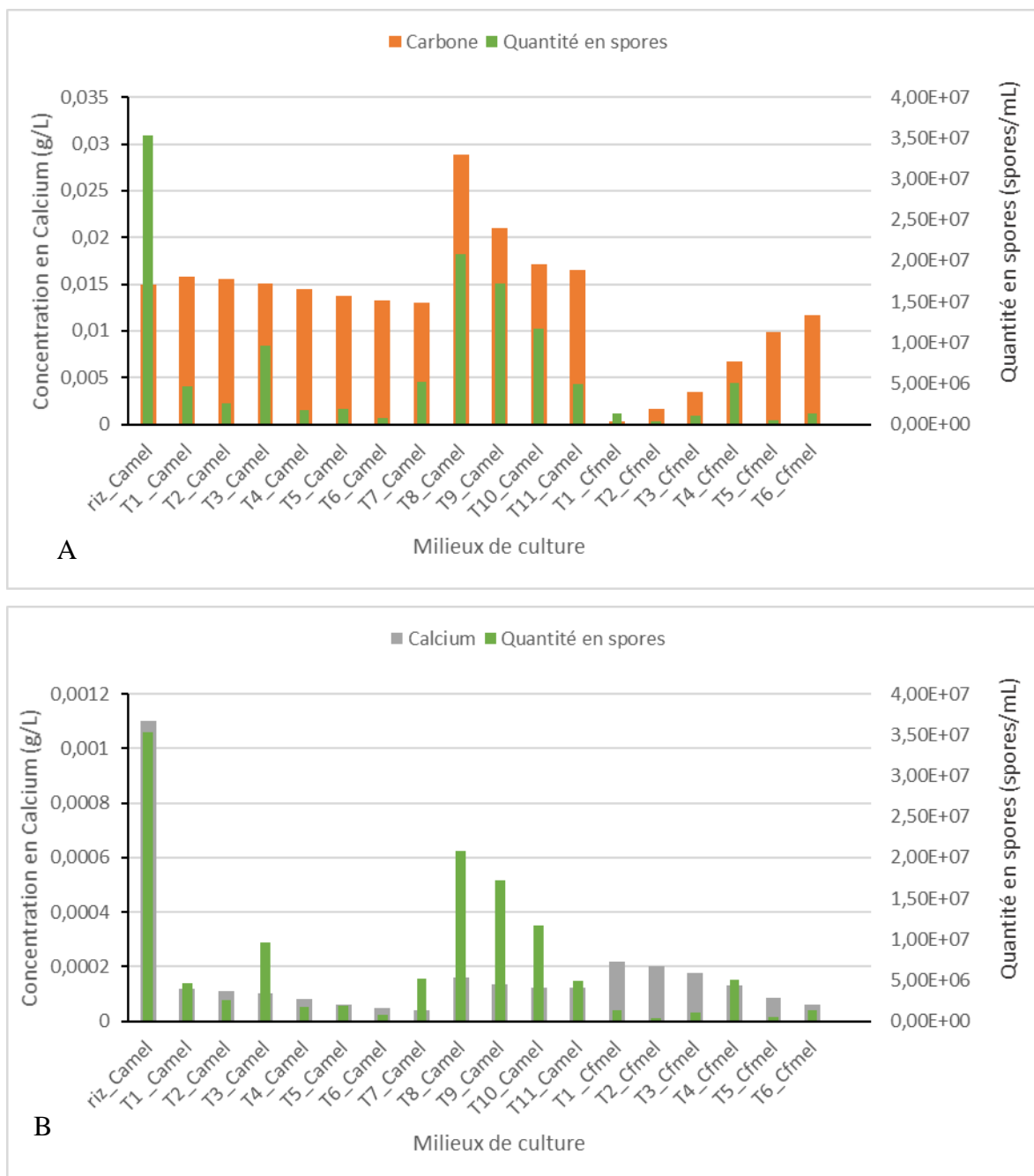


Figure 22 : Effet de la concentration en carbone et en calcium des milieux de culture sur la quantité de spore produite par *Metarhizium anisopliae*

A : Concentrations en spores et en carbone pour chaque milieu de culture

B : Concentrations en spores et en calcium pour chaque milieu de culture

7.4 Efficacité de l'activation des isolats locaux de *M. anisopliae* sur les caractères pathogéniques

L'influence de l'activation des isolats a été étudiée sur deux volets : l'effet de l'activation sur les caractéristiques pathogéniques des isolats et l'effet de l'interaction activation-isolats.

7.4.1 Effet de l'activation des isolats locaux de *M. anisopliae* sur le taux de mortalité des adultes de *Cosmopolites sordidus*

7.4.1.1. Effet de l'activation des isolats sur le temps léthal pour 100 % des charançons

L'activation a permis, de manière générale, de réduire le TL100 de l'ensemble des isolats (Figure 23). Les différentes activations ont montré un effet statistiquement différent ($p < 0,05$) sur le TL100 des isolats. L'activation 2 a permis d'obtenir des TL100 plus rapides chez 60 % des isolats. Tandis que l'activation 3 a permis une réduction du TL100 chez 40 % des isolats. Par ailleurs, les isolats ont présenté des agressivités différentes ($p < 0,001$) selon le type d'activation réalisé (Annexe 1.3).

Ainsi, trois groupes ont pu être distingués pour l'ensemble des trois activations :

- le premier groupe est constitué des isolats METE, D23, ELIMA A7 et BME2 au TL100, relativement rapides avec une moyenne de 8 jours. Ils ont obtenu une réduction du temps léthal avec l'activation 3 ;
- le deuxième groupe est constitué de l'isolat BME5, BAS6, D24, DME1 avec une moyenne de 9 jours. Ils ont obtenu une réduction du temps léthal avec les activations 2 et 3 ;
- le troisième groupe est constitué des isolats EGL1 et EGL2, qui se sont révélés être les moins agressifs, pour l'ensemble des activations avec une moyenne de 10 jours. Ils ont obtenu une réduction du temps léthal avec l'activation 2.

7.4.1.2 Effet de l'activation sur le TL50

L'activation a permis de réduire le TL50 de l'ensemble des isolats (Figure 24). Les différentes activations ont montré un effet statistiquement différent ($p < 0,001$) sur le TL50 des isolats (Annexe 1.4). Elles ont permis selon les isolats de régénérer le TL50. L'activation 2 a permis une réduction du TL50 chez cinq (5) isolats. L'activation 3 quant à elle, a permis une réduction pour un seul isolat. L'activation 1 a permis de réduire le temps léthal pour trois (3).

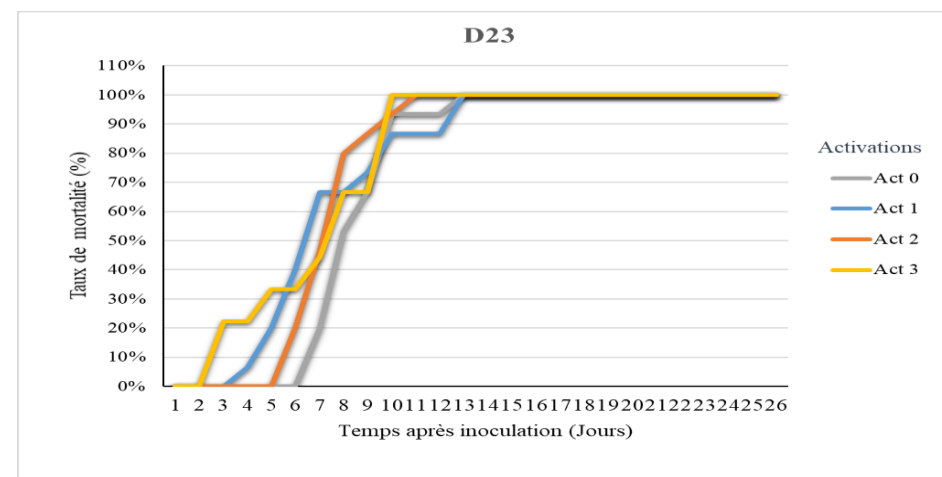
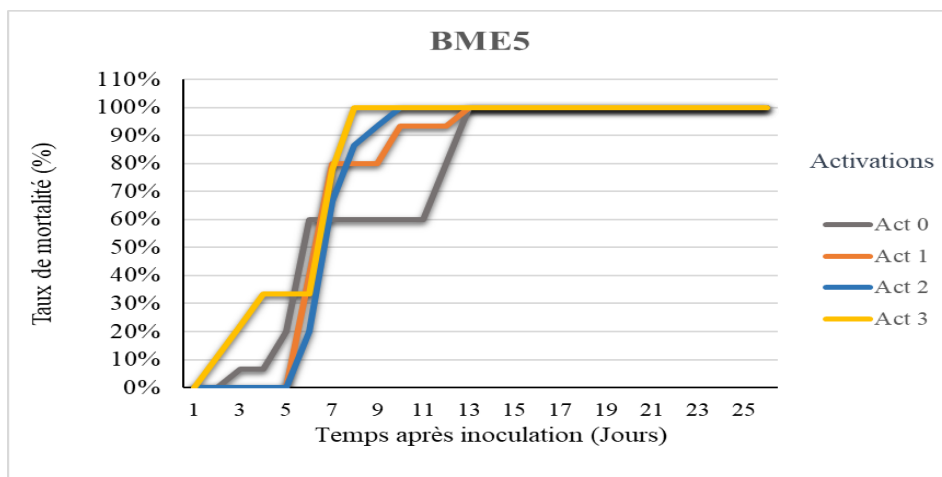
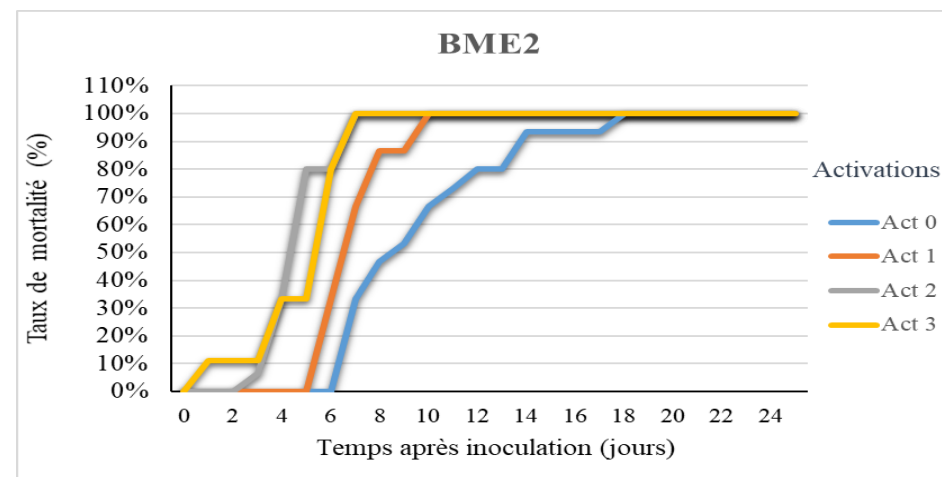
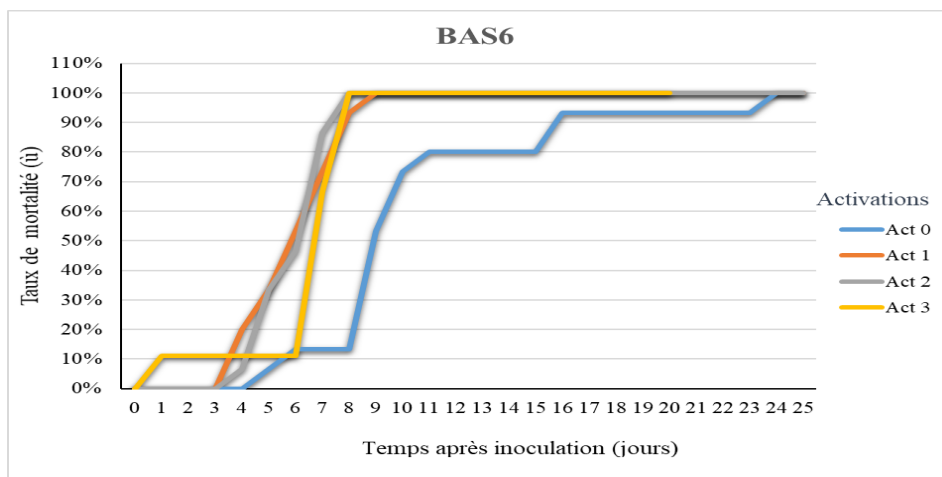


Figure 23 : Variation du taux de mortalité des adultes de *Cosmopolites sordidus* inoculés par marche sur les colonies de cultures des dix isolats locaux de *Metarhizium anisopliae* activés et non-activés

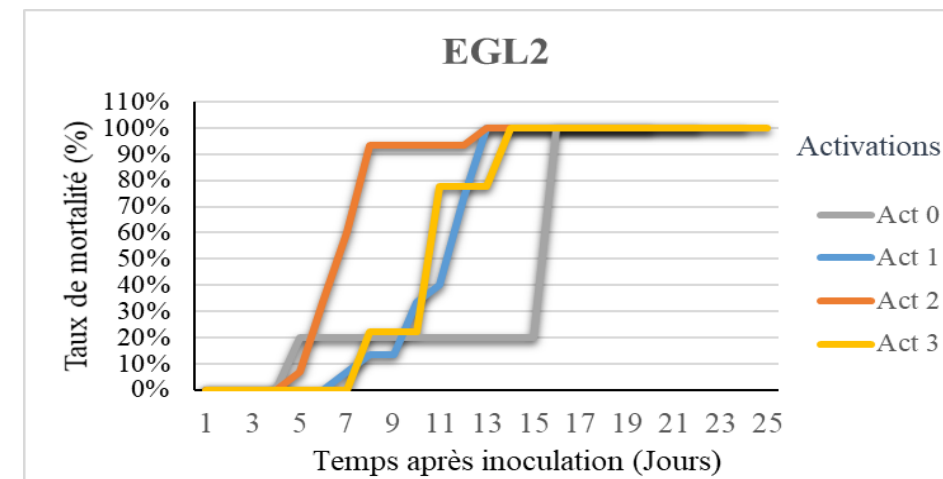
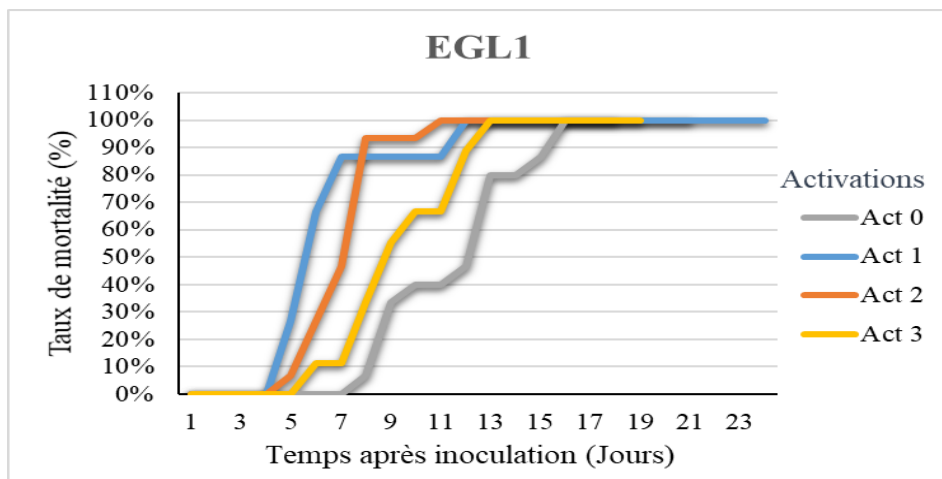
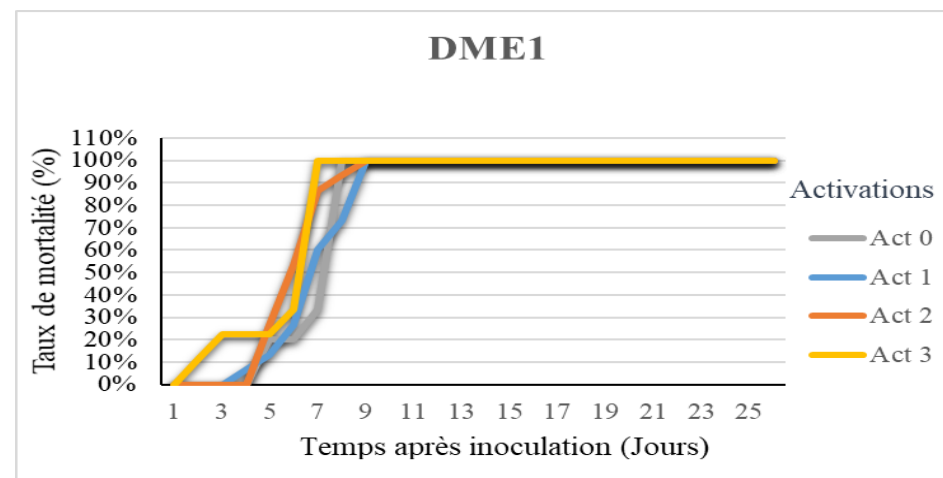
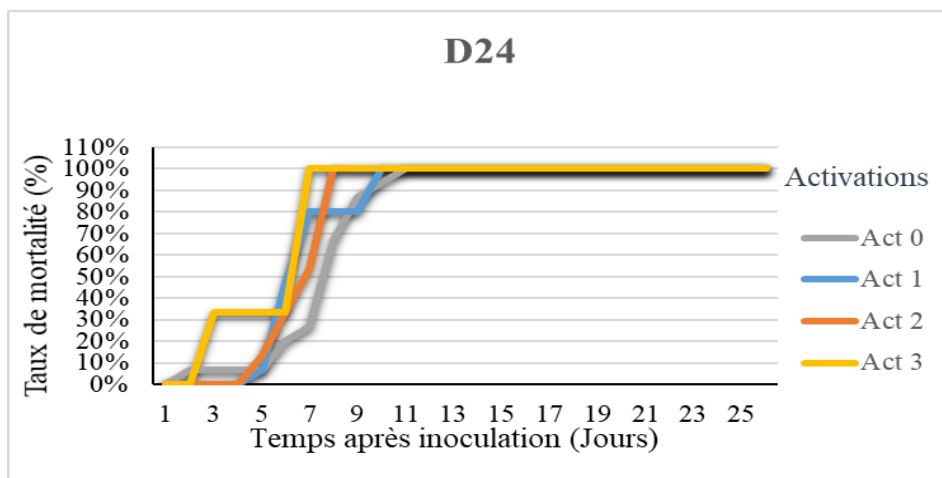


Figure 23 : (suite)

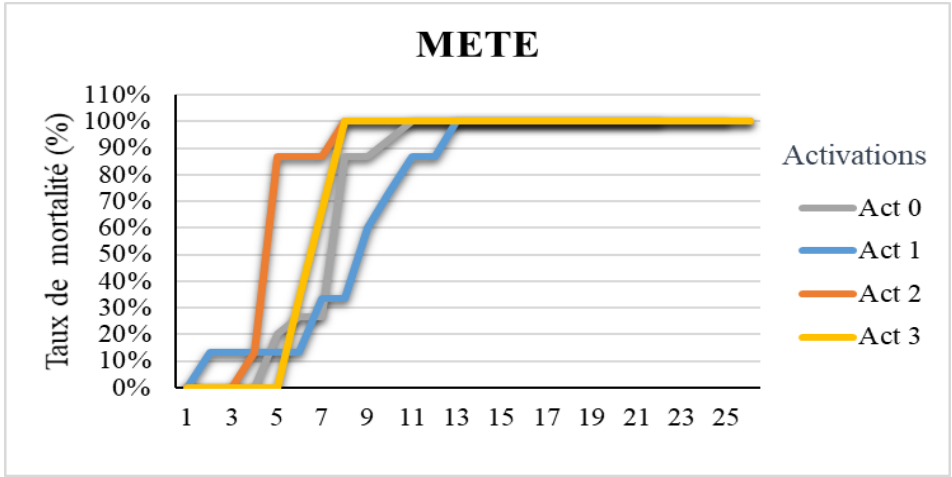
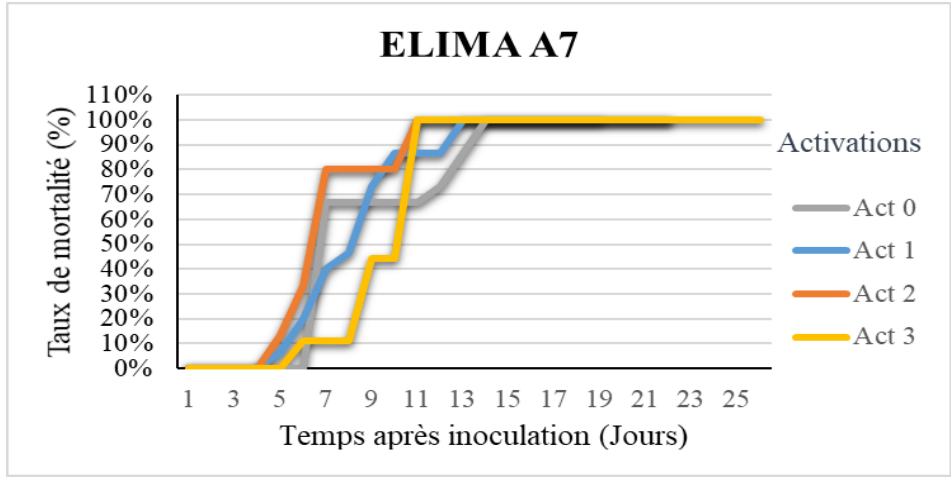


Figure 23 : Variation du taux de mortalité des adultes de *Cosmopolites sordidus* inoculés par marche sur les colonies de cultures des dix isolats locaux de *Metarhizium anisopliae* activés et non-activés

D'autre part, les isolats ont montré des capacités différentes de TL50 ($p < 0,001$). En conséquence, quatre groupes ont pu être distingués :

- le premier groupe est constitué des isolats DME1, BME2, ELIMA A7, EGL2 et METE très rapide, avec une moyenne de 5,7 jours. Ils ont obtenu une réduction du temps létal avec l'activation 2 ;
- le deuxième groupe est constitué des isolats D24 au TL50, rapide, avec une moyenne de 6,1 jours ; Ils ont obtenu une réduction du temps létal avec l'activation 3 et 1.
- le troisième groupe est constitué des BAS6, D23, et EGL1. Ils ont obtenu une réduction du temps létal avec l'activation 1.
- le quatrième groupe est constitué de l'isolat BME5 sur lequel les différentes activations n'ont eu aucun effet.

7.4.2 Effet de l'activation sur le délai d'apparition du duvet mycélien des isolats de *Metarhizium* sp. sur les adultes de *C. sordidus* morts

L'activation a permis, pour la majorité des isolats, de réduire progressivement le délai d'apparition du duvet mycélien (Figure 24). Le délai d'apparition du duvet est passé, en moyenne, de 3,28 jours pour la non activation, à 2,11 jours pour l'activation 3.

Les différentes activations ont montré un effet statistiquement différent sur le délai d'apparition du duvet mycélien ($p=0,000$).

Le délai d'apparition du duvet mycélien, pour l'ensemble des isolats, a été significativement ($p=0,001$) influencé par les différentes activations réalisées.

Les isolats ont réagi différemment aux activations ($p=0,000$) (Annexe 1.12). Les isolats BME5 et EGL1 ont obtenu leur meilleur délai d'apparition du duvet mycélien au cours de la seconde activation. Tandis que pour l'isolat D24, l'absence d'activation (Act 0) s'est révélée être plus adéquate. Ainsi, trois (3) groupes ont pu être distingués :

- le premier groupe est constitué des isolats METE et BME2 qui ont un délai d'apparition du duvet relativement rapide de 2 jours. Ils ont obtenu une réduction du délai d'apparition du duvet mycélien avec l'activation 3.
- le deuxième groupe est constitué des isolats BAS6, EGL1, et BME5 qui présentent, en moyenne, un délai d'apparition moyen de 2,7 jours. Pour ces isolats, les activations 2 et 3 ont permis une réduction du délai d'apparition.
- le troisième groupe est constitué des isolats DME1, EGL2, et ELIMA A7 qui présente, en moyenne, un délai d'apparition du duvet lent de 3,1 jours. Les trois activations ont permis une réduction progressive du délai d'apparition.
- le quatrième groupe est constitué de l'isolat D24. Les différentes activations n'ont eu aucun effet sur le délai d'apparition du délai d'apparition.

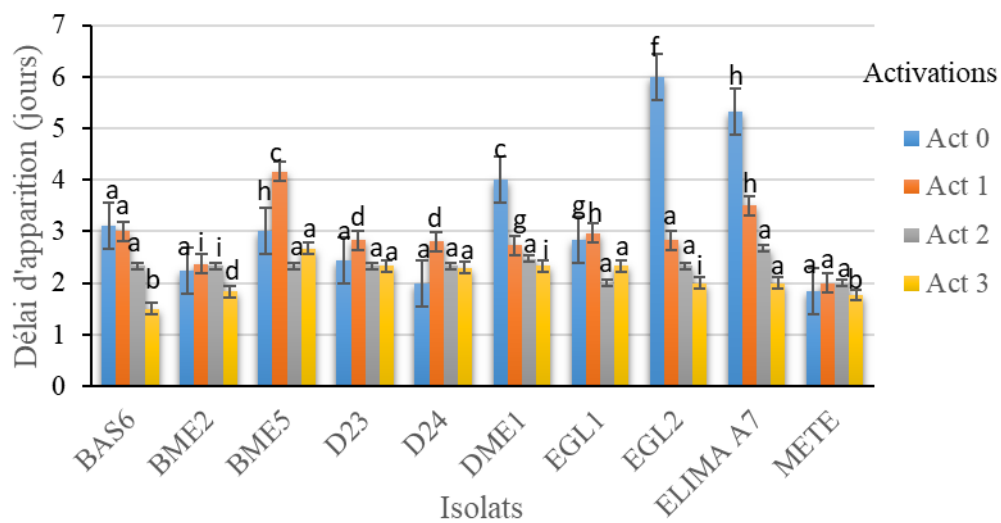


Figure 24 : Effet de l'activation sur le délai d'apparition du duvet mycélien des isolats de *Metarhizium anisopliae* sur les adultes de *Cosmopolites sordidus* morts

Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon la classification de Fisher

7.4.3 Effet de l'activation sur la croissance radiale isolats de *Metarhizium anisopliae*.

Les différentes activations ont eu un effet significatif ($p=0,001$) sur la croissance radiale des isolats (Annexe 1.11). La croissance radiale des isolats est différente ($p=0,000$). Elle est passée, en moyenne de 1,61mm/jour en absence d'activation (Act 0) à 1,94 mm/jour pour l'Activation 3 (Figure 25). L'isolat EGL1 a obtenu une vitesse de croissance radiale plus élevée avec l'activation 1. Les autres isolats ont obtenu une vitesse de croissance radiale maximale avec l'activation 3.

En conséquence, deux groupes ont pu être distingués :

- le premier groupe est constitué des isolats BAS6, BME2, ELIMA A7 et METE à croissance lente avec, une vitesse 1,7 mm/jour respectivement. La croissance radiale augmente avec l'activation 3.
- le deuxième groupe comprend l'isolat METE pour qui les différentes activations ont permis d'améliorer progressivement la croissance radiale. La vitesse moyenne a été de 1,8 mm/jour.

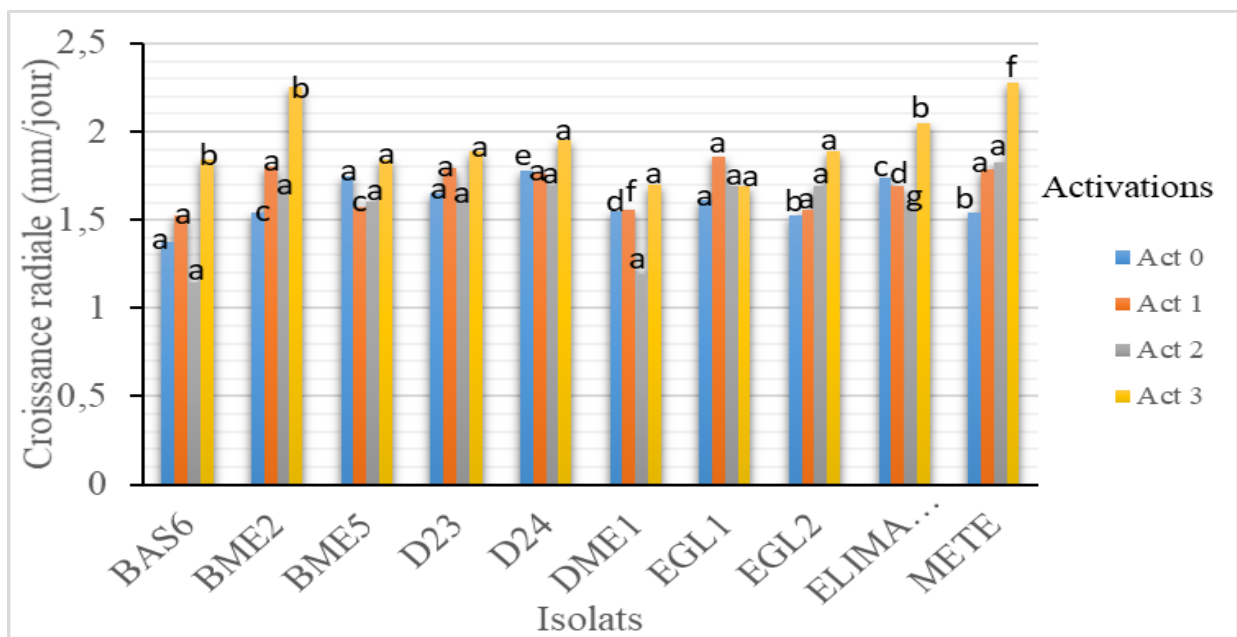


Figure 25 : Effet de l'activation sur la croissance radiale des isolats de *Metarhizium anisopliae* sur les adultes de *Cosmopolites sordidus* morts

Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon la classification de Fisher

7.4.4 Effet de l'activation sur la sporulation des isolats de *Metarhizium* sp.

La capacité de sporulation a varié selon l'isolat et le type d'activation (Figure 26). La concentration en spores des inocula de chaque isolat a augmenté, en moyenne de $1,55.10^7$ spores/ml, en absence d'activation à $4,46.10^7$ spores/ml à la seconde activation et à $2,32.10^7$ spores/ml au cours de la troisième activation. La seconde activation a été plus bénéfique à l'augmentation de la capacité de sporulation des différents isolats de façon générale. La capacité de sporulation pour la seconde activation a été multipliée par 15 pour l'isolat BME2 et par 20 l'isolat D23. Seuls les isolats DME1 et BAS6 ont été plus sporulant au cours de la troisième activation. Ils ont vu leur capacité multipliée par 1,57 pour BAS6 et 3,86 pour DME1.

Les différentes activations ont montré un effet différent ($p=0,000$) sur la concentration en spores (Annexe 1.5). D'autre part, les isolats ont montré des capacités différentes ($p=0,000$) de sporulation. Ainsi, 3 groupes ont pu être distingués :

- le premier groupe est constitué des isolats BME2, D23, DME1 et EGL2 pour qui toutes les activations ont permis d'augmenter progressivement la concentration en spores.
- le deuxième groupe est constitué de l'isolat BAS6 pour qui seule la troisième activation a favorisé une augmentation significative de la concentration en spore.
- le troisième groupe est constitué des isolats BME5, D24 et METE pour qui seule la seconde activation a favorisé une augmentation significative de la concentration en spore.
- le quatrième groupe est constitué des isolats EGL1 et ELIMA A7 pour qui la première et la seconde activation ont favorisé une augmentation significative de la concentration en spores.

L'activation a permis une restauration progressive des isolats de *Metarhizium* sp, conservés depuis plus de 3 ans en laboratoire sur les milieux artificiels. En effet, elle a permis de raccourcir, à la fois, les TL100 et TL50 de l'ensemble des isolats éprouvés ainsi que le délai d'apparition du duvet mycélien sur les charançons morts. L'activation a permis aussi d'accroître la capacité de sporulation de 90 % des isolats.

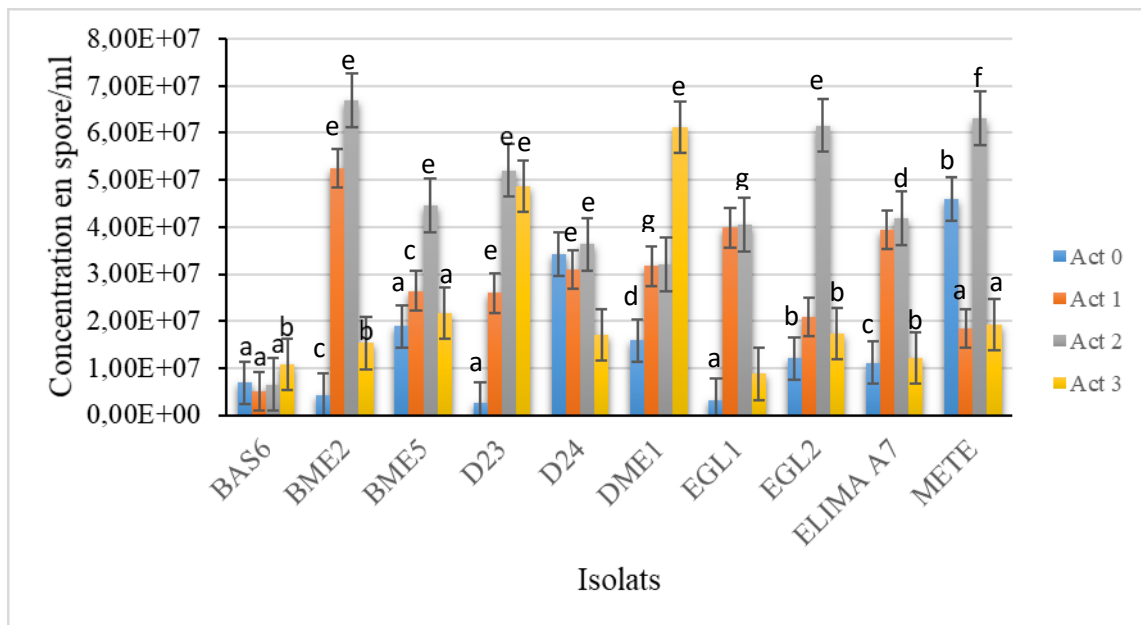


Figure 26 : Effet de l'activation sur la sporulation des isolats de *Metarhizium anisopliae*. sur les adultes de *Cosmopolites sordidus* morts

Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes au seuil de 5% selon la classification de Fisher

7.5 Restauration des capacités pathogéniques des isolats et choix de l'isolat d'intérêt

L'analyse en composante principale (ACP) et la classification ascendante hiérarchique (CAH) ont été utilisées pour retenir l'isolat et l'activation qui conviennent à une production en masse du *Metarhizium anisopliae*. L'analyse des résultats a mis en évidence que la majeure partie des informations est expliquée par les deux premiers axes factoriels. On ne retient que les axes associés à des valeurs propres supérieures à 1 (critère de KAISER), en l'occurrence les axes (1 et 2). Dans le plan factoriel F1xF2, les valeurs propres des deux composantes F1 et F2 et leur contribution à l'inertie totale sont représentées dans l'annexe 1.6. Les deux axes, pris en considération pour décrire les corrélations entre les variables liées aux structures spatiales, détiennent, à eux seuls, 62,069 % de l'information totale, avec respectivement 44,849 % pour l'axe 1 et 17,220% pour l'axe 2 (Annexe 1.6). L'axe 1 est exprimé vers son pôle positif par la TL50 et la TL100 et vers son pôle négatif par la concentration en spores (Tableau XI). Il oppose les isolats présentant une toxicité élevée à ceux ayant une concentration en spores élevée. Tandis que l'axe 2 est défini par le délai d'apparition du duvet mycélien vers son pôle positif. L'examen de la matrice de corrélation (Tableau XII) entre le T150 et la T1100 montre une corrélation positive. Elles sont moyennes entre la TL50, et la TL100 (0,665), et faibles entre la concentration et les différentes toxicités (0,286 et 0,361). La structure typologique dégagée par le plan F1 X F2 est le regroupement des isolats en trois groupes (Figure 27) selon les paramètres étudiés. Cette distinction de groupes montre que la concentration en spores et la toxicité des isolats sont des variables corrélées négativement.

Tableau XI : Caractéristiques de l'ACP appliquée aux données relevés sur les différents isolats activés et non activés après rotation Varimax

| Paramètres | Composantes | |
|---|--------------|-------------|
| | 1 | 2 |
| Concentration (spore/ml) | -,590 | -,312 |
| TI50 | ,838 | ,001 |
| TI100 | ,880 | -,053 |
| Délai d'apparition du duvet mycélien (jour) | -,007 | ,943 |
| Croissance radiale (mm/jour) | -,353 | ,203 |

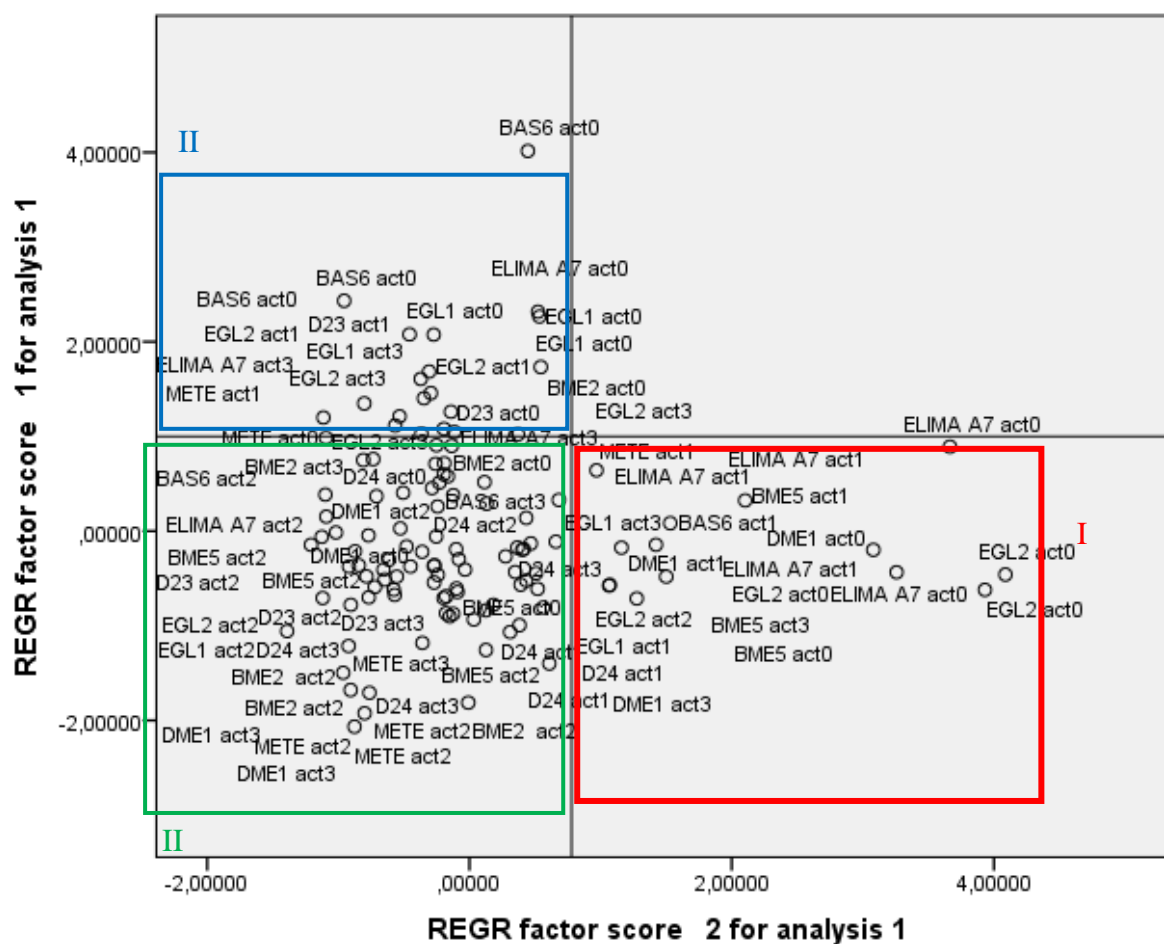


Figure 27 : Carte factorielle des isolats locaux de *Metarhizium anisopliae*

Tableau XII : Matrice de corrélation entre les variables étudiées

| | | Cr | TL50 | TL100 | Del | Crrad |
|-------------|-------|-------|-------------|-------|-------|-------|
| Corrélation | Cr | 1,000 | -,286 | -,351 | -,086 | ,088 |
| | tl50 | -,286 | 1,000 | ,665 | ,022 | -,120 |
| | tl100 | -,351 | ,665 | 1,000 | -,022 | -,193 |
| | Del | -,086 | ,022 | -,022 | 1,000 | ,003 |
| | crrad | ,088 | -,120 | -,193 | ,003 | 1,000 |

Cr : Concentration en spores/ml ; Del : Délai d'apparition du duvet mycélien ; Crrad : Croissance radiale ; TL50 : temps léthal pour 50% de la population, TL100 : temps léthal pour 100% de la population.

7.5.1 Regroupement des isolats activés et non-activés selon leurs caractéristiques pathogéniques

L'ensemble des paramètres pathogéniques couplés aux coordonnées des axes obtenus dans l'ACP ont permis de classer les isolats grâce à une classification hiérarchique ascendante (Figure 28). La classification a été réalisée selon la méthode de la distance unique à partir de distances euclidiennes. Ainsi, sur le dendrogramme obtenu, six classes se matérialisent à la troncature 10. L'isolat BME2 activé deux fois est celui qui se distingue au niveau des différents paramètres de l'étude. Cet isolat est celui qui allie la capacité de sporulation et la capacité de virulences. Il est celui qui présente les meilleurs paramètres en vue de la production de masse.

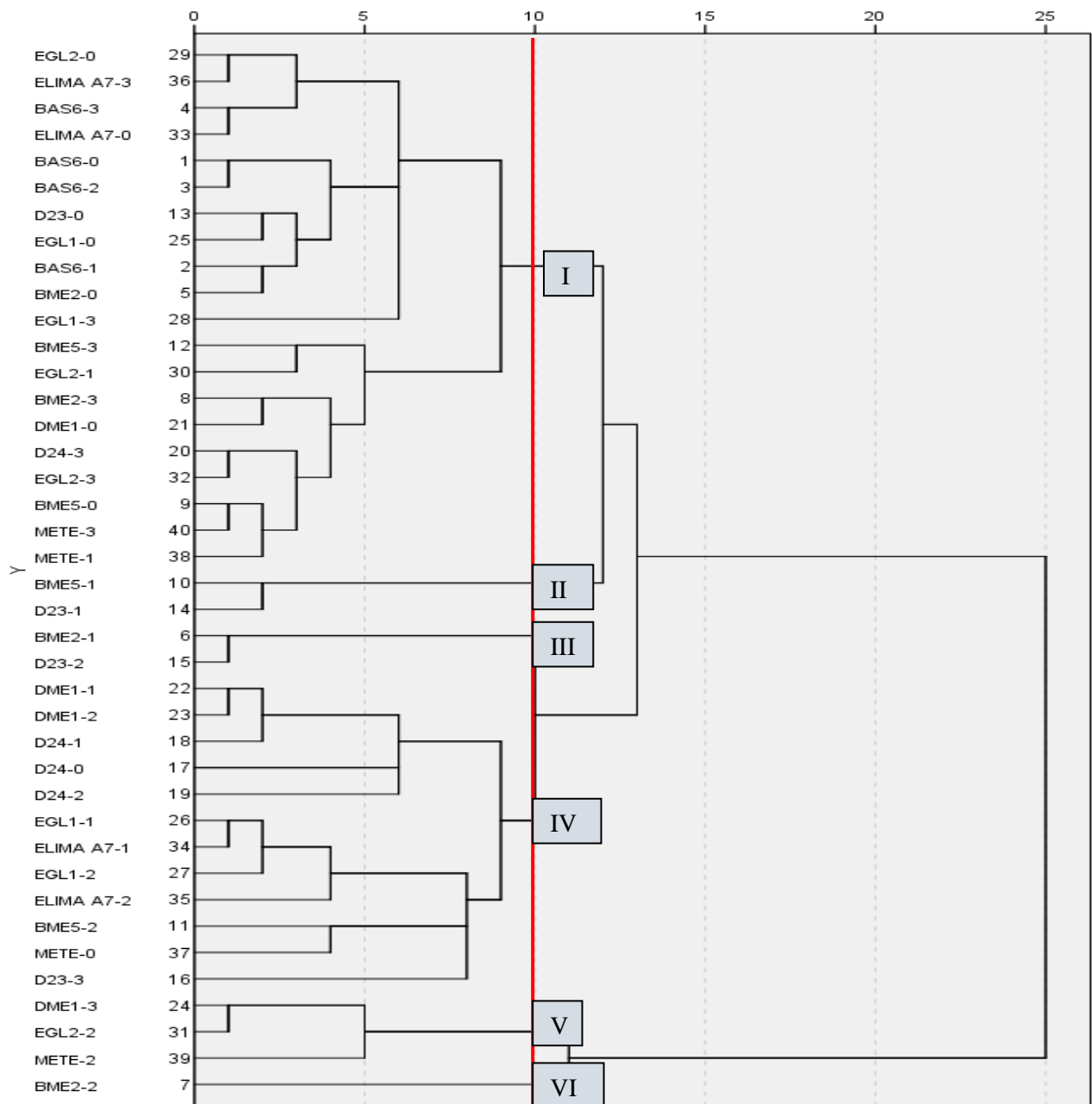


Figure 28 : Dendrogramme de classification hiérarchique des isolats de *Metarhizium anisopliae* activés et non-activés

7.6 Efficacité des traitements pesticides contre le charançon noir du bananier

7.6.1 Efficacité des traitements pesticides dans les parcelles en jachère

Les essais avaient pour objectif d'identifier une méthode de lutte permettant d'assainir les parcelles. Cela en vue de garantir une replantation quasi indemne de l'effet néfaste du charançon noir par une baisse du coefficient d'infestation en dessous du seuil d'intervention de 5 %. Bien que, statistiquement, aucune différence n'a été établie, les parcelles ont montré des réactions différentes aux traitements réalisés (Annexe 1.14). La mise en jachère des parcelles, couplée aux traitements réalisés, a permis de réduire de 55 % les taux d'infestation des bananiers par les charançons à la replantation.

A la plantation de SAKJ, six mois après la récolte, la sévérité des attaques, le coefficient d'infestation, dans la parcelle non traitée atteint le seuil (= 5) qui implique une application d'insecticide. Sur les parcelles ayant bénéficié du traitement T_{1J} (application du champignon et de la phéromone), le coefficient d'infestation est de 1,5. Il a permis une réduction de 60 % du coefficient d'infestation. Pour les parcelles ayant reçu le traitement T_{2J} (application de phéromone + ramassage) ce coefficient est de 0,75. Il a permis une réduction de 50 % du coefficient d'infestation dans ces parcelles, la sévérité des attaques est largement en dessous du seuil 5 (Figure 29 A).

Ces résultats vont de pair avec le taux de bananiers attaqués dans les parcelles traitées par le champignon et la phéromone. Ce taux est en dessous de 10 % (seuil de déclenchement d'application insecticide) tandis que dans la parcelle témoin, ce seuil a été atteint dès le 4^e mois. Au 6^e mois, le pourcentage de bananiers attaqués a été de 15 % largement au-dessus du seuil 10 % induisant un traitement insecticide dans les parcelles non-traitées (Figure 29 B).

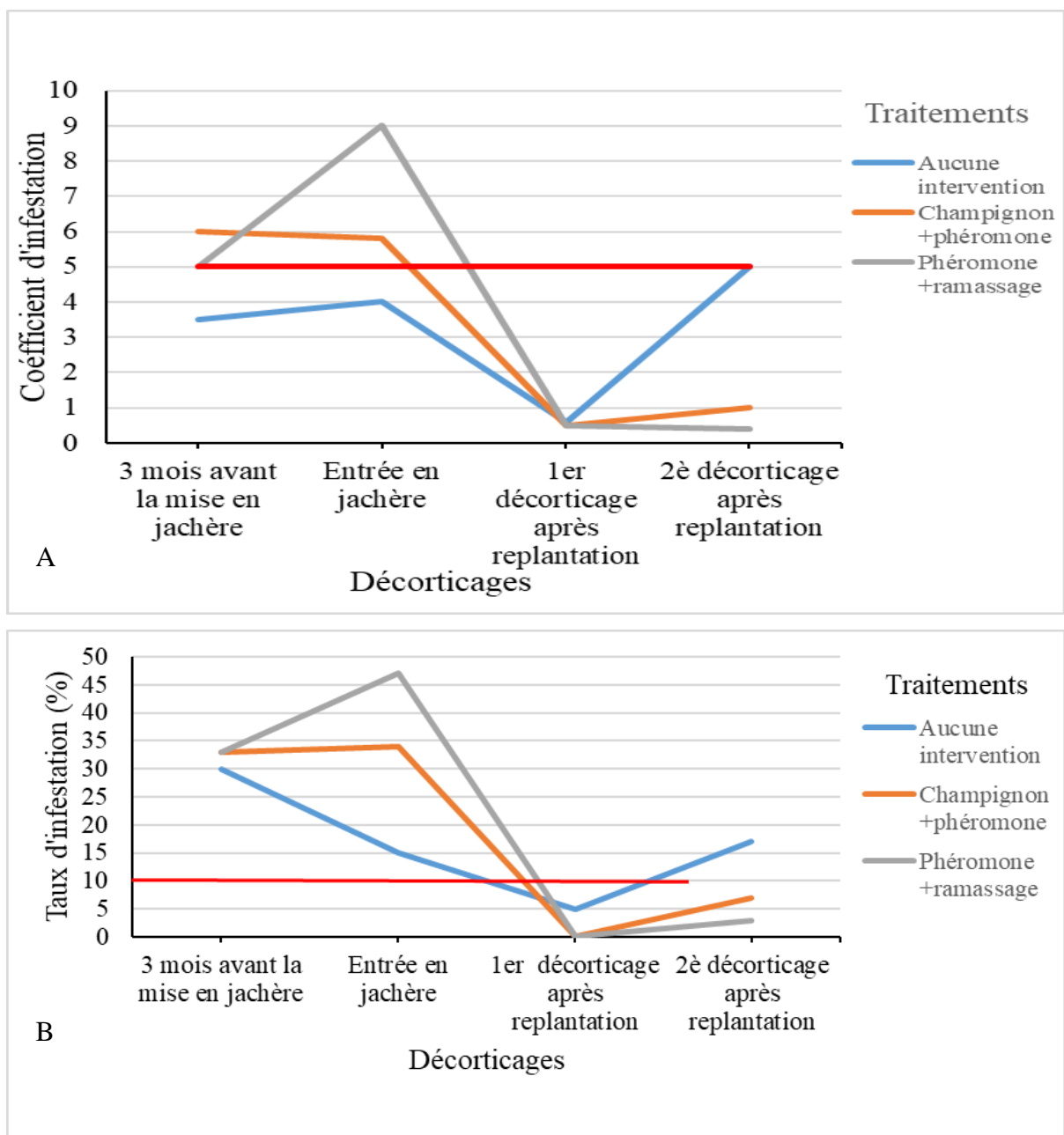


Figure 29 : Effet des traitements sur le coefficient et sur le taux d'infestation des charançons noirs avant et après la mise en jachère des parcelles à SAKJ

— Seuil d'intervention

A : Effet des traitements sur le coefficient d'infestation

B : Effet des traitements sur le pourcentage d'infestation

7.6.2 Efficacité des traitements pesticides sur les parcelles en production

Les essais avaient pour objectif d'identifier une méthode de lutte permettant d'assainir les parcelles. Cela en vue d'assurer une baisse des différents paramètres en dessous du seuil d'intervention. Trois paramètres ont été mesurés sur l'ensemble des plantations : le coefficient d'infestation et le taux d'infestation. Le niveau d'infestation a été variable selon les plantations. Les traitements ont eu des effets différents dans les différentes plantations ($p < 0,001$). Les plantations ont eu des réactions différentes face aux traitements appliqués ($p < 0,001$). Il existe une interaction ($p < 0,001$) entre les traitements et les plantations (Annexe 1.13).

7.6.2.1 Coefficient d'infestation des plantations

L'utilisation du coefficient d'infestation donne des informations sur l'efficacité relative ou absolue des traitements étudiés dans différentes plantations.

A la plantation SCB BANCOMOÉ, le traitement T_{3P}, traitement chimique sur avertissement biologique, a été le plus performant sur l'ensemble des décorticages (Figure 30 A). Il a permis une réduction de 18 % du coefficient d'infestation. La 2^e application de l'Imidacoprid (T_{3P}), 9 mois après la mise en place de l'essai, a permis d'avoir des infestations presque nulles (4^e décorticage) dans les parcelles abritant ce traitement. Toutefois, cet effet a été de courte durée, avec une augmentation rapide des infestations après le 4^e décorticage en août 2013 faisant passer le coefficient de 0 à 10. Une 3^e application de l'insecticide a été donc nécessaire. Il est suivi des traitements : T_{2P} ou application du traitement systémique et de l'inoculum (8,29 %), T_{1P} ou application du champignon (35,38 %), et T_{4P} ou application mensuelle du champignon et piégeage (4,05 %).

A la plantation SAKJ, le traitement T_{3P}, application du traitement chimique sur avertissement biologique, a été le plus performant sur l'ensemble des décorticages (Figure 30 B). Il a permis de réduire le coefficient d'infestation en moyenne de 82,9 %. Il est suivi des traitements : T_{2P} (70 %), T_{1P} (62,22 %), et T_{4P} (-124,24 %). L'augmentation du coefficient d'infestation pour le traitement T_{2P}, 12 mois après l'application du Thiamethoxam a été faible. L'application d'appui du champignon a été réalisée après 18 mois. Cette application successive, durant trois mois du champignon, suite à la remontée du coefficient d'infestation constatée au 5^e décorticage en décembre 2013, a baissé le coefficient d'infestation.

A la plantation SPDCIE, le traitement T_{4P} a été le plus performant. Il a permis de faire baisser le coefficient d'infestation en dessous du seuil (Figure 30 C). Il a permis de réduire le

coefficient d'infestation en moyenne de 35 %. Il est suivi des traitements : T_{3P} (65,5 %), T_{2P} (72,5 %), et T_{1P} (35 %).

7.6.2.2 Taux d'infestation des plantations par le charançon noir

Les traitements ont eu des efficacités variées sur les différentes plantations (Figure 31)

A la plantation SCB BANCAMOÉ, le traitement T_{3P} fait baisser le taux d'infestation en dessous du seuil au quatrième décorticage (Figure 31 A). Il a permis une réduction de 15,15 % sur l'ensemble des décorticages tout en conservant le taux d'infestation en dessous du seuil d'intervention. Aucun des autres traitements n'a pu engendrer une baisse du taux d'infestation en dessous du seuil d'intervention. La deuxième application de l'Imidacoprid, 9 mois après la mise en place de l'essai, a permis d'avoir des infestations presque nulles (au 4^e décorticage) dans les parcelles abritant ce traitement. Une 3^e application de l'insecticide a été donc nécessaire. Il est suivi des traitements : T_{2P} ou application du traitement systémique + application mensuelle du champignon (17,78 %), T_{4P} ou application mensuelle du champignon et piégeage (9,33 %), et T_{1P} ou application du champignon (-15,68 %).

A la plantation SAKJ, le traitement T_{2P} a été le plus performant des traitements utilisés. Il a pu baisser le taux d'infestation en dessous du seuil (Figure 31 B). Il a été le plus performant sur l'ensemble des décorticages. Il a permis de réduire le taux d'infestation de 23,70 %. Il est suivi des traitements : T_{3P} (78,33 %), T_{4P} (25,33 %) et T_{1P} (32,63 %). Au niveau du traitement T_{3P}, l'effet du Thiamethoxam a été persistant, même si une légère remontée des infestations est observée.

A la plantation SPDCIE, où les niveaux des paramètres d'infestation ont été parfois en dessous des seuils, le traitement T_{4P} a été le plus performant (Figure 31 C). Il a permis une réduction de 25,73 %. Il est suivi des traitements : T_{3P} (61,69 %), T_{2P} (67,23 %), et T_{1P} (-5 %). L'effet du Thiamethoxam, en traitement T_{3P}, a été persistant, même si une légère remontée des infestations a été observée. Au niveau du traitement T_{2P}, l'augmentation des niveaux d'infestation, 12 mois après l'application du Thiamethoxam a été faible. L'application d'appui du champignon a été réalisée après 18 mois.

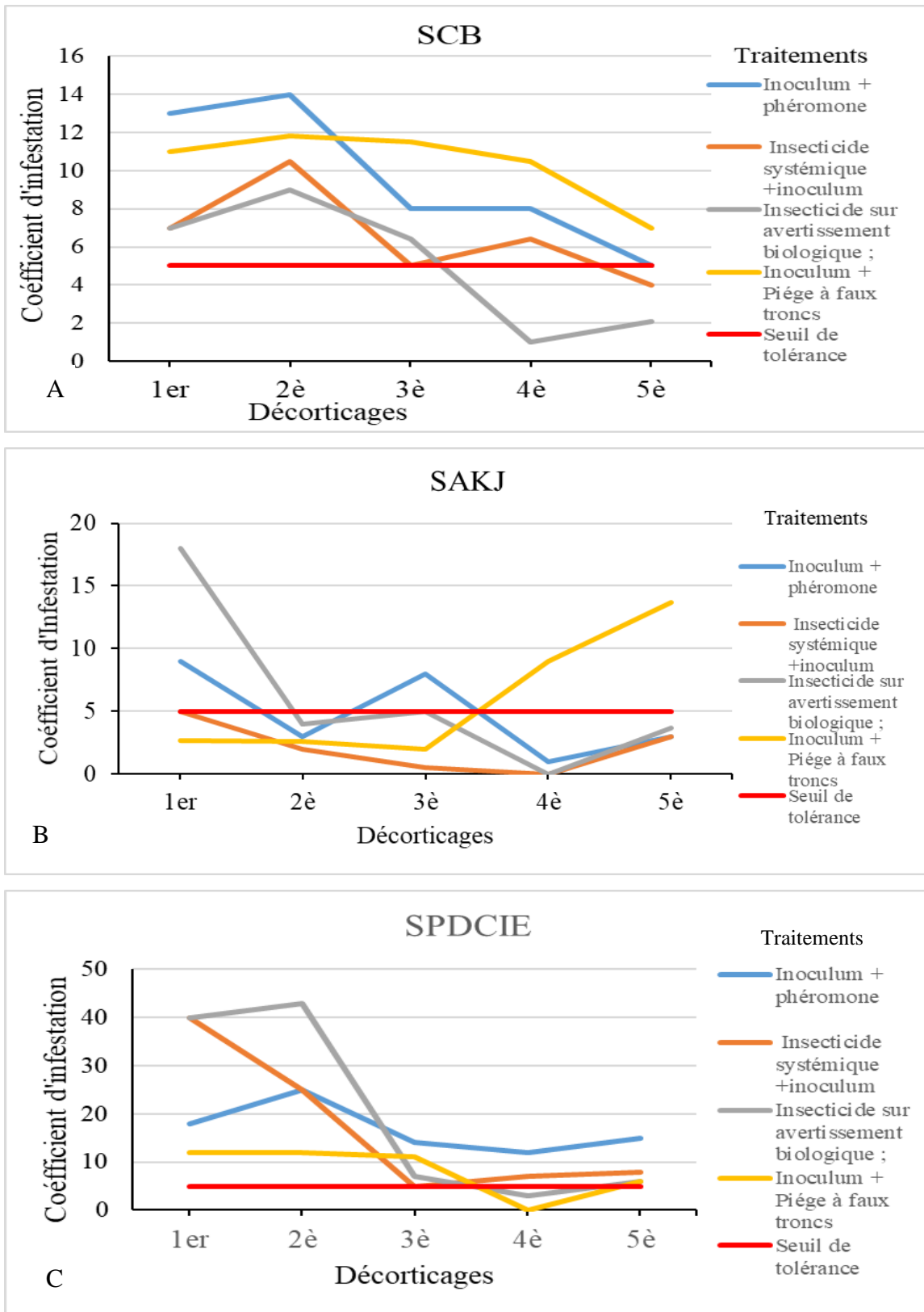


Figure 30 : Efficacité des traitements sur le coefficient d'infestation des plantations par le charançon noir

A : SCB BANCOMOÉ

B : SAKJ

C : SPDCIE

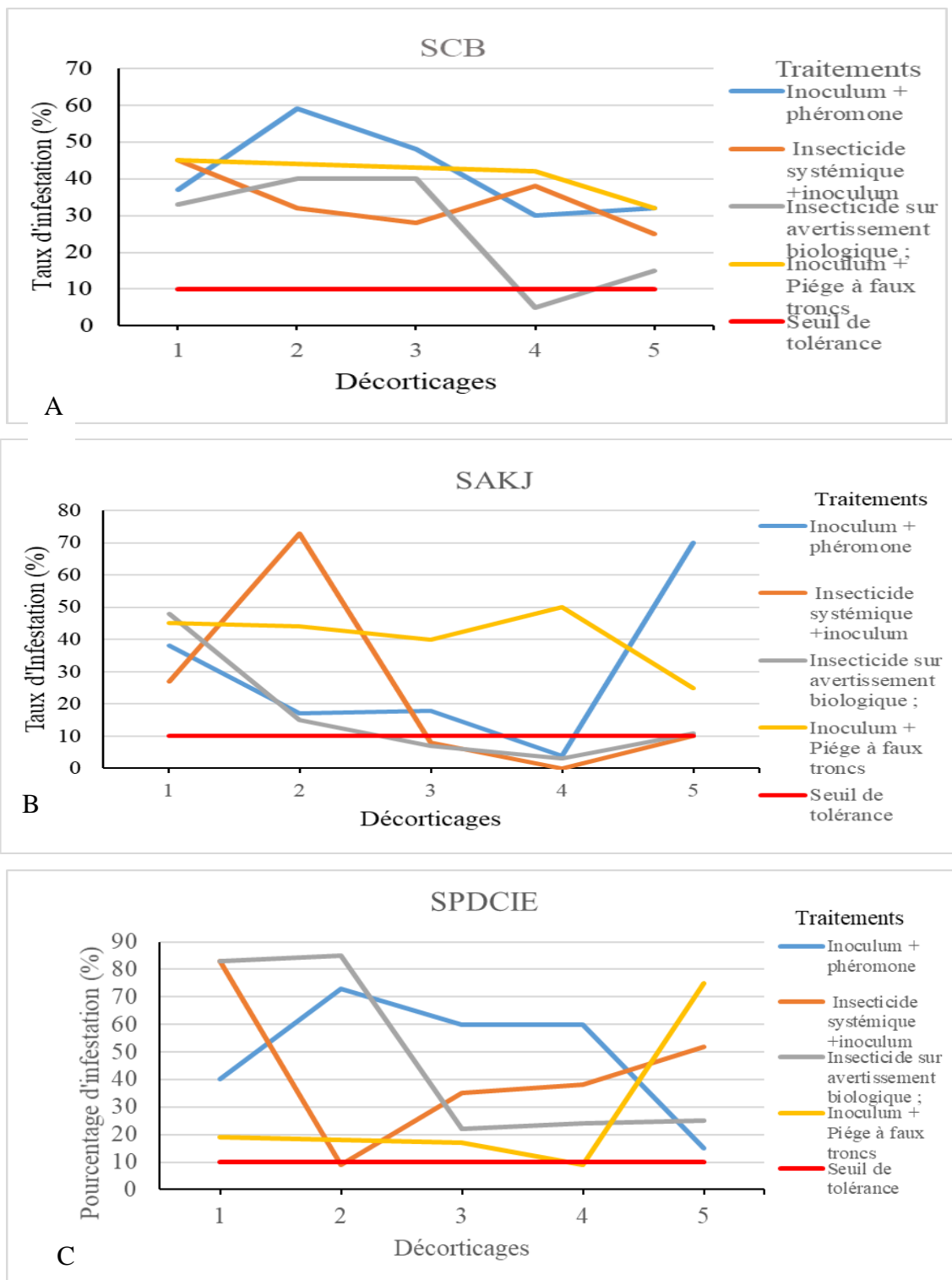


Figure 31 : Efficacité des traitements sur le taux d'infestation des plantations par le charançon noir

A : SCB BANCOMOÉ,
 B : SAKJ
 C : SPDCIE

Sur l'ensemble des paramètres de l'étude, le traitement T_{3P} ou traitement chimique sur avertissement biologique, a été le plus performant. Il est suivi des traitements : T_{2P} ou application de l'insecticide systémique et l'application mensuelle du champignon, T_{4P} piégeage des adultes et l'application mensuelle du champignon et T_{1P} : application du champignon.

CHAPITRE VIII : DISCUSSION

8.1 Caractères morphologiques et microscopiques des isolats de *Metarhizium* sp.

Dix isolats de *Metarhizium anisopliae* issus de différentes aires de culture bananière pure ont été caractérisés morphologiquement. La totalité des isolats obtenus en Côte d'Ivoire a développé, après 21 jours d'incubation, des colonies de couleur verte. Quatre morphotypes ont été observés en se basant sur la couleur du revers, la texture, et l'abondance. Le morphotype 1 a été caractérisé par une texture aérienne et floconneuse, un revers blanc et une abondance du thalle. Ce morphotype comprend des isolats provenant de régions différentes. Les trois autres morphotypes comprennent des isolats provenant chacun de la même région.

En se basant sur les caractères cultureux et microscopiques (la taille, la forme et l'arrangement des conidies sur le conidiophore) établies par Bischoff *et al.* (2009) et les clés de détermination, il s'est avéré que les dix isolats fongiques appartiennent au genre *Metarhizium*.

De plus, les dimensions des conidies des dix isolats de *Metarhizium* spp étudiés se rapprochent des dimensions de certaines souches de *Metarhizium anisopliae*. Cependant, l'absence de différence entre les dimensions des conidies ne permet pas de les séparer. Ce constat a également été fait par Bischoff *et al.* (2009) et Fernandes *et al.* (2010), qui démontrèrent l'incapacité des dimensions des conidies de différencier les espèces du genre *Metarhizium*.

Les données de la caractérisation macroscopique et microscopique mises ensemble ne permettent pas d'identifier clairement les isolats en présence. Entz *et al.* (2005) ont évoqué les difficultés d'identification des espèces en se basant sur des caractères morphologiques. Selon ces auteurs, exposées à des conditions environnementales et physiologiques différentes, les espèces pourraient présenter une morphologie différente. En conséquence, l'examen morphologique n'est pas suffisant pour une identification précise des variétés et des espèces de *Metarhizium* sp.

8.2 Identification moléculaire des isolats de *Metarhizium* sp.

L'amplification a donné un fragment unique de 550 pb pour tous les isolats. DeStefano *et al.* (2004) ont analysé la même région et ont obtenu un fragment de 540 pb pour *M. anisopliae* var. *anisopliae* souche E9, B / Vi et C isolé au Brésil et 600 pb pour *M. anisopliae*

souche 14 isolé en Australie. Plusieurs auteurs ont accepté de considérer l'ITS comme étant le premier choix pour établir le barcode ADN du règne des champignons (Kõljalg *et al.*, 2005 ; Summerbell *et al.*, 2007). Les produits ont été séquencés et comparés aux séquences contenu dans la Genbank. Ils ont montré une identité de 98 % à 100 % avec des espèces de *M. anisopliae*. Les séquences soutiennent la parenté des dix souches au genre *Metarhizium*. Neuf des dix souches étaient appariées à l'espèce *M. anisopliae*. La souche EGL1 était apparentée aux espèces *M. anisopliae* et *M. pinghaense*. Le dendrogramme a été regroupé en 6 classes. La distance génétique des souches Ivoiriennes par rapport aux autres espèces du genre *Metarhizium* pourrait suggérer une nouvelle variété ou un nouveau sous-type. Il pourrait s'agir d'une nouvelle espèce ou d'une nouvelle variété. Aucun morphotype n'a pu être confirmé par l'analyse moléculaire. L'analyse phylogénétique des séquences obtenues n'a pas permis d'étudier la variabilité existant au sein des espèces locales. Elle n'a pas mis en évidence une diversité génétique sur cette région de l'ADN entre les isolats locaux de *Metarhizium anisopliae*. Le marqueur génétique choisi peut influencer l'identification moléculaire. Les travaux de Bischoff *et al.* (2009) ont montré l'incapacité des séquences de l'ADNr 5.8S et des espaceurs internes ITS et ITS2 de différencier des séquences voisines. Ce constat a aussi été réalisé par Bruns (2001) et Geiser *et al.* (2004). Les travaux de Bischoff *et al.* (2009) ont conseillé l'utilisation d'une PCR multiplex couvrant les régions EF-1 α , RPB1, RPB2 et du gène β -tubulin pour différencier les espèces du genre de *Metarhizium*. Elle serait la région la plus informative à utiliser pour l'identification systématique des espèces avec ce genre.

8.3 Influence de la composition du milieu de culture sur la capacité de sporulation des isolats

La sporulation de *M. anisopliae* a été observée sur tous les milieux testés au cours de cette étude. Le milieu de culture riz a produit significativement plus de conidies suivi du milieu de culture PDA. Une valeur nutritive élevée du milieu de culture riz et une teneur plus élevée en carbone et en calcium favoriseraient probablement une meilleure production de spores. Cette performance du substrat à base de riz a été mise en évidence par Aby (2013), Latifian *et al.* (2014) et Zapata. (2018). Les autres milieux, à base de parches de café ou de téguments de cacao et/ou mélasse ou de saccharose, ont montré des efficacités diverses quant à leur capacité à favoriser la sporulation des isolats. Les milieux les plus performants ont été ceux qui avaient les concentrations en carbone et en calcium les plus élevées.

L'importance de la source de carbone pour induire la sporulation a pu être démontrée. En effet, les milieux riches en saccharose commercial ont été les moins sporulants, notamment les milieux T6Cfs, T7s, T5Cfs et T6Cas.

Le saccharose commercial ne pourrait constituer une source de carbone pour le développement des isolats locaux de *Metarhizium anisopliae*. Quelles que soient les proportions auxquelles il est ajouté au café ou au cacao, il induit une baisse de la sporulation. L'impossibilité de certains champignons à dégrader le saccharose a été relevée sur une souche de *Metarhizium acridum* par Ming *et al.* (2014). Ils ont démontré que la présence du MaSnf1 qui est un gène de protéine kinase non fermentante du saccharose, dans cette souche participerait à l'augmentation du rendement en conidies et à la germination des conidies sur un milieu gélosé.

Les milieux café additionnés de mélasse ou de saccharose commercial, ont été moins sporulants que les milieux cacao dans les mêmes proportions. Le milieu T1Cf (100 % café) a été le plus sporulant des milieux café. La différence de concentration en spores des milieux café et cacao dans les mêmes proportions peut s'expliquer par leur composition. La composition en méthylxanthines du cacao et du café peut en être l'une des causes. L'étude biochimique du catabolisme de la caféine chez des champignons filamenteux n'a pas fait l'objet de nombreux travaux. Par contre, plusieurs études ont porté sur la décaféination de la pulpe de café par voie biologique, et notamment sur la sélection de souches de champignons aptes à éliminer cet alcaloïde contenu dans ce sous-produit. Sans être a priori exceptionnelle, cette propriété n'est donc pas commune à un grand nombre de souches fongiques. La plupart des champignons filamenteux étudiés pour leur capacité à dégrader la caféine, appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Perraud-Galme, 1995, Hakil et Viniestra-Gonzalez, 1999). Les parches de café, du fait de leur concentration en caféine, peuvent être utilisées comme unique source d'azote et de carbone. Cependant, l'ajout de sources additionnelles a engendré une baisse de 3 à 16 fois la concentration obtenue avec le café à 100 %. L'effet insecticide additionnel de la caféine a été démontré. Avec la présence de méthylxanthines, selon Kehe (1988) la caféine permet de protéger naturellement les plantes contre les infections microbiennes, les moisissures, et de provoquer la mort des larves de certains insectes (Lépidoptères, Coléoptères).

En plus de leur capacité à apporter de l'azote, les téguments de cacao présentent l'avantage de fournir du carbone pour le développement des isolats. Les coques de cacao stimulent l'activité microbienne par leur apport en carbone (C) labile, support énergétique des

microorganismes (Barry, 2006). Sa plus faible proportion en caféine pourrait expliquer sa capacité à accepter l'ajout d'autres sources de carbone, notamment la mélasse. Abobi *et al.* (2014) ont démontré les effets bénéfiques des résidus de coques de cacao sur les paramètres de croissance du maïs. La biodisponibilité des éléments nutritifs, par la décomposition des coques de cacao, a permis une meilleure croissance des plants de maïs.

La mélasse, sous forme solide, a présenté une capacité de sporulation inférieure à celle du riz, du PDA, mais également des parches de café et de téguments de cacao utilisées à 100 %. Latifian *et al.* (2014) ont fait le même constat sur la forme solide de la mélasse. Ils ont démontré, par contre, l'efficacité de la mélasse sous sa forme liquide, comparativement à plusieurs céréales dont le riz, pour la production et la germination des spores de *M. anisopliae*. Son ajout, dans certains milieux à base de téguments de cacao, a permis d'accroître la capacité de sporulation sur les téguments de cacao notamment pour les isolats DME1, D23, D24 et EGL1. L'ajout de carbone au milieu augmente les rendements en biomasse (concentration cellulaire), ainsi que la viabilité du thalle à long terme. L'augmentation de la viabilité permet d'obtenir une fenêtre plus étendue quant au temps d'arrêt et de conservation de la culture, allongeant ainsi la période efficace d'ensemencement en milieu solide.

La variation des niveaux de carbone et de calcium sur les milieux semble être la cause de la variation du rendement en spores. Le rapport C/N est important pour la capacité de sporulation et de germination des champignons. Ces caractéristiques sont des qualités essentielles d'un bon substrat solide pour la production en masse des champignons entomopathogènes et le rend donc plus approprié pour leur croissance et leur multiplication.

De très nombreux milieux ont été utilisés pour la culture des champignons. Certains, très spécifiques pour des espèces précises, d'autres par contre permettent la culture de très nombreuses espèces.

8.4 Influence de l'activation des isolats sur leurs caractères pathogéniques

Les activations ont permis de réduire les temps létaux des isolats. En effet, le TL100 a baissé des isolats non-activés aux isolats activés. Le même constat est réalisé avec les TL50. La conservation des isolats sur une longue période a engendré une baisse des capacités pathogéniques, en comparaison aux essais réalisés par Aby (2013) sur les mêmes isolats. Toutefois, la susceptibilité des charançons noirs a varié en fonction des isolats fongiques auxquels ils ont été soumis. De telles variations ont déjà été observées avec d'autres espèces

de coléoptères (Devi *et al.*, 2008 ; Sabbahi *et al.*, 2008 ; Sabbahi *et al.*, 2009 ; Latifian et Rad, 2012).

La restauration des capacités pathogéniques des isolats était primordiale avant le choix de l'isolat le plus efficient pour la production en masse du champignon. Parmi les isolats testés dans la présente étude, les adultes de *C. sordidus* ont montré une susceptibilité particulière à trois isolats, nommément les isolats BME2, METE, et D24. Les variations de la pathogénicité des champignons pourraient être influencées par plusieurs facteurs, y compris la structure chimique de la cuticule des insectes, les facteurs abiotiques sur la cuticule (Bogús *et al.*, 2010), les microbiotes associés aux insectes (Wegensteiner, 2004, Popa *et al.*, 2012, Durand *et al.*, 2015) et le mode d'application fongique. La cuticule des insectes est un point d'entrée pour tous les champignons entomopathogènes.

L'abondance des composés hydrocarbures de la cuticule varie entre les insectes ainsi qu'entre les stades du développement de ceux-ci (Ortiz-Urquiza et Keyhani, 2013). Même si l'inhibition de l'adhésion des conidies à la surface de la cuticule est un mécanisme de défense assez rare, il est bien connu que la différence en abondance des composés hydrocarbures de la cuticule et la variété des composés antimicrobiens sécrétés à la surface de la cuticule peuvent avoir des effets sur la pathogénicité des préparations fongiques. Par exemple, les composés lipidiques et les aldéhydes de la cuticule de la punaise *Nezara viridula* L. ont des effets d'inhibition sur l'adhésion et la germination des conidies de *M. anisopliae* (Sosa-Gomez *et al.*, 1997). Pour sa part, le scarabée de feuille de saule cuivré, *Phratora vitellinae* L., sécrète des substances volatiles granulaires avec le salicylaldéhyde qui présentent une toxicité contre les champignons entomopathogènes (Gross *et al.*, 2008). Plus particulièrement, les larves et les adultes de la chrysomèle de la moutarde, *Phaedon cochleariae* Fabricius, transsudent des sécrétions glandulaires contenant les monoterpènes iridoïdes qui présentent les activités antifongiques contre *B. bassiana* (Gross *et al.*, 1998). De plus, la germination des conidies et le développement des hyphes sont profondément influencés par certains facteurs abiotiques à la surface de la cuticule d'insecte, notamment les nutriments, la teneur en eau, l'oxygène, la température et le pH (Sandhu *et al.*, 2012). Ainsi, les besoins nutritionnels des champignons entomopathogènes semblent dépendre de leur spectre d'hôtes.

Les caractères pathogéniques de l'isolat EGL1 ont montré des caractères pathogéniques différents de ceux des autres isolats. Ce résultat vient en appui de celui des analyses moléculaire et morphométrique où l'isolat EGL1 a montré des caractéristiques différentes des autres isolats.

8.5 Influence des traitements pesticides à base de *Metarhizium anisopliae* dans la lutte intégrée contre le charançon noir du bananier

Les résultats obtenus au champ peuvent être expliqués par différentes raisons dont la susceptibilité de l'hôte à *Metarhizium anisopliae* et la mise en place du champignon dans l'écosystème où il est introduit.

Les traitements chimiques ont eu un effet choc sur le taux d'infestation suite à quoi une remontée progressive du taux d'infestation est observée. Ce qui inclut de nouvelles applications du pesticide, cas du traitement T_{3P} en parcelle en production. Compte tenu de la rémanence de ces produits toxiques, de telles pratiques sont à l'origine d'une charge polluante importante au niveau de l'environnement (Olvera-Velona *et al.*, 2003 ; Ganry 2004).

Les résultats obtenus sur les différentes parcelles montrent l'efficacité des méthodes de lutte intégrée incluant le *M. anisopliae*. L'introduction du champignon dans les différentes parcelles, a permis de réduire le taux d'infestation en agissant sur le réseau trophique existant dans les différentes parcelles. En effet cela a permis d'augmenter la population de bioagresseurs du charançon noir du bananier. L'association de la méthode chimique à l'inoculum (T_{2P}) a permis d'obtenir de meilleur résultat, limitant ainsi l'emploi de pesticide chimique de synthèse. Les insectes stressés sont généralement plus susceptibles aux pathogènes que ceux non stressés (Vago, 1963). Ces stress peuvent être causés par le manque de nourriture ainsi que par les blessures mécaniques ou chimiques. Ils peuvent expliquer l'efficacité du traitement T_{1J} (application du champignon et de la phéromone) dans les parcelles en jachère en comparaison au traitement T_{2J} (application de phéromone + ramassage) ; et du traitement T_{2P} (application du traitement systémique et de l'inoculum) dans les parcelles en production. Ce qui a permis d'établir un équilibre champignon entomopathogène/ravageurs d'être en faveur du champignon.

L'association entre le champignon et les pièges à phéromone (T_{4P} et T_{1P}) en parcelle en production a permis d'obtenir de moins bons résultats sur la période de l'essai. L'efficacité d'une méthode incluant le champignon dépend de l'équilibre entre la population d'entomopathogène et celle du charançon noir du bananier. Ces traitements ont permis de modifier la population de ravageur existante de manière progressive.

La susceptibilité des insectes aux champignons entomopathogènes est influencée par plusieurs facteurs, comme la morphologie, la physiologie de l'hôte et l'environnement (Inglis *et al.*, 2001). La susceptibilité des insectes peut varier selon les stades de développement des insectes. Les insectes immatures sont souvent plus susceptibles aux infections fongiques que

les insectes matures (Feng *et al.*, 1985). Par exemple, les jeunes larves des pyrales du maïs, *Ostrinia nubilalis* Hübner, sont plus susceptibles à *B. bassiana* que les larves du dernier stade. Contrairement aux observations de l'équipe de Feng (1985), les adultes des thrips des petits fruits, *Frankliniella occidentalis* Pergande, sont plus susceptibles à *Verticillium lecanii* que les larves (Vestergaard *et al.*, 1995). La densité d'insectes semble aussi être un facteur important dans la propagation de mycoses au sein d'une population d'insectes. Plus la densité est élevée, plus la probabilité que ces insectes entrent en contact avec un pathogène fongique augmente. Ce qui explique un effet plus marqué du champignon sur les sites à densité élevée en charançon noir du bananier.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Cette étude a été conduite dans le but de contribuer à l'amélioration de la production de la banane et de la banane plantain, par le contrôle des populations de *Cosmopolites sordidus*, à partir de champignon entomopathogène. Le charançon noir du bananier, *Cosmopolites sordidus*, occasionne d'énormes pertes économiques et agricoles dans les bananeraies. Les méthodes de lutte classiquement utilisées contre ce bioagresseur consistent en l'utilisation massive de produits phytosanitaires. Compte tenu de la rémanence de ces produits toxiques, de telles pratiques sont à l'origine d'une charge polluante importante au niveau de l'environnement.

L'apport principal de cette thèse est la mise en œuvre d'un moyen de lutte agroécologique plus respectueux de l'environnement et de la santé humaine. En lien avec cette démarche, des expérimentations ont été conduites en station de recherche et au champ, pour tester de pratiques agroécologiques innovantes dans le but d'améliorer l'état sanitaire des bananeraies et leur durabilité. Pour ce faire, la méthodologie adoptée s'est articulée autour de quatre grands axes. Le premier axe a consisté à caractériser les isolats locaux de *Metarhizium* sp.. Le deuxième axe était de définir les conditions optimales de sporulation de *Metarhizium* sp.. Le troisième axe a proposé une formulation de l'inoculum du biopesticide à base de *Metarhizium* sp.. Le quatrième axe était d'évaluer l'efficacité au champ de l'inoculum.

Les isolats ont été caractérisés sur le plan biologique et moléculaire. Les isolats appartiennent à l'espèce *Metarhizium anisopliae*. Ils ont développé, après 21 jours d'incubation, des colonies de couleur verte. Quatre morphotypes ont été observés en se basant sur la couleur du revers, la texture, et l'abondance. Le morphotype 1 a été caractérisé par une texture aérienne et floconneuse, un revers blanc et une abondance du thalle. Ce morphotype comprend des isolats provenant de régions différentes. Les trois autres morphotypes comprennent des isolats provenant chacun de la même région.

Le présent travail a permis de déceler, pour l'ensemble des isolats, l'activation permettant de régénérer les capacités pathogéniques des isolats. La deuxième activation a de manière générale permis d'améliorer les temps létaux, la vitesse d'apparition du duvet mycélien, et la croissance radiale. L'activation a eu pour but de restaurer la pathogénicité des isolats afin d'avoir une meilleure lisibilité des paramètres à prendre en compte dans le choix de l'isolat adapté.

Le champignon utilisé et les composants du milieu sont responsables de la croissance des thalles et du rendement en spores. Bien que les champignons utilisent une gamme variée

de sources de nutriments, pour la production de masse et la commercialisation, des milieux simples et bon marché sont nécessaires. Les concentrations en carbone et en calcium jouent un rôle important dans la capacité de chaque milieu à induire la sporulation des isolats. La réaction singulière de chaque isolat sur chaque milieu de culture a permis d'identifier le milieu adéquat, T1Camel, T11Camel, T10Camel, T8Camel ou T9Camel, au développement des isolats en remplacement des milieux conventionnels que sont le riz et le PDA.

Les résultats de cette étude peuvent être appliqués pour la production de masse de *Metarhizium anisopliae* d'une manière agroécologique. Le champignon peut être cultivé en milieu solide constitué de parches de café, de téguments de cacao et de mélasse. L'isolat BME2 activé deux fois en cas de perte de la pathogénicité et cultivé sur le milieu T8Camel, par les résultats concluant au laboratoire, pourrait être utilisé comme biopesticide contre *C. sordidus*.

Les méthodes de lutte conventionnelles ont été confrontées aux pratiques agroécologiques innovantes. Des méthodes d'assainissement ont été retenues selon l'état de la parcelle, parcelle en production ou parcelle en jachère. En ce qui concerne l'assainissement des jachères, l'application mensuelle pendant plus de six mois du champignon *Metarhizium*, dans les pièges à phéromone (20 pièges /ha), est la méthode qui s'est montrée la plus efficace. Dans le cas de l'assainissement des parcelles en production, la méthode de lutte employant l'insecticide systémique et le champignon, et celle employant les pièges à faux tronc et l'inoculum, ont été les plus performant.

La présente étude a mis en évidence la capacité du *Metarhizium anisopliae* à dégrader la caféine, et les éventuelles possibilités de son utilisation comme moyen de valoriser la pulpe de café par la production de métabolites à haute valeur ajoutée.

Malgré ces résultats prometteurs, des études complémentaires sont nécessaires afin de permettre le transfert de cette technologie aux bénéficiaires qui sont les acteurs de la filière banane en Côte d'Ivoire. Ainsi donc, à court et moyen termes, il faut :

- i) Déterminer le temps de conservation des capacités pathogéniques des isolats de *Metarhizium anisopliae* après leur activation ;
- ii) Étudier l'impact de ce biopesticide sur la qualité du sol, à travers sa faune (microfaune, mésofaune et macrofaune) et son impact sur le contrôle biologique d'autres bioagresseurs telluriques ainsi que sur la durabilité des plantations ;
- iii) Evaluer la persistance dans le sol des spores après l'application du champignon ;
- iv) Réaliser une étude économique de l'emploi des méthodes de lutte intégrée retenues ;

v) Produire en masse l'inoculum.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abera-Kalibata A. M. (1997).** Oviposition preferences and timing of Attackby the Banana Weevil (*Cosmopolites sordidus*, Germar) in East African Highland Banana (*Musa* spp.). Masters thesis, Makerere University, Ouganda P167.
- Abobi A. H. D., Angui T. K., & Kouadio Y. J. (2014).** Influence de la fertilisation à base des coques de cacao sur les paramètres chimiques d'un ferralsol et sur la croissance du maïs à Oumé Cote d'Ivoire, *Journal of Applied Biosciences* 82 :7359 – 7371
- Aby N. (2013).** Lutte biologique contre le charançon noir du bananier, *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptere : Curculionidae) en Côte d'Ivoire : Caractéristiques entomopathologiques d'isolats locaux de *Metarhizium* sp testés sur les populations au laboratoire et en bananeraie. Thèse de Doctorat unique Université Félix Houphouët-Boigny de Cocody, Côte d'Ivoire, 181p.
- Aby N., Kobénan K., Kéhé M., Gnonhoury P., Koné D. & Zouzou M. (2010).** *Metarhizium anisopliae*: parasite du charançon noir du bananier *Cosmopolites sordidus* dans les bananeraies Ivoiriennes. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 7 (1) : 729- 741.
- AIP, 2016,** <https://aip.ci/la-production-annuelle-de-la-banane-plantain-estimee-a-17-million-de-tonnes-en-cote-divoire-cnra/>, consulté le 16/01/2020.
- Amin I., Quazi J., Mansoor S., Ilyas M. & Briddon R.W. (2008).** Molecular characterization of *Banana Bunchy Top Virus* (BBTV) from Pakistan. *Virus Genes* 36: 191-198.
- Aranzazu L. F., Arcila M. I., Bolanos M. M., Castellanos P. A., Castrillon C., Perez J. C., Rodriguez J. L. & Balencia J. A. (2000).** Manejo Integrado del Cultivo de Platano. Manual Tecnico. Manizales, Colombia: CORPOICA.
- Aranzazu L. F., Munoz C. I., Castellanos P. A., Castrillon C., Bolanos M. M., Arcila M. I., Valencia J. A., Perez J. C., Rodriguez J.L., Lucas J. C. & Diaz L. B. (2001).** Capacitation y transferencia de tecnologia para contribuir al mejoramiento del agronegocio del platano en los Departamentos del Quindio y Valle del Cauca. Manizales, Colombia: CORPOICA.

- Araya M., De Waele D. & Vargas R. (2002).** Occurrence and population densities of nematodes parasite of banana (*Musa AAA*) in Costa Rica. *Nematropica* 32 : 21-33.
- Arkam F., Kara - Toumi F. Z., Tail - Halil G., & Saidi F. (2017).** Effets des traitements avec le Green muscle® en milieu naturel (NordOuest de l'Algérie) sur les larves de *Dociostaurus maroccanus* (Thunberg, 1815) et sur l'histologie du tégument, *Algerian Journal of Natural Products* 5(3) 530-540.
- Arleu R. J. & Neto S. S. (1984).** Banana disease caused by *Cosmopolites sordidus* (Germ. 1824): Coleoptera: Curculionidae. *Brocada bananeira Cosmopolites sordidus* (Germ., 1824) (Coleoptera: Curculionidae).34, 359.
- Bakry F., Carreel F., Caruana M. L., Côte F.X. & Jenuwein H. (2001).** Banana. In Charrier A., Jacquot M., Hamon S. & Nicolas D. *Tropical Plant Breeding*, 1-21. Edition Quae.
- Bakry F., (1984).** Application des techniques de culture in vitro à l'amélioration du bananier (*Musa* sp.). Orsay: Université de Paris-Sud, 131 p. Thèse du 3ème Cycle.
- Barnett H.L. & Barry B.H. (1972).** Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Compagny, 13p.
- Barry Y., (2006).** La transformation des apports organiques dans le sol (modèle TAO) : cas des apports riches en azote. Master Recherche CGSE : UHP, Nancy, France, 31p.
- Beccari F., (1967.)** Contributo alla conoseenza del *Cosmopolites sordidus* Ger. (Coleoptera, Curculionidae), Parte I–II. Riv. Journal of Agriculture and Rural Development in the Tr opics and Subtropics., 61 : 51–93 ; 131–150.
- Benserradj O., (2014).** Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques, mémoire de thèse de Doctorat 3ème cycle LMD en Biotechnologies, Biologie et Environnement, Université Constantine 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie, p 165.
- Bidochka M.J & Small C., (2005).** Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungus. In: F.E. Vega & M. Blackwell (Eds.) *Insect-Fungal Associations*. 28-49. Oxford University Press Inc., New York.

- Bischoff J. F., Rehner S. A., & Humber R. A., (2006).** *Metarhizium frigidum* sp. nov.: a cryptic species of *M. anisopliae* and a member of the *M. flavoviride* complex. *Mycologia*, 98(5), 737–745.
- Bischoff J.F., Rehner S.A. & Humber R.A. (2009).** A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage". *Mycologia*, 101: 512–530.
- Boguś M. I., Czygier M., Gołębiowski M., Kędra E., Kucińska J., Mazgajska J., Samborski J., Wieloch W. & Włóka E., (2010).** Effects of insect cuticular fatty acids on in vitro growth and pathogenicity of the entomopathogenic fungus *Conidiobolus coronatus*. *Experimental Parasitology* 125: 400-408.
- Bonan H., Prime J.L., (2001).** Rapport sur la présence de pesticides dans les eaux de consommation humaine en Guadeloupe. Ministère de l'Emploi et de la solidarité (Rapport IGAS n°2001-070), Ministère de l'Aménagement de territoire et de l'environnement (IGE n°01/007), Paris, 86 p., http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/cgi-bin/brp/telestats.cgi?brp_ref=074000066&brp_file=0000.pdf
- Boucias D.G & Pendland J.C. (1991).** Attachment of mycopathogens to cuticle. In: *The Fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals*. (Cole GT, Hoch HC (Editors). Plenum Press, New York.
- Braga G., Flint S., Miller C., Anderson A. & Roberts D. (2001).** Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61°N to 54°S. *Journal of Invertebrate Pathology*.78 :98-108.
- Bridge P.D., Williams M.A.J., Prior C., & Paterson R.R.M. (1993).** Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Journal of General Microbiology*. 139, 1163–1169.
- Brunner-Mendoza C., Moonjely S., Reyes-Montes M. del R., Toriello C., & Bidochka M. (2017).** Physiological and phylogenetic variability of Mexican *Metarhizium* strains. *Biocontrol Science and Technology*, 62(6), 779–791.
- Mendoza B. C., Reyes-Montes M. del R., Moonjely S., Bidochka M. & Toriello C. (2019).** A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico. *Biocontrol Science and Technology*, 29 (1), 83-102.

- Bruns T. D. (2001).** ITS Reality. *Inoculum*. 52: 2-3.
- Butt T.M. (1990).** Fungal infection processes. A Mini-Review 5th Int.Colloquium of Invertebrate Pathology. Adelaide. Soc, Inverbr.Pathol. 121-124.
- Butt T.M., Ibrahim L., Ball B.V & Clark S.J. (1994).** Pathogenicity of the entomogenous fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against crucifer pests and the honey bee. *Biocontrol Science Technology*. 4 :207-214.
- Campanella J.J., Bakllamaja V., Restieri T., Vomacka M., Herron J., Patterson M. & Shahtaheri S. (2003).** Isolation of an ILR1 auxin conjugate hydrolase homolog from *Arabidopsis suecica*. *Plant Growth Regulation*. 39: 175–181.
- Campos R. A., Arruda W., Boldo J. T., Da Silva M.V., de Barros N.M., De Azevedo J. L., Schrank A. & Vainstein M. H. (2005).** *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana* SEM analysis and regulation of subtilisin-like protease and chitinases. *Current Genetics*.50:257-261.
- Carlier J., Zapater M. F., Lapeyre F., Jones, D. R., & Mourichon X. (2000).** Septoria leaf spot of banana: A newly discovered disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (Anamorph *Septoria eumusae*). *Phytopathology* 90:884-890.
- Carnero A., Padilla A. & Montesdeoca M. (2002).** Metodos alternativos para el control del picudo de la platanera *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae). *Actividades del ICIA en Platanera*, 75.
- Caruana M.L. (2003).** Analyse du risque phytosanitaire (ARP). Bananiers : Banana streak badnavirus - BSV. CIRAD. 27p.
- Chaboud A. (2013).** Impact de l'approche moléculaire sur la classification des Agaricomycetidae, thèse présentée pour l'obtention du titre de Docteur en pharmacie diplôme d'Etat, université Joseph Fourier faculté de pharmacie de Grenoble, p97.
- Chalker F.C. (1987).** Banana growing. Agfact H6.1.2. Departement. Agricultural. New South Wales, 15 p.
- Champion J. (1963).** Productions bananières et recherche scientifique. *Fruits*, 30: 11–17.
- Charnley A. K. (1989).** Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In: *Biotechnology of fungi for improving plant growth*. Whipps JM, Lumsden RD (eds), Cambridge University Press ,UK .p.85-123.

- Charnley A.K & St Leger. (1991).** The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis of insects. In : The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Publishing Co.,New York, p 267-286.
- Cheesman E. E. (1948).** Classification of the Bananas. Kew Bulletin 3, 17-28.
- Chen W. H., Han Y. F., Liang J. D., Liang Z. Q., & Jin D. C. (2017).** *Metarhizium dendrolimatilis*, a novel *Metarhizium* species parasitic on *Dendrolimus* sp larvae. Mycosphere, 8(1), 31–37.
- Chinniah C., Ravikumar A., Kalyanasundaram M. & Parthiban P. (2016).** Field evaluation of *Metarhizium anisopliae* liquid formulation (BioMagic®) against brown plant hopper, *Nilaparvata lugens* Stal on rice. Journal of Biopesticides 9(2):211-219 (2016)
- Churchill A.C.L. (2011).** *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control Molecular Plant Pathology 12: 307.
- Cirad-Gret, 2002.** Mémento de l'agronomie. Centre de coopération Internationale en Recherches Agronomique pour le développement (CIRAD); Groupe de Recherches et d'Echanges Technologiques (GRET). Imprimé en France Jouve.
- Cito A., Mazza G., Strangi A., Benvenuti Barzanti G. P., Dreassi E., Turchetti T., Valeria Francardi, & Roversi P. F., (2014).** Characterization and comparison of *Metarhizium* strains isolated from *Rhynchophorus ferrugineus*, Federals European Microbiology Letters 108-115.
- Clark T.B., Kellen W.R., Fukuda R & Lindegren, J. E. (1968).** Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquito. Journal Invertebrate Pathology 11: 1-8.
- Cloyd R. A., (1999).** The Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*". Midwest Biological Control News VI (7). *Cosmopolites sordidus* (Germar) damage on highland banana growth, yield and stand duration *Cosmopolites sordidus*. Biocontrol Science. Technology, 3:177–187.
- Collingborn F.M.B., Gowen S.R., & Mueller-Harvey I. (2000).** Investigations into the biochemical basis for nematode resistance in roots of three *musa* cultivars in response

- to *Radopholus similis* infection. Journal Agricultural Food Chemistry ;48 (11) : 5297–5301.
- Cuillé J. & Vilardebo A., (1963).** Les calandrinis nuisibles au bananier. In: Entomologie appliquée à l'agriculture (Ed. by Balachowsky, A. S.), pp. 1098-1114: Masson.
- Cuillé J., (1950).** Recherches sur le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus*, Germar: Monographie de l'insecte et recherche de ses chimiotropismes. Paris: IFAC Série Technique 4.
- Crous P. & Mourichon X.. (2002).** *Mycosphaerella eumusae* and its anamorph *Pseudocercospora eumusae* spp. nov.: Causal agent of eumusae leaf spot disease of banana. South African Journal of Science - S AFR J SCI. 54.
- Daniells J. W., Geering A. D. W., Bryde N. J., & Thomas J. E. (2001).** The effect of Banana streak virus on the growth and yield of dessert bananas in tropical Australia. Annals of applied biology 139, 51-60.
- Delattre P. (1980).** Recherche d'une méthode d'estimation des populations du charançon du bananier, *Cosmopolites sordidus* Germar (Col., Curculionidae). Acta Oecologica : Oecologica Applicata, 1, pp. 83-92.
- DeStefano R. R., Suzete H. A., DeStefano II L., & Messias C. L. (2004).** Détection de *Metarhizium anisopliae* var. *Anisopliae* sein infecté canne à sucre pyrale de *Diatraea* (Lépidoptères, Pyralidae) en utilisant des amorces spécifiques, Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Genética e Evolução, Campinas, São Paulo, Brésil II Instituto Biológico, Laboratório de bacteriologia Végétal, Campinas, São Paulo, Brésil.
- Devi K. U., Padmavathi J., Rao C. U. M., Khan A. A. P. & Mohan M. C. (2008).** A study of host specificity in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Hypocreales, Clavicipitaceae). Biocontrol Science and Technology 18: 975-989.
- Dhed'a D., Moango M. & Swennen R. (2011).** La culture des bananiers et bananiers plantain en République Démocratique du Congo, Support didactique, Saint Paul, Kinshasa, 85p.
- Diekmann M. & Putter C.A.J. (1996).** *Musa* spp.: Technical Guidelines for the Safe Movement of Germoplasm, No. 15, FAO/IPGRI.

- Dong C., Zhang J., Chen W., Huang H., & Hu Y. (2007).** Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme and phylogenetic analysis. *Microbiology Research* 162 :53–61.
- Dorel M., Tixier P. Dural D. & Zanoletti S. (2011).** Alternatives aux intrants chimiques en culture bananière, *Innovations Agronomiques* 16 (2011), 1-11
- Douglas A. E. (2009).** The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* 23: 38–47.
- Driver F., Milner R.J., & Trueman J.W.H. (2000).** A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycology Research* 104:134–150.
- Ducroquet H., Tillie P., Louhichi K. & Gomez-Y-Paloma S. (2017),** L’agriculture de la Côte d’Ivoire à la loupe : Etats des lieux des filières de production végétales et animales et revue des politiques agricoles. EUR 28754 FR.
- Durand A-A, Bergeron A., Constant P., Buffet J. P., Déziel E. & Guertin C. (2015).** Surveying the endomicrobiome and ectomicrobiome of bark beetles: the case of *Dendroctonus simplex*. *Scientific Reports* 5 : 17190.
- Eden-Green S.J., (1994).** La maladie du sang du bananier. In INIBAP, 2001. Maladies de Musa, Fiche technique N° 3, 2p.
- Entz C., Johnson L. & Kawchuk L., (2005).** Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*, *Mycology Research* 109(11) : 1302–1312.
- Essis B, Kobenan K, Traoré S, Yati J, Koné D, Aby N. et Thiémélé D.E.F., (2016).** Pression d’inoculum de la maladie des raies noires (MRN) causée par *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, dans les plantations industrielles de bananiers, en Côte d’Ivoire. *European Scientific Journal* 12 (3) : 37-52.
- FAO, (2020).** <http://www.fao.org/faostat/fr/#data/QC>
- FAO, (2019).** Banana market review preliminary results for 2018, Rome (Italie)
- FAO, (2018).** <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananes/fr/> consulté le 06/09/2019

- Fargues J., Goettel M. S., Smits N., Ouedraogo A. & Rougier M. (1997).** Effect of temperature on vegetative growth of *Beauveria bassiana* isolates from different origins. *Mycologia* 89: 383-392.
- Fargues J., Goettel M. S., Smits N., Ouedraogo A., Vidal C., Lacey L. A., Lomer C. J. & Rougier M. (1996).** Variability in susceptibility to simulated sunlight of conidia among isolates of entomopathogenic hyphomycetes. *Mycopathologia* 135: 171-181.
- Faria M. & Wraight S.P. (2001).** Biological control of *Bemisia tabaci* with fungi. *Crop Protection*, 20: 767-778.
- Fegan M. & Prior P. (2006).** Diverse members of the *Ralstonia solanacearum* species complex cause bacterial wilts of banana. *Australas. Plant Pathology* 35, 93–101.
- Felsenstein J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39 :783-791.
- Feng Z., Carruthers R. I., Roberts D. W. & Robson D. S. (1985).** Age-specific dose-mortality effects of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) on the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 46: 259– 264.
- Fernandes E.K.K., Keyser C.A., Rangel D.E.N., Foster R.N & Roberts D.W. (2010).** CTC medium: A novel dodecane-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biological Control*. 54 (6) : 197-200.
- Ferron P. (1977).** Influence of relative humidity on the development of fungal infection caused by *Beauveria bassiana* (Fungi Imperfecti Moniliales) in imagines of *Acanthoscelides* Entomophaga, 22: 393-396.
- Ferron P., Fargues J & Riba G. (1991).** Fungi as microbial insecticides against pests. In: Arora D.K., Ajello L., Mukerji K.G (eds) *Handbook of Applied Mycology. Volume 2: Humans, Animals, and Insects*. 18: 665–706. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Ferron P., Fargues J. & Riba G. (1993).** Les champignons agents de lutte microbiologique contre les ravageurs D5, 65-92. (*Handbook of applied mycology*, vol. 2, Humans, Animals and Insects, 1991). *Entomophaga*. 22 :393-396.
- Fogain R. & Price N. S. (1994).** varietal screening of some *Musa* cultivars for susceptibility to the banana borer weevil. 49(4) :247-251.

- Fogain R. (2001).** Nematodes and weevil of bananas and plantain in Cameroon: occurrence, importance and host susceptibility. *International Journal of Pest Management* 47(3): 201-205.
- Fotio D. & Temwa A. (2012).** Les biopesticides de plus en plus préconisés mais peu utilisés en agriculture de l’Afrique de l’Ouest et du Centre, Comité inter-Etats des Pesticides d’Afrique Centrale. http://www.cpac-cemac.org/article_fr.php?IDActu=209 consulté le 20/07/2017
- Froggatt J. L. (1925).** The banana weevil borer (*Cosmopolites sordidus*). *Queensland Journal of Agriculture*, 24, 558.
- Ganry J. (2004).** Diversité spécifique des peuplements végétaux à l'échelle du bassin versant et contrôle des parasites des cultures : l'exemple de la culture bananière aux Antilles françaises. *C.R. Biologies* 327, 621-627.
- Ganry J., Fouré E., De lapeyre de Bellaire, L. & Lescot T. (2012).** An integrated approach to control the Black leaf streak disease (BLSD) of bananas, while reducing fungicide use and environmental impact. In Dhanasekaran, D. Thajuddin, N. Panneerselvam, A. *Fungicides for Plant and Animal Diseases*, pp. 193-226.
- Geiser D. M., Jimenez-Gasco M. D., Kang S. C., Makalowska I., Veeraraghavan N., Ward T. J., Zhang N., Kuldau G. A., O'Donnell K. (2004).** FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying Fusarium. *European Journal Plant Pathology* 110:473–479.
- Getha, K. & Vikineswary, S. (2002).** Antagonistic effects of *Streptomyces violaceus niger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 4: indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 28 :303-310.
- Gigleux I., Gagnon J., St-Pierre A., Cantin B., Dagenais G. R., Meyer F., Despres J. P. & Lamarche B. (2006).** Moderate alcohol consumption is more cardioprotective in men with the metabolic syndrome. *Journal of Nutrition*; 136:3027-3032.
- Goettel M.S. & Jaronski S.T. (1997).** Safety and registration of microbial agents for control of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada* 171: 83-99.

- 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. Ibadan, Nigeria: CAB International /IITA, 122-131.
- Goettel M.S., St Leger R.J., Rizzo N.W., Staples R. & Roberts D.W. (1989).** Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *Journal of General Microbiology* 135 :2233-2239.
- Gold C.S. & Messiaen S. (2000).** le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus*, Parasites et ravageurs des Musa: fiche technique n°4, Réseau international pour l'amélioration de la banane et de la banane plantain, Parc Scientifique Agropolis II.
- Gold C. S., Pena J. E. & Karamura E. B. (2001).** Biology and integrated pest management for the banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae). *Integrated Pest Management Reviews*, 6, 79-155.
- Gowen S.R. Quénéhervé P., & Fogain R. (2005).** Nematode parasites of bananas and plantain, *Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture: Second Edition*, CAB International, Wallingford, UK, p 611-645.
- Groden E. & Lockwood J. L. (1991).** Effects of soil fungistasis on *Beauveria bassiana* and its relationship to disease incidence in the Colorado potato beetle. *Leptinotarsa decemlineata*, in Michigan and Rhode Island soils. *Journal Invertebrate Pathology*
- Gross J., Müller C., Vilcinskis A. & Hilker M. (1998).** Antimicrobial activity of exocrine glandular secretions, hemolymph, and larval regurgitate of the mustard leaf beetle *Phaedon cochleariae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 72: 296–303.
- Gross J. B., Protas M., Conrad M., Scheid P. E., Vidal O., Jeffery W. R., Borowsky R., & Tabin C. J. (2008).** Synteny and candidate gene prediction using an anchored linkage map of *Astyanax mexicanus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 20106–20111. 10.1073/pnas.0806238105
- Hajek A. E & St Leger. (1994).** Interaction between fungal pathogens and insect host. *Annual Review Entomology* 39 :293-322.

- Hakil M V. & Viniegra-Gonzalez A. (1999).** Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamaritii*: Effects of additional nitrogen sources. *Process Biochemistry* 35: 103-109.
- Hallsworth J. F & Magan K.E. (1999).** Water and temperature relations of growth of three entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* and *Paecilomyces farinosus*, *Journal Invertebrate Pathology* 261-266.
- Hoaru I. (2005).** Life cycle of banana root borer, *Cosmopolites sordidus* (Germar). Cookwise from top right, adulte, larva, and tunnels in the banana corm. In: McCormack G. (2006). *Cook Islands Biodiversity Database*. Cook Islands Natural Heritag Trust, rarotonga, 1: 71-97.
- Humber R. A., Hansen K. S., & Wheeler M. M. (2017)** *Metarhizium* plus *Nomuraea* and *Metarhiziopsis* [Hypocreales: Clavicipitaceae], USDA-ARS Biological Integrated Pest Management Research Robert W. Holley Center for Agriculture and Health, p138.
- Inglis G.D., Goettel M.S, Butt T.M & Strasser H. (2001).** Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt TM, Jackson CW, Magan N (eds) *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. CABI Publishing, Wallingford, UK, 23–55.
- Jaronski S.T. (2010).** Ecological factors in the inundative use of fungal entomopathogens. *Biocontrol* 55, 159–185.
- Jaronski S.T. (2014).** Mass production of entomopathogenic fungi : state of the art. In: *Mass production of beneficial organisms invertebrates and entomopathogens*, pp. 357-413.
- Jenuwein H. (1988).** Avocado, Banana, Coffee. How to grow useful exotic plants for fun. *British Museum Natural History*, p 126.
- Jones D. R. (2003).** The distribution and importance of the *Mycosphaerella* leaf spot diseases of banana. Pages 25-41 in: *Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook*. Proc. Workshop *Mycosphaerella Leaf Spot Dis.* L. Jacome, P. Lepoivre, D. Marin, R. Oriz, R. Romero, and J. V. Escalant, eds. The International Network for the Improvement of Banana and plantain, Montpellier, France.
- Kamp A. M. & Bidocbka M. J. (2002).** Conidium production by insect pathogenic fungi on commercially available agars. *Letters Applied Microbiology* 35 :74-77.

- Kehe M., (1988).** Le charançon du bananier (*Cosmopolites sordidus*) les acquis et les perspectives de la recherche : contribution de l'IRFA-CIRAD/Côte d'Ivoire.
- Keller S. & Zimmermann G.J. (1989).** Mycopathogens of soil insects. [n Wilding, N., N. Collins N. M.; Hammond, P. M. Webber, and I. F. Webber (eds.), Insect-Fungus Interactions. Academic Press, London, p. 240-269.
- Kepler R. M. & Rehner S. A. (2013).** Genome-assisted development of nuclear intergenic sequence markers for entomopathogenic fungi of the *Metarhizium anisopliae* species complex. *Molecular Ecology Resources*, 13(2), 210–217.
- Kepler R. M., Ugine T. A., Maul J. E., Cavigelli M. A. & Rehner, S. A. (2014).** Community composition and population genetics of insect pathogenic fungi in the genus *Metarhizium* from soils of a long-term agricultural research system. *Environmental Microbiology*.
- Kerbellec F. (1996).** Etablissement d'une technique d'androgénèse pour l'amélioration génétique du bananier (*Musa* spp.). PhDthesis, Ecole Nationale Agronomique de Rennes, France.
- Kiggundu A., Gold C.S., Labauschaagne M.T., Vuytsteke D. & Louw S. (2003).** Level of host plant resistance to banana weevil, *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) in: Uganda *Musa* germplasm, *Euphytica*, 133:267-277.
- Kobenan K. (1991).** Parasites du système racinaire des bananiers en Côte d'Ivoire. *Fruits* 46 (6) : 633-641.
- Kõljalg U., Larsson K.-H., Abarenkov K., Nilsson R. H., Alexander I. J., Eberhardt U. & Ursing B. M. (2005).** a database providing web-based methods for the molecular identification of ectomycorrhizal fungi: *Methods, New Phytologist*, vol. 166, n°3, p. 1063-1068.
- Kouadio T. (2013),** Caractérisation des virus infectant les bananiers (*Musa* spp.) dans les plantations industrielles et en milieu paysan en Côte d'Ivoire, Thèse de Doctorat en sciences agronomiques et ingénierie biologique, Université De Liege Gembloux Agro-Bio Tech, Belgique, 165p.
- Kumar S., Tamura K., Nei M., (1994).** MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput Appl Biosci.* 1994;10:189–191

- Lamare A., Otaghvari A. M., & Rao S. R., (2016).** Phylogenetic implications of the internal transcribed spacers of nrDNA and chloroplast DNA fragments of *Musa* in deciphering the ambiguities related to the sectional classification of the genus, *Genetic Resources and Crop Evolution* (2017) 64 :1241–1251.
- Lassois L., Busogoro J. P. & Jijakli H. (2009).** La banane : de son origine à sa commercialisation. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*. 13, 575-586.
- Lassoudière A. (2007).** Le bananier et sa culture. Collection Savoir Aire, Editions Quae, p 384
- Lassoudière A. (2010).** L’histoire du bananier, Editions Quae, p 351.
- Lassoudière A. (2012).** le bananier un siècle d’innovations techniques, éditions quae, pages 203 à 205.
- Latifian M. & Rad B. (2012).** Pathogenicity of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillmin, *Beauveria brongniartii* Saccardo and *Metarhizium anisopliae* Metsch to adult *Oryctes elegans* Prell and effects on feeding and fecundity. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 4: 1026-1032.
- Latifian M., Rad B. & Amani M. (2014).** Mass production of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* by using agricultural products based on liquid- solid diphasic method for date palm pest control, *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 4.368-372.
- Lecuona R., Clement J.L., Riba G., Joulie C & Juarez P. (1997).** Spore germination and hyphal growth of *Beauveria* sp. on insect lipids. *Journal of Economy Entomology*. 90:119-123.
- Lema A. (2005).** Cours d'entomologie générale. III^e Graduat Facagro/Unikin inédit.
- Lemaire L. (1996).** Les relations sémiouchimiques chez le charançon *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera : Curculionidae) et la résistance de sa plante-hôte, le bananier. Montpellier : USTL, 268 p. Thèse de doctorat : Biologie des Organismes et Ecologie : Université des sciences et techniques du Languedoc, France.
- Lepoivre P. (2003).** La phytopathologie. Ed. De Boeck. 427p.

- Lheureux F., Carreel F., Jenny C., Lockhart B.E.L., & Iskra-Caruana M-L. (2003.)** Identification of genetic markers linked to Banana streak disease expression in inter-specific *Musa* hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*; 106: 594-598.
- Lockhart B.E.L. (2002).** Management of viral diseases of banana, Acorbat. *Memorias XV reuniòn*, 217-221.
- Longoria A. (1968).** Diferencias sexuales en la morfología externa de *Cosmopolites sordidus* Germar (Coleoptera, Curculionidae). *Ciencias Biologicas, La Habana*, 1, 1.
- Loridat P. (1986).** Contribution à l'étude des facteurs limitant le rendement en bananeraie martiniquaise. *Mémoire d'Etude ENSH Versailles*. 69 p.
- Masanza M., Gold C.S., Van Huis A., Ragama P.E. & Okech S.H.O. (2005).** Effect of crop sanitation on banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) populations and crop damage in farmers' fields in Uganda. *Crop Protection*, 24, 275– 283.
- Mbida Mindzie C. (2001).** First archaeological evidence of banana cultivation in central Africa during the third millenium before present. *Vegetation History and Archaeobotany*, 10, 1-6.
- McCoy A., Quintela E.D & Faria M. (1990).** Environnemental Persistence of Entomopathogenic Fungi. In, *New direction in biological control*. R.R. Baker and P. E. Dunn (eds), A.R. Liss, New York, 139-159.
- Mendoza C. B., Reyes-Montes M. D. L., Moonjely S., Bidochka M. J. & Toriello C. (2019).** A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico, *Biocontrol Science and Technology*, 29:1, 83-102, DOI: 10.1080/09583157.2018.1531111
- Mestre J. (1995).** Reconnaissance des sexes chez le charançon du bananier, *Cosmopolites sordidus* (Germar, 1824) (Coleoptera Cucurlionidae). p. 8 : CIRAD.
- Metschnikoff E. (1879).** Disease of wheat chafers. *Zapiski imperatorskogo Obscestva Sel'skogo Hoziatstva Juznoi Roosii Godsorok devjaytyi*, 21–50. (In Russian).
- Milner R.J. (2000).** Current status of *Metarhizium* as a mycoinsecticide in Australia. *Biocontrol News and Information* 21(2)

- Ming Y., Wei Q., Jin K. & Xia Y. (2014).** MaSnf1, a sucrose non-fermenting protein kinase gene, is involved in carbon source utilization, stress tolerance, and virulence in *Metarhizium acridum*, Applied Microbiology Biotechnol. Dec ;98(24):10153-64. doi: 10.1007/s00253-014-6066-z.
- Miranpuri G.S & Khachatourians G.G. (1991).** Infection sites of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. Entomol. 16 :215234.
- Mitchell G. (1978).** The estimation of banana borer population and resistance levels. Technical Bulletin 2, Windward Island Banana Growers Association (WINBAN), St Lucia. 34p.
- Mitchell G. (1980).** Banana entomology in the Windward Islands. Final Report 1974–1978. Windward Island Banana Growers Association (WINBAN), St Lucia, 216p.
- Mitsuaki S. (2004).** Effect of temperature on growth of *Beauveria bassiana* F-263, a strain highly virulent to the Japanese pine sawyer, *Monochamus alternatus*, especially tolerance to high temperatures. Appl Entomol Zool. 39 : 469-475.
- Mollot G., Duyck P. F., Lefeuvre P., Lescouret F., Martin J. F., Piry S., Canard E. & Tixier P. (2014).** Cover cropping alters the diet of arthropods in a banana plantation : a metabarcoding approach. PLoS ONE, 9 (4): e93740.
- Moznette G. F. (1920).** Banana root-borer. Journal of Agricultural Research, 19, 39.
- Nahif A. A., Koppenhöfer A. & Madel, G. (1994).** Morphology, biology and importance of *Cosmopolites sordidus*, Germar, 1824 (Coleoptera: Curculionidae). Zeitschrift für Angewandte Zoologie, 80, 435.
- Napolitano R. & Juárez M. P. (1997).** Entomopathogenous fungi degrade epicuticular hydrocarbons of *Triatoma infestans*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 344 :208-214.
- Nasraoui B., & Lepoivre P. (2003).** Les champignons phytophagènes. In : De Boeck Université (eds.), Phytopathologie : Bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. (pp.111-142). Bruxelles, Belgique.
- Ndowora T., Dahal G., LaFleur D., Harper G., Hull R., Olzsewski N., & Lockhart B.E. L. (1999).** Evidence that badnavirus infection in *Musa* can originate from integrated pararetroviral sequences. Virology; 255: 214-220.

- Olvera-Velona A., Benoit P., Capowiez Y., Charnay M.P., & Barriuso E., (2003).** Disponibilité d'insecticides organophosphorés dans les sols agricoles du Mexique et impacts écotoxicologiques sur les vers de terre (*A. Caliginosa*). Actes des 2èmes rencontres de l'INRA 4 avril 2003. 2 p.
- ONU (2017):** <https://www.un.org/development/desa/fr/news/population/world-population-prospects-2017.html>
- Ortiz-Urquiza A. & Keyhani N. O. (2013).** Action on the surface: entomopathogenic fungi versus the insect cuticle. *Insects* 4: 357-374.
- Padmanaban B. & Sathiamoorthy S., (2001).** le charançon du pseudotrunc du bananier *Odoiporus longicollis*, Parasites et ravageurs des Musa - fiche technique n°5, lu sur http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/The_Banana_stem_weevil_Odoiporus_longicollis_756_FR.pdf consulté le 08/04/2015.
- Paulian R. (1954).** Coléoptères Dynastides, Chironides et Dynamopides de l'Afrique noire française. *Bulletin de l'Institut français d'Afrique noire*, 16, 4, 1119.1221.
- Pearce F. (2003).** Going bananas. *New Scientist*. 177 : 26-29.
- Perraud-Galme L. (1995).** Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la decaféination de la pulpe de café. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, 210 p.
- Perrin A. (2015)** Etude de la filière Banane Plantain en Côte d'Ivoire Projet « Promotion et commercialisation de la Banane Plantain et du Manioc en Côte d'Ivoire » financé par le Comité Français pour la Solidarité Internationale (CFSI), https://www.alimenterre.org/system/files/ressources/pdf/1067-diagnostic-de-la_filiere-banane-plantain-cotedivoire.pdf, consulté le 27/02/2020
- Pham H. H.; Preston T. R., (2009).** Effect of dried cassava peelings on the rumen environment of cattle fed natural grasses. *Livest. Res. Rural Dev.*, 21 (9): 156
- Polidoro B.A., Dahlquist R.M., Castillo L.E., Morra M.J., Somarriba E., & Bosque Pérez N.A. (2008).** Pesticide application practices, pest Knowledge, and cost-benefits of plantain production in the Bribri-Cabécar Indigenous Territories, Costa Rica. *Environmental Research* 108, 98-106.

- Popa V., Déziel E., Lavallée R., Bauce E. & Guertin C. (2012).** The complex symbiotic relationships of bark beetles with microorganisms: a potential practical approach for biological control in forestry. *Pest Management Science* 68: 963-975.
- Prakash G.B., Padmaja V. & Kiran R.S. (2008.)** Statistical optimization of process variables for the large-scale production of *Metarhizium anisopliae* conidiospores in solid-state fermentation. *Bioresource Technology* 99(6), 1530-1537.
- Proteggente A. R., Pannala A. S., Paganga G., van Buren L., Wagner E., et Wiseman S. (2002).** The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Research*, 36(2), 217–233.
- Quénéhervé P., Salmon F., Topart P., & Horry J.P. (2009).** Nematode resistance in bananas: screening results on some new *Mycosphaerella* resistant banana hybrids. *Euphytica* 2009; 165: 137–143
- Rabbani G. H., Teka T., Saha S. K., Zaman B., Majid N., Khatun M., Wahed M. A., & Fuchs G. J. (2004).** Green banana and pectin improve small intestinal permeability and reduce fluid loss in Bangladeshi children with persistent diarrhea, *digestive disease science*, Mar ; 49(3) : 475-84.
- Rahman SA, Mohd Zain SN, Bilal Mat MZ, Sidam AK, Othman RY, & Mohamed Z. (2014).** Population distribution of plant-parasitic nematodes of bananas in Peninsular Malaysia. *Sains Malaysiana* ; 43 : 175–183.
- Reichel H., Martinez A.K., Arroyane J.A., Sedano R., Morales F.J., Duterme O., Kummert J. & Lepoivre P. (2003).** First report of *Banana mild mosaic virus* isolated from Plantains (*Musa AAB*) in Colombia. *Plant Disease* 87: 1150.
- Risède J. M., Lescot T., Cabrera C. J., Guillon M., Tomekpé K., Carbap, Kema H.J., & Côte F. (2010).** Nouvelles stratégies à court et moyen termes pour réduire l'utilisation des pesticides dans les cultures de bananes, www.endure-network.eu
- Rombach M. C., Humber R. A., & Evans H. C. (1987).** *Metarhizium album*, a Fungal Pathogen of Leaf- and Planthoppers of Rice. *Transactions of the British Mycological Society*, 88(884), 451–459. Doi :10.1016/S0007-1536(87)80028-1
- Sabbahi R., Lavallée R., Merzouki A. & Guertin C. (2009).** Differentiation of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Ascomycetes : Hypocreales) isolates by PCR-RFLP. *Phytoprotection* 90: 49-56.

- Sabbahi R., Merzouki A. & Guertin C. (2008).** Efficacy of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. Against the tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* L., in strawberries. *Journal of Applied Entomology* 132 : 124-134.
- Sahayaraj K. & Namasivayam S.K.R. (2008).** Mass production of entomopathogenic fungi using agricultural products and by products. *African Journal of Biotechnology* 7(12).
- Saitou N. & Nei M., 1987.** The neighbor-joining method : A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4 :406-425.
- Sandhu S. S., Sharma A. K., Beniwal V., Goel G., Batra P., Kumar A., Jaglan S., Sharma A. K. & Malhotra S. (2012).** Myco-biocontrol of insect pests: factors involved, mechanism and regulation. *Journal of Pathogens* 2012: 1-10.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A. R., (1977),** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, n°12, p. 5463-5467.
- Sarah J.L. (1989).** Nematological review - banana nematodes and their control in Africa. *Nematropica*, 19 : 199-216.
- Sarah J.L., Hugon R., & Simon S. (1990).** Les viroses des bananiers. La mosaïque en plages des bananiers Virus diseases in banana. *Banana mosaic. Fruits (spéc.)* : 51-56. Schoofs, 1997, The origin of embryogenic cell in *Musa*, Doctorat proefs-chrift Nr 330 an de Faculteit Landbawkundige in toegepaste biologische wetenschappen van de K.U. Leuven.
- Sarah, J-L, Pinochet, J. & Stanton, J. (1996).** Résistance à la fusariose, aux maladies foliaires causées par les *Mycosphaerella* spp. et aux nématodes, Guide technique INIBAP N°7, 57p.
- Sasser J.N. & Freckman D.W. (1987).** A world perspective on nematology: the role of the Society. In: *Vistas on Nematology*. Veech J.A. and Dickson D.W., (Eds). Society of Nematologists, Inc, Hyattsville, USA. Pp. 7-14.
- Sawadogo B. (2015).** Evaluation de l'effet insecticide d'une application épicutanée de fipronil 1% sur des glossines de laboratoire (*glossina palpalis gambiensis*, vanderplank 1949) Master Recherche en Analyse des populations des espaces fauniques et halieutiques, Université Polytechnique de Bobo Dioulasso. P47

- Siebeneicher S.R., Vinson S.B & Kenerley C.M. (1992).** Infection of the red imported fire ant by *Beauveria bassiana* through various routes of exposure. *J. Invertebr. Pathol.* 59 : 280-285.
- Siljo A., Bhat A. I., Biju C. N. & Venugopal M. N. (2012).** Occurrence of *banana bract mosaic* virus on cardamom. *Phytoparasitica* 40: 77-85
- Silva S. O., Alves É J., Raimundo J., Silveira S. & Lima M. B. (2001).** Banana breeding program at Embrapa In Crop. *Breeding and Applied Biotechnology* 1, 399-436).
- Simmonds N. W. (1962).** The evolution of the bananas. *The Evolution of the Bananas*, p 170.
- Simmonds N. W. & Shepherd.K. (1955).** The taxonomy and origins of the cultivated bananas. *Journal of the Linnean Society of London, Botany* 55, 302-12.
- Sosa-Gomez D. R., Boucias D. G. & Nation J. L. (1997).** Attachment of *Metarhizium anisopliae* to the southern green stink bug *Nezara viridula* cuticle and fungistatic effect of cuticular lipids and aldehydes. *Journal of Invertebrate Pathology* 69: 31-39.
- Sponagel K. W., Diaz F. J. & Cribas A. (1995).** El picudo negro del platano, *Cosmopolites sordidus* Germar. La Lima, Honduras: FHIA, La Lima, Honduras, p 34.
- St Leger R.J. (1993).** Biology and mechanisms of insect-cuticle invasion by deuteromycete fungal pathogens, In: *Parasites and pathogens of insects*. Beckage NE, Thompson SN, (eds), Federici BA (eds.). Academic Press Inc., New York, USA .2: 211-225.
- St Leger R.J., Allee L.L., May B., Staples R.C & Roberts D.W. (1992).** World-wide distribution of genetic variation among isolates of *Beauveria* spp. *Mycology Research*. 96: 1007-1015.
- St Leger R.J., Lacetti L.B., Staples R.C & Roberts D.W. (1990).** Protein kinases in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Genetics Microbiology*. 136 :1401-1411.
- St Leger R.J. (1986a).** Cuticle- degrading enzymes of entomothogenic fungi: Synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*. 48 :85-95
- St Leger R.J. (1986b).** Cuticle- degrading enzymes of entomothogenic fungi: cuticle degradation in vitro by enzymes from entomothogens. *Journal of Invertebrate Pathology*. 47 :167-177.

- Starnes R.L., Liu C.L & Marone P.G. (1993).** History, use and future of microbial insecticides. *American Journal of Entomology*. 39 :83-91.
- Stover R. H. & Simmonds N. W. (1987).** Bananas: Third Edition. 469 pp
- Sung G. H., Hywel-Jones N. L., Sung J. M., Luangsa-ard J. J., Shrestha, B. & Spatafora J. W. (2007).** Phylogenetic classification of Cordyceps and the clavicipitaceous fungi. *Studies in Mycology*, 57, 5–59.
- Swennen R. & Vuylsteke D. (2001).** Breeding black sigatoka resistant plantain with a wild banana. *Tropical Agriculture* 70, 74-78.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiski A. & Kumar S. (2013).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tanada Y. & Kaya H.K. (1993).** Insect pathology. Academic Press Inc., San Diego, USA , 666 p . Treverrow R., N., Peasley, D. et Ireland, G, 1992, Banana Weevil Borer : A pest Management Handbook for Banana Growers: Banana Industry Committee, New South Wales Agriculture.
- Tangthirasunun N., Poeaim S., Soyong K., Sommartya P. & Popoonsak S. (2010).** Variation in morphology and ribosomal DNA among isolates of *Metarhizium anisopliae* from Thailand, *Journal of Agricultural Technology* 2010 Vol. 6(2): 317-329.
- Thakre M., Thakur M., Malik N. & Ganger S. (2011).** Mass scale cultivation of entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi* using agricultural products and agro wastes. *Journal of Biopesticides* 4(2), 176 179
- Thomas J.E. & Iskra-Caruana M.L. (2000).** Bunchy top. In: *Diseases of Banana, Abaca and Ensete*, Edited by D.R. Jones. CAB International, Wallingford, UK: 241-253
- Thomas J.E., Iskra-Caruana M.L, Magnaye L.V. & Jones D.R. (1999).** Bract mosaic. In Jones D.R. (ed): *Diseases of banana, abacà and enset*. london, CABI publishing, , pp 253-263.
- Thwaites R., Eden-Green S. J. & Black R. (2000).** “Diseases caused by bacteria,” in *Diseases of Banana, Abacà and Enset* ed. Jones D. R., editor. (Wallingford: CAB International;) 213–239.

- Todorova S.J., Côté L.C., Martel P & Coderre D. (1994).** Heterogeneity of two *Beauveria bassiana* strains revealed by biochemical tests, protein profiles and bioassays on *Leptinotarsa decemlineata* (Col: Coccinellidae) larvae. *Entomophaga*. 39 :159-169
- Toto H.C. (1993).** Quelques éléments complémentaires sur la biologie du charançon noir du bananier. Mise au point d'une méthode de lutte insecticide en conditions contrôlées. Rapport de stage, Diplôme d'Ingénieur Agronome option Défense des cultures, ENSA, Côte d'Ivoire, 39p.
- Traore L., Gold C. S. Boivin G. & Pilon J. G. (1996).** Postembryonic development in the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*. *Fruits Paris*, 51, 105-113.
- Traore L., Gold C. S., Pilon J. G. & Boivin G. (1993).** Effects of temperature on embryonic development of banana weevil, *Cosmopolites sordidus* Germar. *Afr. Crop Sci. J.*, 1, 111-116.
- Treverrow N. (1985).** Banana weevil borer. *Agfacts H6. AE.1*, 1-3.
- Treverrow N. L. & Bedding R. A. (1993).** Development of a system for the control of the banana weevil borer, *Cosmopolites sordidus* with entomopathogenic nematodes. In: *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*, Ed. by Bedding, R., Akhurst.
- Teycheney P.-Y., Laboureau N., Iskra-Caruana M.-L. & Candresse T. (2005).** High genetic variability and evidence for plant-to-plant transfer of banana mild mosaic virus. *Journal of General Virology* 86: 3179-3187.
- Tulloch M. (1976).** The genus *Metarhizium*. *Transactions of the British Mycological Society*. 66 :497-411.
- Uma S., Backiyarani S., Saravanakumar A. S., Chandrasekar A., Thangavelu R., Saraswathi M. S., (2016).** Identification of *Mycosphaerella eumusae* responsive unique genes/transcripts from a resistant banana cultivar. *Acta Horticulturae*. 1114, 111-118
- Vago C. (1963).** Predispositions and interrelations in insect diseases. *Insect pathology: an advanced treatise*, Steinhaus EA (Édit.) Academic Press, New York, USA, First Ed Vol 1. p 339-379.

- Van Der Valk H. (2007).** Review of the efficacy of *Metarhizium anisopliae* var *acridum* against the desert locust, plant protection and production division, locust and other migratory pest group, food and agriculture organization of united nations p77.
- Vanderweyen A. (1962).** Maladies et insectes nuisibles au bananier. In : précis des maladies et insectes nuisibles rencontrés au Congo, Rwanda et Burundi. P 447.
- Vega F.E., Jackson M.A., Mercadier G & Poprawski T.J. (2003).** The impact of nutrition on spore yields for various fungal entomopathogens in liquid culture, World Journal of Microbiology and Biotechnology. 19 :363-368.
- Vestergaard S., Gillespie A. T., Butt T. M., Schreiter G. & Eilenberg J. (1995).** Pathogenicity of the hyphomycete fungi *Verticillium lecanii* and *Metarhizium anisopliae* to the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. Biocontrol Science and Technology 5: 185-192.
- Vilardebo A. (1950).** Conditions d'un bon rendement du piégeage de *Cosmopolites sordidus*. In: Fruits, pp. 399-404.
- Vilardebo A. (1960).** Los insectos y nematodos de las bananeras del Ecuador. p. 78. Paris : Instituto Franco-Euaotiano de Investigaciones Agronomicas.
- Vilardebo A. (1973).** Le coefficient d'infestation, critère d'évaluation du degré d'attaques des bananeraies par *Cosmopolites sordidus* Germ. le charançon noir du bananier. Fruits, 28, 417.
- Vinatier F. (2010).** - Dynamique spatiale du charançon du bananier en interaction avec le système de culture et l'organisation paysagère. Thèse de Doctorat unique Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech), France, 204p.
- Vishnoi R., Raj S. K. & Prasad V. (2009).** Molecular characterization of an indian isolate of *Banana Bunchy Top Virus* based on six genomic DNA components. Virus Genes 38: 334-344.
- Wang B., Kang Q., Lu Y., Bai L., & Wang C. (2012).** Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. Proc Natl Acad Sci 109: 1287–1292.
- Wang C., Butt T. M., & St. Leger R. J. (2005).** Colony sectorization of *Metarhizium anisopliae* is a sign of ageing. Microbiology, 151(10), 3223–3236.

- Wang S. C. & Ko W. H. (2004).** Cavendish banana cultivars resistant to Fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan. *Plant Disease*. 88:580-588.
- Wegensteiner R. (2004).** Pathogens in bark beetles. *Bark and wood boring insects in living trees in Europe, a synthesis*, Lieutier F, Day KR, Battisti A, Grégoire J-C & Evans HF (Édit.) Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. p 291-313.
- White T. J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990).** Amplification et séquençage direct de gènes d'ARN ribosomique fongique pour la phylogénétique. dans les protocoles de PCR: un guide des méthodes et des applications. eds Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (Academic Press, Inc. New York, NY), pp 315 – 322.
- Wraight R. J. & Roberts D. W. (1987).** Insect control effort with fungi. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28: 77-87.
- Zapata P.D. (2018).** Evaluation of rice by-products, incubation time, and photoperiod for solid state mass multiplication of the biocontrol agents *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, *Agronomy Research* 16(5), 1921-1930.

ANNEXES

ANNEXE 1 : LISTE DES TAXONS CITES

A

Anisoplia austriaca Herbst p38

B

Banana Bract Mosaic Virus Magnaye et Espino p19

Banana Bunchy Top Virus Dale p19

Banana Mild Mosaic Virus (BanMMV) Gambley et Thomas p19

C

Cosmopolites sordidus Germar px, pxi, p1, p2, p22, p23, p55, p102, p130, p156, p157

Cucumber Mosaic Virus Doolittle et Jagger (*CMV*)p xvi, p19

Cylindrocladium spp. p19

E

Entomophthora anisopliae Eaton p138

H

Hanseniella ivorensis Juberthie-Jupeau et. Kehe p22

Helicotylenchus multicinctus Cobb p21

Heteroligus meles Billberg p22

M

Meloidogyne incognita p21

Meloidogyne javanica p21

Metarhizium acridum Driver & Milner p39, p41, p131

Metarhizium album Petch p39

Metarhizium anisopliae Sorokin p38, p39, p42, p46, p69, p84, p85, p87, p88, p90, p93, p113, p124, p132, p133

Metarhizium anisopliae var. *acridum* Driver & Milner p39

Metarhizium anisopliae var. *anisopliae* Driver & Milner p125

Metarhizium anisopliae var. *lepidiotae* Driver & Milner p125

Metarhizium anisopliae var. *majus* Johnst p39

Metarhizium brunneum Petch p39, p41
Metarhizium flavoridae Gams & Rozsypal p39
Metarhizium globosum Bisch., Rehner & Humber P39
Metarhizium guizhouense Liang, Liu, Liu p39
Metarhizium lepidiotae J.F. Bisch., Rehner & Humber p39
Metarhizium pingshaense p39, p41
Metarhizium robertsii Bisch., Rehner & Humber p39, p41
Musa balbisiana pxvi, p6, p20
Mycosphaerella spp. p18
Mycosphaerella fijiensis Morelet p18
Mycosphaerella musicola Leach p18

O

Oidoporus longicollis Olivier p22

P

Pratylenchus coffeae Zimmermann p21

R

Radopholus similis Cobb p21, p22
Ralstonia solanacearum (Smith 1896) Yabuuchi *et al.* 1996 p17

ANNEXES 2: QUELQUES RESULTATS DES TRAITEMENTS A BASE DE
METARHIZIUM ANISOPLIAE DANS LA PROTECTION INTEGREE DU BANANIER
CONTRE LE CHARANÇON NOIR

Annexe 2.1 : Analyse de variance de la concentration en spore des isolats

| Source | | Sig. |
|------------------|-----------|-------|
| MILIEU | Hypothèse | 0 |
| | Erreur | |
| ISOLATS | Hypothèse | 0,001 |
| | Erreur | |
| MILIEU * ISOLATS | Hypothèse | 0 |
| | Erreur | |

Annexe 2.2 : Analyse de variance univariée pour les facteurs milieu et isolat.

| Source | Somme des carrés de type III | Ddl | Moyenne des carrés | Sig. |
|----------------------|------------------------------|-----|--------------------|------|
| Modèle Corrigé | 752,099 ^a | 329 | 2,286 | ,000 |
| Ordonnée A L'origine | 33316,813 | 1 | 33316,813 | ,000 |
| Isolats | 37,411 | 9 | 4,157 | ,000 |
| Traitement | 384,715 | 32 | 12,022 | ,000 |
| Isolats * Traitement | 330,792 | 288 | 1,149 | ,000 |

Annexe 2.3 : Analyse univariée du temps létal pour 100% de la population

| Source | Somme des carrés de type III | ddl | Moyenne des carrés | D | Sig. |
|----------------------|------------------------------|-----|--------------------|-------|------|
| Modèle corrigé | 46,300 ^a | 40 | 1,158 | 3,209 | ,000 |
| Ordonnée à l'origine | ,417 | 1 | ,417 | 1,155 | ,286 |
| Isolats | 14,468 | 9 | 1,608 | 4,456 | ,000 |
| Traitement | 4,484 | 4 | 1,121 | 3,108 | ,020 |
| Isolat* Traitement | 27,300 | 27 | 1,011 | 2,803 | ,000 |

Annexe 2.4: Analyse univariée du temps létal pour 50% de la population

| Source | Ddl | Moyenne des carrés | D | Sig. |
|----------------------|-----|--------------------|----------|------|
| Modèle corrigé | 40 | ,240 | 4,736 | ,000 |
| Ordonnée à l'origine | 1 | 183,349 | 3621,145 | ,000 |
| Isolats | 9 | ,353 | 6,966 | ,000 |
| Traitement | 4 | ,268 | 5,292 | ,001 |
| Isolats * Traitement | 27 | ,197 | 3,892 | ,000 |
| Erreur | 79 | ,051 | | |
| Total | 120 | | | |

| | |
|---------------|-----|
| Total corrigé | 119 |
|---------------|-----|

Annexe 1.5 : Analyse univariée du logarithme de la concentration en spore

| Source | Somme Des Carrés De Type III | Ddl | D | Sig. |
|----------------------|------------------------------|-----|-----------|------|
| Modèle Corrigé | 752,099 ^a | 329 | 4,978 | ,000 |
| Ordonnée A L'origine | 33316,813 | 1 | 72554,907 | ,000 |
| Isolats | 37,411 | 9 | 9,052 | ,000 |
| Traitement | 384,715 | 32 | 26,181 | ,000 |
| Isolats * Traitement | 330,792 | 288 | 2,501 | ,000 |
| Erreur | 288,833 | 629 | | |

Annexe 1.6 : Variance totale expliquée

| Composante | Valeurs propres initiales | | | Extraction Sommes des carrés des facteurs retenus | | |
|------------|---------------------------|------------------|-----------|---|------------------|---------------|
| | Total | % de la variance | % cumulés | Total | % de la variance | % cumulés |
| 1 | 2,691 | 44,849 | 44,849 | 2,691 | 44,849 | 44,849 |
| 2 | 1,033 | 17,220 | 62,069 | 1,033 | 17,220 | 62,069 |
| 3 | ,958 | 15,973 | 78,043 | | | |

Annexe 2.7 : les valeurs propres des composantes des axes du plan factoriel

| Matrice des composantes ^a | | |
|--------------------------------------|------------|-------|
| | Composante | |
| | 1 | 2 |
| concentration en spore/ml | -,536 | -,328 |
| t150 | ,847 | -,032 |
| t1100 | ,891 | -,076 |
| Tm | ,907 | -,077 |
| délai d'apparition du duvet mycélien | ,011 | ,952 |
| croissance radiale | -,264 | ,084 |

Annexe 2.8 : Etude sur la régression linéaire en fonction de la composition du milieu de culture

| Récapitulatif des modèles ^b | | | | | | | | | |
|--|-------------------|--------|---------------|---------------------------------|----------------------------------|----------------|------|------|---------------------|
| Modèle | R | R-deux | R-deux ajusté | Erreur standard de l'estimation | Changement dans les statistiques | | | | |
| | | | | | Variation de R-deux | Variation de F | ddl1 | ddl2 | Sig. Variation de F |
| 1 | ,961 ^a | ,923 | ,899 | 2928294,904 | ,923 | 38,912 | 4 | 13 | ,000 |

a. Valeurs prédites : (constantes), Rapport C/N, Calcium, Carbone, Azote

b. Variable dépendante : V12

Annexe 2.9 : valabilité du modèle linéaire obtenu

| ANOVA ^a | | | | | | |
|--------------------|------------|----------------------|-----|---------------------|--------|-------------------|
| Modèle | | Somme des carrés | Ddl | Moyenne des carrés | D | Sig. |
| 1 | Régression | 1334679050160332,800 | 4 | 333669762540083,200 | 38,912 | ,000 ^b |
| | Résidu | 111473843617444,670 | 13 | 8574911047495,744 | | |
| | Total | 1446152893777777,500 | 17 | | | |

a. Variable dépendante : V12

b. Valeurs prédites : (constantes), Rapport C/N, Calcium, Carbone, Azote

Annexe 2.10 : valeurs des constantes de la fonction de regression

| | | Coefficients ^a | | | | |
|--------|-------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------|--------|------|
| Modèle | | Coefficients non standardisés | | Coefficients standardisés | t | Sig. |
| | | A | Erreur standard | Bêta | | |
| 1 | (Constante) | - | 3321945,614 | | -4,175 | ,001 |
| | | 13870201,50 | | | | |
| | | 2 | | | | |
| | Azote | 994280465,1 | 524831101,231 | ,318 | 1,894 | ,081 |
| | | 59 | | | | |
| | Carbone | 1078068179, | 190793436,338 | ,802 | 5,650 | ,000 |
| | | 427 | | | | |
| | Calcium | 28510278292 | 3077012640,834 | ,733 | 9,266 | ,000 |
| | | ,260 | | | | |
| | Rapport C/N | -23362,099 | 163058,727 | -,016 | -,143 | ,888 |

a. Variable dépendante : V12

Annexe 2.11 : Analyse univariée sur la croissance radiale

| Source | ddl | D | Sig. |
|-------------------------|-----|----------|------|
| Modèle corrigé | 39 | 3,835 | ,000 |
| Ordonnée à l'origine | 1 | 2993,224 | ,000 |
| ISOLATS | 9 | 5,212 | ,000 |
| TRAITEMENT | 3 | 10,157 | ,000 |
| ISOLATS * TRAITEMENT | 27 | 2,673 | ,000 |

Annexe 2.12 : Analyse univariée du délai d'apparition du duvet mycélien

| Source | Ddl | Moyenne des carrés | D | Sig. |
|----------------------|-----|--------------------|---------|------|
| Modèle corrigé | 40 | 2,341 | 3,522 | ,000 |
| Ordonnée à l'origine | 1 | 353,541 | 531,996 | ,000 |
| Isolats | 9 | 2,779 | 4,182 | ,000 |
| Traitement | 4 | 5,802 | 8,731 | ,000 |
| Isolats * Traitement | 27 | 1,657 | 2,494 | ,001 |
| Erreur | 79 | ,665 | | |
| Total | 120 | | | |
| Total corrigé | 119 | | | |

Annexe 2.13 : Analyse univariée des paramètres d'infestation mesurée dans les plantations en production

| Source | Somme Des Carrés De Type III | Ddl | D | Sig. |
|--------------------------|------------------------------|-----|-----------|------|
| Modèle Corrigé | 752,099 ^a | 329 | 4,978 | ,000 |
| Ordonnée A L'origine | 33316,813 | 1 | 72554,907 | ,000 |
| Paramètres | 37,411 | 9 | 9,052 | ,000 |
| Plantations | 384,715 | 32 | 26,181 | ,000 |
| Paramètres * Plantations | 330,792 | 288 | 2,501 | ,000 |
| Erreur | 288,833 | 629 | | |

Annexe 1.14 : Analyse univariée des paramètres d'infestation mesurée dans les plantations en jachère

| Source | Somme des carrés de type III | ddl | Moyenne des carrés | D | Sig. |
|---------------------------|------------------------------|-----|--------------------|---------|------|
| Modèle corrigé | 10,037 ^a | 20 | ,502 | 2,622 | ,005 |
| Ordonnée à l'origine | 27,255 | 1 | 27,255 | 142,365 | ,000 |
| PLANTATIONS | 2,161 | 2 | 1,080 | 5,644 | ,007 |
| TRAITEMENTS | 2,109 | 6 | ,352 | 1,836 | ,119 |
| PLANTATIONS * TRAITEMENTS | 2,942 | 12 | ,245 | 1,281 | ,270 |
| Erreur | 7,083 | 37 | ,191 | | |

ANNEXES 3 : PUBLICATION SCIENTIFIQUE ET COMMUNICATIONS ISSUES DE LA
THESE

Annexes 2.1. : Article



Optimisation de la sporulation de dix isolats de Côte d'Ivoire de *Metarhizium anisopliae* par la culture sur milieux à base de parches de cacao et de café, et de la mélasse.

KOUADIO Demby Laetitia Muriel^{1*}, Amani Bienvenu³, ABY N'goran², ABO Kouabenan¹, TRAORE Siaka², KOBENAN Kouman², GNONHOURI Philippe²

¹ Institut National Polytechnique Houphouët Boigny, Côte d'Ivoire

² Centre National de Recherche Agronomique, Côte d'Ivoire

³ Université Jean Lorougnon Guédé, UFR Agroforesterie

*auteur correspondant : email : dlnkouadio@gmail.com, téléphone : 00 225 08 05 92 32

Original submitted in on 9th January 2019. Published online at www.m.elewa.org/journals/ on 30th June 2019
<https://dx.doi.org/10.4314/jab.v138i1.4>

RÉSUMÉ

Objectif : L'étude vise à rechercher des milieux alternatifs de culture pour la production en masse de *Metarhizium anisopliae*, conditions nécessaires à la formulation d'un bio pesticide. Spécifiquement, des milieux de culture, issus de la valorisation des parches de café et de cacao) et de la mélasse ont été testés à cet effet

Méthodologie et résultats : Les parches de café et de cacao, réduits en poudre pour leur utilisation. La capacité de sporulation de chaque milieu est évaluée à l'hématimètre de Malassez. Ces milieux, complétés avec de l'antibiotique chloramphénicol, sont répartis dans des boîtes de Pétri de 11 cm de diamètre. Quatre répétitions sont réalisées par milieu. Les colonies des isolats de *Metarhizium anisopliae*, sur les milieux de cultures, abondent après repiquage, en moyenne au bout de 10 jours d'incubation (28±2°C) à l'obscurité. La réaction singulière de chaque isolat sur chaque milieu de culture a permis d'identifier le milieu adéquat, T1Camel, T11Camel, T10Camel, T8Camel ou T9Camel, au développement des isolats en remplacement des milieux conventionnels que sont le riz et le PDA.

Conclusion et application des résultats : Les milieux composés de café, de cacao et de mélasse peuvent être utilisés comme milieu de culture de *Metarhizium anisopliae* pour la formulation d'un bio pesticide contre le charançon noir du bananier.

Mots clés : *Metarhizium anisopliae*, café, cacao, mélasse, Côte d'Ivoire

ABSTRACT

Objective: The study aims to search for alternative culture media for the mass production of *Metarhizium anisopliae*, conditions necessary for the formulation of a bio pesticide. Specifically, growing media from the processing of coffee and cocoa residues and molasses were tested.

Methodology and Results: The parchment of cocoa and coffee are reduced in powder. The sporulation capacity of the media are evaluated with Malassez hematimeter. Each media are supplemented with an antibiotic, chloramphenicol. The singular reaction of each isolate on each culture medium made it possible to identify the appropriate media, T1Camel, T11Camel, T10Camel, T8Camel or T9Camel, for the development of the isolates to replace rice media and PDA.

Conclusion and application of results: Media composed of coffee, cocoa residues and molasses can be used as a media for the growing of *Metarhizium anisopliae* for the formulation of a biopesticide against black banana weevil.

Keywords: *Metarhizium*, cocoa, coffee, molasses, Côte d'Ivoire

INTRODUCTION

Les microorganismes entomopathogènes occupent une place importante parmi les méthodes alternatives de lutte contre ce bio agresseur. Ainsi, des essais réalisés en Amérique, en Australie et en Afrique ont montré des résultats concluants avec les champignons entomopathogènes des genres *Beauveria* et *Metarhizium* (Ochieng, 2001). En Côte d'Ivoire, *Metarhizium anisopliae*, a été identifié sur les aires de culture bananière (Kouadio *et al.*, 2018, Aby, 2013). Les tests préliminaires (Aby, 2013) sur les isolats obtenus ont révélé des comportements variables selon les critères tels que : l'aptitude à provoquer la mycose mortelle chez l'hôte et la réaction aux différents pesticides courants en plantation. L'efficacité de son mode d'action fait de lui un bio-insecticide par excellence. Pour l'utilisation étendu de ce bio insecticide, une production importante de sa biomasse est nécessaire, en utilisant des techniques simples et peu coûteuses. Le riz est le milieu qui

s'est révélé être le plus performant pour la production en milieu solide sur substrat naturel (Latifian *et al.*, 2014). Cependant, la production du riz en Afrique reste déficitaire et l'importation est nécessaire pour couvrir la demande. Les industries agricoles et alimentaires engendrent des quantités appréciables de sous-produits, qui sont pour la plupart peu ou pas valorisés et dont le rejet dans la nature constitue une menace pour l'environnement, néanmoins ils peuvent être utilisés pour des fins biotechnologiques. A cet effet, notre étude est basée sur l'utilisation des résidus agroindustriels comme substrat pour la culture du champignon dans le but d'obtenir un rendement en biomasse important. L'étude a porté sur la sporulation de dix isolats locaux de *Metarhizium anisopliae* sur des milieux naturels solides issus de l'industrie agroalimentaire qui sont les parches de café et de cacao, de la mélasse et du sucre de canne.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Matériel fongique : Le matériel fongique est issu d'une collecte réalisée en 2008 dans différentes aires de production bananière des régions des Grands Ponts, de l'Agneby-tchassa et du Sud Comoé en Côte d'Ivoire. Il se compose de dix isolats de *Metarhizium* spp auxquels des noms de code ont été attribués selon la région de provenance. Les isolats : Bas6, Bme2, et Bme5 ont été récoltés dans la région des grands ponts, dans la plantation Batia. Deux autres isolats D23 et D24 sont issus de la plantation SAKJ Diby, dans la région Sud Comoé. Les isolats Dme1, Elima A7 et Mete sont issus de la plantation Elima, dans la région Sud Comoé. Les isolats Egl1, Egl2 sont issus

respectivement des plantations d'Eglin Azaguié et d'Eglin Agboville.

Milieux de cultures : Les substrats des différents milieux naturels seront constitués des sous-produits du café, du cacao et de sucre de canne/Mélasse. Leur efficacité en tant que substrat de base pour la production en masse est comparée à celle du milieu riz, qui jusque-là, a prouvé son efficacité, et au milieu PDA.

Méthodes

Préparation des milieux de culture à base de parche de cacao, de parche de café et de mélasse/ sucre de canne : Les substrats des différents milieux intermédiaires et organiques sont constitués des sous-produits de café, de cacao et de sucre de canne ou de

mélasse de la canne à sucre. Leur efficacité en tant que substrat de base pour la production en masse de *Metarhizium* sp est comparée à celle du milieu à base de grain de riz qui, jusque-là, a prouvé son efficacité. Après stérilisation à l'autoclave, les substrats ont été ensemencés par des rondelles de 0,5 cm de diamètre de culture pure de *Metarhizium*. Ils ont, ensuite, été mis en incubation à l'étuve 28 ± 2 °C. Les parches de café et de cacao, réduits en poudre pour leur utilisation, sont

considérés comme la source principale de protéine en négligeant les autres apports (glucides, lipides). La canne à sucre et la mélasse seront considérées comme la source de glucides (Tableau 1). La capacité de sporulation de chaque milieu est évaluée à l'hématimètre de Malassez. Ces milieux, complétés avec de l'acide citrique, ont été répartis dans des boîtes de Pétri de 11 cm de diamètre.

Tableau 1 : composition des traitements pour 125 ml d'eau distillée

| Traitements | Composition (%) |
|-------------|---|
| T0 | 5g riz +5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T1 | 100% Ca/Cf + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T2 | 90% Ca/Cf + 10% S/M+ 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T3 | 75% Ca/Cf + 25% S/M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T4 | 50% Ca/Cf + 50% S/M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T5 | 25% Ca/Cf + 75% S/M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T6 | 10% Ca/Cf + 90% S/M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T7 | 100% S/M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T8 | Ca + M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T9 | Ca + M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T10 | Ca+M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |
| T11 | Ca + M + 5g A+ 0,125g de chloramphénicol |

Ca : cacao, Cf : café, S : sucre, A : agar, R : riz, P : semoule de pomme de terre, G : glucose, M : mélasse

Etude de la sporulation : Les isolats ont été cultivés sur les différents milieux dans des boîtes de Pétri pendant 21 jours. La colonie formée dans chaque boîte de Pétri a été ensuite raclée avec une spatule stérile et agitée à 150 Tr/min pendant 30 min dans 10 ml d'eau distillée stérile. L'évaluation de la capacité à sporuler a été réalisée par numération à l'aide d'un hématimètre de Malassez, selon la méthode décrite par Aby (2013).

Analyse statistique : Les résidus des données obtenues ont d'abord subi un test de normalité. Les valeurs des paramètres évalués ont été soumises à des analyses de variance en utilisant les modèles linéaires généralisés. Les concentrations ont subi une transformation logarithmique népérienne préalable avant leur analyse.

RÉSULTATS

Les colonies des isolats de *Metarhizium* sp sur les milieux de cultures se développent après repiquage, en moyenne au bout de 10 jours d'incubation (28 ± 2 °C) et à l'obscurité. Les différents milieux de culture favorisent la germination et la sporulation des différents isolats de *Metarhizium* sp. Tous les milieux de culture utilisés permettent le développement de tous les isolats, mais avec un degré d'évolution différent en fonction de l'isolat et de la composition du milieu.

- Sur les milieux PDA et riz, tous les isolats ont donnés des colonies de couleur blanc cotonneux devenant verdâtre foncée après 21 jours (figure 1C).
- Sur les milieux à base de cacao, les isolats ont présenté en début de croissance un mycélium d'aspect blanc cotonneux. A 21 jours, un léger changement, d'aspect jaunâtre apparait au centre de la colonie tandis que tout le reste de la colonie demeure blanc (figure 1B).

- Sur les milieux à base de café et de 100% et plat en début de croissance et à maturité (figure 1A).
mélasse, le mycélium des isolats est blanc cotonneux

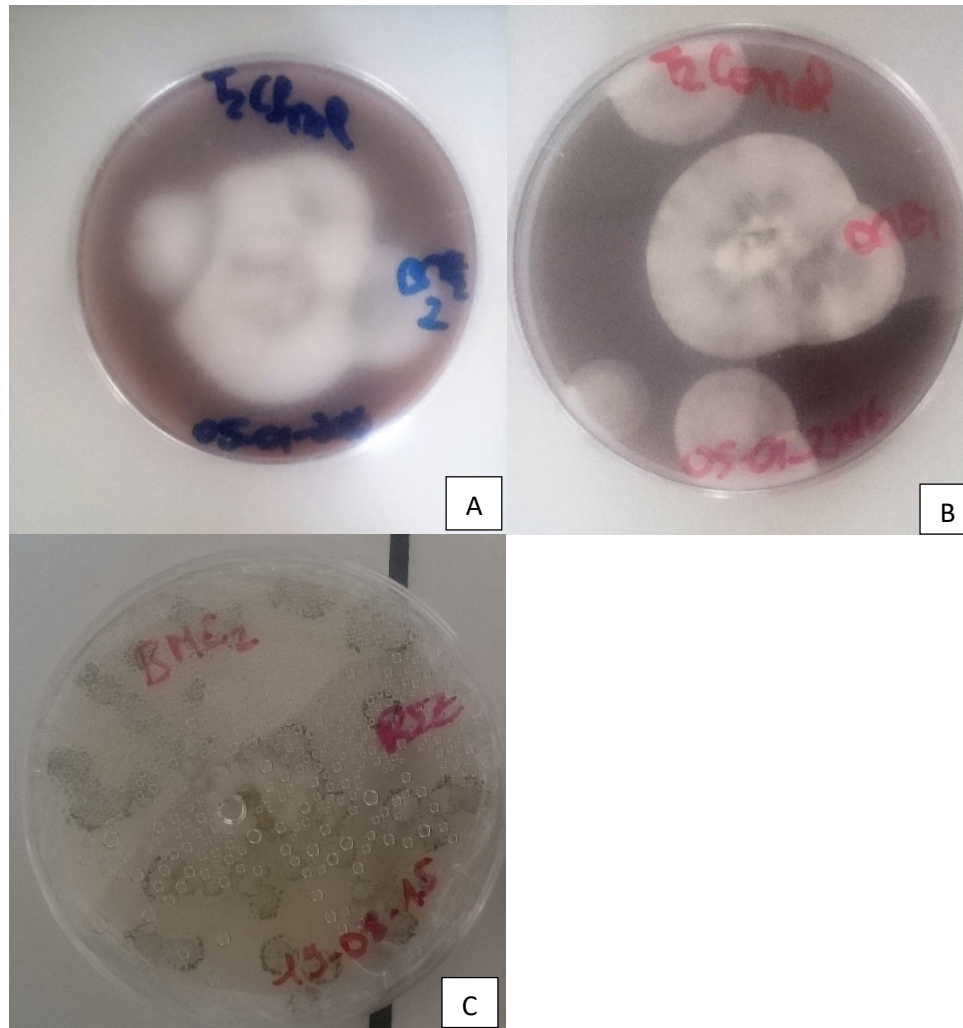


Figure 1 : Aspect macroscopique des isolats de *Metarhizium* sp de 21 jours sur les milieux de culture, A : café et mélasse, B : cacao, C : riz

La maturation des isolats se manifeste après 21 jours d'incubation. Cela se matérialise par l'apparition d'un nombre important de spores de couleurs vertes sur les milieux de culture. Ces pigments verts ne sont

observables que sur les milieux PDA et riz. La concentration en spore des isolats diffère selon le milieu de culture (de cacao ou de café et/ou de mélasse ou de canne à sucre).

Tableau 2: Analyse de variance univariée pour les facteurs milieu et isolat.

| Source | Somme des carrés de type III | Ddl | Moyenne des carrés | des | Sig. |
|----------------------|------------------------------|-----|--------------------|-----|------|
| Modèle corrigé | 752,099 ^a | 329 | 2,286 | | ,000 |
| Ordonnée à l'origine | 33316,813 | 1 | 33316,813 | | ,000 |
| ISOLATS | 37,411 | 9 | 4,157 | | ,000 |
| TRAITEMENT | 384,715 | 32 | 12,022 | | ,000 |
| ISOLATS * TRAITEMENT | 330,792 | 288 | 1,149 | | ,000 |

La composition du milieu de culture influence hautement la concentration en spore des isolats ($p < 0,001$). Le milieu riz a été celui qui a permis de manière générale une meilleure expression de la capacité de sporulation. Cinq groupes homogènes se sont dégagés des milieux testés. Deux groupes se sont

montré les plus adaptés par leur composition à l'expression de la capacité de sporulation des isolats (tableau 3). Le milieu riz forme le premier groupe. Un deuxième groupe est composé de : PDA, T1Camel, T11Camel, T10Camel, et T9Camel.

Tableau 3 : Classement de Student Newman et Skeuls du log de la concentration en spore des isolats de *Metarhizium* sp sur les milieux de culture

| Traitements | Log Concentration | |
|-------------|-------------------|---|
| T6Camel | 4,93 | a |
| T7CaS | 4,97 | a |
| T6CfS | 5,00 | a |
| T5CfS | 5,27 | a |
| T6CaS | 5,27 | a |
| T4CfS | 5,37 | b |
| T6Cfmel | 5,53 | b |
| T3Cfs | 5,60 | b |
| T2Cfmel | 5,63 | b |
| T5Camel | 5,67 | b |
| T5CaS | 5,67 | b |
| T3Cfmel | 5,69 | b |
| T4Cfmel | 5,77 | b |
| T3CfS | 5,90 | c |
| T5Cfmel | 5,90 | c |
| T7Camel | 5,90 | c |
| T4Camel | 5,97 | c |
| T4CaS | 6,00 | c |
| T2CfS | 6,03 | c |
| T3Camel | 6,10 | c |
| T2CaS | 6,13 | c |
| T3CaS | 6,13 | c |
| T2Camel | 6,30 | d |
| T8Camel | 6,30 | d |
| T1Cfmel | 6,48 | d |
| T9Camel | 6,77 | e |
| T10Camel | 6,83 | e |
| T11Camel | 6,86 | e |
| T1Camel | 6,93 | e |
| PDA | 6,97 | e |
| RIZ | 7,40 | f |

Les valeurs dans une même colonne avec des lettres différentes sont significativement différentes

Chaque isolat a réagi de manière significativement différente ($p < 0,001$) sur les différents milieux sur

lesquels il était mis en culture. Trois groupes ont été formés. Par ordre croissant de leur capacité de sporulation, ils sont composés de :

Groupe 1 : Egl2 ;

Groupe 2 : Dme1, Elima A7, Egl2, Bas6 D24, Egl1, Bme2;

Groupe 3 : Bme5, Bas6 ;

La sporulation de chaque isolat varie significativement ($p < 0,001$) en fonction du milieu sur lequel il est mis en culture. En effet, chaque isolat répond de manière singulière à un milieu donné. Les isolats Bas6, Bme2,

Bme5, Egl2 et Elima a7 ont atteint leur concentration maximale avec le milieu riz. Les isolats D24 et Mete se sont montrés plus sporulant sur le milieu PDA. Le milieu T10Camel a permis une meilleure expression de la capacité de sporulation de l'isolat Dme1. L'isolat D23 a quant à lui obtenu une meilleure réponse sur le milieu T1Ca. Le milieu T8Camel a été le milieu le plus sporulant pour l'isolat Egl1. Les trois meilleurs milieux ayant permis au mieux la sporulation des isolats sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Classement par ordre décroissant de l'efficacité des milieux de culture par isolat

| ISOLATS | MILIEUX | CONCENTRATION MOYENNE EN SPORE/ml | RANG |
|----------|----------|-----------------------------------|------|
| BAS6 | RIZ | 1,71E+07 | 1 |
| | T10Camel | 1,60E+07 | 2 |
| | T3Camel | 1,09E+07 | 3 |
| BME2 | RIZ | 3,54E+07 | 1 |
| | T8Camel | 2,08E+07 | 2 |
| | T9Camel | 1,72E+07 | 3 |
| BME5 | RIZ | 4,32E+07 | 1 |
| | PDA | 1,89E+07 | 2 |
| | T8Camel | 1,06E+07 | 3 |
| D23 | T1Camel | 8,50E+07 | 1 |
| | T10Camel | 2,48E+07 | 2 |
| | RIZ | 2,38E+07 | 3 |
| D24 | PDA | 3,42E+07 | 1 |
| | RIZ | 1,70E+07 | 2 |
| | T10Camel | 4,93E+06 | 3 |
| DME1 | T10Camel | 2,52E+07 | 1 |
| | T9Camel | 2,07E+07 | 2 |
| | T8Camel | 1,63E+07 | 3 |
| EGL1 | T8Camel | 1,12E+07 | 1 |
| | RIZ | 1,03E+07 | 2 |
| | T9Camel | 7,86E+06 | 3 |
| EGL2 | RIZ | 4,76E+07 | 1 |
| | PDA | 1,21E+07 | 2 |
| | T1Camel | 1,14E+07 | 3 |
| ELIMA A7 | RIZ | 6,00E+07 | 1 |
| | T10Camel | 1,14E+07 | 2 |
| | PDA | 1,11E+07 | 3 |
| METE | PDA | 4,60E+07 | 1 |
| | RIZ | 3,82E+07 | 2 |
| | T8Camel | 6,28E+06 | 3 |

DISCUSSION

La sporulation de cet entomopathogène a été observée sur tous les milieux testés au cours de l'étude. Parmi les milieux, le riz a produit significativement plus de conidies ($2,99.10^7$ spores par millilitres) suivi du milieu PDA ($1,56.10^7$ spores par millilitres). Une valeur nutritive élevée du riz et une teneur plus élevée en amidon favorisaient probablement une meilleure production de spores. Cette performance du substrat à base de riz a été mise en évidence par Aby (2013) et Latifian *et al.* (2014). Les autres milieux à base de parches de café ou de cacao et/ou mélasse ou de saccharose, ont montré des efficacités diverses quant à leur capacité à favoriser la sporulation des isolats. Les milieux riches en saccharose commercial ont été ceux qui ont été les moins sporulants, notamment les milieux T6Cfs ($2,11.10^5$ spores par millilitres), T7s ($2,28.10^5$ spores par millilitres), T5Cfs ($9,51.10^5$ spores par millilitres), et T6Cas ($4,70.10^5$ spores par millilitres). Le saccharose commercial ne constitue donc pas une source de carbone suffisante pour le développement des dix souches de *Metarhizium anisopliae*. Quelles que soient les proportions auxquelles il est ajouté au café ou au cacao, il induit une baisse de la sporulation. Les milieux cafés dans les mêmes proportions additionnées de mélasse ou de saccharose commercial, ont été moins sporulants que les milieux cacaos dans les mêmes conditions. Le milieu T1Cf (100% café) ayant été le plus sporulant des milieux cafés. La différence de concentration en spore des milieux cafés et cacaos dans les mêmes proportions peut s'expliquer par leur composition. La composition en méthylxanthines contenues dans le cacao (théobromine 0,5 à 2,7%, caféine 0,25 à 0,5%) et café (caféine 1 à 3%) peut en être l'une des causes. Cette différence pourrait expliquer la réaction. L'étude biochimique du catabolisme de la caféine chez des champignons filamenteux n'a pas fait l'objet de nombreux travaux. Par contre, plusieurs études ont porté sur la décaféination de la pulpe de café par voie biologique, et notamment sur la sélection de souches de champignons aptes à éliminer cet alcaloïde contenu dans ce sous-produit. Sans être a priori exceptionnelle, cette propriété n'est donc pas commune à un grand

CONCLUSION

Les milieux composés de café, de cacao et de mélasse peuvent être utilisés comme milieu de culture de *Metarhizium anisopliae* pour la formulation d'un bio-pesticide contre le charançon noir du bananier. Mis à

nombre de souches fongiques. La plupart des champignons filamenteux étudiés pour leur capacité à dégrader la caféine, appartiennent aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Perraud-Galme, 1995). Les spores de 6 jours d'*Aspergillus tamaritii* sont capables de dégrader la caféine en fermentation solide (Hakil *et al.*, 1999). La caféine peut être utilisée comme unique source d'azote par les champignons qui la dégradent (Kurtzman & Schwimmer, 1971). En effet l'ajout de source exogène de Carbone, saccharose commercial et mélasse, a engendré une baisse 3 à 16 fois la concentration obtenue avec le café à 100%. Cette remarque a été également observée sur une souche de *Penicillium crustosum* qui dégrade la caféine contenue dans une infusion de café en absence de source exogène de carbone, mais beaucoup plus lentement qu'en présence de saccharose ou de glucose (Kurtzman & Schwimmer, 1971). De même, plusieurs souches de *Penicillium* et d'*Aspergillus* dégradent la caféine de la pulpe de café, sans apport exogène de carbone ou d'azote (Perraud-Galme, 1995). En plus de leur capacité à apporter de l'azote par la matière sèche qu'elles contiennent les parches de cacao présentent l'avantage de fournir du carbone pour le développement des isolats. En effet, les coques de cacao stimulent l'activité microbienne par leur apport en carbone (C) labile, support énergétique des microorganismes (Barry, 2006). Sa plus faible proportion en caféine pourrait expliquer sa capacité à accepter l'ajout d'autre source de carbone, notamment la mélasse. La mélasse sous forme solide a présenté une capacité de sporulation inférieure à celle du riz, du PDA mais également des parches de café et de cacao utilisés à 100%. Latifian *et al.*, 2014 firent le même constat sur la forme solide de la mélasse. Ils démontrèrent par contre l'efficacité de la mélasse sous sa forme liquide, comparativement à plusieurs céréales dont le riz, pour la production et la germination des spores de *M. anisopliae*. Son ajout pour certains milieux à base de parches de cacao a permis d'accroître la capacité de sporulation sur le cacao notamment pour les isolats Dme1, D23, D24 et Egl1.

part les milieux riz et PDA, les milieux à forte concentration en cacao sont les plus adaptés à la culture des isolats. Ces sucres constituent une source de carbone indispensable au développement du

champignon. L'étude du preferendum cultural montre que les différents milieux naturels à base de parches de cacao et de mélasse pour certains isolats. Les taux de sporulation de *Metarhizium anisopliae*, sur les milieux constitués majoritairement de parches de cacao, permet de constater que ce sous-produit de l'industrie agricole convient à l'accroissement du champignon et qu'il peut

être utilisé comme milieu de culture. Les milieux à base de saccharose commerciale se sont montrés les moins sporulants pour le développement de l'ensemble des isolats. La projection de notre essai à grande échelle permettra de concrétiser les résultats obtenus au sein du laboratoire.

BIBLIOGRAPHIE

- Aby N, Kehe, M, Kobenan K. and Gnonhour P: 2008. Recherche de souches locales de champignons parasites des charançons du bananier dans les principaux bassins de production de banane dessert en Côte d'Ivoire, Premier rapport d'étape Projet FIRCA/CNRA, 22p.
- Aby N: 2013. Lutte biologique contre le charançon noir du bananier *Cosmopolites sordidus* Germar (Coléoptère, Curculinodae) en Côte d'Ivoire : Caractéristiques entomopathologiques d'isolats locaux de *Metarhizium* sp. sur les populations au laboratoire et en bananeraie, mémoire de thèse de Doctorat présentée à l'UFR biosciences de l'université de Cocody, p169,
- Barry Y: 2006. La transformation des apports organiques dans le sol (modèle TAO) : cas des apports riches en azote. Master Recherche CGSE : UHP, Nancy, France, 31p.
- Kouadio DLM, Kouabenan AK, Kouadjo ZC, Kobenan K, Traore S. and Gnonhour: 2018. Caractérisation d'isolats locaux de *Metarhizium* spp, champignon entomopathogène de *Cosmopolites sordidus* germar, isolés des bananeraies en Côte d'Ivoire, European Scientific Journal, vol.14, No.19, No.20, et No.21.
- Kurtzman Rh. and Schwimmer S: 1971. Caffeine removal from growth media by microorganisms. *Experientia*, 27 (4), 481-482.
- Latifian M, Rad B. and Amani M: 2014. Mass production of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* by using agricultural products based on liquid- solid diphasic method for date palm pest control, *International Journal of Farming and Allied Sciences*
- Ochieng VO: 2001. Genetic biodiversity in banana weevil *Cosmopolites Sordidus* populations in banana growing regions of the world, Ph.D. Thesis, University of Nairobi, 139p.
- Perraud-Galme : 1995. Cultures mixtes en milieu solide de bactéries lactiques et de champignons filamenteux pour la conservation et la décaféination de la pulpe de café. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier II, France, 210 p.

Annexes 2.2. : Communications

COMMUNICATION N°22 :

SCREENING DE MILIEUX ORGANIQUES A BASE DE PARCHES DE CAFE, DE CACAO ET DE CANNE A SUCRE COMME SUBSTRAT DE CULTURE DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*, PARASITE DU CHARANCON NOIR DU BANANIER

KOUADIO Demby Laetitia Muriel ^{1,2*} **ABY N'goran**², **TRAORE Siaka**², **AMANI Bienvenu**³, **GNONHOURI Phillipe**², **ABO Kouabenan**¹, **KOBENAN Kouman**²

1 Laboratoire de phytopathologie et de Biologie Végétale, Institut National Polytechnique Houphouët-Boigny (INP-HB), BP 1313 Yamoussoukro, Côte d'Ivoire

2 Centre National de Recherche Agronomique (CNRA), 01 BP 1536 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

3 Université Jean Lorougnon Guédé, UFR Agroforesterie BP 150 Daloa

*Auteur correspondant, E-mail : dlnkouadio@gmail.com, Téléphone : 0022508059232

Problématique

Le charançon noir du bananier, *Cosmopolites sordidus* Germar, occasionne d'importantes pertes économiques dans les bananeraies. L'approche de lutte consiste en l'usage de pesticides de synthèse. Ces produits sont connus pour leurs effets souvent néfastes sur la santé des utilisateurs et sur l'équilibre des écosystèmes. L'alternative à ces produits chimiques est la lutte biologique, avec divers champignons entomopathogènes, notamment des espèces de *Metarhizium*, ennemis naturels du charançon. Une collection de dix isolats de *Metarhizium anisopliae* a été obtenue à partir des cultures bananières en Côte d'Ivoire. Le riz est utilisé fréquemment comme substrat de base pour la production en masse du champignon. Toutefois, le prix élevé de cette denrée, et du reste, important aliment de base pour de nombreuses populations, limite son utilisation.

Objectif

L'étude vise à rechercher des milieux alternatifs de culture pour la production en masse de *Metarhizium anisopliae*, conditions nécessaires à la formulation d'un biopesticide. Spécifiquement, des milieux de culture, issus de la valorisation des résidus agricoles (café, cacao) et de l'industrie (canne à sucre) ont été testés à cet effet.

Méthodes

Des parches de cacao et de café, réduits en poudre, sont considérés comme la source principale de protéines. La mélasse a été considérée comme la source de glucides. Leur efficacité, en tant que substrat de base pour la production en masse de *Metarhizium anisopliae*, est comparée à celle des milieux riz et PDA (*Potato Dextrose Agar*) par la concentration en spores induite et la croissance radiale du champignon.

Résultats

Les colonies des isolats de *Metarhizium anisopliae*, sur les milieux de cultures, abondent après repiquage, en moyenne au bout de 10 jours d'incubation (28±2°C) à l'obscurité. Les milieux organiques les plus performants après les milieux riz et PDA ont été les milieux composés de 100 % de cacao (T1Camel), avec 1,2.10⁶ spores/ml, de mélasse et de cacao T10 Camel, avec 1,11 10⁶ et 100 % café, avec 8,4.10⁵ spores/ ml. Les milieux de culture ont montré une réaction différente (p<0,001) selon leurs compositions à favoriser la croissance radiale des isolats. Le fort taux de sucre apporté par la mélasse dans certains milieux favoriserait la croissance radiale au détriment de la sporulation.

Conclusion

Les milieux composés de café, de cacao et de mélasse peuvent être utilisés comme milieu de culture de *Metarhizium anisopliae* pour la formulation d'un biopesticide contre le charançon noir du bananier

Mots clés : Milieux organiques, culture, *Metarhizium anisopliae*

RÉDUCTION DES INFESTATIONS DU CHARANÇON NOIR *COSMOPOLITES SORDIDUS* PAR L'APPLICATION DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* EN CULTURE DE BANANIER DESSERT

Aby N., Demby L. M. K., Kobenan K., Traoré S., Deless .T.F.E, Ghnonhourri G.P., Badou J., Ouya A., Koné D., Philippe K.

Dans l'objectif de disposer une méthode de lutte efficace contre le charançon noir du bananier, des essais ont été conduits en Côte d'Ivoire de juillet 2012 à Août 2014 dans les plantations SPDCIE à Dabou (Sud), SCB BANCOMOÉ à Akoupé (Centre-Est) et SAKJ à Ayamé (Sud-Est). Les combinaisons, phéromone + eau et phéromone + *Metarhizium* ont été testées pour l'assainissement des jachères. Le piège Vilardebo + *Metarhizium*, insecticide chimique suivi de piège Vilardebo + *Metarhizium* et insecticide chimique ont été testées pour la gestion des infestations en production continue.

Quatre (4) décorticages ont permis de suivre les niveaux d'infestation des parcelles. Dans les parcelles en production continue, le traitement piège Vilardebo + *Metarhizium* a diminué les coefficients et pourcentages d'infestation jusqu'en dessous des seuils, respectivement de 96,67% et 93,05% à SAKJ ; de 49,33% et 50,84% à SCB BANCOMOÉ ; 50,58% et 17,56% à SPDCIE. Quand à l'insecticide chimique appliquée en moyenne deux fois sur cette période, il a induit des baisses de ces paramètres respectivement à SAKJ de 99% et 94%, à SCB BANCOMOÉ de 90% et 87% et à SPDCIE 94% et 72%. Après la replantation des jachères, la combinaison phéromone + *Metarhizium* a induit des niveaux d'infestation inférieurs aux seuils d'intervention chimique : coefficient=1,2 (< au seuil 5), taux d'attaque =7 (< au seuil 10) tandis que dans les parcelles sans intervention une application d'insecticide chimique s'impose : coefficient=5 (= au seuil 5), taux d'attaque = 16 (> au seuil 10). L'intégration d'un bioinsecticide à base de *Metarhizium* dans les méthodes de lutte actuelles peut permettre de réduire les infestations des charançons et le niveau d'application des insecticides chimiques contre ce ravageur.

Mots clés : *Metarhizium anisopliae*, réduction, infestation, *Cosmopolites sordidus*, bananeraie