

---

**Mise au point d'une méthode d'évaluation des micro-organismes et  
identification de champignons entomopathogène pour la lutte contre la chenille  
légionnaire d'automne Spodoptera Frugiperda (J. E. Smith, 1797)**

**Auteur :** Vanden Bussche, Raphaël

**Promoteur(s) :** Francis, Frédéric

**Faculté :** Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

**Diplôme :** Master en bioingénieur : sciences agronomiques, à finalité spécialisée

**Année académique :** 2020-2021

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/12241>

---

*Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

**MISE AU POINT D'UNE METHODE D'EVALUATION  
DES MICRO-ORGANISMES ET IDENTIFICATION DE  
CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGENE POUR LA  
LUTTE CONTRE LA CHENILLE LEGIONNAIRE  
D'AUTOMNE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (J. E.  
SMITH, 1797)**

**RAPHAËL VAN DEN BUSSCHE**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2020-2021**

**PROMOTEUR : PROFESSEUR FREDERIC FRANCIS**

*"Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique de Gembloux Agro-Bio Tech"*

*"Le présent document n'engage que son auteur"*

**MISE AU POINT D'UNE METHODE D'EVALUATION  
DES MICRO-ORGANISMES ET IDENTIFICATION  
DE CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGENE POUR  
LA LUTTE CONTRE LA CHENILLE LEGIONNAIRE  
D'AUTOMNE *SPODOPTERA FRUGIPERDA* (J. E.  
SMITH, 1797)**

**RAPHAËL VAN DEN BUSSCHE**

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE  
MASTER BIOINGENIEUR EN SCIENCES AGRONOMIQUES**

**ANNEE ACADEMIQUE 2020-2021**

**PROMOTEUR : PROFESSEUR FREDERIC FRANCIS**



# Remerciement

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à l'accomplissement de ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur Professeur Frédéric Francis pour m'avoir donné la possibilité de réorienter mon travail de fin d'étude vers une thématique passionnante ainsi que pour son intérêt et sa disponibilité malgré un emploi du temps chargé.

Ensuite, je vous voudrais remercier Grégoire Noël pour les relectures, les nombreuses discussions et l'aide avec les analyses statistiques. Merci à Nicolas Poncelet pour m'avoir permis de prendre mes marques dès mon arrivée au laboratoire. Merci également à Emilie Bera pour les coups de mains en microbiologie. De même, Merci à Joachim Carpentier pour le coup de main en génomique. Enfin, je tiens à remercier toute l'unité d'entomologie fonctionnel et évolutive pour la bonne ambiance générale partagée et ce malgré un contexte particulier.

Merci à Lallie Glacet d'avoir été une binôme formidable lors de mes dernières années d'études. Merci à mes parents, mon frère Réginald, Nathalia et Tonton Jeannot d'avoir cru en moi jusqu'au bout. Merci Bilal pour ta fidèle amitié.

Je remercie du fond du cœur ma famille gembloutoise. Je pense particulièrement à Sam, Renard, Claire et Arthur sur qui j'ai pu compter à de nombreuses reprises pendant toutes ces années à la fac. Enfin, merci les Déch et tous les autres.

Je dédie ce travail à la mémoire de mon père.

## Résumé

L'émergence d'espèces invasives exotiques est un phénomène de plus en plus récurrent accentué par le dérèglement climatique et la mondialisation. La chenille légionnaire d'automne *Spodoptera frugiperda* est une espèce envahissante problématique qui depuis son introduction en Afrique en 2016 est maintenant répandue à travers toutes les régions tropicales et subtropicales du monde. L'utilisation des insecticides de synthèse pour répondre à cet envahisseur a conduit à une augmentation de populations résistantes du ravageur ainsi qu'à la diminution de ses ennemis naturels. Dans ce contexte, les recherches s'intensifient pour trouver des moyens de lutte efficaces qui permettent de cibler spécifiquement la légionnaire d'automne. A cet égard, les champignons entomopathogènes et les bactéries semblent être des candidats prometteurs comme alternative aux insecticides de synthèse. Dans ce travail, deux dispositifs ont été mis en place pour évaluer la pathogénicité de quatre souches de champignons isolées à partir de cadavres ainsi que les propriétés insecticides des métabolites produits par les bactéries *Streptomyces hygroscopicus* et *Streptomyces albus*. en utilisant *Spodoptera frugiperda* comme modèle biologique. Cependant, les micro-organismes étudiés dans ce travail n'ont pas diminué la survie des larves lors des essais biologiques. Un séquençage de la région ITS de l'ADN des quatre souches de champignons a permis d'identifier une souche d'*Aspergillus sp*, deux souches de *Penicillium sp* et une souche de *Metarhizium rileyi*. Ce travail constitue une première approche de l'étude des champignons entomopathogènes et des inhibiteurs de tréhalase sur le modèle de *Spodoptera frugiperda* et devrait permettre d'orienter les futures recherches en matière de lutte contre ce ravageur.



# Abstract

The emergence of exotic invasive species is a phenomenon increasingly recurrent and emphasised by climate change and globalisation. The fall armyworm *Spodoptera frugiperda* is a problematic invasive specie since its introduction in Africa in 2016 which is now widespread throughout tropical and subtropical regions of the world. The use of synthetic insecticides against these invaders has resulted in the increase of the resistant population of this pest and contributed to the decrease of its natural enemies. In this context, researches are intensifying to find effective control methods that specifically target the fall armyworm. In this regard, entomopathogenic fungi and bacteria seem to be promising candidates as an alternative to synthetic insecticides. For this research, two devices were put in place in order to evaluate the pathogenicity of four fungal strains isolated from cadavers and the insecticidal properties of the metabolites produced by bacteria *Streptomyces hygrosopicus* and *Streptomyces albus*. using *Spodoptera frugiperda* as a biological model. However, the micro-organisms studied here did not reduce larval survival during the bioassay. Sequencing of the ITS regions of each of the four fungal strains' DNA enabled to identify a *Aspergillus sp* strain, two *Penicillium sp* strains and a *Metarhizium rileyi* strain. This work represents a first approach for the study of entomopathogenic fungi and trehalase inhibitors with the *Spodoptera frugiperda* model and should help guide future researches in the control of this pest.

# 1 Table des matières

1.	Introduction .....	1
1.1	Contexte .....	1
1.2	<i>Spodoptera frugiperda</i> .....	4
1.2.1	Taxonomie, origine et répartition géographique .....	4
1.2.2	Biologie et cycle de vie .....	6
1.2.3	Œufs .....	6
1.2.4	Stades larvaires.....	7
1.2.5	Chrysalide.....	8
1.2.6	Imago.....	8
1.2.7	Plantes hôtes .....	9
1.3	Monitoring et caractérisation moléculaire de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	10
1.3.1	Surveillance de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	10
1.3.2	Caractérisation moléculaire de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	12
1.4	Ennemis naturels .....	13
1.4.1	Macro-organismes .....	13
1.4.2	Micro-organismes.....	15
1.5	Caractérisation moléculaire des champignons .....	20
2	Objectifs du travail .....	22
3	Matériels et méthodes.....	23
3.1	Conduite de l'élevage.....	23
3.2	Culture de micro-organismes .....	23
3.2.1	Culture des champignons entomopathogènes.....	23
3.2.2	Culture de <i>Streptomyces albus</i> et de <i>Streptomyces hygroscopicus</i> .....	24
3.3	Tests préliminaires .....	25
3.3.1	Pathogénicité des champignons.....	25
3.3.2	Toxicité des produits de fermentation de <i>Streptomyces</i> .....	26
3.4	Essai biologique .....	27
3.4.1	Toxicité des jus de fermentation introduit dans la diète .....	27
3.4.2	Pathogénicité des champignons.....	28
3.4.3	Concentration en spores des suspensions .....	28
3.4.4	Diagnostic de la mort des larves.....	29
3.5	Identification des souches de champignons entomopathogènes.....	29
3.5.1	Observation morphologique .....	29
3.5.2	Extraction, qualité et dosage de l'ADN.....	29
3.5.3	Amplification du gène ITS et séquençage des amplicons .....	30
3.6	Analyses statistique et bio-informatique .....	32

4	Résultats .....	34
4.1	Tests préliminaires .....	34
4.1.1	Pathogénicité des champignons.....	34
4.1.2	Toxicité des produits de fermentation de <i>Streptomyces</i> .....	37
4.2	Essais biologique.....	38
4.2.1	Toxicité des produits de fermentation de <i>Streptomyces</i> .....	38
4.2.2	Pathogénicité des champignons.....	38
4.2.3	Concentration en conidies viables des suspensions.....	39
4.2.4	Diagnostic de la mort des larves.....	40
4.3	Identification des souches de champignons .....	41
4.3.1	Observations morphologique.....	41
4.3.2	Dosage et qualité de l'ADN .....	42
4.3.3	Amplifications d'ADN .....	44
4.3.4	Traitement des séquences .....	45
4.3.5	Identification par Blastn et analyses phylogénétiques.....	45
5	Discussion .....	47
6	Conclusions et perspectives.....	55
7	Références .....	57
8	Annexes .....	66
8.1	Protocole d'extraction du kit DNeasy plant .....	66
8.2	Gels électrophorèses.....	67
8.3	Arbres phylogénétiques.....	69
8.4	Photo.....	70

## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
BIC	Bayesian Information Criterion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CABI	Centre for Agricultural Bioscience International
CIMMT	The International Maize and Wheat Improvement Center
COI	Cytochrome c oxidase subunit I
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EFE	Entomologie Fonctionnel et évolutive
EPPO	European and Mediterranean Plant Protection Organization
EU	European Union
FAMEWS	FAW Monitoring and Early Warning System
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FAW	Fall Armyworm
GYM	Glucose-Yeast extract Medium
IPM	Integrated Pest Management
IPPC	International Plant Protection Convention
ISP2	International Streptomyces Project-2 Medium
ITS	Internal Transcribed Spacer
L2Q	Laboratoire de Quarantaine
LT50	Median Lethal Time
MCL	Maximum Composite Likelihood
MPN	Most Probable Number
MUSCLE	MUltiple Sequence Comparison by Log- Expectation
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NJ	Neighbor-Joining
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PE	Polyéthylène
RDC	République Démocratique du Congo
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RH	Relative Humidity
RPB	RNA polymerase subunit
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SE	Standard Error
SfMNPV	Spodoptera frugiperda Multicapsid Nucleopolyhedrovirus
TE	Tampon Tris-EDTA
TFE	Travail de Fin d'étude
Tpi	Triose-phosphate isomérase
WG	Wettable Granules
WP	Wettable Powders

## Liste des tables

Tableau 1 : Prédateurs et parasitoïdes de <i>Spodoptera frugiperda</i> .....	14
Tableau 2 : Amorces et protocoles d'amplifications utilisés .....	31
Tableau 3 : Concentrations en conidies dans les suspensions pulvérisées (conidies viables/ml) .....	39
Tableau 4 : Dosage de l'ADN total et ratios d'absorbance pour les différentes souches de F1 à F4 des champignons et le contrôle positif (GHA= Botanigard 22WP) .....	42
Tableau 5 : Résultats de la recherche dans la base de données Blastn.....	46

## Liste des Figures

Figure 1 : Papillon adulte mâle <i>Spodoptera frugiperda</i> (Goergen et al., 2016) .....	4
Figure 2 : Plateforme global FAMEWS, données provenant des pièges à phéromone (FAO, 2020). .....	5
Figure 3 : Marques caractéristique de <i>Spodoptera frugiperda</i> (Visser, 2017).....	7
Figure 4 : Structures chimique du tréhalose (1), le substrat de la tréhalase et trois de ses inhibiteur. ( source : Matassini et al., 2020 ) .....	16
Figure 5 : Larve de <i>Spodoptera litura</i> complètement recouverte de mycélium de <i>Beauveria bassiana</i> . Photo: (Dhar et al., 2019).....	18
Figure 6 : Mode d'infection de <i>Beauveria bassiana</i> et répression du système immunitaire. Lors de la pénétration de l'appressoria, le microARN bba-milR1 est fortement exprimé pour inhibé la production de peptides antimicrobien. Une fois dans l'hémocoèle, cette expression diminue pour éviter l'expression du gène CLIPB9 qui active le processus de mélánisation. Source: Cui et al., 2019 .....	19
Figure 7 : Région ITS situé entre les petites et grandes sous-unités de l'ARN ribosomique et primers utilisés pour son amplification (Raja et al., 2017) .....	21
Figure 8 : Fermentation de streptomycetes hygrosopicus après 5 jours.....	24
Figure 9 : Courbes de survie Kaplan-Meier du 1 <sup>er</sup> test préliminaire. Le premier graphique en haut à gauche représente la courbe de survie globale de tous les traitements pris en même	

- temps. Les autres graphique représente les courbes de survie de chaque traitement (courbe pleine bleu) vis-à-vis du groupe témoin négatif (courbe en pointillé rouge) (Test Log-Rank)..... 35
- Figure 10 : Courbes de survie Kaplan-Meier du 2<sup>ième</sup> test préliminaire. Le premier graphique en haut à gauche représente la courbe de survie globale de tous les traitements pris en même temps. Les autres graphique représente les courbes de survie de chaque traitement (courbe pleine bleu) vis-à-vis du groupe témoin négatif (courbe en pointillé rouge) (Test Log-Rank)..... 36
- Figure 11 : Proportion des larves ayant atteint le stade chrysalide lors du test préliminaire n°2, erreur standard ( Test de Tukey HSD ..... 36
- Figure 12 : Courbes de survie Kaplan-Meier du 3<sup>ième</sup> test préliminaire. La courbe en pointillée rouge représente la survie du témoin négatif et la courbe pleine bleu représente la survie des larves dans le groupe traité. Les marges de couleurs autour des courbes représentent les intervalles de confiance des courbes de survies (Test Log-Rank)..... 37
- Figure 13 : Courbes de survie Kaplan-Meier des larves ayant été élevé sur diète artificiel modifiées. La courbe pleine rouge représente le contrôle positif traité avec le *Bacillus thuringiensis*. La courbe pleine bleu représente la diète témoin négatif constituée avec la gélatine. La courbe en pointillée mauve représente la diète témoin négatif constituée avec l'agar-agar. Les autres courbes en pointillées représente les modalités de contenant les jus de fermentation des bactéries filamenteuses *Streptomyces albus* et *Streptomyces hygroscopicus* à une concentration de 2% et 10%. (Test Log-Rank). ..... 38
- Figure 14 : Courbes de survie Kaplan-Meier des larves ayant été élevé en présence de spores. La courbe rouge pleine représente le contrôle positif composé de *Bacillus thuringiensis*, la courbe pleine bleu représente le témoin composé de Tween 80 à 0.05% et les courbes en pointillés représentent les modalités traitées avec les souches de champignons F1, F2, F3, F4 et GHA ( Test Log-Rank) ..... 39
- Figure 15 : Larves retrouvées mortes dans l'essais biologiques qui ont été stérilisées puis mises à incuber pour vérifier si la mort de la larve est due au champignon et ainsi évaluer la pathogénicité des souches étudiées ( F2 en haut à gauche ; GHA en haut à droite ; F1 en-bas). Photographie van den Bussche 2021 ..... 40
- Figure 16 : Observations microscopique réalisées sur les souches F1 et F2 avec un agrandissement ×40. La souche F1 sur l'image à droite possède des conidiophores en forme de vésicule hémisphérique et la souche F2 sur l'image de gauche possède des conidiophores munies de phialides biverticillées. Photographie van den Bussche 2021 41
- Figure 17 : Observations macroscopique des cultures sur PDA des quatre souches étudiées (De gauche à droite et de haut en bas) : Face supérieur de F2, face inférieur de F2, face supérieur et inférieur de F3 et face supérieur de F1). Photographie van den Bussche 2021 ..... 42

- Figure 18 : Migration sur gel électrophorèse des amplicons obtenu après PCR classique avec les amorces ITS5 et ITS4 sur les échantillons d'ADN des champignons F3 ( A1, A2 et A3), F1 (B1 et B2), F2 (C1 et C2).et *Beauveria bassiana* GHA (x1,x2 et BB(+)) extrait selon la première méthode d'extraction. Gelred et SYBRsafe ..... 67
- Figure 19 : Migration sur gel électrophorèse des amplicons obtenu après PCR classique avec les amorces its5 et its4 sur les échantillons d'ADN des champignons F1(1A, 1B, 1C), F2 (2A, 2B, 2C) et F4 (3A, 3B, 3C) extrait avec le kit QIAGEN DNeasy plant (L, ladder ; 1B, F1 ; 2A, F2 ; 3B, F4). A: Vérification de la qualité des extraction d'ADN. B:Vérification de la taille des amplicons sélectionnés pour le séquençage (~600bp)..... 67
- Figure 20 : Migration sur gel elctrophorèse des produits d'amplification du gène de la Calmoduline (Cam) avec la première méthode d'extraction ..... 68
- Figure 21 : Migration sur gel elctrophorèse des primer(résultats négatifs) du gene de la Calmoduline (Cam) sur les échantillon d'ADN extrait avec le kit QIAGEN DNeasy plant ..... 68
- Figure 22 : Migration sur gel électrophorèse des produits d'amplification du gène de la beta-tubuline (Ben/Tub2) avec la première méthode d'extraction ..... 68
- Figure 23 : Arbres phylogénétiques représentés ont été construit selon la méthode du maximum de vraisemblance. Le modèle de substitution choisi pour la construction des arbres A et B est le modèle à 3 paramètres de Tamura (source Tamura). Le modèle de substitution à 2 paramètres de Kimura a été choisi pour la construction de l'arbre C. Les arbres initiaux utilisés pour la recherche heuristique des arbres A et B ont été obtenus en appliquant la méthode Neighbor-Joining à une matrice de distances par paire estimées avec le modèle à 3 paramètre de Tamura. Les arbres initiaux utilisés pour la recherche heuristique ont été obtenus en appliquant la méthode de Neighbor-Joining à une matrice de distances par paires estimées à l'aide de l'approche MCL (Maximum Composite Likelihood). Une distribution Gamma discrète a été utilisée pour modéliser les différences de taux d'évolution entre les sites (5 catégories (+G, paramètre = 0,1380)). Pour tous les arbres construits, toutes les positions présentant une couverture de site inférieure à 95% ont été éliminées (i.e. Les lacunes d'alignement < 5%, les données manquantes et les bases ambiguës étaient autorisées à toutes positions) (option : Pairwise deletion). L'ensemble des données finales de A, B et C comportes 429, 411 et 334 positions nucléotidiques respectivement. La construction des arbres A, B et C résulte de l'analyses de 11, 12 et 13 séquences nucléotidiques respectivement. L'arbre A représente les relations phylogénétiques entre 11 organismes appartenant au genre *Aspergillus* de la section Flavi. L'arbre B représente les relations phylogénétiques entre 12 organismes du genre *Penicillium* de la section Citrina. L'arbre C représente les relations phylogénétiques entre la souche F3 (*Metarhizium rileyi*) et les 10 organismes proches sélectionnés dans la base de données NCBI. .... 69
- Figure 24 : Fermentation liquide de *Streptomyces albus* après 5 jours à 37°C..... 70

# 1. Introduction

## 1.1 Contexte

La légionnaire d'automne, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera :Noctuidae) est un ravageur important de plus de 80 productions végétales différentes. Avec une préférence pour les Poaceae comme le maïs, le riz, le sorgho, le millet ou encore la canne à sucre, elle peut aussi s'attaquer au coton, au arachides, au soja ou aux plantes maraichères (Day et al., 2017; FAO, 2017a). Selon Montezano et al. (2018), il existe en Amérique plus de 350 espèces de plantes enregistrées comme hôte de *S. frugiperda*. Cette espèce très colonisatrice a un cycle de vie de 30 jours, un potentiel reproducteur de 1000 œufs par femelle et une capacité à parcourir des distances de plus de 100 km en utilisant le vent (Johnson, 1987; FAO, 2017a).

En janvier 2016, cet insecte originaire des régions tropicales et subtropicales du continent américain a été détecté pour la première fois en Afrique de l'Ouest et s'est rapidement répandu à travers toute l'Afrique subsaharienne (Goergen et al., 2016; Cock et al., 2017). Actuellement, elle a colonisé la plupart des régions tropicales et subtropicales du monde, puisque sa présence a ensuite été confirmée pour la première fois en Inde en juillet 2018 et dans 5 pays d'Asie dont la Chine au début de l'année 2019 (Hruska, 2019). Le 1<sup>er</sup> août 2019, le règlement (EU) 2016/2031 relatif aux mesures de protection contre les organismes nuisibles aux végétaux a été complété d'une liste d'organismes de quarantaines prioritaires où *S. frugiperda* y figure (Europ, 2016). Plus récemment, sa présence a été confirmée en Australie (IPPC, 2020).

Bien que la littérature sur le contrôle de la légionnaire d'automne soit conséquente, celle-ci provient essentiellement du continent Américain où les systèmes agricoles diffèrent de l'Afrique notamment au niveau de la taille des exploitations. Par exemple, en Afrique 98% des paysans sont des petits cultivateurs qui exploitent des parcelles inférieures à 2 ha (Fritz et al., 2015; Day et al., 2017; FAO, 2017b). En l'absence de contrôles, les pertes de rendements liées à ce ravageur ne sont pas négligeables. Selon une estimation de Day et al. (2017), les pertes de rendement des cultures de maïs occasionnées par la légionnaire d'automne dans 12 pays d'Afrique se situe entre 8,3 et 20,6 millions de tonnes par an. En Afrique, la légionnaire d'automne est le facteur le plus important qui affecte les rendements avant la sécheresse (Rwomushana et al., 2018).



Menaçant la sécurité alimentaire en Afrique, la première réponse à l'émergence de la légionnaire d'automne a été l'utilisation de pesticides chimiques (Prasanna et al., 2018a). Selon l'étude de Togola et al. (2018) les résidus de 5 substances actives (Deltaméthrine, Permethrine, Cyperméthrine, Lambda-cyhalothrine et Chlorpyrifos) couramment utilisées pour lutter contre la légionnaire d'automne, persistent dans le sol et l'environnement avec des impacts négatifs sur la santé humaine ainsi que sur les organismes non-cibles. Ces impacts sont particulièrement importants dans le contexte Africain où l'accès aux matériels de protection individuel est onéreux pour les petits paysans et où les produits utilisés sont souvent interdits en Europe en raison de leur toxicité (Rwomushana et al., 2018). De plus, l'utilisation répétée d'insecticides aboutit inévitablement au développement de populations résistantes chez les ravageurs (Yu et al., 2003). Les insecticides de synthèse à large spectre ou à base d'extraits de plantes, ont des effets néfastes sur les ennemis naturels des ravageurs (Monsreal-Ceballos et al., 2018; Prasanna et al., 2018a). Globalement, les pesticides sont le deuxième facteur de la disparition des espèces après la perte d'habitat due à la conversion vers l'agriculture intensive (Sánchez-Bayo et al., 2019).

Le concept de lutte intégrée (Integrated Pest Management en anglais « IPM ») est né dans les années 70 avec la prise de conscience des risques liés aux pesticides (Kogan, 1998). Depuis, les méthodes chimiques sont progressivement remplacées par des méthodes biologiques telles que l'utilisation de micro-organismes, de prédateurs ou de parasitoïdes (Kouassi, 2001). Parmi ceux-ci, les micro-organismes, les champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* ont montré des effets significatifs contre la légionnaire d'automne (Akutse et al., 2019). Ceux-ci offrent également une meilleure compatibilité vis-à-vis des parasitoïdes par rapport aux insecticides de synthèse (Ramos et al., 2020).

Les myco-insecticides sont moins sujets au développement de résistance chez les insectes cibles car les champignons entomopathogènes agissent généralement selon plusieurs modes d'action. De plus, ils sont généralement moins toxiques pour les mammifères, ce qui les rendent intéressants pour une utilisation dans un programme de lutte intégrée. Cependant, les myco-insecticides ne sont pas toujours spécifiques à l'espèce et peuvent avoir une large gamme d'hôte. Ce qui pourrait avoir des effets néfastes sur les populations de prédateurs et parasitoïdes des ravageurs mais aussi sur les pollinisateurs. Il est donc important de comprendre leurs effets sur les insectes non-cibles. Les interactions entre les plantes, les micro-organismes et les insectes font de plus en plus l'objet de recherches (Ludwig et al., 2001).

Le contrôle biologique est une des clefs de la gestion intégrée des bio-agresseurs. Trois stratégies de contrôle biologique peuvent être envisagées. La première est le contrôle biologique classique, qui consiste à importer un ennemi naturel provenant de la région d'origine du ravageur. La deuxième stratégie est de fournir un contrôle temporaire en relâchant un ennemi naturel qui a été produit en grande quantité, c'est le contrôle biologique par augmentation. La troisième est le contrôle biologique par conservation des ennemis naturels déjà présent dans le milieu qui peut être amélioré par l'application de pratiques culturales variées (Kenis et al., 2019).

Dans sa région d'origine, *S. frugiperda* a de nombreux ennemis naturels. En effet, l'étude de (Molina-Ochoa et al., 2003), fourni un inventaire de 150 espèces de parasitoïdes et parasites appartenant à 14 familles dont neuf appartiennent à l'ordre des Hyménoptères, quatre à l'ordre des Diptères et une parmi les Nématodes. Parmi ceux-ci, *Telenomus remus* Nixon est un Hyménoptère parasitoïde des œufs de Lépidoptères qui a été utilisé comme agent de lutte biologique dans de nombreuses régions du monde pour lutter contre *Spodoptera* spp. (Pomari et al., 2013; Kenis et al., 2019).

Au sein de l'espèce *S. frugiperda*, il existe deux populations qui sont adaptés à des plantes hôtes différentes. La première est inféodée au maïs (*Zea mays* L.) et la deuxième au riz (*Oryza sativa* L.) (Pashley, 1988). En l'absence de technique moléculaire, il est impossible de distinguer les deux populations avec certitude car elles sont identiques morphologiquement (Levy et al., 2002). L'identification des populations est importante car des différences biologiques, toxicologiques et comportementales ont été observées (Meagher et al., 2003). L'analyse du polymorphisme des fragments de restriction générés après digestion d'une région de 569bp (appelée PCR-RFLP) du gène mitochondriale de la sous-unité 1 du Cytochrome oxydase (COI) est une méthode qui a permis de différencier les deux populations (Levy et al., 2002). Ces deux populations peuvent aussi être identifiées grâce au gène de la Triose Phosphate Isomérase (Tpi) (Nagoshi, 2012). Le polymorphisme génétique entre ces deux populations résulte principalement d'une spéciation due à la différence dans la chronologie de l'accouplement (Unbehend et al., 2014). Cependant, des populations hybrides existent et s'accouplent avec des individus de lignées pures. Des différences dans la composition des phéromones sexuelles ont également été relevées (Groot et al., 2008).

## 1.2 *Spodoptera frugiperda*

### 1.2.1 Taxonomie, origine et répartition géographique

La position de la légionnaire d'automne (FAW, i.e. Fall Army Worm en anglais) dans l'arbre taxonomique est la suivante (CABI, 2020) :

- Embranchement : *Arthropoda*
- Classe : *Insecta*
- Ordre : *Lepidoptera*
- Super-famille : *Noctuoidea*
- Famille : *Noctuidae*
- Sous-famille : *Noctuinae*
- Genre : *Spodoptera*
- Espèce : *Spodoptera frugiperda*



FIGURE 1 : Papillon adulte mâle *Spodoptera frugiperda* (Goergen et al., 2016)

*S. frugiperda* est un insecte de l'ordre des Lépidoptères de la famille des *Noctuoidea* originaire des régions tropicales et subtropicales du continent américain (Figure 1). L'ordre des Lépidoptères est le 3<sup>ème</sup> ordre le plus abondant des insectes après les Coléoptères (387.100 espèces) et les Diptères (159.294 espèces) avec 157.424 espèces. La super-famille des *Noctuoidea* comporte 6 familles dont les *Noctuidae* sont les plus nombreux en terme de nombre d'espèces après les *Erebidae* (24.569 espèces) et devant les *Notodontidae* (3.800 espèces) (Zhang, 2011). Cet insecte a été décrit et classifié pour la première fois par James Edward Smith et John Abbot en 1797 (Simmons et al., 1993). C'est en 1845 qu'il commence à attirer l'attention après avoir fait des dégâts considérables dans des plantations de Maïs, de Canne à sucre et de Riz à l'ouest de la Floride (Luginbill, 1928). La classification phylogénétique et les caractéristiques morphologiques du genre *Spodoptera* ont ensuite été revues par (Pogue, 2002). Une clé d'identification du genre est fournie par l'Organisation Européenne pour la Protection des Plantes (EPPO, 2015). D'abord restreinte au continent américain, la légionnaire d'automne a été découverte en Afrique de l'ouest en 2016, où sa présence a été confirmée au Nigeria, au Togo, au Bénin et São Tomé et Príncipe (Goergen et al., 2016; Day et al., 2017). Depuis, elle a continué sa progression en Afrique et en Asie où elle est apparue pour la première fois en Inde (Maruthadurai et al., 2020; Nagoshi et al., 2020). Plus récemment, *S. frugiperda* a été observée en Chine et en Australie (IPPC, 2020; Li et al., 2020; Wang et al., 2020). Les modèles Climex

et MaxEnt (maximum entropy) ont été utilisés comme modèles de prédiction pour déterminer les aires de distribution potentielles de *S.frugiperda* (du Plessis et al., 2018; Wang et al., 2020).

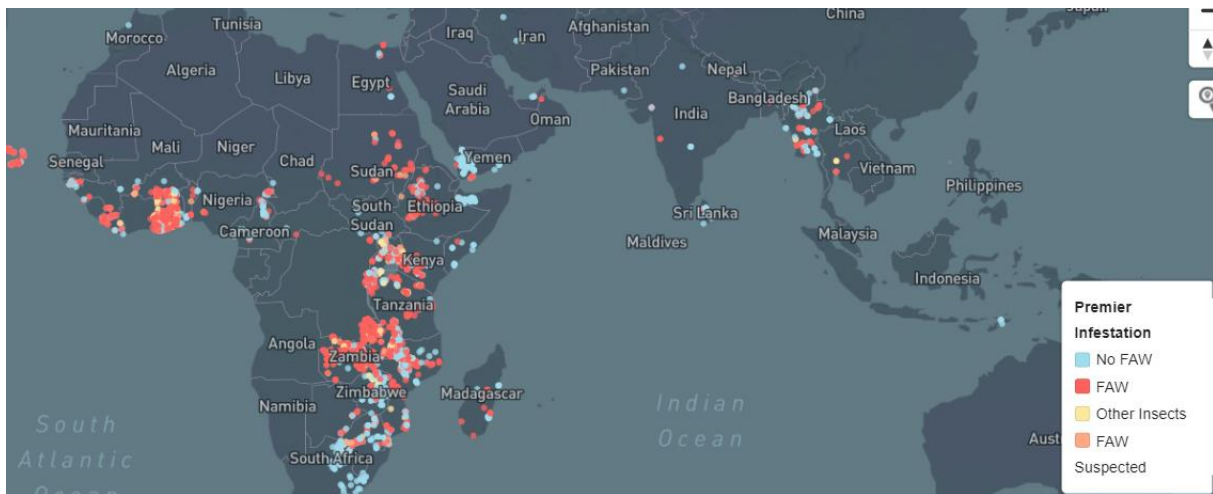


FIGURE 2 : Plateforme global FAMEWS, données provenant des pièges à phéromone (FAO, 2020).

La détermination de la distribution géographique potentielle du ravageur est particulièrement importante pour mettre en place un système d'alerte précoce et un contrôle efficace (Wang et al., 2020). Etant donné la menace qu'elle crée pour les petits paysans, fin décembre 2019 l'Organisation des nations unis pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a lancé une action mondiale en réponse à la propagation rapide de *S. frugiperda*. Parmi les activités menées, la FAO a développé un système de surveillance et d'alerte précoce de la légionnaire d'automne (FAMEWS). Ce système qui est mis à disposition des agriculteurs sous la forme d'une application mobile de collecte de données et d'une plateforme de cartographie mondial (Figure 2), fournit des informations précieuses sur la manière dont les populations évoluent au fil du temps. Les données sont collectées lors des explorations au champs et à l'aide de pièges à phéromones (FAO, 2020). Les phéromones sexuelles sont couramment utilisées pour le piégeage de masse, pour la perturbation d'accouplement et le monitoring des ravageurs. Les mâles attirés par des molécules de synthèse qui miment la phéromone sexuelle produite par les femelles sont capturés par le piège et un comptage permet ensuite d'estimer la pression du ravageur au niveau de la parcelle. Les pièges à phéromones sont de ce fait, des outils d'aide à la décision pratique pour le choix des applications de pesticides (Cruz et al., 2012)

## 1.2.2 Biologie et cycle de vie

*Spodoptera frugiperda* est un papillon nocturne, les adultes émergent en début de soirée et se déplacent à la recherche de plantes hôtes disponibles pour se nourrir, s'y reproduire et y déposer des œufs. En générale, les femelles commencent à émettre leurs phéromones d'accouplement environ deux heures après le coucher du soleil (Sparks, 1979). A une température de 25°C, le cycle de vie est accompli en 30 jours. Le cycle de vie dure entre 30 et 90 jours en fonction du lieu et de la saison (Capinera, 1999). La capacité de diapause n'est pas observée chez cette espèce dont le seuil de température minimal de croissance est de 12°C (Sparks, 1979; Du Plessis et al., 2020). La légionnaire d'automne peut être confondue avec d'autres espèces du genre *Spodoptera spp.* Les deux caractères qui permettent de la distinguer des autres espèces sont la présence de large pinacules et un tégument à la texture granuleuse (Pogue, 2002). Selon une étude des effets de la température sur le développement de *S. frugiperda* effectuée par Du Plessis et al. (2020), le nombre de Degrés Jour nécessaire au développement complet de l'œuf à l'adulte est de  $391.61 \pm 1.42$  °Jour (moyenne $\pm$ se). Pour les stades œuf, larvaire et chrysalide, le nombre de degrés jour était de  $35.68 \pm 0.22$  °J,  $204.60 \pm 1.23$ °J et  $150.54 \pm 0.93$ °J respectivement.

## 1.2.3 Œufs

En moyenne, une femelle *S. frugiperda* produit entre 1000 et 2000 œufs au total au cours de sa vie. Ils sont pondus en amas de 100 à 200 œufs disposés en une à quatre couches et couverts de soies abdominales protectrice (Capinera, 1999). Généralement, les œufs sont pondus sur la face inférieure des feuilles des parties basses de la plante. Cependant, en cas de population élevée, la ponte peut être généralisée à l'ensemble de la plante y compris les parties hautes (CABI, 2020). Dans les jeunes plantations, les œufs peuvent être déposés sur les tiges. Les œufs mesurent 0.4mm de diamètre et 0.3mm de haut, ils sont en forme de dôme aplati à la base et possèdent un point circulaire au sommet. Au moment de l'oviposition, les œufs sont de couleur jaune pâle et virent au brun clair juste avant éclosion (Capinera, 1999). Quand la température se situe entre 20°C et 30°C, les œufs éclosent après 2 à 3 jours après la ponte.

## 1.2.4 Stades larvaires

La phase larvaire de la légionnaire d'automne est divisée en 6 stades. Elle dure entre 14 et 30 jours en fonction de la saison. Le temps moyen de développement à 25°C pour les stades 1 à 6 sont de 3.3, 1.7, 1.5, 1.5, 2.0 et 3.7 jours respectivement. En moyenne pour les stades 1 à 6, la largeur de la tête est de respectivement 0.35, 0.45, 0.75, 1.3, 2.0 et 2.6 mm et la longueur du corps 1.7, 3.5, 6.4, 10.0, 17.2 et 34.2mm (Capinera, 1999). A la naissance, les larves sont peu différenciables des autres noctuelles. À la fin du premier stade, les jeunes larves sont verdâtres à brunâtres avec des lignes blanche longitudinales dorsales et latérales. La couleur brune et les lignes blanche s'accroissent à partir du 3<sup>ème</sup> stade (Capinera, 1999). Une particularité qui permet de la distinguer de *S. exigua* est une ligne rosâtre qui se développe près des spiracles au niveau des segments abdominaux postérieurs (EPPO, 2015). Lors des derniers stades larvaires, la légionnaire d'automne est très différente des autres chenilles du genre *Spodoptera spp.* À maturité, les larves font entre 30 et 40 mm de long et leurs têtes sont marquées par un motif en « Y » inversé de couleur jaune (Figure 3). Leur couleur varie du brunâtre à noir, en passant par le jaunâtre, couleur olive, rosâtre et gris terne. De larges pinacles dorsales forment un motif particulier sur les 8<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> segment abdominaux. Les pinacles du 8<sup>ème</sup> segment sont disposés en carré tandis que celles du 9<sup>ème</sup> segment forment un trapèze. (EPPO, 2015). Lorsque les populations sont nombreuses, un comportement de cannibalisme a été observé et a pour conséquence de réduire le risque de prédation (Chapman et al., 2000).

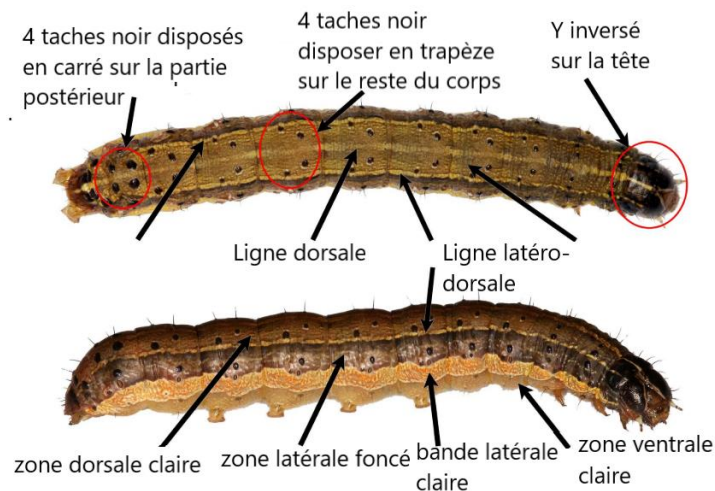


FIGURE 3 : Marques caractéristique de *Spodoptera frugiperda* (Visser, 2017).

### 1.2.5 Chrysalide

À la fin du 6<sup>ième</sup> stade, la larve se laisse tomber au sol où la nymphose va prendre place à une profondeur entre 2 et 8 cm. Si le sol est trop dur, la larve peut se transformer en chrysalide dans les débris végétaux à la surface du sol (Capinera, 1999). Parfois, la nymphose peut aussi avoir lieu dans les organes reproductifs du maïs (Sparks, 1979; CABI, 2020). La chrysalide est de couleur brun rougeâtre et mesure entre 14 et 18 mm de long pour 4.5mm de large (Capinera, 1999). La durée de la phase nymphale varie entre 7 et 45 jours en fonction de la température (Sparks, 1979; CABI, 2020). A ce stade, *S. exigua* peut être différenciée des autres espèces de *Spodoptera spp* par une paire supplémentaire de courte épines le long des épines caudal (EPPO, 2015).

### 1.2.6 Imago

Au stade adulte, les papillons ont une envergure comprise entre 32 et 40 mm. Les ailes postérieures sont blanc argenté muni d'une bordure sombre. La durée de vie moyenne d'un adulte est de 10 jours et varie de 7 à 21 jours. Les adultes sont nocturnes et actifs lors de soirées chaudes et humides. Les mâles sont généralement plus petits que les femelles, leurs ailes antérieures sont brun foncé avec des zones grisées et possèdent des taches blanches à l'extrémité et au centre de l'aile. Chez les femelles, les ailes antérieures sont uniformément brun grisâtre avec de fines marbrures. A la sortie de la chrysalide, les papillons commencent une période de pré-oviposition de 3 à 4 jours. Normalement, la plupart des œufs sont pondus pendant les 4 à 5 premiers jours mais la ponte peut se poursuivre jusqu'à 3 semaines (Luginbill, 1928; Sparks, 1979; Capinera, 1999; CABI, 2020). Cependant, une identification fiable à ce stade nécessite une dissection des parties génitales dont les caractéristiques complètes sont données par (Pogue, 2002). La fiche de mesures phytosanitaires PM 7/124 donne une clé d'identification basée sur les caractères morphologiques (EPPO, 2015). Dans sa région d'origine, les papillons adultes sont connus pour effectuer de longues migrations de plusieurs centaines de kilomètres au fil des générations vers le nord des États-Unis. Il est donc tout à fait probable d'avoir dans le futur des migrations de *Spodoptera frugiperda* vers le centre et le nord de l'Europe pendant les mois chaud de l'été (Jeger et al., 2017). Le comportement reproductif des adultes apparaît en début de scotophase pour la ligné inféodée au maïs et en fin de scotophase pour la population qui s'établi sur le riz (Schöfl et al., 2009; Unbehend et al., 2013).

## 1.2.7 Plantes hôtes

L'étude de Montezano et al. (2018) recense 353 espèces de plantes hôtes provenant de 76 familles différentes. Les principales familles de plantes hôtes de la légionnaire d'automne sont les Poaceae (106), les Asteraceae (31), et les Fabaceae (31) (CABI, 2020). Lors de trois études menées au Cameroun dans 10 régions, 31 espèces de plantes hôtes ont été inspectées. Des larves de *Spodoptera frugiperda* ont été enregistrées sur 6 des 31 espèces de plantes : dans 10.6%, 2.8%, 1.9%, 0.8%, 0.4% et 1.9% des cas sur *Sorghum bicolor* (L.) Moench (n = 1300), *Solanum tuberosum* L. (n = 36), *Ipomoea batatas* (L.) Lam. (n = 107), *Saccharum officinarum* L. (n = 120), *Phaseolus vulgaris* L. (n = 530) et *Gossypium hirsutum* L. (n = 1250) respectivement (Kuate et al., 2019). D'autres cultures sont fréquemment attaquées, comme la luzerne, l'orge, l'herbe des Bermudes, le sarrasin, le trèfle, l'avoine, le millet, l'arachide, l'ivraie, la betterave sucrière, le soja, le tabac et le blé. Occasionnellement, on la retrouve aussi sur des fruitiers tel que les pommiers, la vigne, les oranger, les papayer, les pêcher, les fraisier ou encore sur des plantes maraîchères. Parmi les plantes adventices connues pour être des hôtes de *Spodoptera frugiperda* on retrouve l'agrostide, *Agrostis spp* ; le digitale, *Digitaria spp* ; l'herbe de johnsons, *Sorghum halepense* ; la gloire du matin, *Ipomoea spp* ; le souchet, *Cyperus spp* ; l'amarante, *Amaranthus spp* et *Cenchrus tribuloides* (Prasanna et al., 2018b).



## 1.3 Monitoring et caractérisation moléculaire de *Spodoptera frugiperda*

### 1.3.1 Surveillance de *Spodoptera frugiperda*

Le monitoring des insectes ravageurs est une étape fondamentale pour la création d'un programme de lutte intégrée efficace (Prasad et al., 2012). Les activités de surveillance, de détection et de suivi des populations de ravageurs, permettent de déterminer la présence d'un ravageur, la taille de sa population et ses mouvements au sein d'une aire géographique donnée pour ensuite évaluer son incidence sur les cultures (Prasanna et al., 2018b). Les outils de surveillance des insectes se présentent généralement sous la forme de différents pièges tels que les pièges à phéromones, les pièges de couleur, les pièges lumineux ou des pièges à succion.

Parmi ces différents outils de capture, le piège à phéromones est le plus populaire en raison de sa spécificité (Prasad et al., 2012). Outre la détection et la surveillance des populations, les phéromones sont aussi utilisées comme outils de lutte par piégeage de masse ou en perturbant les accouplements. Depuis la découverte du Bombykol en 1959, la plus grande base de données de phéromones disponible en ligne sur le site (<https://www.pherobase.com/>) s'est fortement agrandie et contient plus de 3 500 molécules sémio-chimiques (Witzgall et al., 2010; Sayed, 2012).

Les phéromones constituent un système de communication chimique pour de nombreux organismes. Chez les insectes, elles sont impliquées dans des modifications comportementales tels que l'attraction du partenaire sexuel pour l'accouplement (phéromone sexuelle), des phénomènes de regroupement sur un site spécifique (phéromones d'agrégation), la formation de pistes (phéromones de marquage) ou encore le phénomène de fuite (phéromone d'alarme) (Jurenka, 2004; Verheggen et al., 2014).

Les phéromones sexuelles sont spécifiques à l'espèce et sont produites par les femelles au niveau de glandes exocrines situées sur les derniers segments de l'abdomen. Les phéromones peuvent être composées d'un mélange de deux ou de plusieurs molécules d'acides gras insaturés à chaîne linéaire avec un nombre paire d'atomes de carbone (C10-C18), le carbone du carbonyle étant modifié pour former un groupe fonctionnel contenant un oxygène (alcool, aldéhyde ou ester d'acétate). La spécificité de chaque mélange est déterminée par une combinaison des molécules et leurs rapports relatifs (Groot et al., 2008).

Chez *Spodoptera frugiperda*, la phéromone sexuelle est constituée d'au moins deux molécules d'acétate, l'acétate de (Z)-9-tétradécén-1-yl (Z9-14 :Ac) et l'acétate de (Z)-7-dodécén-1-yl (Z7-12 :Ac) (Tumlinson et al., 1986). Par la suite, trois autres molécules ont été identifiées sur des femelles *S. frugiperda* aussi bien en Afrique et qu'en Amérique, l'acétate de (Z)-9-dodécén-1-yl (Z9-12 :Ac), l'acétate de (Z)-11-hexadécén-1-yl (Z11-16 :Ac) et l'acétate de (E)-7-dodécén-1-yl (E7-12 :Ac) (Haenniger et al., 2020).

En pratique, les pièges à phéromones constitués d'une combinaison de molécules différent dans leur sélectivité et leur spécificité en fonction de la région. Lors d'essais au Togo sur l'attractivité de leurres ayant des compositions différentes, un manque de sélectivité a été remarqué pour les leurres composés de 3 molécules qui attirait *Leucania loreyi* (Duponchel, 1827), une autre espèce de papillon nocturne de la même famille (Noctuidea) qui partage le composé Z11-16 :Ac (Meagher et al., 2019).

Des différences dans la composition phéromonale ont été observées entre les lignées maïs et riz sur des populations d'Amérique avec une production plus faible du composé (Z7-12 :Ac) pour les femelles de la lignée maïs. Toutefois, ces différences dans la composition ne sont pas constantes en fonction des régions, ce qui suggère que des variations géographiques pourraient influencer la composition phéromonale spécifique à la race (Unbehend et al., 2013). Cependant, l'étude de Haenniger et al. (2020) n'a pas montré de différence spécifique à la race au niveau de la composition phéromonale entre les géotypes Corn et les géotypes hybrides Corn-Rice dans les populations du Benin et du Nigeria.

En plus du suivi par les pièges à phéromone, un dépistage au niveau des parcelles doit être effectué afin d'évaluer le niveau d'infestation et les dégâts aux cultures. Afin d'avoir un échantillonnage en routine, l'approche souvent utilisé est le modèle en « W » qui consiste à parcourir le champ en zigzag en s'arrêtant à 5 endroits différents au niveau desquels 10 à 20 plantes sont inspectées et les dégâts évalués. Afin d'éviter les effets de bordure, les points de mesures doivent être situés à au moins 5 mètres du bord de la parcelle inspectée. Lorsque la culture est à un stade plus avancé, l'approche en « W » est remplacée par l'approche « en maille » qui permet un déplacement plus facile dans la parcelle (Prasanna et al., 2018b).

### 1.3.2 Caractérisation moléculaire de *Spodoptera frugiperda*

Des différences génétiques au sein de l'espèce *S. frugiperda*, ont permis d'identifier deux lignées adaptées à des plantes hôtes différentes. La lignée Corn préfère s'établir sur le maïs (*Zea mays* L.) tandis que la lignée Rice s'établi de préférence sur le riz (*Oryza sativa* L.) ou les graminées fourragères (Pashley, 1988). Ces deux groupes indiscernables morphologiquement, présentent des différences biologiques importantes pour la gestion du ravageur comme la préférence pour la plante hôte, la réponse aux insecticides, le comportement d'accouplement ou encore la transmission des maladies (Lu et al., 1992). Les populations de type maïs en Amérique centrale peuvent être divisées en 2 sous-populations sur base de la fréquence relatives des haplotypes mitochondriaux (CS-h1-4) révélée par les polymorphismes du gène *COI*. Une des sous-population provient des régions du Texas et du Mexique tandis que l'autre est originaire de Floride (Nagoshi et al., 2015). Selon Nagoshi et al. (2017), les fréquences des haplotypes mitochondriaux des populations du Togo suggèrent que les populations à l'origine des infestation en Afrique seraient des lignées de type maïs provenant de Floride et des Caraïbes.

## 1.4 Ennemis naturels

### 1.4.1 Macro-organismes

Dans sa région d'origine, la légionnaire d'automne possède une grande diversité d'ennemis naturels (FAO, 2018). Selon (Kenis et al., 2019), plus de 150 espèces de parasitoïdes sont des ennemis naturels de *S. frugiperda*. Tous les stades de développement de la légionnaire d'automne sont susceptibles d'être attaqués (FAO, 2018). Aux Etats-Unis, les guêpes parasitoïdes les plus utilisées contre *S. frugiperda* et d'autres noctuelles sont *Cotesia marginiventris* (Cresson, 1865) et *Chelonus texanus* (Cresson, 1872) (Hymenoptera : Braconidae). Parmi les Diptères, le plus abondant est *Archytas marmoratus* (Townsend, 1915) qui est une mouche parasitoïde de la famille des Tachinidae. Les prédateurs de la légionnaire d'automne sont des généralistes qui attaquent beaucoup d'autres espèces de chenilles ravageuses. Un nombre important de ces prédateurs sont les carabes (Coleoptera : Carabidae) ; les forficules, *Labidura riparia* (Pallas, 1773) (Dermaptera : Labiduridae) ; les punaises soldats, *Podisus maculiventris* (Say, 1832) (Hemiptera : Pentatomidae) ; et les punaises insidieuses, *Orius insidiosus* (Say, 1832) (Hemiptera : Anthocoridae). Des vertébrés comme les oiseaux et les rongeurs consomment aussi les larves et les chrysalides. Ces ennemis naturels ont le potentiel de réduire les populations de chenilles légionnaires et par conséquent de réduire les dégâts dont elles sont responsables. L'impact des ennemis naturels dépend de nombreux facteurs comme la diversité des organismes qui sont actifs, leurs mode de vie, le moment de leur émergence, leur spécificité d'hôte, les pratiques agronomiques et les méthodes de gestion des ravageurs. Un défi est de créer les conditions qui permettent d'exploiter au maximum le potentiel de ces organismes (FAO, 2018). Le Tableau 1, ci-dessous, donne une liste non-exhaustive des prédateurs et parasitoïdes retrouvés dans la littérature dont plusieurs espèces sont présentes en Afrique, notamment *Telenomus remus*, *Cotesia icipe* ou encore *Coccygidium luteum* (Kenis et al., 2019; Agboyi et al., 2020).

**TABLEAU 1 : Prédateurs et parasitoïdes de *Spodoptera frugiperda***

Ordre	Famille	Espèce	Source		
Hymenoptera	Trichogrammatidae	<i>Trichogramma pretiosum</i> (Riley, 1879)	A, B, F		
		<i>Trichogramma atopovirilia</i> (Oatman & Platner, 1983)	C		
	Trichogrammatoidea	<i>Trichogrammatoidea armigera</i> (Nagaraja, 1972)	A		
		Platygastridae	<i>Telenomus remus</i> (Nixon, 1937)	A, B, F, G	
			Braconidae	<i>Chelonus insularis</i> (Cresson, 1865)	A, B, C, F
		<i>Chelonus curvimaculatus</i> (Cameron, 1906)		E	
		<i>Chelonus bifoveolatus</i> (Szépligeti, 1910)		G	
		<i>Cotesia icipe</i> (Fernández-Triana & Fiaboe, 2017)		A, E, G	
		<i>Cotesia marginiventris</i> (Cresson, 1865)		B, C, F	
		<i>Homolobus truncator</i> (Say, 1828)		C, F	
		<i>Aleiodes laphygmae</i> (Viereck, 1912)		C, F	
		<i>Coccygidium luteum</i> (Brullé, 1846)		E, G	
		<i>Glyptapanteles creatonoti</i> (Viereck)		D	
		Eulophidae		<i>Euplectrus plathypenae</i> (Howard, 1885)	C
			Ichneumonidae	<i>Meteorus laphygmae</i> (Viereck, 1913)	C, F
		<i>Ophion flavidus</i> (Brullé, 1846)		C	
		<i>Charops ater</i> (Szépligeti, 1910)		E, G	
		<i>Pristomerus spinator</i> (Fabricius, 1804)		C	
		<i>Ichneumon promissorius</i> (Erichson, 1842)		F	
		<i>Campoletis sonorensis</i> (Cameron, 1886)		A, C	
<i>Campoletis chlorideae</i> (Uchida, 1957)	D				
Diptera	Tachinidae	<i>Winthemia trinitatis</i> (Thompson, 1963)		A, B	
		<i>Archytas marmoratus</i> (Townsend, 1915)		A, B, F	
		<i>Archytas apicifer</i> (Walker, 1849)		F	
		<i>Drino quadrizonula</i> (Thomson, 1869)	G		
		<i>Drino imperbis</i> (Wiedmann, 1830)	G		
		<i>Lespesia archippivora</i> (Riley, 1871)	A, B		
		<i>Acroglossa vetula</i> (Reinhard, 1964)	F		
		Coleoptera	Sarcophagidae	<i>Helicobia morionella</i> (Aldrich, 1930)	F
				Coccinellidae	<i>Coleomegilla maculata</i> (De Geer, 1775)
			<i>Hippodamia convergens</i> (Guérin-Ménéville, 1842)		A, B
<i>Eriopis connexa</i> (Mulsant, 1850)	B				
<i>Olla v-nigrum</i> (Mulsant, 1866)	A, B				
<i>Harmonia axyridis</i> (Pallas, 1773)	B,				
<i>Cycloneda sanguinea</i> (Linnaeus, 1763)	A, B				
Dermaptera	Carabidae		<i>Calosoma granulatum</i> (Perty, 1830)		A, B
	Forficulidae		<i>Doru luteipes</i> (Scudder, 1876)		A, B, C, D
Hemiptera	Carcinophoridae		<i>Euborellia annulipes</i> (Lucas, 1847)	A, B	
		Reduviidae	<i>Zelus longipes</i> (Linnaeus, 1767)	A, B, C	
	<i>Zelus leucogrammus</i> (Perty, 1833)		A, B		
	Lygaeidae		<i>Geocoris punctipes</i> (Say, 1831)	A, B	
	Anthracoridae		<i>Orius insidiosus</i> (Say, 1832)	A, B, C	
	Nabidae		<i>Nabis rugosus</i> (Linnaeus, 1758)	A, B	
	Pentatomidae		<i>Podisus maculiventris</i> (Say, 1832)	A, B	
		<i>Podisus sagitta</i> (Fabricius, 1794)	C		

**Sources** : A) Prasanna et al., 2018a ; B) FAO, 2018 ; C) Hoballah et al., 2004 ; D) Shylesha et al., 2018 ; E) Sisay et al., 2018 ; F) Molina-Ochoa et al., 2003 ; G) Agboyi et al., 2020

## 1.4.2 Micro-organismes

Les micro-organismes entomopathogènes sont présents partout dans le monde et sont de plus en plus utilisés pour le développement de biopesticides en vue de remplacer les molécules de synthèses. Les pathogènes les plus connus couramment associés à la légionnaire d'automne sont des nucleopolyhedrovirus virus comme le *Spodoptera frugiperda* Multicapsid Nucleopolyhedrovirus (SfMNPV), des champignons comme, *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorokin 1883, *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin ou *Nomuraea rileyi*, (Farlow), des bactéries comme *Bacillus thuringiensis* kurstaki mais aussi des protozoaires et des nématodes (Glare et al., 2012; FAO, 2018). Bien que ces pathogènes provoquent des hauts taux de mortalité dans certaines populations, ces maladies apparaissent souvent trop tard pour éviter des niveaux de défoliation élevés (Capinera, 1999; Prasanna et al., 2018b). Selon Molina-ochoa et al. (2003), la présence naturelle de pathogènes et des nématodes parasites est responsable de 3.5% de la mortalité larvaire chez la légionnaire d'automne au Mexique.

### 1.4.2.1 Les bactéries

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie gram positive qui produit des inclusions cristallines contenant des toxines insecticides appelées delta-endotoxines ou protoxines. Ces delta-endotoxines englobent deux types de protéines, les protéines Cry et les protéines Cyt. Pour avoir un effet larvicide, les inclusions cristallines libérées lors d'une phase de sporulation de la bactérie doivent être ingérées par l'insecte. Une fois dissoutes par le pH alcalin du mésentéron de la larve, les protoxines subissent un clivage des régions N- et/ou C-terminales par des protéases qui permettent ainsi de générer quatre toxines actives : Cry4A, Cry4B, Cry11A et Cyt1A. Ces toxines se fixent de manière spécifique aux récepteurs membranaires à la surface des cellules épithéliales du mésentéron et s'oligomérisent. Cette oligomérisation engendre la formation de pores dans la membrane plasmique qui laissent entrer les ions dans la cellule. S'ensuit une lyse cellulaire qui perfore le tube digestif de l'insecte et permet aux spores bactériennes de proliférer dans l'hémolymphe, conduisant à la septicémie (Bawin et al., 2015). En fonction de la souche, cette bactérie peut être utilisée contre les Diptères, les Lépidoptères et les larves de Coléoptères (Deravel et al., 2014; Bawin et al., 2015).

Les cultures transgéniques de type « Bt » qui expriment les toxines Cry provenant de *B. thuringiensis* ont été largement utilisées pour le contrôle des ravageurs depuis les années 2000.

Cependant, son usage extensif et prolongé a créé une pression de sélection pour des individus résistants qui sont rapidement apparus dans les populations de *S. frugiperda* de Porto Rico. Le marqueur génétique lié à la résistance à la toxine Cry1Fa courante dans les populations de Porto Rico n'a cependant pas été trouvé dans les collections de légionnaire d'automne du Togo (Nagoshi et al., 2017). Les produits à base de *Bacillus thuringiensis* sont relativement disponibles en Afrique. Au Ghana en 2018, 25% des agriculteurs ont utilisés des produits à base de Bt (Rwomushana et al., 2018).

Les *Streptomyces spp* sont des bactéries gram-positives qui possèdent un ADN à haute teneur en guanine et cytosine. Ils appartiennent à la famille des *Streptomycetaceae* au sein du groupe des Actinobactéries. Ces organismes qui partagent des caractéristiques semblables avec les champignons sont largement répandus à travers les écosystèmes telluriques et aquatiques. Ils se retrouvent principalement dans le sol où ils jouent un rôle important dans la formation de l'humus par la dégradation de la matière organique. Les bactéries du genre *Streptomyces spp* sont parmi les premières à avoir été utilisées par l'industrie pharmaceutique pour la production d'antibiotique. À ce jour, il existe plus de 12000 antibiotiques produits par le genre *Streptomyces spp*. On retrouve par exemples la Streptomycin, le chloramphénicol ou l'Hygromycin. (Ranjani et al., 2016). En particulier, la *Streptomyces hygroscopicus subsp. limoneus* produit un ensemble de métabolites dont la validamycine A (2) est le composé principal. Les Validamycines sont des pseudo-oligosaccharides constitués par l'association d'une molécule de glucose et de deux aminocyclitols (la valienamine et la validamine) reliés entre eux par un atome d'azote. La validoxyamine A (3) résulte de l'hydrolyse de la liaison glycosidique de (2) (Figure 4).

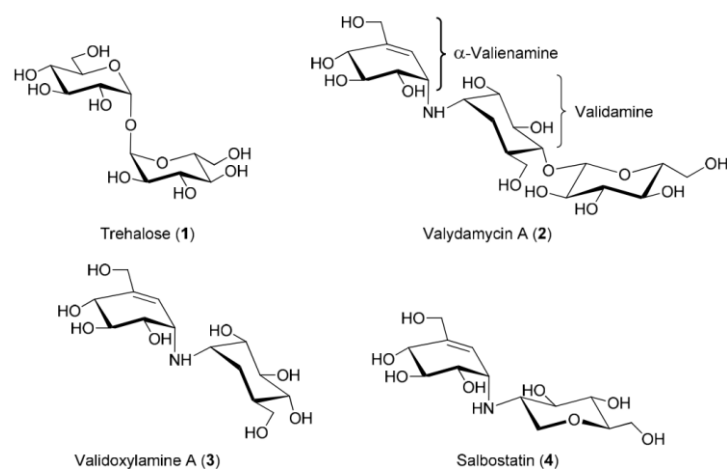


FIGURE 4 : Structures chimiques du tréhalose (1), le substrat de la tréhalase et trois de ses inhibiteurs. ( source : Matassini et al., 2020 )

La tréhalase est une glycosidase retrouvée chez de nombreux organismes tels que les champignons, les bactéries, les nématodes, les plantes, les insectes et certains vertébrés. Chez les insectes, la tréhalase joue un rôle important dans le métabolisme énergétique en hydrolysant le tréhalose qui est le principal sucre contenu dans l'hémolymphe (Shukla et al., 2015).

Matassini et al. (2020) ont réalisé une revue des différentes recherches qui étudient les effets inhibiteurs de plusieurs molécules telles que la Salbostanine, la validoxylamine A et la validamycine A sur la tréhalase d'insectes comme *Bombyx mori* ou *Spodoptera litura* et sur la tréhalase de champignons comme *Rhizoctonia solani*. On retrouve notamment l'étude de ASANO et al. (1990), qui a montré les propriétés insecticides de la validamycine A et de validoxylamine A sur des larves de *Spodoptera litura*.

La souche *Streptomyces albus* ATCC21838 est connue pour produire de la salinomycine et de la salbostatine. (Miyazaki et al., 1974; Vértesy et al., 1994). La salinomycine est un antibiotique ayant une activité contre les bactéries gram positives et les champignons filamenteux qui est utilisé depuis plusieurs années par les vétérinaires comme traitement contre la coccidiose et qui est vu actuellement comme une molécule prometteuse pour le traitement des cellules cancéreuses résistantes aux traitements chimiothérapeutiques (Miyazaki et al., 1974; Dewangan et al., 2017; Michalak et al., 2020).

#### 1.4.2.2 Les champignons entomopathogènes

Il existe entre 700 et 800 espèces de champignons appartenant aux groupes des Ascomycètes, des Deuteromycètes, des Chytridiomycètes, des Oomycètes et des Zygomycètes qui sont reconnus pour être des pathogènes d'arthropodes (Bawin et al., 2015). Les champignons entomopathogènes sont connus depuis plus d'un siècle et leur utilisation a gagné en popularité au cours de ces 50 dernières années (Jaronski, 2013). La plupart des champignons entomopathogènes qui font actuellement l'objet de recherches appartiennent soit à la classe des Hyphomycètes chez les Deuteromycota, soit à la classe des Entomophthorales chez les Zygomycota. Les Hyphomycètes sont généralement des pathogènes opportunistes qui ont une large gamme d'espèces hôtes et sont souvent associés avec la production de mycotoxines. Parmi elles, la beauvericine est une toxine produite par *Beauveria bassiana* (Figure 5) et de nombreux autres champignons dont les *Fusarium spp* (Wang et al., 2012).





FIGURE 5 : Larve de *Spodoptera litura* complètement recouverte de mycélium de *Beauveria bassiana*.  
Photo: (Dhar et al., 2019)

Chez les Entomophthorales, l'infection et la mort de l'hôte à tendance à apparaître à cause de la colonisation des tissus avec peu ou pas d'utilisation de toxines. En général, les Entomophthorales ont des relations biotrophiques avec leurs insectes hôtes avec peu ou pas de saprophytisme, tandis que les Hyphomycètes peuvent être hémibiotrophiques avec des phases parasitaires bien définies au sein des insectes hôtes et des phases saprophytiques à la mort de leurs hôtes (Shah et al., 2003).

Les Hyphomycètes peuvent exister sous une forme asexuelle (anamorphe) et sexuelle (téléomorphe). Ce sont généralement les spores et conidies produites de manière asexuée qui sont dispersées partout dans l'environnement et qui sont responsables des infections. Le processus d'infection et de transmission des champignons entomopathogènes est très similaire à celui des pathogènes des plantes avec la formation d'un appressorium et d'un tube germinatif (Shah et al., 2003).

Chez les Hyphomycètes, le processus d'infection se déroule en 4 étapes. (1) Une interaction hydrophobe provoque l'adhésion des conidies à la cuticule où des sites de reconnaissance spécifique comme les lectines peuvent renforcer l'attachement par des substances mucilagineuse et faciliter la germination. (2) La germination débute par l'hydratation des conidies et initie la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires (protéases et peptidases, chitinases, lipases et lipoxygénases) au niveau du tube germinal qui servent à utiliser les molécules dérivées de l'hôte comme source d'énergie et pour la synthèse de

macromolécules. (3) S'ensuit la formation d'un appressoria au niveau de la surface cuticulaire. (4) La pression enzymatique et mécanique permet la pénétration de la cuticule par les filaments infectieux qui aboutissent dans l'hémocoel où leur croissance et leur multiplication mènent à la production de corps hyphaux. Ceux-ci envahissent les tissus de l'hôte et produisent des métabolites toxiques qui interagissent avec les mécanismes de défense immunitaire (Bawin et al., 2015). Par exemple chez le moustique, *Beauveria bassiana* exprime un micro ARN (Figure 6) lors de la pénétration de l'appressorium qui a pour but de réprimer l'expression de la protéine Spz4 responsable de l'activation de la réponse immunitaire par la voie de signalisation Toll (Cui et al., 2019).

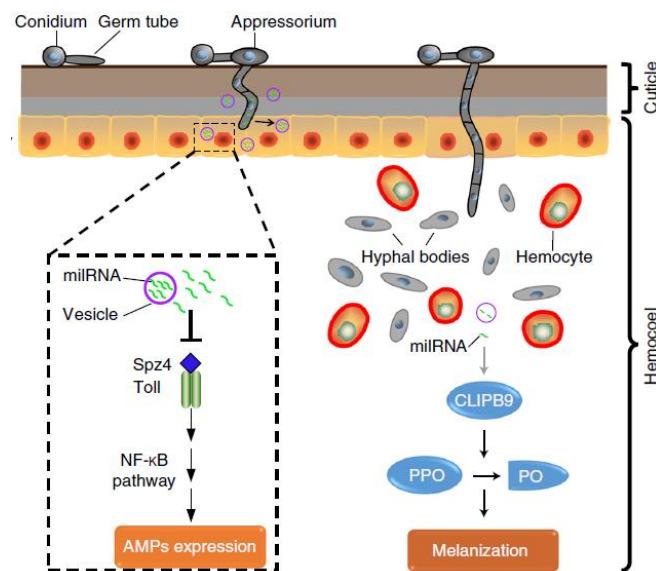


FIGURE 6 : Mode d'infection de *Beauveria bassiana* et répression du système immunitaire. Lors de la pénétration de l'appressoria, le microARN bba-miR1 est fortement exprimé pour inhibé la production de peptides antimicrobien. Une fois dans l'hémocoel, cette expression diminue pour éviter l'expression du gène CLIPB9 qui active le processus de mélanisation. Source: Cui et al., 2019

Enfin, à la mort de l'insecte, une nouvelle sporulation se produit et disperse à nouveau des conidies dans l'environnement. Les structures d'hivernation des Hyphomycètes sont basées sur des hyphes comprimés (sclérotés) ou des spores persistantes à paroi épaisse (chlamydospores). L'activation de la voie de signalisation Toll par les bactéries gram positive et les champignons induit chez les insectes la production de peptides antimicrobien (AMPs) (Buchon et al., 2014; Bawin et al., 2015).

Les champignons entomopathogènes les plus utilisés en lutte biologique sont *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, et *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin car ils sont capables de causer une infection à tous les stades de vie de leurs hôtes. Dans l'étude de Ramos et al. (2020), *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* ont montré des taux de mortalité de 87% et 75% respectivement 11 jours après traitement pour des larves de *S. frugiperda* du 4<sup>ième</sup> stade. Des méthodes de production de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* sont données par Jaronski (2013). Ces deux espèces ont également été retrouvées comme endophytes chez *Vicia faba* et *Phaseolus vulgaris* (S. Akutse et al., 2016). Les études basées sur la performance des insectes élevés sur des plantes colonisées par des champignons endophytes supposent que la présence des champignons dans les tissus végétaux a un effet dissuasif ou d'antibiose sur l'alimentation des insectes (Vega, 2008). Ces endophytes améliorent la résistance de leurs hôtes contre les insectes ravageurs par la production de molécules défensives comme les alcaloïdes ou par l'altération de la qualité nutritive des tissus de la plante (Thakur et al., 2013).

## 1.5 Caractérisation moléculaire des champignons

En 2012, un consortium de mycologue a évalué 6 régions de l'ADN pour l'identification des champignons. Ils ont comparés 3 régions codantes pour les sous-unités de l'ARN ribosomique (ITS, 18S et 28S) à 3 autres régions représentatives codantes pour des protéines (*RPB1*, *RPB2* et *MCM7*). Parmi elles, la région de *COI* a été exclue de l'analyse car chez les champignons, cette région n'est pas suffisamment variable, inclut souvent des introns de grandes tailles et est généralement difficile à amplifier. En raison de son utilisation très répandue, de sa facilité à être amplifiée et de sa variabilité interspécifique, l'ITS (Internal transcribed spacer) présente la plus grande probabilité de succès de l'identification parmi une large gamme d'espèces et a donc été admis par le consortium de mycologue comme étant le marqueur génétique universel des champignons (Schoch et al., 2012). L'ITS est une région d'environ 600bp constituée de deux régions hypervariables ITS1 et ITS2 séparées par la région très conservée du 5.8S (Figure 7). L'ensemble des régions ITS1-5.8S-ITS2 est à son tour entouré par les régions conservées 18S et 28S des petites et grandes sous-unités de l'ARN ribosomique. (White et al., 1990). Bien que le marqueur génétique ITS soit le plus approprié dans la plupart des cas, il peut ne pas suffire pour une identification précise chez certains genres comme chez les *Aspergillus*, les *Fusarium*, les *Penicillium* et chez les *Trichoderma*. Dans le cas des *Aspergillus spp* et des *Penicillium spp*

par exemple, il est recommandé d'utiliser des marqueurs génétique secondaires tel que le *CaM* (Calmodulin) et le *tub2/BenA* (beta-tubulin) (Raja et al., 2017).

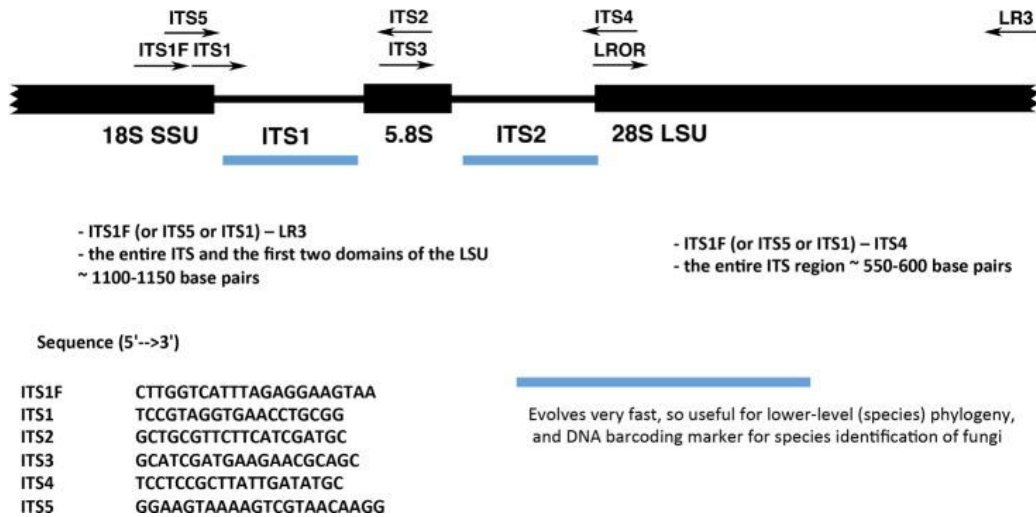


FIGURE 7 : Région ITS situé entre les petites et grandes sous-unités de l'ARN ribosomique et primers utilisés pour son amplification (Raja et al., 2017)

## 2 Objectifs du travail

L'émergence des espèces invasives au travers des cinq continents est un phénomène de plus en plus récurrent accentué par la mondialisation et le réchauffement climatique. À cet égard, les ravageurs des cultures constituent une menace majeure pour la sécurité alimentaire, la santé humaine et l'environnement à cause des dégâts occasionnés aux productions agricoles et l'utilisation des pesticides de synthèse toxiques couramment utilisés pour les combattre. Avec la prise de conscience des dangers que représentent l'utilisation des insecticides de synthèse et le développement de résistances qui apparaissent chez les insectes ravageurs, les recherches s'orientent depuis plusieurs années vers les micro-organismes pour développer des insecticides plus spécifiques à l'espèce visée et moins dangereux pour l'homme et la biodiversité. Ces recherches ont également pour intérêt de contribuer à la connaissance des interactions entre les plantes, les insectes et leurs microbiotes.

L'objectif général de ce TFE est d'étudier l'effet de plusieurs micro-organismes sur la mortalité de la chenille légionnaire d'automne *Spodoptera frugiperda* par l'intermédiaire d'une alimentation artificielle incluant des produits de fermentation de bactéries productrices de molécules inhibitrices d'enzymes et par l'utilisation de suspensions de spores de champignons entomopathogènes. Dans ce travail, trois souches de champignons potentiellement entomopathogènes récupérées sur le terrain en République Démocratique du Congo par Marcellin Cokola (Marcellin, 2019) et une souche isolée au laboratoire d'Entomologie Fonctionnel et Évolutive de Gembloux AgroBio-Tech ainsi que les bactéries productrices d'inhibiteur de tréhalase : *Streptomyces albus* et *Streptomyces hygroscopicus* ont été considérées.

Lors de ce travail les activités suivantes ont été réalisées:

- La mise en place d'un dispositif expérimental permettant d'évaluer la pathogénicité et la virulence de quatre souches de champignons potentiellement entomopathogènes
- La mise en place d'un dispositif expérimental permettant d'évaluer la toxicité des métabolites produits par *Streptomyces hygroscopicus* et *Streptomyces albus*
- Procéder à une identification des champignons étudiés dans ce travail à l'aide d'outils moléculaires et phylogénétique

## 3 Matériels et méthodes

### 3.1 Conduite de l'élevage

Les chenilles légionnaires d'automne *Spodoptera frugiperda* proviennent de l'Université de Montpellier II (France) et sont élevées au sein du laboratoire de quarantaine de l'unité d'Entomologie Fonctionnelle et Evolutive (Gembloux Agro-Bio Tech, université de Liège) dans la chambre climatisé L2Q maintenue à  $25\pm 1^\circ\text{C}$  et  $50\pm 10\%\text{RH}$  avec une photopériode de 16/8h (lumière/obscurité). Les larves sont élevées dans des boîtes en PE (24x15x8cm) ventilées dans lesquelles a été mise une litière à base de papier absorbant. Elles sont nourries avec 3-4 morceaux de 20g de diète artificielle fabriquée à partir de 144 g/L de diète en poudre (product #F9772, Frontier Scientific Services) et de  $19\text{ gL}^{-1}$  de poudre d'agar. La diète est remplacée tous les 2 à 3 jours. Les boîtes contenant les larves sont placées dans des cages de 24.5x24.5x63cm (BugDorm, Megaview Science, Taichung, Taiwan). Une fois les larves transformées en chrysalides, elles sont transférées dans des cages d'accouplement de 32.5x32.5x32.5cm (BugDorm) jusqu'à émergence des adultes. Ces derniers sont nourris avec du papier absorbant imbibé d'eau sucrée à 10%. Du papier absorbant est également placé dans la cage comme substrat de ponte. Les œufs sont placés dans les boîtes en PE et de la diète est apportée au moment de l'éclosion.

### 3.2 Culture de micro-organismes

#### 3.2.1 Culture des champignons entomopathogènes

Les trois souches de champignons entomopathogènes isolées à partir des chenilles provenant du Sud-Kivu et la souche isolée à partir de la chrysalide sont produites sur milieu potato dextrose agar (PDA) en boîte de Petri mises à incuber pendant 10 jours à  $25^\circ\text{C}$ . Une mise en solution des spores est effectuée à l'aide d'une solution d'eau distillée avec du Tween à 0,1%. Ces solutions sont ensuite filtrées avec une étamine dans le but de retirer le mycélium. Les concentrations en spores des solutions sont ensuite estimées à l'aide d'un hémacytomètre de Neubauer. Les boîtes de Petri sont inoculées avec  $100\mu\text{L}$  d'une solution à  $10^4$  spores/mL. Le contrôle positif composé de *Beauveria bassiana* souche GHA (Botanigard 22WP) est également produit sur boîte de Petri selon les mêmes conditions que les autres souches étudiées dans ce travail.

### 3.2.2 Culture de *Streptomyces albus* et de *Streptomyces hygroscopicus*

Les bactéries du genre *Streptomyces* ont été mises en culture en boîte de Petri sur milieu GYM ( $4\text{gL}^{-1}$  glucose,  $4\text{gL}^{-1}$  d'extrait de levure,  $10\text{gL}^{-1}$  d'extrait de malt,  $2\text{gL}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$  et  $15\text{gL}^{-1}$  d'agar, le pH est ajusté à 7,2 avant l'ajout d'agar) à  $28^\circ\text{C}$  pendant 8 jours afin d'être réactivées.

La production des métabolites a été faite par fermentation des milieux de culture GYM liquide (sans l'agar et le  $\text{CaCO}_3$ ) en présence des souches de *Streptomyces* sur milieu. Pour cela, les cultures sur boîtes de Petri ont mises en solutions avec 5mL d'eau peptonée qui sont ensuite filtrée à travers une étamine pour ne recueillir que les spores. Les concentrations en spores des solutions ont été estimées à l'aide d'une cellule de Neubauer comme pour les solutions fongiques.

La méthode de fermentation de base consiste à disposer 100mL de milieu de culture GYM (sans agar ni  $\text{CaCO}_3$ , pH 7,2) dans un erlenmeyer de 1000mL et de l'inoculer avec  $10^6$  spores avant une mise en incubateur rotatif à 125rpm et une température de  $28^\circ\text{C}$  pendant 5 jours (Miyazaki et al., 1974; Druart, 2017).

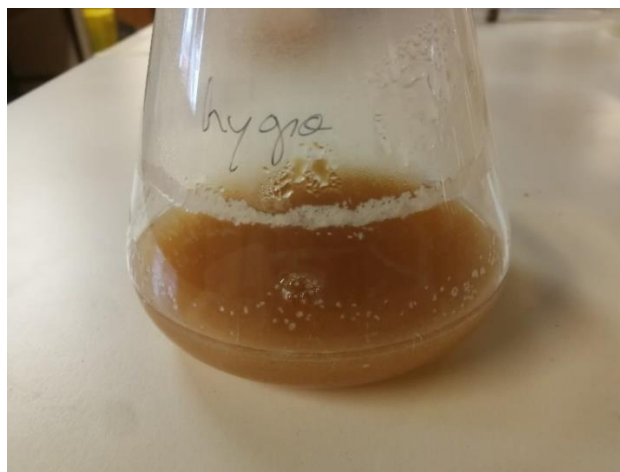


FIGURE 8 : Fermentation de streptomyces hygroscopicus après 5 jours.

Lors de ce travail, une deuxième méthode de fermentation a été réalisée. En effet, selon Liao et al. (2009), la culture de la souche *Streptomyces hygroscopicus* 5008 à une température de  $37^\circ\text{C}$  augmente la production de validamycine A. Ainsi, pour cette deuxième fermentation, la première étape consiste à réaliser une culture d'ensemencement en inoculant 50mL de milieu

ISP2 (4 gL<sup>-1</sup> d'extrait de levure, 10 gL<sup>-1</sup> d'extrait de malt, 4 gL<sup>-1</sup> de glucose et 20 gL<sup>-1</sup> d'agar ajusté à pH 7.2 avec du NaOH) contenu dans un erlenmeyer de 250mL avec 100µL de la solution raclée sur les boîtes de Petri. Cette culture d'ensemencement a ensuite été mise à incuber à 28°C pendant 24h en incubateur rotatif à 125rpm. Après 24h d'incubation, 5mL de la culture d'ensemencement ont été prélevés pour inoculer 100mL de milieu ISP2 liquide (sans l'agar) contenu en Erlenmeyer de 1000mL mis à fermenter pendant 96 heures à 37°C en incubateur rotatif à 125rpm. Les métabolites secondaires sont récupérés par filtration des surnageants de cultures liquides. Pour cela, les cultures liquides fermentées sont centrifugées à 13500rpm pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants sont ensuite filtrés une première fois à l'aide d'un filtre Whatman™ puis successivement avec des filtres à seringue en polyéthersulfone de 0,45µm et 0,22µm. Les surnageants sont utilisés immédiatement ou stockés à -20°C avant utilisation.

### 3.3 Tests préliminaires

Dans le but d'évaluer l'effet des champignons et des jus de fermentation des bactéries du genre *Streptomyces* sur la survie des chenilles légionnaire *Spodoptera frugiperda* (Smith), trois tests préliminaires ont été réalisés afin de concevoir le dispositif expérimental final. Les chenilles utilisées pour les expériences ont été fournies par le laboratoire de diversité, génomes et interactions micro-organismes-insectes de l'université de Montpellier et sont maintenues en élevage au laboratoire d'Entomologie Fonctionnel et Évolutive (Gembloux Agro-Bio Tech). Les micro-organismes testés sur les chenilles lors de ces tests préliminaires étaient constitués des trois souches de champignons entomopathogènes provenant du Sud-Kivu et d'une souche de champignon isolés à partir d'un cadavre issus d'un envoi de chrysalides par l'Université de Montpellier. Lors de cette étude, deux souches de *Streptomyces spp* présente au sein du laboratoire ont également été testées. La souche *Streptomyces albus* ATCC21838 et la souche *Streptomyces hygroscopicus* Subsp. *jinggangensis* 5008.

#### 3.3.1 Pathogénicité des champignons

Les concentrations en spores des solutions choisies pour ces tests préliminaires étaient de 10<sup>7</sup> spores mL<sup>-1</sup>. Ces trois champignons ont été comparés à un traitement témoin composé d'eau



distillée contenant du Tween 80 à 0,05% et à un traitement contrôle positif composé de *Beauveria bassiana* GHA (Botanigard® 22WP) fourni par la société Certis Europe B.V. (Bruxelles, Belgique).

Lors de la préparation du premier test préliminaire, 5 boîtes de Petri par modalités testées ont été pulvérisées à l'aide du Potter spray tower avec 2mL des solutions préalablement préparées. Les boîtes de Petri ont ensuite été laissées à sécher avant l'introduction des larves. Une fois les boîtes de Petri sèches, 20 larves de stade L2 âgées de 5 jours ont été introduites par boîte de Petri pendant une heure avant d'être transférées dans une boîte ventilée de 430 mL avec 2 morceaux de 5 g de diète artificielle. Les boîtes contenant les larves ont séjourné en enceinte climatique (Memmert®) à  $25\pm 1^\circ\text{C}$  ( $70\pm 10\%$  HR ; 16:8H j:n). Ce premier test préliminaire a été mené sur 20 larves par traitement avec 5 répétitions par modalités testées, soit 500 larves au total. Le nombre de larves mortes a été relevé une fois par jour pendant 8 jours

Lors du second test préliminaire, 30 larves de stade L2 par modalités ont été endormies en boîte de Petri sur glace pendant 2 min avant d'être pulvérisées à l'aide d'un Potter spray tower avec 2mL des solutions préalablement préparées. Afin de retirer l'effet du cannibalisme, les larves ont été individualisées dans des piluliers (3,5x7cm) en polypropylène munis d'aération et contenant un morceau de 5g de diète artificielle. Lors de ce deuxième test préliminaire, 30 répétitions ont été appliquées par modalités, une larve faisant office d'unité expérimentale, soit 30 larves par modalité et 150 larves au total. Les autres conditions restant identiques au premier test préliminaire. Les larves mortes ont été relevées de manière quotidienne jusqu'à la formation des chrysalides.

### 3.3.2 Toxicité des produits de fermentation de *Streptomyces*

Pour ce troisième test préliminaire, les extraits de fermentation issus des deux souches de *Streptomyces* produits avec la première méthode de fermentation ont été introduits à raison de 2% et 10% (v/v) dans la diète ( $144\text{ gL}^{-1}$  product #F9772, Frontier Scientific Services et  $19\text{ gL}^{-1}$  d'agar). Une diète contrôle contenant de la validamycine A à  $90\text{ mgL}^{-1}$  (DSMZ) et une diète témoin sans métabolites ont été constituées. Lors de la préparation des diètes, les extraits de fermentation et la solution du contrôle positif ont été introduits dans la diète lors du refroidissement juste avant la température de gélification de l'agar vers  $44^\circ\text{C}$ . Comme pour le test préliminaire n°2, les chenilles ont été individualisées dans les piluliers avec un morceau de

5g de diète correspondant à la modalité concernée. La diète a été remplacé tous les 3 jours. Lors de ce troisième test, 20 répétitions ont été testées selon les 6 modalités, une larve faisant office d'unité, soit un total de 120 larves. Les observations ont été poursuivies jusqu'à l'émergence des imagos.

## 3.4 Essai biologique

À la suite des essais menés lors des tests préliminaires, plusieurs modifications ont été apportées au protocole de l'expérimentation final afin de pouvoir vérifier certaines hypothèses susceptible d'être à l'origine de l'absence d'effets significatifs sur la survie des chenilles lors des tests préliminaires. Pour cette dernière expérience, le test de toxicité des jus de fermentation et le test de pathogénicité des champignons ont été réalisés de manière simultanée avec une chenille de stade L2 faisant office d'unité et 20 répétition pour les 12 modalités, soit un total de 240 larves de stade L2 pour l'ensemble du dispositif expérimental. Lors de cette dernière expérience, un contrôle positif a été réalisée à l'aide d'un insecticide biologique commercial (DiPel® DF, Sumitomo Chemical Agro Europe SAS) en granulés à disperser dans l'eau (WG) à base de 54% de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*, souche ABTS-351 à une dose de 10 g L<sup>-1</sup> correspondant à 0,5 Kg ha<sup>-1</sup>. La conduite des essais a été réalisée en chambre climatique (Snijders Scientific) à 25±1°C (70±10% HR ; 16:8H j:n)

### 3.4.1 Toxicité des jus de fermentation introduit dans la diète

Lors de la préparation des différentes modalités de diète incluant les extraits de fermentation, il a été décidé de vérifier que la température nécessaire à la gélification de l'agar n'ait pas dégradé les métabolites présents dans les jus de fermentation. Pour cela, l'agar utilisé comme gélifiant dans la diète a été remplacé par de la gélatine alimentaire EWALD® (50 g/L) pour cette dernière expérimentation. Ainsi pour la préparation de la diète, la gélatine est ajoutée dans l'eau distillée à température ambiante. La solution est agitée jusqu'à solubilisation complète de la gélatine en chauffant doucement jusqu'à 33°C maximum. Ensuite, la diète en poudre (144 g/L product #F9772, Frontier Scientific Services) est ajoutée sous agitation en laissant refroidir. Les jus de fermentation sont introduits en dernier dans la solution encore sous agitation juste avant de couler la diète encore liquide dans un bac en plastic préalablement refroidi au -80°C pendant

15 minute afin de figer la diète lors du coulage. Les jus de fermentation choisis pour ce test sont issus de la méthode de fermentation n°1 pour la souche *S. albus* et de la méthode n°2 pour la souche *S. hygrosopicus*. Les concentrations en jus de fermentation dans les diètes sont de 2% et 10% pour chaque souche comme dans le troisième test préliminaire. Le témoin négatif est constitué de la modalité diète avec la gélatine comme gélifiant.

### 3.4.2 Pathogénicité des champignons

Au niveau des champignons, la concentration des solutions de spores à tester a été revue à la hausse en passant de  $10^7$  spores.mL<sup>-1</sup> à  $10^8$  spores.mL<sup>-1</sup>. Les conditions d'application des solutions de spores ont également changé. Lors de cet essai,  $289,4 \pm 11\mu\text{L}$  (moyenne  $\pm$  SE) des solutions contenant les spores à tester ont été pulvérisés à l'intérieur des piluliers à l'aide d'un petit vaporisateur à parfum. Les piluliers ont ensuite été mis à sécher avant l'introduction de la diète (à base d'agar) et des larves. Les piluliers servent ensuite de logette individuelle aux larves pour toute la durée de l'expérience. Ces dernières sont de cette manière en présence de spores pendant toute la durée de l'expérience.

### 3.4.3 Concentration en spores des suspensions

Afin de mesurer la quantité de spores viables présents dans les suspensions pulvérisées, le nombre de spores présent dans les solutions a été calculé par la méthode du nombre le plus probable (MPN=Most Probable Numbers) tel que décrite par Inglis et al, 2012. Pour cela, des dilutions d'un facteur  $10^3$  à  $10^5$  sont réalisées à partir de la suspension de spore initiale destinée à être pulvérisés ( $10^8$  spores mL<sup>-1</sup>). 100  $\mu\text{L}$  de chaque dilution sont étalés sur PDA en boîte de Petri qui est mises à incuber à 25°C. Trois répétitions ont été faite pour chaque dilution et chaque traitement. Après 48h, les boîtes de Petri qui comportent entre 50 et 200 colonies sont sélectionnées et le nombre de colonies y ont été comptés. La concentration Y (spores mL<sup>-1</sup>) en spores viables dans les suspensions à pulvériser est calculée comme suit :

$$Y = \text{nombre de colonies} \times 10 \times \text{facteur de dilution}$$

### 3.4.4 Diagnostic de la mort des larves

Afin de pouvoir confirmer que la mort des larves est bien dû suite à l'infection par le champignon entomopathogène, les larves retrouvées mortes dans les modalités correspondantes aux champignons ont été stérilisées en les trempant dans une solution d'éthanol 70% pendant 1 minute puis dans une solution de NaClO 5% pendant 1 min avant d'être rincées dans trois bain successifs d'eau stérilisée. Les larves ont ensuite été disposées sur un papier filtre humide et stérile dans une boîte de Petri scellée avec du Parafilm® et mises en incubateur à 25°C. La mort par les champignons est confirmée dans le cas où il y a un développement de mycélium sur l'insecte.

## 3.5 Identification des souches de champignons entomopathogènes

### 3.5.1 Observation morphologique

Afin de pouvoir observer les caractéristiques morphologiques des souches étudiées, des cultures sur lamelle microscopiques ont été réalisées avec les différentes souches selon la méthodologie préconisée par Inglis et al, 2012. Un morceau de PDA de 10 mm x 10 mm x 5 mm est placé entre lame et lamelle microscopique de manière aseptique et inoculé avec les souches étudiées à l'aide d'une anse stérile. Les préparations sont scellées en boîte de Petri et mises à incuber pendant 15 jours avant observation avec un microscope Oxion Euromex® et un grossissement X40.

### 3.5.2 Extraction, qualité et dosage de l'ADN

La première extraction de l'ADN des champignons est basée sur une méthode modifiée de Saitoh et al. (2006). Un morceau de mycélium (300mg) a été excisé de la culture en boîte de Petri à l'aide d'une anse inoculatrice et introduit dans un tube de 1.5mL en présence de 500µL de tampon d'extraction (Tris-HCl 200mM, EDTA 50mM, NaCl 200mM et SDS 1%, pH8.0). Le morceau de mycélium est broyé avec l'anse inoculatrice dans le tampon d'extraction puis laissé à incuber pendant une nuit à 56°C en présence de 10µL protéinase K. Après une centrifugation à 15Krpm pendant 5 minute à 4°C, le surnageant (400µL) est récupéré et mélangé

à 1125µL d'alcool absolu pré-refroidi à -20°C. Une centrifugation à 15Krpm pendant 2 minutes à 4°C est effectuée et le surnageant est jeté. Ensuite le culot est lavé à l'aide d'éthanol à 70% pré-refroidi à -20°C et centrifugé pendant 2 minutes à 4°C. Le culot est ensuite laissé à sécher avant d'être dissous dans 40µL de tampon TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0).

Après les résultats issus de la première amplification, une deuxième extraction de l'ADN des champignons nommés F1, F2 et F4 a été réalisée à l'aide d'un kit QIAGEN DNeasy plant kit en suivant le protocole du fabricant repris en annexe 1. La concentration d'ADN ainsi que les ratios A280/260 et A260/230 des échantillons ont été mesurés à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop One.

### 3.5.3 Amplification du gène ITS et séquençage des amplicons

Les réactions en chaîne par polymérase (PCR) ont été effectuées selon les protocoles préconisés dans l'annexe fournie par Raja et al. (2017).

La réaction d'amplification PCR a été réalisée à l'aide de la Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA polymérase (0.8U par réaction de 20µL) dans le tampon approprié incluant le MgCl<sub>2</sub> (50mM), les dNTPs (0,2mM de chaque dNTP), les amorces *Forward* et *Reverse* (Tableau 2) (Eurogentec) à une concentration de 10µM. Des réactions de 20µL ont été réalisées avec 16µL de prémix et 4µL d'ADN. Lorsque cela était possible, les échantillons d'ADN ont été normalisés à 20ng/µL afin d'obtenir une concentration finale d'ADN de 80ng au total dans la réaction. De l'eau distillée UltraPure™ DNase/RNase free (Invitrogen) a été utilisée comme témoin négatif lors des PCR pour vérifier la présence de contamination. Les produits d'amplification ont ensuite été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% avec du SybrSAFE comme agent intercalaire afin de vérifier que les amplicons aient une taille de 500-600 paires de bases. Les séquences d'ADN qui ont été correctement amplifiées ont été purifiées avec un kit NucleoSpin gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel GmbH) en suivant le protocole du fabricant et envoyées pour un séquençage des séquences de l'ITS avec la méthode Sanger par la société Eurofins Genomics Germany GmbH

**TABLEAU 2 : Amorces et protocoles d'amplifications utilisés**

Locus	Primer	Oligonucléotides (5'→3')	Programme PCR	Références
<b>ITS</b>	ITS5 ( <i>Forward</i> )	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	1. 95°C 5min 2. 94°C 30 s 3. 52°C 30 s 4. 72°C 1min 5. 35X les étapes 2) à 4) 6. 72°C 8min 7. 4°C- ∞	(White et al., 1990)
	ITS4 ( <i>Reverse</i> )	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		
<b>Cam</b>	CMD5	CCG AGT ACA AGG AGG CCT TC	1. 94°C 1min 2. 94°C 1min 3. 55°C 30 s 4. 72°C 90 s 5. 35X les étapes 2) à 4) 6. 72°C 10min 7. 4°C ∞	(Hong et al., 2005)
	CMD6	CCG ATA GAG GTC ATA ACG TGG		
<b>tub2/BenA</b>	Bt2a	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	1. 95°C 5min 2. 94°C 45 s 3. 55°C 45 s 4. 72°C 1min 5. 35X les étapes 2) à 4) 6. 72°C 7min 7. 4°C ∞	(Glass et al., 1995)
	Bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC		

## 3.6 Analyses statistique et bio-informatique

### Analyse de survie

Pour les tests préliminaires et le test de survie final, des analyses de survie avec l'estimateur non-paramétrique de Kaplan-Meier ont été effectuées afin de comparer les effets des trois différentes souches de champignons entomopathogènes sur la survie des insectes. Les courbes de survies ont été modélisées à l'aide du logiciel statistique Rstudio version 4.0.2 et ont été couplées à des tests Log-rank afin de mettre en évidence d'éventuelles différences significatives entre les traitements (Harris, 2018). Les packages qui ont été utilisés pour les analyses statistique sont les packages « survival », « Survminer », « ggplot2 », « tidyverse » et « ggpubr » (Wickham, 2009; CoreTeam, 2017; Kassambara et al., 2017; Wickham et al., 2019; Therneau, 2021).

### Analyse phylogénétique

Une analyse phylogénétique a été réalisée sur les données de séquençages. Les séquences des amplifiées de chaque échantillons ont été vérifiées, nettoyées puis alignées avec le logiciel BioEdit 7.2 afin de trouver des séquences consensus (Hall, 1999). Si une séquence consensus n'a pas pu être trouvée, la séquence *Forward* ou son *Reverse* complément nettoyé a été utilisé tel quel. Une fois les séquences consensus trouvées, elles ont été soumises à une recherche à l'aide de l'outil BLASTn disponible sur le site de la National Center Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) afin de lister une dizaine d'organismes ayant au taux de similarité supérieur à 97% des séquences étudiées (Altschul et al., 1990). Les séquences de chaque souches étudiées ont ensuite été alignées une à une avec avec les dix séquences des organismes les plus proches pour être comparées à l'aide de l'outil MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) avec les paramètres par défaut et l'option « pairwise deletion » dans le logiciel MEGA 10.2.5 (Edgar, 2004; Kumar et al., 2018). Pour la construction des arbres phylogénétiques, les modèles de substitution ont été calculés selon la méthode du maximum de vraisemblance et choisis selon le plus faible score BIC (Bayesian Information Criterion). La phylogénie des séquences alignées a été reconstruite à l'aide de la méthode de maximum de vraisemblance avec un "bootstrapping" de 100 répétition sur MEGA 10.2.5.

Les modèles de substitutions qui ont été choisi pour la construction des arbres sont les modèles Tamura à 3 paramètres pour les arbres A et B ainsi que le modèle Kimura à 2 paramètre pour

l'arbre C (Kimura, 1980; Tamura, 1992). Pour la recherche heuristique les arbres initiaux de A et B ont été générés en appliquant la méthode Neighbor-Joining (NJ) à une matrice de distance estimée à l'aide du modèle à 3 paramètres de Tamura. Pour C, l'application de la méthode NJ s'est faite à matrice de distance par paires estimées par l'approche MCL (Maximum Composite Likelihood). Pour cette dernière, une distribution Gamma discrète a été utilisée pour modéliser les différences de taux d'évolution entre les sites (5 catégories (+G, paramètre = 0.1380)). Les analyses de A, B et C ont été réalisées sur 11, 12 et 13 séquences nucléotidiques respectivement.



## 4 Résultats

### 4.1 Tests préliminaires

#### 4.1.1 Pathogénicité des champignons

Une différence significative de l'analyse de survie par Kaplan-Meier apparaît de manière globale entre les courbes de survie des différentes modalités ( $\chi^2=14.1$  ; ddl=4 ;  $p = 0,007$ ) (Figure 9). Toutefois, lorsque les modalités sont comparées une à une avec celle du témoin négatif on remarque que cette différence provient du traitement avec le champignon F2 dont la survie des larves est significativement différente ( $\chi^2=4.5$  ; ddl=1 ;  $p = 0,023$ ) de celle du témoin négatif qui atteint les 50% de mortalité au bout de 4 jours. Lors de ce premier test préliminaire, les larves comptées pour morte n'ont pas pu être retrouvés au sein des différentes modalités car elle ont été entièrement consommées par leurs congénères. La mortalité de ce test résulte donc essentiellement du comportement de cannibalisme des chenilles légionnaire aux sein des unités expérimentale.

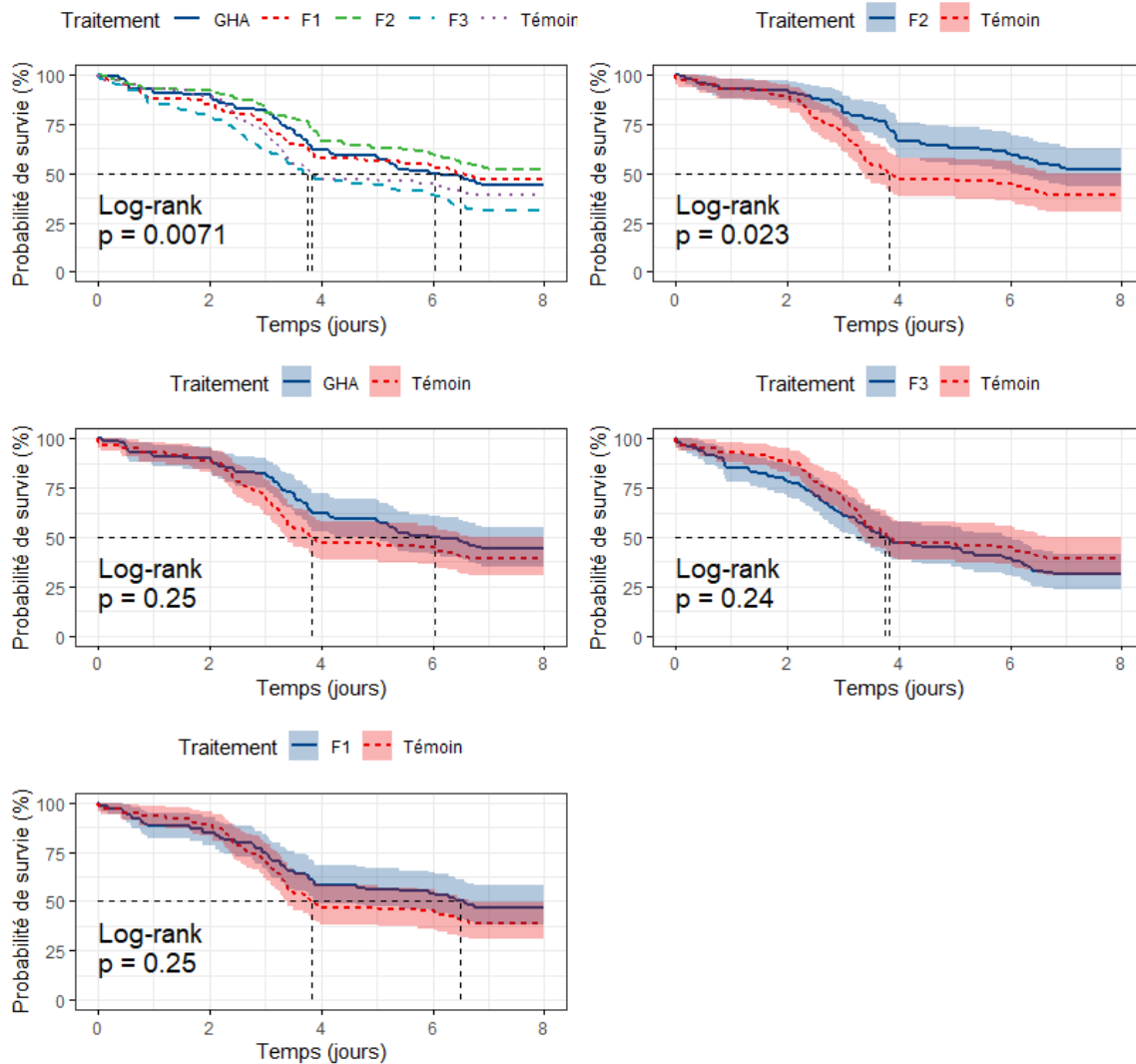


FIGURE 9 : Courbes de survie Kaplan-Meier du 1<sup>er</sup> test préliminaire. Le premier graphique en haut à gauche représente la courbe de survie globale de tous les traitements pris en même temps. Les autres graphique représente les courbes de survie de chaque traitement (courbe pleine bleu) vis-à-vis du groupe témoin négatif (courbe en pointillé rouge) (Test Log-Rank).

Au niveau de ce deuxième test, les larves ont été pulvérisées avec les solutions puis individualisées. On retrouve à nouveau une différence significative de manière globale entre les cinq courbes ( $\chi^2=10.3$  ; ddl=4 ;  $p = 0,02$ ) ( Figure 10). Lorsque les traitements sont comparés au témoin, des survies significativement plus importante que le témoin négatif apparaissent au niveau des modalités F2 ( $\chi^2=5.1$  ; ddl=1 ;  $p = 0,016$ ) et F3 ( $\chi^2=5.7$  ; ddl=1 ;  $p = 0,023$ ). Les traitements avec le champignon F1 et le *Beauveria bassiana* GHA ne montrent toujours pas de différence significative par rapport au groupe témoin. Par ailleurs, en tenant compte de la proportion des individus qui ont pu atteindre le stade chrysalide, les différences entre les différents traitements ne sont pas significatives (figure 11).

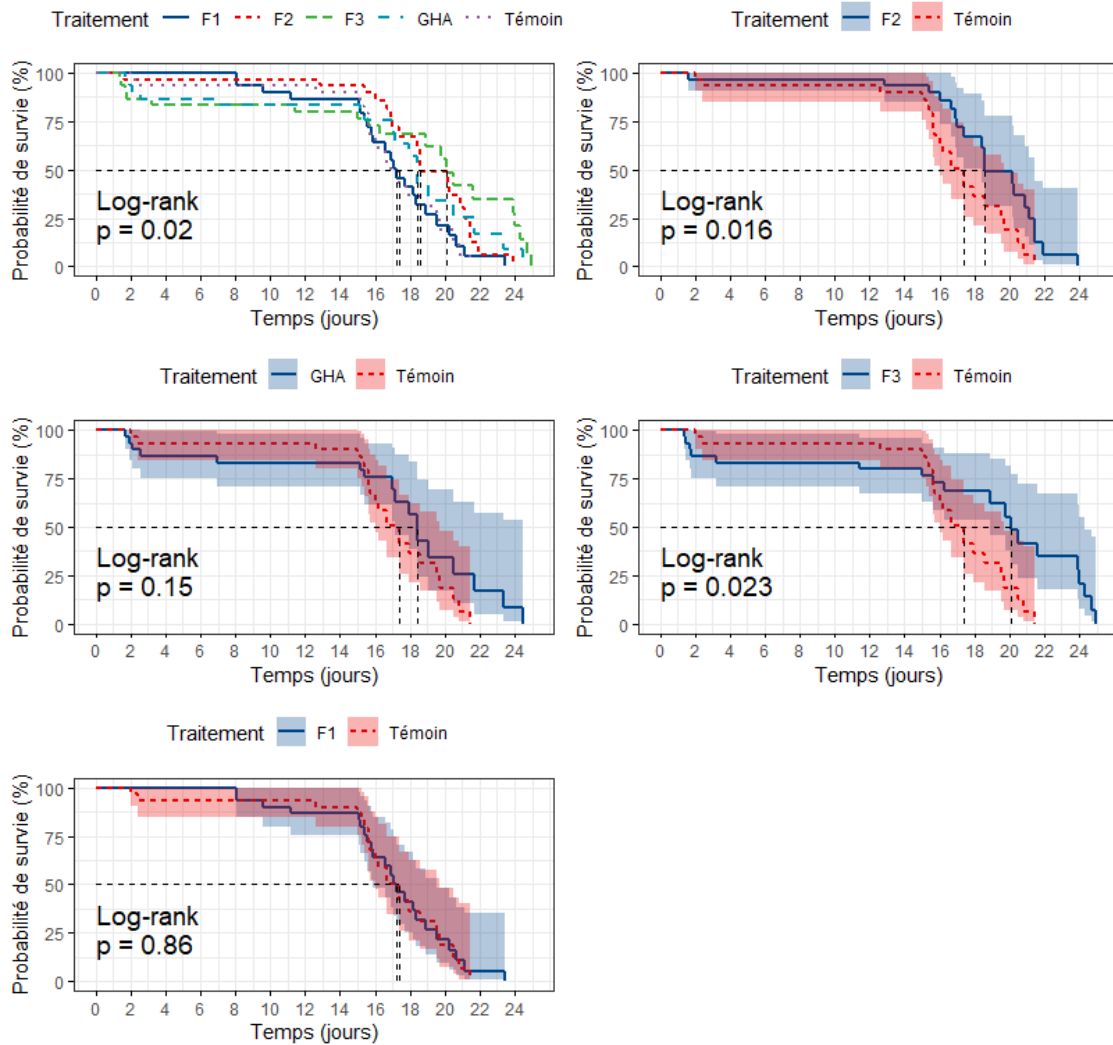


FIGURE 10 : Courbes de survie Kaplan-Meier du 2<sup>ème</sup> test préliminaire. Le premier graphique en haut à gauche représente la courbe de survie globale de tous les traitements pris en même temps. Les autres graphiques représentent les courbes de survie de chaque traitement (courbe pleine bleu) vis-à-vis du groupe témoin négatif (courbe en pointillé rouge) (Test Log-Rank).

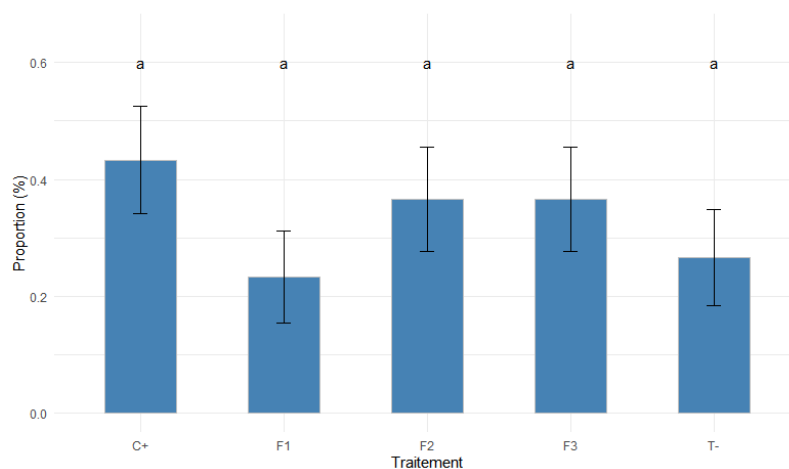


FIGURE 11 : Proportion des larves ayant atteint le stade chrysalide lors du test préliminaire n°2, erreur standard (Test de Tukey HSD)

### 4.1.2 Toxicité des produits de fermentation de *Streptomyces*

Pour le test préliminaire destiné à évaluer les jus de fermentation des souches *Streptomyces albus* et *Streptomyces hygroscopicus* sur la survie des larves, les courbes de survie des différents traitements par rapport au groupe témoin sont présentées figure 12. Les traitements ne présentent pas de survie qui diffère significativement vis-à-vis du groupe témoin. Dans tous les cas, le groupe témoin négatif présente une survie plus faible avec une LT50 à 18 jours.

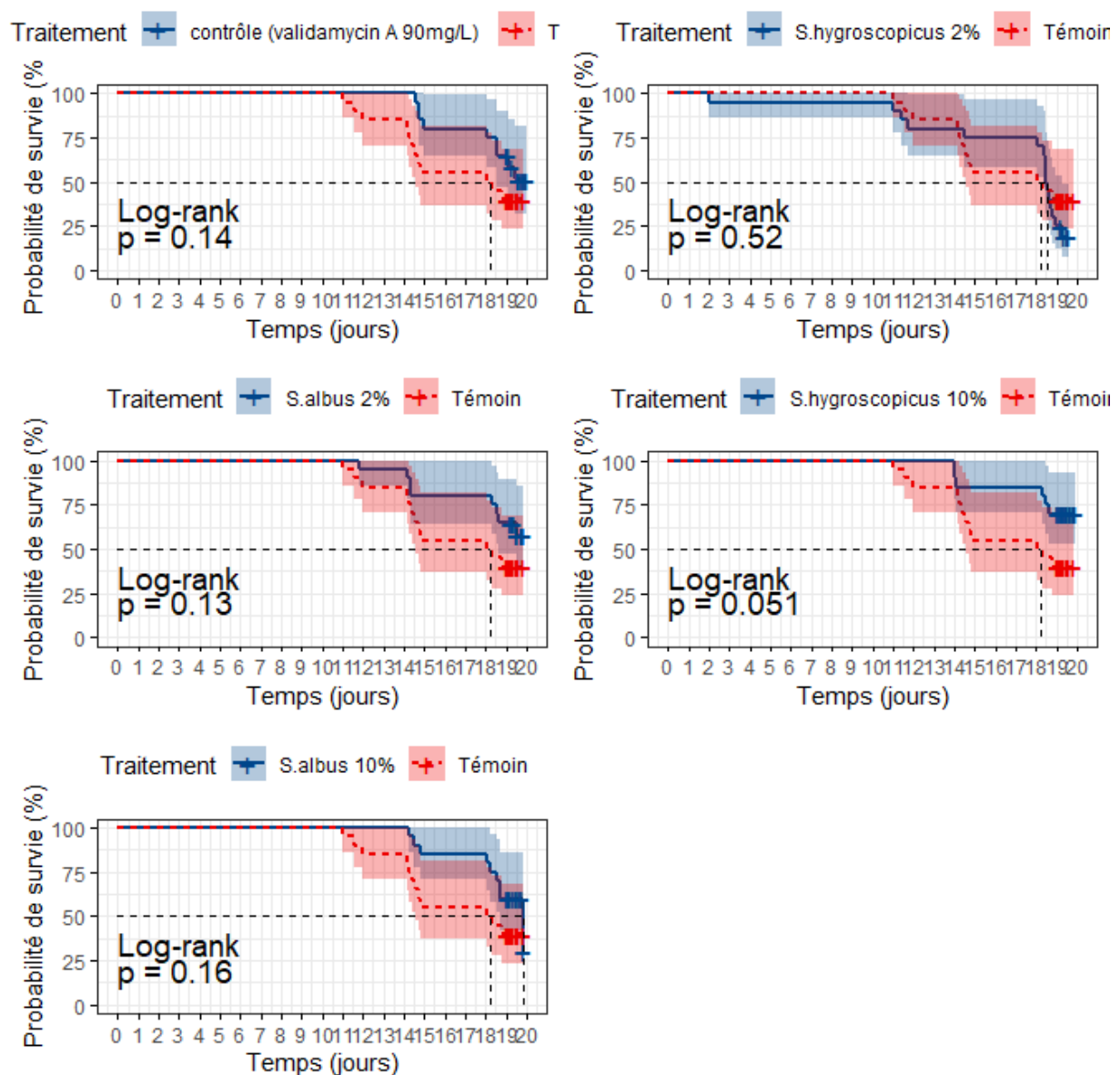


FIGURE 12 : Courbes de survie Kaplan-Meier du 3<sup>ème</sup> test préliminaire. La courbe en pointillée rouge représente la survie du témoin négatif et la courbe pleine bleu représente la survie des larves dans le groupe traité. Les marges de couleurs autour des courbes représentent les intervalles de confiance des courbes de survies (Test Log-Rank)

## 4.2 Essais biologique

### 4.2.1 Toxicité des produits de fermentation de *Streptomyces*

Les courbes de survie des larves élevées sur les diètes à base de gélatine et contenant les jus de fermentation sont représentées à la figure 13.

Aucune différence significative n'est observée entre les courbes de survie des individus élevés sur les diètes contenant les jus de fermentation et celles des groupes témoin. Seule la courbe de survie des individus appartenant au contrôle positif à base de *Bacillus thuringiensis* a été très significativement plus courte que les autres traitements avec seulement 2,5 jours pour atteindre 50% de mortalité. Bien qu'une différence visuelle de vitesse de croissance des larves a été remarquée entre le témoin sur diète à base d'agar et le témoin sur diète à base de gélatine, aucune différence significative n'apparaît entre les courbes de survie de ces deux modalités témoin.

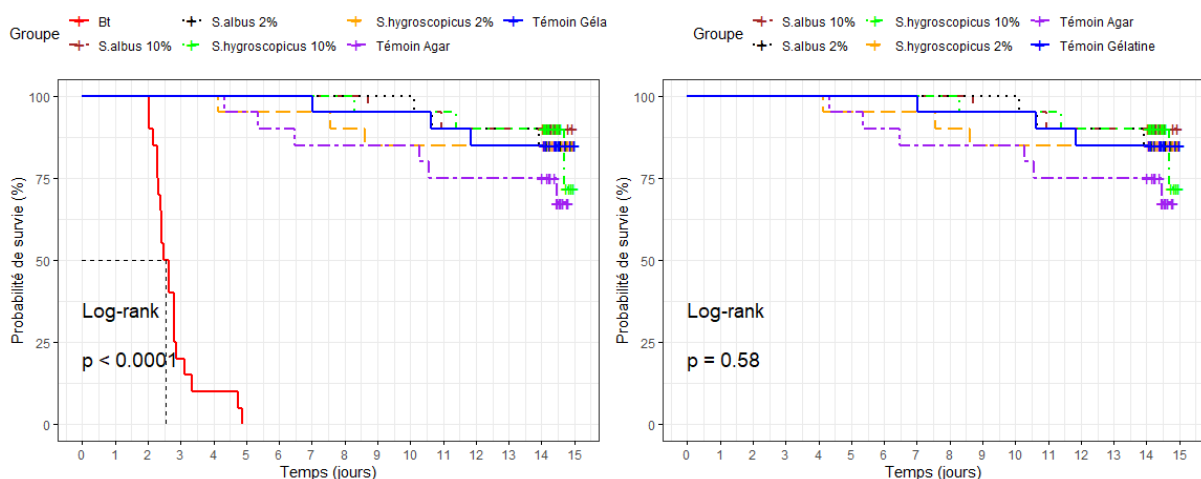


FIGURE 13 : Courbes de survie Kaplan-Meier des larves ayant été élevé sur diète artificielle modifiées. La courbe pleine rouge représente le contrôle positif traité avec le *Bacillus thuringiensis*. La courbe pleine bleu représente la diète témoin négatif constituée avec la gélatine. La courbe en pointillée mauve représente la diète témoin négatif constituée avec l'agar-agar. Les autres courbes en pointillées représente les modalités de contenant les jus de fermentation des bactéries filamenteuses *Streptomyces albus* et *Streptomyces hygroscopicus* à une concentration de 2% et 10%. (Test Log-Rank).

### 4.2.2 Pathogénicité des champignons

La survie des larves qui ont été élevées pendant 15 jours en présence des spores des champignons est représentée par la figure 14. De manière similaire au test précédent concernant l'utilisation des *Streptomyces spp*, il n'y a pas de différence significative entre les courbes de

survie lorsque le contrôle positif constitué de *Bacillus thuringiensis* n'est pas pris en compte. Comme on peut le remarquer, les courbes de survie des larves traitées avec les champignons semblent suivre une trajectoire similaire à celle du groupe témoin.

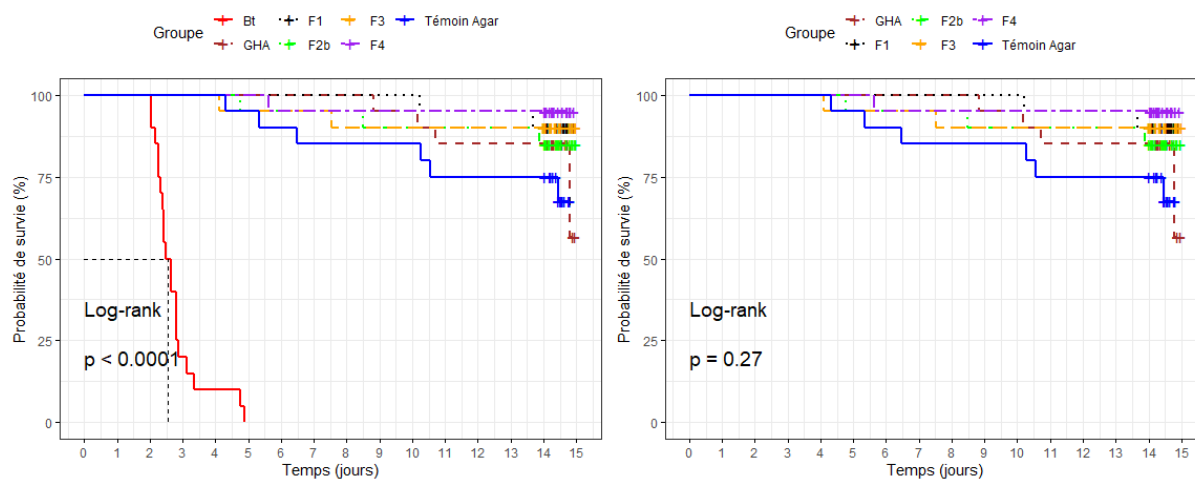


FIGURE 14 : Courbes de survie Kaplan-Meier des larves ayant été élevé en présence de spores. La courbe rouge pleine représente le contrôle positif composé de *Bacillus thuringiensis*, la courbe pleine bleu représente le témoin composé de Tween 80 à 0.05% et les courbes en pointillés représentent les modalités traitées avec les souches de champignons F1, F2, F3, F4 et GHA ( Test Log-Rank)

### 4.2.3 Concentration en conidies viables des suspensions

L'estimation selon la méthode du nombre le plus probable du nombre de conidies viables présentes dans les suspensions qui ont été pulvérisés est reprise dans le tableau 3. Cette mesure permet de constater des disparités entre les différentes suspensions normalement standardisées à  $10^8$  conidies  $\text{mL}^{-1}$  avec la cellule de Neubauer.

**TABLEAU 3 : Concentrations en conidies dans les suspensions pulvérisées (conidies viables/ml)**

Souches	Concentration moyenne $\pm$ SE	Dose moyenne $\pm$ SE
F1	$5,50 \times 10^7 \pm 0,29 \times 10^7$	$4238 \pm 222$
F2	$9,40 \times 10^7 \pm 0,68 \times 10^7$	$7243 \pm 524e$
F3	$1,98 \times 10^5 \pm 0,41 \times 10^5$	$15 \pm 3$
F4	$1,73 \times 10^8 \pm 0,17 \times 10^8$	$13356 \pm 1430$
GHA	$5,53 \times 10^7 \pm 1,13 \times 10^7$	$4264 \pm 873$

NB : Concentration moyenne (conidies viables  $\text{mL}^{-1}$ ) ; Dose moyenne (conidies viables  $\text{mm}^{-2}$ ) ; SE = erreur type

#### 4.2.4 Diagnostique de la mort des larves

Au total sur l'ensemble des cadavres retrouvés au cours de l'expérience et mis à incuber, quatre ont développé un mycélium semblable à la modalité concernée ( Figure 15), deux provenant du groupe traité avec le champignons F2 ( *Penicillium sp* ), une appartenant au groupe traité avec F1 ( *Aspergillus sp* ) et une du groupe traité avec *Beauveria bassiana* GHA. Les autres larves mortes au cours de l'expérience n'ont pas montré de développement de mycélium. La sporulation des champignons sur les cadavres est apparue au bout de 10, 15 et 17 jours pour les traitements F2, GHA et F1 respectivement.

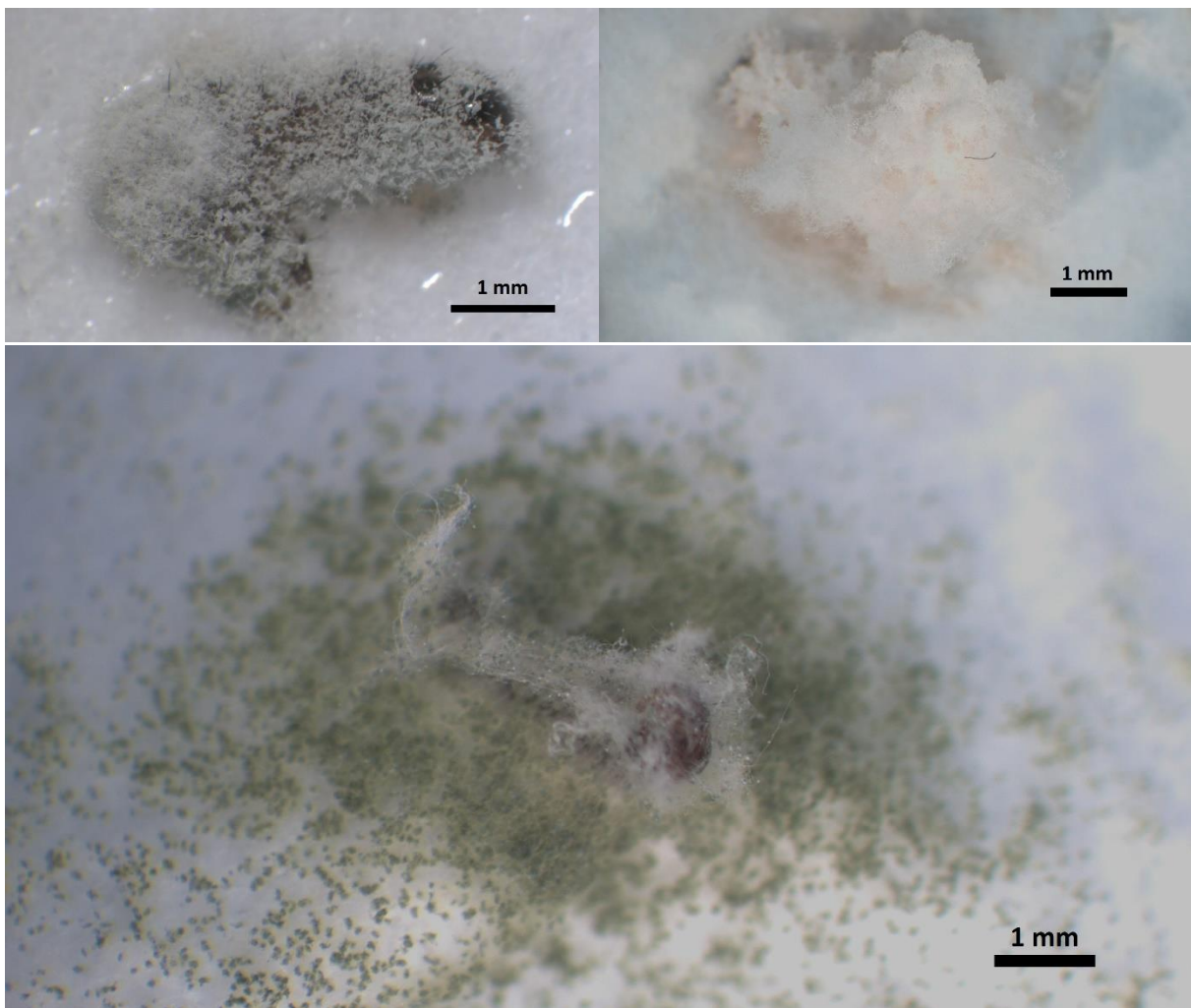


FIGURE 15 : Larves retrouvées mortes dans l'essais biologiques qui ont été stérilisées puis mises à incuber pour vérifier si la mort de la larve est due au champignon et ainsi évaluer la pathogénicité des souches étudiées ( F2 en haut à gauche ; GHA en haut à droite ; F1 en-bas). Photographie van den Bussche 2021

## 4.3 Identification des souches de champignons

### 4.3.1 Observations morphologique

Les préparations microscopiques ont permis de réaliser l'observation des conidiophores des champignons F1 et F2. Au niveau du champignon F2, on peut observer des conidiophores qui portent des phialides biverticillées, semblables à une ombelle. Chez la souche F1, on observe la présence de conidiophores dressés terminés par une vésicule supportant une rangée de phialides (Figure 16). Les préparations microscopique de la souche F3 n'ont pas permis d'obtenir des images exploitables et ne sont donc pas présentées. Au niveau macroscopique, des différences notables ont pu être observées entre les trois souches. Chez la souche F3, on observe une croissance plus lente et relativement restreinte du mycélium formant une excroissance circulaire de couleur blanche et d'aspect cotonneux à la surface du milieu de culture (voir photos figure 17). À la différence de la souche F3 qui semble ne se développer qu'en surface du milieu, la souche F2 montre une croissance du mycélium qui s'incruste dans le milieu de culture en formant des stries dans le sens de sa croissance. Chez la souche F1 la couleur varie d'un vert kaki clair à jaune avec un mycélium qui a plutôt tendance à rester en surface et ne montre pas de modification de la forme du milieu de culture. La couleur de la souche F2 varie du bleu turquoise foncé à gris foncé.

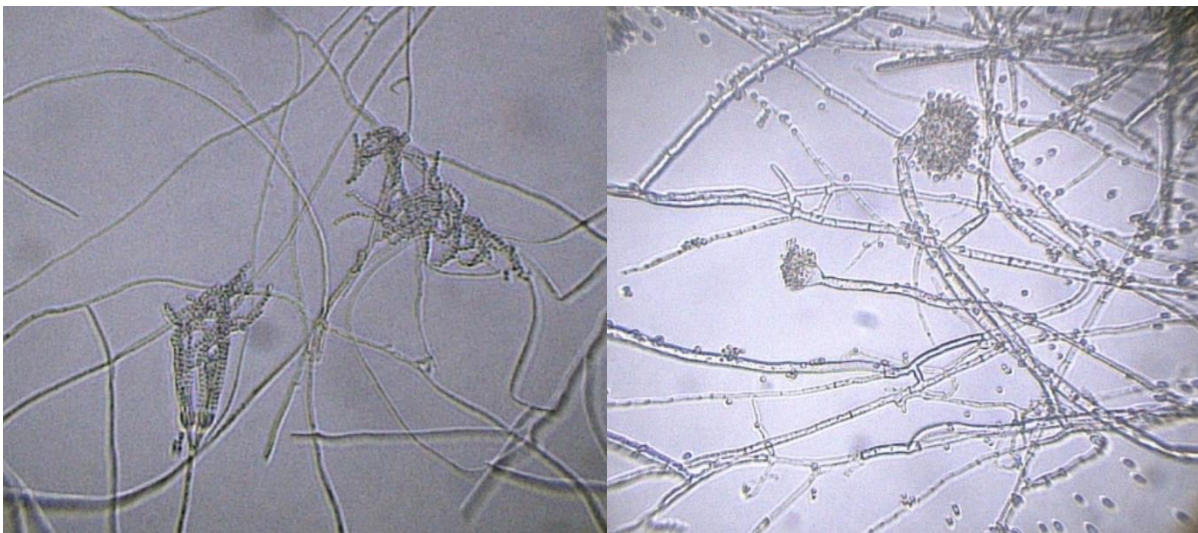


FIGURE 16 : Observations microscopique réalisées sur les souches F1 et F2 avec un agrandissement  $\times 40$ . La souche F1 sur l'image à droite possède des conidiophores en forme de vésicule hémisphérique et la souche F2 sur l'image de gauche possède des conidiophores munies de phialides biverticillées. Photographie van den Bussche 2021



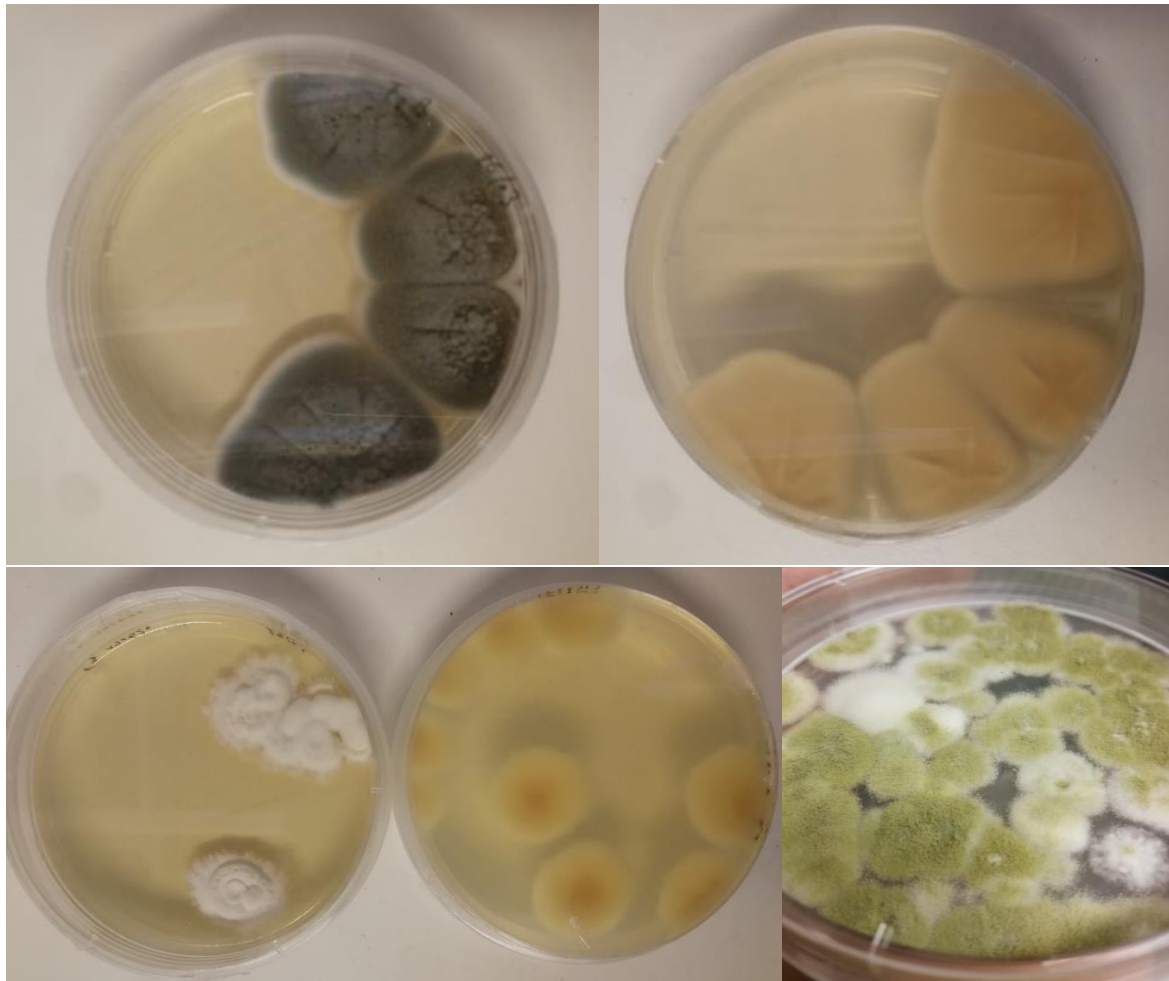


FIGURE 17 : Observations macroscopique des cultures sur PDA des quatre souches étudiées (De gauche à droite et de haut en bas) : Face supérieur de F2, face inférieur de F2, face supérieur et inférieur de F3 et face supérieur de F1). Photographie van den Bussche 2021

#### 4.3.2 Dosage et qualité de l'ADN

Le dosage et la qualité d'ADN des échantillons ont été analysés à l'aide du Nanodrop One. Les mesures prises sont reprises dans le Tableau 4. Pour chaque souche, deux à trois échantillons ont été prélevés d'une seule et même culture.

**TABLEAU 4 : Dosage de l'ADN total et ratios d'absorbance pour les différentes souches de F1 à F4 des champignons et le contrôle positif (GHA= Botanigard 22WP)**

Méthode d'extraction	Code d'identification du champignon	Nr d'échantillon	Dosage (ng $\mu\text{L}^{-1}$ )	A260/280	A260/230
1 <sup>ère</sup> méthode	F1	1	48,8	1,54	0,86
		2	46,7	1,49	0,84
	F2	1	31,9	1,85	0,76

		2	22,5	1,95	0,85
	F3	1	606,1	1,66	1,03
		2	861,5	1,67	0,84
		3	162,2	1,68	0,96
	<i>Beauveria bassiana</i> GHA (contrôle+)	1	470,9	2,15	2,18
		2	273,5	2,12	1,89
2 <sup>ème</sup> méthode (DNeasy plant kit QIAGEN)	F1	1	1,1	1,49	-0,21
		2	1,5	1,73	-1,07
		3	0,6	1,65	0,09
	F2	1	14,8	1,6	0,85
		2	37,8	1,46	0,67
		3	24,9	1,70	0,81
	F4	1	4,1	1,29	-5,11
		2	56,6	1,56	0,64
		3	13,9	1,25	0,9

Pour les échantillons des champignons F1 à F3 et le contrôle positif selon la première méthode d'extraction, la quantité d'ADN total varie de 22,5 à 606,1 ng/μL. Pour les champignons F1, F2 et F4, la concentration d'ADN total présent dans les échantillons après extraction avec le kit DNeasy plant QIAGEN® varie de 0,6 à 56,6 ng/μL. Les ratios d'absorbance ont pour but d'évaluer la pureté de l'ADN présent dans les échantillons. Ceux-ci doivent se situer entre 1,8 et 2,0 pour le rapport A260/280 et entre 2,0 et 2,2 pour le rapport A260/230. Mis à part quelques ratios A260/280 de faibles valeurs (< 1,5), le reste des échantillons ont des ratios A260/280 de valeurs acceptables. Une faible valeur du rapport A280/260 peut être expliquée par une contamination par des protéines. À l'inverse, une valeur élevée de ce rapport est associée à la présence d'ARN dans l'échantillon d'ADN. Au niveau du ratio A260/230, seuls les échantillons du contrôle positif ont des valeurs acceptables. Tous les autres échantillons ont un ratio anormalement bas. Or ce rapport est sensible à un plus grand nombre de contaminants tel que l'hydrochlorure de guanidine, le thiocynate de guanidine, l'EDTA, des phénols, des

polysaccharides (agarose,...) ou encore les fibres de silices présentes dans les colonnes de purification fournies dans les kit DNeasy (Koetsier et al., 2019). Les variations de pH ont également une influence sur ces ratios (Wilfinger et al., 1997). Or les tampons utilisés pour l'extraction et l'élution contiennent du Tris-HCL à pH = 8,0. D'autre part, les kits QIAGEN étant connus mondialement pour obtenir de bons résultats, les mauvais ratios obtenus pendant ce travail résultent probablement de contaminations ou de coextractions. Néanmoins, malgré les faibles ratio certains échantillons ont été conservés pour tenter d'identifier les champignons. Les échantillons d'ADN extraits avec kit qui ont été sélectionnés pour l'amplification et le séquençage sont les échantillons F1 n°2, F2 n°1 et F3 n°2.

### 4.3.3 Amplifications d'ADN

Les réactions en chaîne de polymérase sont réalisées sur les régions de l'ITS, de la Calmoduline et de la Beta-tubulin des échantillons d'ADN des champignons F1 à F3 provenant de la première méthode d'extraction. Des amplicons d'une taille d'environ 600bp ont été obtenus pour la région ITS des échantillons de champignons F3 et ont donc été sélectionnés pour le séquençage. Des produits d'amplification de la région de la bêta-tubulin ont été obtenus pour les échantillons d'ADN des champignons F2 et F3. Cependant, la taille des amplicons de cette région du gène étant différente entre les deux champignons, ceux-ci n'ont pas été choisis pour le séquençage. L'amplification du gène de la Calmoduline sur les échantillons d'ADN issus de la première méthode d'extraction n'a pas permis d'obtenir d'amplicons. Les résultats de la migration sur gel d'agarose des produits d'amplification pour les trois gènes sont représentés en annexe ( Figure 18 à 22 )

À l'issue de l'extraction avec le kit DNeasy plant, les réactions PCR des régions ITS et Cam ont été réalisées sur les échantillons d'ADN des champignons F1, F2 et F4. Des amplicons du gène ITS d'environ 600 paires de bases ont été obtenus pour les trois champignons. Comme pour la PCR après la première extraction, aucun produit d'amplification n'a pu être généré avec les amorces CMD5 CMD6 lors de ce deuxième run de PCR ( Annexe 2, Figure 21). Une variation des conditions de la PCR n'a pas pu être effectuée en-dehors du temps imparti pour obtenir des amplicons.

#### 4.3.4 Traitement des séquences

Le séquençage en deux run réalisé par la firme Eurofins Genomics Germany GmbH a permis d'obtenir un total de 10 séquences en format FASTA de l'ITS ( 5 *Forward* et 5 *Reverse* ) allant de 591 à 1102bp sur 6 échantillons d'ADN provenant des quatre souches étudiés. Après nettoyage des parties en amont et en aval des 10 séquences, les brins complémentaires des séquences *Reverse* ont été alignés avec les séquences *Forward* pour chaque échantillon afin de trouver une séquence consensus. Sur les 6 échantillons analysés, 4 séquences consensus qui varie de 406 à 572 paires de bases ont pu être établies pour trois des champignons étudiés. Pour le champignon F1, la séquence *IB proper* de 542bp a été obtenue. Deux séquences consensus de 406 et 563bp ont pu être générées pour le champignon F3 et une séquence consensus de 545bp pour le champignon F4. Les séquences *A3 proper noconsensus* et *2A proper noconsensus* sont les séquences des champignons F3 et F2 respectivement dont aucun consensus n'a pu être trouvé. À noter qu'un bruit important est visible au niveau du chromatogramme fournis avec les séquences brutes ayant servi à l'obtention de la séquence *2A proper noconsensus* du champignons F2.

#### 4.3.5 Identification par Blastn et analyses phylogénétiques

Suite aux recherches avec l'outil Blastn effectuées sur les séquences travaillées, les organismes les plus proche des souches F1, F3, F2 et F4 répertoriés dans la base de données NCBI sont les espèces *Aspergillus oryzae*, *Metharhizium rileyi* et *Penicillium copticola* respectivement (Tableau 5).

Les arbres phylogénétique représentés en annexe 3 (Figure 23) sont ceux qui présentent la plus forte vraisemblance logarithmique ( $\ln L = -1106,24$  pour A,  $\ln L = -1304,57$  pour B et  $\ln L = -1314,56$  pour C). Les matrices de séquences utilisés pour la construction des arbres A, B et C sont constitué d'alignement de 429, 411 et 334 sites nucléotidiques respectivement. Ces alignements ont été réalisé sur les souches étudiées (F1, F2, F3 et F4) avec les séquences des 10 espèces ou souches les plus proches issus des résultats de l'identification des souches étudiées sur la NCBI. D'après le cladogramme A qui montre les relations phylogénétique entre différentes espèces du genre *Aspergillus* spp de la section *Flavi*, la souche F1 forme un groupe monophylétique avec *A. flavus* soutenu par une valeur moyenne de bootstrap de 49. L'arbre B est formé par un ensemble d'espèces appartenant au genre *Penicillium* spp section *Citrina*. Au

sein de l'arbre B la souche F4 forme un clade bien défini avec *P. terrigenum* et *P. copticola* avec une valeur de bootstrap élevée de 95 tandis que la souche F2 reste plus proche des espèces *P. steckii* et *P. sumatraense* avec toutefois une valeur de bootstrap moins robuste de 57. Le cladogramme C illustre les espèces les plus proche de la souche F3. Celui-ci se divise en 5 groupe monophylétique dans lesquels on retrouve différents genres. Les *Cordyceps sp* et les *Métacordyceps sp* forment un clade moyennement soutenu (65) avec le genre *Paecilomyces sp*. Les trois échantillons de la souche F3 se situe dans un clade appart à côté du groupe constitué de *Metarhizium rileyi* et *Nomuraea rileyi*. Ces deux groupes se rejoignent au niveau d'un nœud supporté par une valeur de bootstrap de 48. Le groupe restant constitué par le genre *Pochonia sp* et *Verticillium sp* supporte une valeur de bootstrap plus élevé de 68.

**TABLEAU 5 : Résultats de la recherche dans la base de données Blastn**

N° identifiant de la souche	Organisme le plus proche	N° d'accension	E-value	Pourcentage d'identité	Couverture de la requête
<b>F1</b>	<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 447	NR_135395.1	0.0	100.00%	100%
<b>F2</b>	<i>Penicillium copticola</i> CBS 127355	NR_121516.1	6.57e-135	92.492%	61%
<b>F3</b>	<i>Metarhizium rileyi</i> isolate Nr Sf-1	MN602591.1	0.0	100.00%	100%
<b>F4</b>	<i>Penicillium copticola</i> CBS 127355	NR_121516.1	0.0	99.63%	99%

## 5 Discussion

### À propos des champignons entomopathogènes

Les résultats obtenus lors des tests préliminaires ont servi à choisir la méthodologie à utiliser pour l'essai biologique. Au niveau des champignons entomopathogène, les deux différences entre les dispositifs du premier et du deuxième test préliminaire résident au niveau du choix de l'unité expérimentale et de la méthode d'application des spores. Ainsi, lors du premier test la disparition des larves attribuable au comportement de cannibalisme naturellement présent au sein de l'espèce *S. frugiperda* a tourné le choix vers un dispositif expérimental permettant d'individualiser les larves afin d'éliminer l'effet du cannibalisme sur la mortalité. D'autre part, différentes méthodes d'application des entomopathogènes sont utilisées dans la littérature. Des méthodes directes comme l'immersion dans la suspension de spores ou la pulvérisation des larves avec la suspension ou des méthodes indirectes comme par exemples via une ingestion d'aliments contaminés ou par le déplacement des insectes sur une surface contaminée par le pathogène (Inglis et al., 2012).

Lors du deuxième test préliminaire, le choix s'est porté vers une pulvérisation directe des chenilles à l'aide du Potter spray tower et une individualisation des larves après traitement. Toutefois, les seuls résultats significatifs sont à nouveau dans le sens d'une plus grande mortalité dans le groupe témoin que chez les sujets traités avec les champignons entomopathogènes. Pourtant, les recherches dans le domaine ont montré l'efficacité de différentes souches de *Beauveria bassiana* dont la souche commerciale GHA et de plusieurs souches de *Metarhizium sp* pour lutter contre la chenille légionnaire. Par exemple, Wraight et collègues (2010) ont obtenu avec la souche GHA commerciale des mortalités après 6 jours de 50% et 95 % sur des larves de stade L2 de *S. frugiperda* avec des doses de 1213 conidies viable/mm<sup>2</sup> et 4234 conidies viables/mm<sup>2</sup>. Dans cette même étude, d'autres souches de *Beauveria bassiana* ont montré une plus grande virulence à l'égard de *S. frugiperda*. Parmi elles, la souche 1200 était la plus virulente contre l'ensemble des insectes étudiés. Dans une autre étude mené en serre, avec 6 souches de *Beauveria bassiana* et 14 souches de *Metarhizium anisopliae*. Les souches ICIPE 41 et ICIPE 7 de *M. anisopliae* se sont avérées très virulentes contre les légionnaires d'automne avec des mortalités enregistrées 7 jours après traitement de  $96.5\% \pm 2.1$  et  $93.7\% \pm 1.9$  respectivement. Parmi les souches de *B. bassiana*, quatre d'entre elles ont montré des mortalités après 7 jours de plus de 70% (Akutse et al., 2019).

Suite aux résultats des tests préliminaires, plusieurs hypothèses d'explication ont été posées. Premièrement, il se pourrait que les entomopathogènes étudiés aient perdu en pathogénicité après avoir été cultivés plusieurs fois successivement sur PDA. En effet, l'atténuation de virulence dans les sous-cultures est un phénomène qui a été observé chez la majorité des champignons entomopathogènes. Selon l'espèce et la souche, le taux de cette atténuation de virulence est variable. Certaines souches perdent leur virulence après une seule ou 2-3 sous-culture tandis que d'autres doivent être cultivées successivement 10-12 fois avant qu'une perte de virulence ne soit observée (Butt et al., 2006). Chez *Metarhizium anisopliae* par exemple, l'étude de Shah et al. (2005) montre que le déclin en virulence de sous-cultures des souches V245 et V275 est corrélée à une diminution de production de protéines *Pr1* (Pathogenesis-related protein) et de métabolites secondaires comme les destruxines qui sont considérées comme des déterminants importants de la pathogénicité chez les champignons entomopathogènes.

Par ailleurs, comme le rappelle Marcellin (2019), les larves des premiers stades muent assez rapidement (1,3 jours pour les larves de stade L2), ce qui a probablement pour effet de réduire la capacité du pathogène à pénétrer son hôte. Afin d'essayer de répondre à ces hypothèses, un dernier essai biologique a été mis en place avec le choix d'un dispositif expérimental axé sur une individualisation des larves et une méthode d'application indirecte qui consiste à laisser la chenille en présence d'une dose de conidies dans sa logette individuelle pour toute la durée de l'expérience. De cette manière, il ne peut plus y avoir de mortalité à cause du cannibalisme et les mues ne permettent plus aux larves d'échapper aux conidies.

Toutefois, les résultats à l'issue du test biologique ne semblent pas différer de ceux des tests préliminaires. Contrairement aux larves traitées avec le *Bacillus thuringiensis*, la survie dans le temps des groupes de larves traitées avec les champignons entomopathogènes ne diffère ni entre eux ni avec celles du groupe témoin. Comme on peut le remarquer, les courbes de survie des larves traitées avec les champignons semblent suivre une trajectoire similaire à celle du groupe témoin, ce qui laisse penser à une mortalité naturelle y compris pour le groupe traité avec la souche commerciale *Beauveria bassiana* GHA. Néanmoins, les deux chenilles provenant des groupes traités avec les champignons F1 et F2 qui ont montrés des signes d'une infection après 17 et 10 jours respectivement, ce qui indique que ces souches ont potentiellement un pouvoir pathogène à l'encontre de la légionnaire d'automne. Cependant, l'estimation de la concentration des suspensions de conidies selon la méthode du nombre le plus probable indique que des doses importantes de conidies viables ont été appliquées pour au moins quatre des cinq traitements.

Dès lors, il est possible qu'une atténuation de la virulence des champignons soit à l'origine de la faible mortalité enregistrée dans ce travail.

Selon Butt et al. (2006) l'atténuation de la virulence peut intervenir à plusieurs étapes de l'infection de l'hôte. Premièrement, la perte de virulence peut provenir d'une perte de l'adhésion des conidies à la cuticule de l'insecte. Ceci peut se produire si les conidies subissent une perte d'hydrophobicité ou deviennent inapte à produire du mucilage. Deuxièmement cette atténuation de la virulence peut aussi provenir d'une germination trop lente, de l'absence de formation d'un appressoria à cause d'un manque d'enzymes appropriées ou parce que la conidie ne perçoit pas le signal de la cuticule de l'insecte. Troisièmement, au moment de la pénétration de l'appressoria, si la force mécanique est insuffisante ou à nouveau par manque d'une combinaison appropriée d'enzymes qui dégradent la cuticule. Enfin, une fois à l'intérieur de l'insecte, le champignon doit se développer dans l'hémocoel où il est sujet à la réponse immunitaire de l'insecte.

Etant donné les doses importantes auxquels les larves ont été exposées lors de cet essai biologique, il y a lieu de se pencher sur la capacité d'adhésion des conidies à la cuticule des insectes. Cette adhésion est régie par une interaction hydrophobe non-spécifique entre la paroi externe de la conidie et la cuticule des insectes (Boucias et al., 1988, 2016; Greenfield et al., 2014). Le caractère hydrophobe des conidies est conféré par la paroi externe des spores constituée de protéines amphiphile appelée hydrophobine et qui forment autour des spores une couche de structures fibrillaires en bâtonnet (« rodlet » en anglais). Outre leur rôle d'adhésion à la cuticule, les hydrophobines permettent également aux conidies de résister à la dessiccation et de rendre leur dispersion dans l'air plus aisée (Wösten, 2001). Chez *Beauveria bassiana* les spores peuvent être de trois formes différentes selon la méthode de culture utilisée. Ils se présentent sous la forme de blastospores lorsque le champignon est cultivé en milieu liquide pauvre en nutriment, sous forme de conidies aérienne lorsqu'il est cultivé sur milieu solide et sous forme de conidie submergée lorsqu'il est cultivé en milieu liquide riche en nutriment (Hegedus et al., 1992). Selon l'étude de Holder et al. (2005), ces trois formes de spores montrent des profils d'hydrophobicité différents. Les conidies provenant de cultures submergées se lient aussi bien aux surfaces hydrophobes qu'hydrophiles alors que les conidies de type aériennes et les blastospores se lient préférentiellement aux surfaces hydrophobes et hydrophiles respectivement.



Un autre élément intéressant à relever de l'étude de Holder et al. (2005) est la forte réduction de l'adhésion des spores aux surfaces lors de l'utilisation de détergent comme le Tween 20 ou le Triton X-100. Or, du Tween 80 a été utilisé dans ce travail pour faciliter la dispersion des conidies dans les suspensions, ce qui pourrait avoir eu des conséquences négatives sur l'adhésion des conidies à la cuticule des larves. D'autre part, les piluliers qui servent de logettes individuelles aux chenilles sont en polypropylène qui constitue une surface hydrophobe. Selon St.Leger et al. (1989), le prérequis à la formation de l'appressorium est un stimulus de contact (thigmotropisme). Après avoir appliqué des conidies de *Metarhizium anisopliae* sur du polypropylène, ils ont observé un taux de germination de 82%. Il est donc possible que la méthodologie d'application de spores utilisée dans ce travail soit inappropriée. En effet, si une majorité des spores restent liés aux parois et germent sans avoir atteint l'hôte, alors les conditions expérimentales ont une influence négative sur la virulence des entomopathogènes étudiés.

Bien que cette dernière hypothèse ne doive pas être écartée, il est plus probable que ce soit les conditions de culture et les sous-cultures successives qui auraient diminué la virulence des souches étudiées, pour autant qu'elles soient reconnues comme étant des espèces entomopathogènes. En effet, il est également possible que les espèces fongiques étudiées dans ce travail aient précédemment infecté des larves de *S. frugiperda* par opportunisme et n'aient pas pour activité principale d'être entomopathogène. En effet, il est communément admis que dans l'écosystème naturel, les plantes sont en relation symbiotique avec des organismes endophytes.

Pour exemple, lors d'une étude menée dans le Nord-Est de l'Inde par Potshangbam et consort, (2017) cent vingt-trois champignons entomopathogènes ont été isolés à partir des différents organes de plants de maïs et de riz. Les espèces dominantes retrouvées dans ces deux cultures appartiennent majoritairement aux genres des *Aspergillus*, des *Penicillium*, des *Sarocladium* et des *Fusarium*. Outre leur rôle protecteur contre les insectes, les champignons entomopathogènes endophytes jouent avec les mycorhize (endo- et ecto-mycorhize) de nombreux rôles bénéfiques pour les plantes. Par exemples, ils procurent une amélioration de l'absorption de l'eau en agissant comme une extension du système racinaire et participent de cette manière à augmenter la résistance des plantes à la sécheresse. Ils permettent également d'améliorer l'assimilation des nutriments comme le phosphore qui tend à devenir une ressource limitante pour le secteur agricole (Drangert, 2012). Ils activent les mécanismes de défense telles que la résistance systémique acquise et induite. Enfin, ils jouent aussi un rôle antagoniste à

l'encontre des micro-organismes pathogènes des plantes (Dara, 2019). L'étude de Gómez-Vidal et al. (2009), montre que les champignons entomopathogènes sont également capables de réguler l'expression de protéine impliquées dans le métabolisme énergétique et photosynthétique à l'intérieur des tissus colonisés. Il est donc intéressant de prendre également en considération les rôles multiples que les champignons entomopathogènes sont en mesure de procurer aux plantes.

### **À propos des *Streptomyces spp***

Les résultats à l'issue du test préliminaire et de l'expérience incluant les surnageants de cultures des souches de *Streptomyces hygroscopicus* et *S. albus* présentes au laboratoire ne permettent pas encore de statuer d'une éventuelle toxicité à l'égard des chenilles légionnaires. À la mise en place de l'expérience, des difficultés liées à la présence de contaminations ont été rencontrées lors de la réactivation des souches. Après plusieurs tentatives des cultures pures ont finalement pu être obtenues. Une première fermentation à 28°C des deux souches de *Streptomyces spp* a été effectuée lorsque les colonies en boîte de Petri ont commencé à devenir grisâtres pour l'espèce *S. hygroscopicus* après environ 10 jours de culture.

Après 5 jours, les produits de fermentation obtenus à partir des deux souches ont présenté des aspects différents. L'espèce *S. albus*, a montré une croissance assez faible avec la formation de pellets sphériques allant de 1 à 3 mm. À l'inverse, une croissance plus importante a été observée sur l'espèce *S. hygroscopicus* avec un produit final d'aspect trouble. À la suite des résultats du test préliminaire qui inclut les surnageants issus de cette première fermentation, plusieurs questions se sont posées. Premièrement, il se peut qu'une contamination ait eu lieu avant ou pendant le processus de fermentation rendant alors la production de métabolites faibles ou inexistantes. Deuxièmement, la question s'est posée de savoir si la validamicyn A du contrôle et les métabolites d'intérêts potentiellement présents dans les surnageant auraient pu être dégradés à cause de la chaleur de la diète lors du mélange étant donné qu'elle avoisine 50°C avant de devenir trop visqueuse pour obtenir une incorporation homogène des surnageants (Zheng et al., 2004). En effet, l'agar nécessite d'être chauffé à une température supérieur à 60°C afin de pouvoir gélifier correctement (Nordqvist et al., 2011). Pour tenter de répondre à cette question, une idée a été de remplacer l'agar par de la gélatine alimentaire qui se dissous facilement dans l'eau autour de 30°C. La diète ainsi obtenue avec ce procédé a permis d'obtenir une diète avec une consistance acceptable pour alimenter les larves. Toutefois, une plus faible croissance des

larves a été observée sur la modalité gélatine par rapport aux larves sur diète à base d'agar sans distinction de traitement. En effet, à la fin de l'essai biologique, les larves sur gélatine était au stade L3 tandis que celle sur la diète à base d'agar était au stade L5 pour la plupart. La consistance de la diète obtenue avec la gélatine est plus élastique et à tendance à se déshydrater plus rapidement qu'avec l'agar. De plus, il faut rapidement la figer par le froid lors du coulage pour obtenir un mélange homogène et devient collante pour les larves lorsqu'elle sèche. Ces problèmes compliquant les opérations lors des expériences, le remplacement de l'agar par de la gélatine et le mélange direct des surnageants dans la diète ne s'avèrent donc pas être une méthode appropriée pour évaluer les propriétés insecticides des métabolites secondaires.

Suite à la lecture de l'étude de Liao et al. (2009), une fermentation des *Streptomyces spp* à 37°C a été effectuée pour tenter d'augmenter la production de métabolites secondaires. À l'issue de cette fermentation une croissance convenable a été observée pour la souche *S. hygrosopicus* (Figure 7). Ce qui n'est pas le cas pour la souche *S. albus* dont la biomasse était pratiquement inexistante à la fin de la fermentation à 37°C (Annexe 4, Figure 24 ). Malgré ce changement de méthode de fermentation, les résultats ne semblent pas différer du test préliminaire. Néanmoins, l'essai biologique n'ayant durée que 15 jours, les larves n'ont pas pu atteindre le stade chrysalide. Or chez les insectes, les tréhalases jouent un rôle important dans la biosynthèse de la chitine au niveau de la cuticule et du tube digestif (Shukla et al., 2015). En réprimant les gènes *SeTre-1* et *SeTre-2* qui code pour les tréhalases chez la noctuelle de la betterave (*Spodoptera exigua*), Chen et al. (2010) ont observé une mortalité importante au stade nymphal et pré-nymphale avec l'apparition de phénotypes anormaux parmi les noctuelles. Dès lors, il serait nécessaire de conduire les expérimentations destinées à évaluer les surnageant de *Streptomyces spp* au moins jusqu'au passage au stade chrysalide voir jusqu'au passage à l'imago afin de pouvoir comptabiliser les chrysalides et papillon malformés en supplément de la mortalité.

### **À propos de l'identification, de l'élevage et des tests en générale :**

Les résultats de l'analyse des régions ITS1-5.8S-ITS2 ont permis de réaliser une identification des souches inconnues de champignons étudiées durant ce travail et préalablement isolés à partir de chenille légionnaire d'automne. Les analyses phylogénétiques réalisés ont pour objectifs d'illustrer les relations de parenté entre les souches étudiées et les espèces les plus proches génétiquement. À l'issus des résultats de séquençage, il a été possible de situer la

séquence de la souche F1 parmi le genre *Aspergillus* section *Flavi* (Frisvad et al., 2019). Les résultats de la recherche Blast sur la base de données NCBI identifie à 100% la souche F1 comme étant *Aspergillus oryzae*. Toutefois, l'analyse phylogénétique permet de constater une homologie entre la souche F1 et l'espèce *A. flavus* qui est régulièrement retrouvé dans les denrées stockées en région tropical. Notamment, on la rencontre dans les céréales tel que le riz, le maïs ou encore dans les arachides où elle peut poser problème à cause de la production d'aflatoxines potentiellement cancérigène. *A. flavus* est une espèce communément retrouvé dans les sols et a un caractère essentiellement de type pathogène opportuniste et saprophyte avec une large gamme d'hôte. *A. flavus* est connu pour provoquer des mycoses aussi bien aux animaux qu'aux insectes (Klich, 2007). À titre de comparaison, les espèces homologues *A. oryzae* et *A. sojae* constitue des souches domestiqués de l'espèces *A. flavus* qui ont perdu le caractère toxique et sont volontairement utilisé dans les fermentations alimentaire pour la production de sauce soja (Frisvad et al., 2019). Les souches F2 (*2A proper noconsensus*) et F4 (*3B proper*) ont été identifiés comme appartenant au genre *Penicillium sp* classé dans la section *Citrina* (Houbraken et al., 2014). Au sein des *Penicillium spp*, la souche F4 forme un clade avec les espèces *P. copticola* et *P. terrigenum* que l'on retrouve comme endophyte chez le *Cannabis sativa* L. et dans les milieux aquatiques respectivement. Les autres espèces de *Penicillium* retrouvés dans la section *Citrina* sont majoritairement retrouvés dans les sols (Kusari et al., 2013; Houbraken et al., 2014; Gonçalves et al., 2019). La souche F3 a été identifiée comme appartenant à l'espèce *Metarhizium rileyi* qui est connue pour être une espèce entomopathogène. Bien qu'elle puisse infecter quelques Coléoptères, Hémiptères et autres représentant des arthropodes, sa gamme d'hôte est principalement limitée aux Lépidoptères de la superfamille des *Noctuiodea* (Fronza et al., 2017). Néanmoins, selon Ignoffo et collègues (1978), les conidies de *Metarhizium rileyi* ont une demi-vie de maximum 90 jours, elles perdent donc rapidement de leur infectiosité. Si on peut être relativement confiant sur l'identification de la souche F3, il conviendrait d'être plus prudent quant aux souches F1, F2 et F4 car l'identification jusqu'à l'espèce des champignons du genre *Aspergillus sp* et *Penicillium sp* nécessite le séquençage de marqueur génétique secondaire appartenant aux gènes de la Calmoduline (*CaM*), de la Béta-tubuline (*BenA*) et du gène codant pour la deuxième plus grande sous-unité protéique, le gène de l'ARN polymérase II (*RPB2*). Les marqueurs génétiques codant pour les protéines présentent généralement une plus grande variabilité inter-espèces que la région ITS et sont donc fréquemment utilisées pour l'identification des espèces appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Houbraken et al., 2014). Les amorces *Forward Bt2a* et *Reverse Bt2b* ont été utilisés dans ce travail mais ceux-ci ont donnés des amplicons de taille

différentes. Au niveau de certain taxon, les primers généralement utilisés pour amplifier le gène de la bêta-tubuline ne sont pas toujours spécifiques au gène *BenA* et le gène paralogue *tubC* qui comporte un intron de moins peut alors être amplifié. Pour éviter ce problème, une plus grande spécificité pour le gène *BenA* peut être obtenue en utilisant le primer *Forward Ben2f* à la place de *Bt2a*. Il est également possible de faire la distinction entre les gènes *BenA* et *tubC* en réalisant une analyse d'usage de codons (Hubka et al., 2016).

Au niveau de l'élevage, une mortalité importante survient lors du passage du stade chrysalide au stade adulte. C'est-à-dire qu'une faible proportion de papillon émerge des chrysalides. Ceci est probablement dû à une perte hydrique importante chez les chrysalides. Les larves au stade pré-nymphale cherche toujours à se protéger en creusant une cavité (ou chambre) au niveau du sol pour le passage au stade chrysalide. Montezano et collègues (2019), ont obtenu des taux d'émergence de 97,95% en utilisant de la vermiculite stérilisée qui facilite le processus d'enfouissement et de construction de la chambre tout en permettant les échanges gazeux et un maintien de l'humidité. Dès lors, il pourrait être intéressant d'intégrer cette étape afin de maintenir un taux de survie plus élevé dans l'élevage et dans les témoins. À titre d'exemple, sur les dix chrysalides formées sur la diète témoin du test préliminaire incluant les jus de fermentation, seulement une chrysalide s'est transformée en papillon. Ce qui est extrêmement faible pour une modalité témoin. Par ailleurs, la diète #F9772 contient de l'acide sorbique, du méthyl parabène et de l'acide ascorbique qui sont des agents conservateurs antifongiques permettant de préserver la diète de la prolifération d'ascomycètes comme *Aspergillus niger* (Su et al., 2014). Enfin, lors de la réalisation des essais biologique, l'individualisation des larves constitue une contrainte importante en termes de manipulation et de disponibilité du matériel. Dès lors, il serait plus approprié dans les recherches futures de réduire le nombre de modalités à tester et d'augmenter le nombre de répétition afin d'obtenir des résultats plus robustes.

## 6 Conclusions et perspectives

Ce travail constitue une base pour l'étude des champignons entomopathogènes et des inhibiteurs de tréhalase destinés à la lutte contre *Spodoptera frugiperda*. Un premier dispositif expérimental a été mis en place pour évaluer la pathogénicité des conidies de quatre souches de champignons dont trois ont été isolées à partir de cadavres de chenilles provenant du Sud-Kivu (RDC) et une à partir d'une chrysalide provenant d'un échange entre Gembloux Agro-Bio Tech et l'université de Montpellier. Sur les quatre évaluées au cours des essais, les souches F1 et F2 ont montré un potentiel pathogène très faible sans qu'aucune virulence avérée ne puisse être démontrée.

Les observations morphologiques et le séquençage de la région ITS de l'ADN ribosomique ont permis d'identifier une souche d'*Aspergillus sp*, deux souches de *Penicillium sp* et une souche de *Metarhizium rileyi*. La souche F1, apparentée au genre *Aspergillus* de la section *Flavi* semble être une espèce proche d'*Aspergillus flavus* qui est généralement retrouvée comme contaminant dans les stocks de graines. La souche F2 est une espèce appartenant au genre *Penicillium* de la section *Citrina* qui sont des champignons que l'on retrouve habituellement dans les sols. Malheureusement, une identification jusqu'à l'espèce des souches F1 et F2 n'a pu être établie endéans le temps imparti. Pour cela, des marqueurs génétiques secondaires tels que les gènes *CaM*, *BenA* et *RPB2* doivent à leurs tours être séquencés. Une identification précise de l'espèce est en effet cruciale pour s'assurer que l'espèce ne soit pas un pathogène des plantes ou un pathogène toxique pour l'être humain. Auquel cas, des recherches sur cette espèce dans le cadre de la lutte contre les ravageurs n'auraient alors plus lieu d'être.

Un deuxième dispositif a été mis en place dans le but d'évaluer la toxicité de diètes modifiées contenant les surnageant de fermentation de *Streptomyces hygrosopicus* et de *S. albus* mais aucune mortalité significativement plus importante que le témoin n'a été enregistrée. Néanmoins, cette expérience mériterait d'être réitérée sur un plus long terme pour voir si des métabolites présents dans les jus de fermentation pourraient induire des malformations lors du passage du stade pré-nymphal au stade chrysalide. Les jus de fermentation doivent encore être analysés pour déterminer la présence de métabolites et devraient dès lors apporter des informations sur les deux méthodes de fermentation utilisées dans ce travail.

Le dispositif expérimental mis en place et la mise en lumière des biais pouvant intervenir dans les étapes du processus d'évaluation devraient aider dans les prises de décision des futures

recherches sur les matériels et méthodes à employer. Différentes recherches pourront être proposées comme la réévaluation de la virulence des souches des champignons étudiées dans ce travail après leur culture sur d'autres types de substrats ou après passage successif sur les larves de *S. frugiperda* (Butt et al., 2006; Safavi et al., 2007). De même pour les *Streptomyces sp*, une optimisation de la production des métabolites pourrait être effectuée par leur culture sur d'autres substrats, par changement de la température et par l'adjonction d'éthanol ou de peroxyde d'hydrogène dans les étapes de fermentation comme proposé par Zhou et al. (2012) et Liao et al. (2009). Une augmentation de la concentration des jus de fermentation dans la diète pourra également être proposée. Enfin, les tests devraient être effectués selon un nombre de modalités plus limité et un nombre de répétitions plus important afin d'obtenir des résultats plus robustes.

Le présent travail ouvre un large éventail de perspectives de recherches, notamment à travers une étude des interactions multi-trophiques entre *Spodoptera frugiperda*, le maïs et les champignons endophytes. En effet, il semble que les champignons endophytes et les micro-organismes endophytes en général puissent apporter un nombre non négligeable de bénéfices aux végétaux à différents niveaux (Kusari et al., 2013; Dara, 2019). Parmi ces bénéfices multiples, il y a la régulation des ravageurs et des maladies mais aussi la régulation de facteurs abiotiques comme l'amélioration de l'absorption des nutriments et de la résistance à la sécheresse, ce qui pourrait s'avérer être un atout capital dans le contexte du réchauffement climatique.

Les souches étudiées dans ce travail constituent un bon départ pour voir si l'établissement d'un endophytisme sur maïs est possible et si cela a un effet sur la survie des chenilles légionnaires d'automne. Par des études de terrain, des liens pourraient être faits entre les communautés constituant le phytobiome, les techniques culturales et l'incidence des ravageurs. On pourrait aisément faire une analogie entre le microbiote constitutif des plantes et du sol et le microbiote intestinal chez l'humain. Ainsi, une bonne gestion du sol et des pratiques culturales participerait à la bonne santé des plantes cultivées comme une alimentation saine et équilibrée contribuerait à la bonne santé de l'être humain. À l'image des probiotiques, on pourrait alors tenter d'améliorer le microbiote des plantes par un enrobage des semences avec un cocktail d'organismes bénéfiques. Si ces recherches aboutissent à de bons résultats, cela pourrait mener au développement de techniques de production de micro-organismes et d'enrobage des semences destinées aux paysans et adaptées au contexte africain afin de contribuer au développement de techniques pour une gestion durable des bio-agresseurs

## 7 Références

- Agboyi L.K., Goergen G., Beseh P., Mensah S.A., Clotney V.A., Glikpo R., Buddie A., Cafà G., Offord L., Day R., Rwomushana I. & Kenis M., 2020. Parasitoid complex of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*, in Ghana and Benin. *Insects* **11**(2), 1–15.
- Akutse K.S., Kimemia J.W., Ekesi S., Khamis F.M., Ombura O.L. & Subramanian S., 2019. Ovicidal effects of entomopathogenic fungal isolates on the invasive Fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Appl. Entomol.* **143**(6), 626–634.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**(3), 403–410.
- Asano N., TAKEUCHI M., KAMEDA Y., MATSUI K. & KONO Y., 1990. Trehalase inhibitors, validoxylamine A and related compounds as insecticides. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **43**(6), 722–726.
- Bawin T., Seye F., Boukraa S., Zimmer J.-Y., Delvigne F. & Francis F., 2015. La lutte contre les moustiques (Diptera: Culicidae): diversité des approches et application du contrôle biologique. *Can. Entomol.* **147**(4), 476–500.
- Boucias D., Liu S., Meagher R. & Baniszewski J., 2016. Fungal dimorphism in the entomopathogenic fungus *Metarhizium rileyi*: Detection of an in vivo quorum-sensing system. *J. Invertebr. Pathol.* **136**, 100–108.
- Boucias D.G., Pendland J.C. & Latge J.P., 1988. Nonspecific Factors Involved in Attachment of Entomopathogenic Deuteromycetes to Host Insect Cuticle †. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**(7), 1795–1805.
- Buchon N., Silverman N. & Cherry S., 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nat. Rev. Immunol.* **14**(12), 796–810.
- Butt T.M., Wang C., Shah F.A. & Hall R., 2006. Degeneration of Entomogenous Fungi. *An Ecol. Soc. Approach to Biol. Control* 213–226.
- CABI, 2020. Datasheet report for *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm). <https://www.cabi.org/isc/datasheetreport/29810>, (09/04/2020).
- Capinera J.L., 1999. Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) 1–6.
- Chapman J.W., Williams T., Martínez A.M., Cisneros J., Caballero P., Cave R.D. & Goulson D., 2000. Does cannibalism in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) reduce the risk of predation? *Behav. Ecol. Sociobiol.* **48**(4), 321–327.
- Chen J., Tang B., Chen H., Yao Q., Huang X., Chen J., Zhang D. & Zhang W., 2010. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by rna interference. *PLoS One* **5**(4).
- Cock M.J.W., Beseh P.K., Buddie A.G., Cafà G. & Crozier J., 2017. Molecular methods to detect *Spodoptera frugiperda* in Ghana, and implications for monitoring the spread of invasive species in developing countries. *Sci. Rep.* **7**(1), 1–10.
- CoreTeam R., 2017. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Cruz I., de Lourdes Corrêa Figueiredo M., da Silva R.B., da Silva I.F., de Souza Paula C. & Foster J.E., 2012. Using sex pheromone traps in the decision-making process for pesticide application against fall armyworm (*Spodoptera frugiperda* [Smith] [Lepidoptera: Noctuidae]) larvae in maize. *Int. J. Pest Manag.* **58**(1), 83–90.



- Cui C., Wang Y., Liu J., Zhao J., Sun P. & Wang S., 2019. A fungal pathogen deploys a small silencing RNA that attenuates mosquito immunity and facilitates infection. *Nat. Commun.* **10**(1), 1–10.
- Dara S.K., 2019. Non-entomopathogenic roles of entomopathogenic fungi in promoting plant health and growth. *Insects* **10**(9).
- Day R., Abrahams P., Bateman M., Beale T., Clotney V., Cock M., Colmenarez Y., Corniani N., Early R., Godwin J., Gomez J., Moreno P.G., Murphy S.T., Oppong-Mensah B., Phiri N., Pratt C., Silvestri S. & Witt A., 2017. Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. *Outlooks Pest Manag.* **28**(5), 196–201.
- Deravel J., Krier F. & Jacques P., 2014. B A Les biopesticides, compléments et alternatives aux produits phytosanitaires chimiques (synthèse bibliographique), *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **220–232**.
- Dewangan J., Srivastava S. & Rath S.K., 2017. Salinomycin: A new paradigm in cancer therapy. *Tumor Biol.* **39**(3).
- Dhar S., Jindal V., Jariyal M. & Gupta V.K., 2019. Molecular characterization of new isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and their efficacy against the tobacco caterpillar, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Egypt. J. Biol. Pest Control* **29**(1), 0–8.
- Drangert J.O., 2012. Phosphorus - A limited resource that could be made limitless. *Procedia Eng.* **46**, 228–233.
- Druart F., 2017. Production De Micro-Organismes Entomopathogenes Pour Lutter Contre Les Moustiques Et Caracterisation De Leurs Metabolites 1–69.
- Du Plessis H., Schlemmer M.-L. & Van den Berg J., 2020. The Effect of Temperature on the Development of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects* **11**(4), 228.
- du Plessis H., van den Berg J., Ota N. & Kriticos D.J., 2018. *Spodoptera frugiperda* (Fall Armyworm). *CSIRO-InSTePP Pest Geogr.* (June), 1–7.
- Edgar R.C., 2004. MUSCLE: A multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**, 1–19.
- EPPO, 2015. PM 7/124 (1) *Spodoptera littoralis*, *Spodoptera litura*, *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera eridania*. *EPPO Bull.* **45**(3), 410–444.
- Europ L.A.C., 2016. RÈGLEMENT DÉLÉGUÉ (UE) 2016/592 DE LA COMMISSION du 1 (3), 10–12.
- FAO, 2017a. Gestion durable de la chenille légionnaire d'automne en Afrique: Programme d'action de la FAO 46.
- FAO, 2017b. FAW GUIDANCE NOTE 6: FALL ARMYWORM IN AFRICA: FAO'S POSITION ON THE USE OF GENETICALLY MODIFIED (GM) MAIZE General. *Faw Guid. Note 6* (May).
- FAO, 2018. *Integrated management of the Fall Armyworm on maize*, 1–133.
- FAO, 2020. Plateforme Global FAMEWS.  
<https://app.powerbi.com/view?r=eyJrIjoimZElODNmYzQtMWZhYS00NTNjLTg1MDU0OTQ2MGMyNDVkZTY3IiwidCI6IjE2M2FjNDY4LWFiYjgtNDRkMC04MWZkLWQ5ZGIxNWUzYWY5NiIsImMiOjh9>, (03/05/2020).
- Frisvad J.C., Hubka V., Ezekiel C.N., Hong S.B., Nováková A., Chen A.J., Arzanlou M., Larsen T.O., Sklenář F., Mahakarnchanakul W., Samson R.A. & Houbroken J., 2019. Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins.

*Stud. Mycol.* **93**, 1–63.

- Fritz S., See L., McCallum I., You L., Bun A., Moltchanova E., Duerauer M., Albrecht F., Schill C., Perger C., Havlik P., Mosnier A., Thornton P., Wood-Sichra U., Herrero M., Becker-Reshef I., Justice C., Hansen M., Gong P., Abdel Aziz S., Cipriani A., Cumani R., Cecchi G., Conchedda G., Ferreira S., Gomez A., Haffani M., Kayitakire F., Malanding J., Mueller R., Newby T., Nonguierma A., Olusegun A., Ortner S., Rajak D.R., Rocha J., Schepaschenko D., Schepaschenko M., Terekhov A., Tiangwa A., Vancutsem C., Vintrou E., Wenbin W., van der Velde M., Dunwoody A., Kraxner F. & Obersteiner M., 2015. Mapping global cropland and field size. *Glob. Chang. Biol.* **21**(5), 1980–1992.
- Fronza E., Specht A., Heinzen H. & de Barros N.M., 2017. *Metarhizium* (*Nomuraea*) *rileyi* as biological control agent. *Biocontrol Sci. Technol.* **27**(11), 1243–1264.
- Glare T., Caradus J., Gelernter W., Jackson T., Keyhani N., Köhl J., Marrone P., Morin L. & Stewart A., 2012. Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnol.* **30**(5), 250–258.
- Glass N.L. & Donaldson G.C., 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(4), 1323–1330.
- Goergen G., Kumar P.L., Sankung S.B., Togola A. & Tamò M., 2016. First report of outbreaks of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a new alien invasive pest in West and Central Africa. *PLoS One* **11**(10), 1–9.
- Gómez-Vidal S., Salinas J., Tena M. & Lopez-Llorca L.V., 2009. Proteomic analysis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) responses to endophytic colonization by entomopathogenic fungi. *Electrophoresis* **30**(17), 2996–3005.
- Gonçalves M.F.M., Santos L., Silva B.M. V., Abreu A.C., Vicente T.F.L., Esteves A.C. & Alves A., 2019. Biodiversity of *Penicillium* species from marine environments in Portugal and description of *Penicillium lusitanum* sp. nov., a novel species isolated from sea water. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **69**(10), 3014–3021.
- Greenfield B.P.J., Lord A.M., Dudley E. & Butt T.M., 2014. Conidia of the insect pathogenic fungus, *metarhizium anisopliae*, fail to adhere to mosquito larval cuticle. *R. Soc. Open Sci.* **1**(2).
- Groot A.T., Marr M., Schöfl G., Lorenz S., Svatos A. & Heckel D.G., 2008. Host strain specific sex pheromone variation in *Spodoptera frugiperda*. *Front. Zool.* **5**, 1–13.
- Haenniger S., Goergen G., Akinbuluma M.D., Kunert M., Heckel D.G. & Unbehend M., 2020. Sexual communication of *Spodoptera frugiperda* from West Africa: Adaptation of an invasive species and implications for pest management. *Sci. Rep.* **10**(1), 3–11.
- Hall T.A., 1999. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **41**(41), 95–98.
- Harris R., 2018. An Introduction to R. *Quant. Geogr. Basics* 250–286.
- Hegedus D.D., Bidochka M.J., Miranpuri G.S. & Khachatourians G.G., 1992. A comparison of the virulence, stability and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**(6), 785–789.
- Hoballah M.E., Degen T., Bergvinson D., Savidan A., Tamò C. & Turlings T.C.J., 2004. Occurrence and direct control potential of parasitoids and predators of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on maize in the subtropical lowlands of Mexico. *Agric. For. Entomol.* **6**(1), 83–88.
- Holder D.J. & Keyhani N.O., 2005. Adhesion of the entomopathogenic fungus *Beauveria* (*Cordyceps*) *bassiana* to Substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(9), 5260–5266.
- Hong S.-B., Go S.-J., Shin H.-D., Frisvad J.C. & Samson R.A., 2005. Polyphasic taxonomy of

- Aspergillus fumigatus* and related species . *Mycologia* **97**(6), 1316–1329.
- Houbraken J., de Vries R.P. & Samson R.A., 2014. *Modern taxonomy of biotechnologically important aspergillus and penicillium species*, Advances in Applied Microbiology, Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved., 199–249.
- Hruska A.J., 2019. Fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) management by smallholders. *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.* **14**(043), 0–3.
- Hubka V., Nováková A., Peterson S.W., Frisvad J.C., Sklenář F., Matsuzawa T., Kubátová A. & Kolařík M., 2016. A reappraisal of *Aspergillus* section *Nidulantes* with descriptions of two new sterigmatocystin-producing species. *Plant Syst. Evol.* **302**(9), 1267–1299.
- Ignoffo C.M., Garcia C., Hostetter D.L. & Pinnell R.E., 1978. Stability of Conidia of an Entomopathogenic Fungus, *Nomuraea rileyi* , in and on Soil 1. *Environ. Entomol.* **7**(5), 724–727.
- Inglis G.D., Enkerli J. & Goettel M.S., 2012. *Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi. Hypocreales.*, Manual of Techniques in Invertebrate Pathology, Elsevier Ltd, 189–253.
- IPPC, 2020. Latest Pest Reports - International Plant Protection Convention. <https://www.ippc.int/en/countries/australia/pestreports/2020/03/detections-of-spodoptera-frugiperda-fall-armyworm-on-mainland-australia/>, (08/04/2020).
- Jaronski S.T., 2013. *Mass Production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art*, Mass Production of Beneficial Organisms: Invertebrates and Entomopathogens, Elsevier, 357–413.
- Jeger M., Bragard C., Caffier D., Candresse T., Chatzivassiliou E., Dehnen-Schmutz K., Gilioli G., Gregoire J.C., Jaques Miret J.A., Navarro M.N., Niere B., Parnell S., Potting R., Rafoss T., Rossi V., Urek G., Van Bruggen A., Van der Werf W., West J., Winter S., Gardi C., Aukhojee M. & MacLeod A., 2017. Pest categorisation of *Spodoptera frugiperda*. *EFSA J.* **15**(7).
- Johnson S.J., 1987. Migration and the life history strategy of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* in the western hemisphere. *Int. J. Trop. Insect Sci.* **8**(4-5-6), 543–549.
- Jurenka R., 2004. Insect Pheromone Biosynthesis 97–132.
- Kassambara A., Kosinski M., Biecek P. & Fabian S., 2017. Package ‘survminer.’ *Draw. Surviv. Curves using ‘ggplot2’.*(*R Packag. version 0.3. 1.*).
- Kenis M., du Plessis H., Van den Berg J., Ba M.N., Goergen G., Kwadjo K.E., Baoua I., Tefera T., Buddie A., Cafà G., Offord L., Rwomushana I. & Polaszek A., 2019. *Telenomus remus*, a candidate parasitoid for the biological control of *Spodoptera frugiperda* in Africa, is already present on the continent. *Insects* **10**(4), 1–10.
- Kimura M., 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**(2), 111–120.
- Klich M.A., 2007. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Mol. Plant Pathol.* **8**(6), 713–722.
- Koetsier G. & Cantor E., 2019. A Practical Guide to Analyzing Nucleic Acid Concentration and Purity with Microvolume Spectrophotometers. *New Engl. Biolabs* **1**(1), 1–8.
- Kogan M., 1998. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. *Annu. Rev. Entomol.* **43**(1), 243–270.
- Kouassi M. de, 2001. La lutte biologique : une alternative viable à l’utilisation des pesticides? *VertigO* **2**(Volume 2 Numéro 2), 4–8.
- Kuate A.F., Hanna R., Doumtsop Fotio A.R.P., Abang A.F., Nanga S.N., Ngatat S., Tindo M., Masso C., Ndemah R., Suh C. & Fiaboe K.K.M., 2019. *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera:

- Noctuidae) in Cameroon: Case study on its distribution, damage, pesticide use, genetic differentiation and host plants. *PLoS One* **14**(4), 1–18.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C. & Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**(6), 1547–1549.
- Kusari P., Kusari S., Spiteller M. & Kayser O., 2013. Endophytic fungi harbored in *Cannabis sativa* L.: Diversity and potential as biocontrol agents against host plant-specific phytopathogens. *Fungal Divers.* **60**(1), 137–151.
- Levy H.C., Garcia-Maruniak A. & Maruniak J.E., 2002. Strain Identification of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Insects and Cell Line: Pcr-Rflp of Cytochrome Oxidase C Subunit I Gene. *Florida Entomol.* **85**(1), 186–190.
- Li X.J., Wu M.F., Ma J., Gao B.Y., Wu Q.L., Chen A.D., Liu J., Jiang Y.Y., Zhai B.P., Early R., Chapman J.W. & Hu G., 2020. Prediction of migratory routes of the invasive fall armyworm in eastern China using a trajectory analytical approach. *Pest Manag. Sci.* **76**(2), 454–463.
- Liao Y., Wei Z.H., Bai L., Deng Z. & Zhong J.J., 2009. Effect of fermentation temperature on validamycin A production by *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *J. Biotechnol.* **142**(3–4), 271–274.
- Lu Y. -J, ADANG M.J., ISENHOUR D.J. & KOCHERT G.D., 1992. RFLP analysis of genetic variation in North American populations of the fall armyworm moth *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Mol. Ecol.* **1**(4), 199–208.
- Ludwig S.W. & Oetting R.D., 2001. Susceptibility of natural enemies to infection by *Beauveria bassiana* and impact of insecticides on *Ipheseius degenerans* (Acari: Phytoseiidae). *J. Agric. Urban Entomol.* **18**(3), 169–178.
- Luginbill P., 1928. *The Fall army worm*, USDA technical bulletin, 60.
- Marcellin C., 2019. Monitoring , caractérisation moléculaire et lutte biologique contre *Spodoptera frugiperda* ( Lepidoptera : Noctuidae ).
- Maruthadurai R. & Ramesh R., 2020. Occurrence, damage pattern and biology of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. smith) (Lepidoptera: Noctuidae) on fodder crops and green amaranth in Goa, India. *Phytoparasitica* **48**(1), 15–23.
- Matassini C., Parmeggiani C. & Cardona F., 2020. New Frontiers on Human Safe Insecticides and Fungicides: An Opinion on Trehalase Inhibitors. *Molecules* **25**(13), 3013.
- Meagher R.L., Agboka K., Tounou A.K., Koffi D., Agbevohia K.A., Amouze T.R., Adjévi K.M. & Nagoshi R.N., 2019. Comparison of pheromone trap design and lures for *Spodoptera frugiperda* in Togo and genetic characterization of moths caught. *Entomol. Exp. Appl.* **167**(6), 507–516.
- Meagher R.L. & Gallo-Meagher M., 2003. Identifying Host Strains of Fall Armyworm (Lepidoptera\ Noctuidae) in Florida Using Mitochondrial Markers. *Florida Entomol.* **86**(4), 450–455.
- Michalak M., Lach M.S., Antoszczak M., Huczynski A. & Suchorska W.M., 2020. Overcoming resistance to platinum-based drugs in ovarian cancer by salinomycin and its derivatives—an in vitro study. *Molecules* **25**(3), 1–16.
- Miyazaki Y., SHIBUYA M., SUGAWARA H., KAWAGUCHI O., HIROSE C., NAGATSU J. & ESUMI S., 1974. Salinomycin, a new polyether antibiotic. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **27**(11), 814–821.
- Molina-Ochoa J., Carpenter J.E., Heinrichs E.A. & Foster J.E., 2003. Parasitoids and Parasites of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas and Caribbean Basin: an Inventory. *Florida Entomol.* **86**(3), 254–289.
- Molina-ochoa J., Lezama-gutierrez R. & Gonzalez-ramirez M., 2003. Pathogens and Parasitic

- Nematodes Associated with Populations of Fall Armyworm (Lepidoptera : Noctuidae ) Larvae in Mexico Marilu Lopez-Edwards , Manuel A . Rodriguez-Vega and Francisco Arceo-Palacios Published by : Florida Entomological Society Stable U **86**(3), 244–253.
- Monsreal-Ceballos R.J., Ruiz-Sánchez E., Ballina-Gómez H.S., Reyes-Ramírez A. & González-Moreno A., 2018. Effects of Botanical Insecticides on Hymenopteran Parasitoids: a Meta-analysis Approach. *Neotrop. Entomol.* **47**(5), 681–688.
- Montezano D.G., Specht A., Sosa-Gómez D.R., Roque-Specht V.F., Paula-Moraes S.V. de, Peterson J.A. & Hunt T.E., 2019. Developmental Parameters of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) Immature Stages Under Controlled and Standardized Conditions. *J. Agric. Sci.* **11**(8), 76.
- Montezano D.G., Specht A., Sosa-Gómez D.R., Roque-Specht V.F., Sousa-Silva J.C., Paula-Moraes S.V., Peterson J.A. & Hunt T.E., 2018. Host Plants of Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas . *African Entomol.* **26**(2), 286–300.
- Nagoshi R.N., 2012. Improvements in the Identification of Strains Facilitate Population Studies of Fall Armyworm Subgroups. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **105**(2), 351–358.
- Nagoshi R.N., Htain N.N., Boughton D., Zhang L., Xiao Y., Nagoshi B.Y. & Mota-Sanchez D., 2020. Southeastern Asia fall armyworms are closely related to populations in Africa and India, consistent with common origin and recent migration. *Sci. Rep.* **10**(1), 1–10.
- Nagoshi R.N., Koffi D., Agboka K., Tounou K.A., Banerjee R., Jurat-Fuentes J.L. & Meagher R.L., 2017. Comparative molecular analyses of invasive fall armyworm in Togo reveal strong similarities to populations from the eastern United States and the Greater Antilles. *PLoS One* **12**(7), 1–15.
- Nagoshi R.N., Rosas-García N.M., Meagher R.L., Fleischer S.J., Westbrook J.K., Sappington T.W., Hay-Roe M., Thomas J.M.G. & Murúa G.M., 2015. Haplotype profile comparisons between spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Mexico with those from Puerto Rico, South America, and the United States and their implications to migratory behavior. *J. Econ. Entomol.* **108**(1), 135–144.
- Nordqvist D. & Vilgis T.A., 2011. Rheological Study of the Gelation Process of Agarose-Based Solutions. *Food Biophys.* **6**(4), 450–460.
- Pashley D.P., 1988. Current Status of Fall Armyworm Host Strains. *Florida Entomol.* **71**(3), 227.
- Pogue M.G., 2002. *A WORLD REVISION OF THE GENUS SPODOPTERA GUENEE (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)*, Oriental Insects, 92–92.
- Pomari A.F., Bueno A. de F., Bueno R.C.O. de F., Menezes Junior A. de O. & Fonseca A.C.P.F., 2013. Releasing number of Telenomus remus (Nixon) (Hymenoptera: Platygasteridae) against Spodoptera frugiperda Smith (Lepidoptera: Noctuidae) in corn, cotton and soybean. *Ciência Rural* **43**(3), 377–382.
- Potshangbam M., Indira Devi S., Sahoo D. & Strobel G.A., 2017. Functional characterization of endophytic fungal community associated with Oryza sativa L. and Zea mays L. *Front. Microbiol.* **8**(MAR), 1–15.
- Prasad Y.G. & Prabhakar M., 2012. Pest monitoring and forecasting. In: *Integrated Pest Management: Principles and Practice*. 41–57.
- Prasanna B., Huesing J.E., Eddy R. & Peschke V.M., 2018a. Fall Armyworm in Africa: a Guide for Integrated Pest Management. *Mex. CDMX CIMMYT. First Edit*, 45–62.
- Prasanna B., Huesing J.E., Eddy R. & Peschke V.M., 2018b. La chenille légionnaire d'automne en Afrique: UN GUIDE POUR UNE LUTTE INTEGREE CONTRE LE RAVAGEUR 124.

- Raja H.A., Miller A.N., Pearce C.J. & Oberlies N.H., 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *J. Nat. Prod.* **80**(3), 756–770.
- Ramos Y., Taibo A.D., Jiménez J.A. & Portal O., 2020. Endophytic establishment of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in maize plants and its effect against *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Egypt. J. Biol. Pest Control* **30**(1).
- Ranjani A., Dhanasekaran D. & Gopinath P.M., 2016. An Introduction to Actinobacteria. In: *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. InTech, 3–38.
- Rwomushana I., Bateman M., Beale T., Besch P., Cameron K., Chiluba M., Clottey V., Davis T., Day R., Early R., Godwin J., Gonzalez-Moreno P., Kansime M., Kenis M., Makale F., Mugambi I., Murphy S., Nunda W., Phiri N., Pratt C. & Tambo J., 2018. Fall Armyworm: Impacts and Implications for Africa. *Outlooks Pest Manag.* **28**(5), 196–201.
- S. Akutse K., K. Maniani N., Ekesi S., K.M. Fiabo K., Van den Be J., L. Ombura O. & M. Khamis F., 2016. Morphological and Molecular Characterization of *Vicia faba* and *Phaseolus vulgaris* Seed-born Fungal Endophytes. *Res. J. Seed Sci.* **10**(1), 1–16.
- Safavi S.A., Shah F.A., Pakdel A.K., Reza Rasoulia G., Bandani A.R. & Butt T.M., 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiol. Lett.* **270**(1), 116–123.
- Saitoh K., Togashi K., Arie T. & Teraoka T., 2006. A simple method for a mini-preparation of fungal DNA. *J. Gen. Plant Pathol.* **72**(6), 348–350.
- Sánchez-Bayo F. & Wyckhuys K.A.G., 2019. Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biol. Conserv.*
- Sayed A.M. Al, 2012. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. *The Pherobase*. <https://www.pherobase.com/>, (29/05/2020).
- Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Bolchacova E., Voigt K., Crous P.W., Miller A.N., Wingfield M.J., Aime M.C., An K.D., Bai F.Y., Barreto R.W., Begerow D., Bergeron M.J., Blackwell M., Boekhout T., Bogale M., Boonyuen N., Burgaz A.R., Buyck B., Cai L., Cai Q., Cardinali G., Chaverri P., Coppins B.J., Crespo A., Cubas P., Cummings C., Damm U., de Beer Z.W., de Hoog G.S., Del-Prado R., Dentinger B., Diéguez-Urbeondo J., Divakar P.K., Douglas B., Dueñas M., Duong T.A., Eberhardt U., Edwards J.E., Elshahed M.S., Fliegerova K., Furtado M., García M.A., Ge Z.W., Griffith G.W., Griffiths K., Groenewald J.Z., Groenewald M., Grube M., Gryzenhout M., Guo L.D., Hagen F., Hambleton S., Hamelin R.C., Hansen K., Harrold P., Heller G., Herrera C., Hirayama K., Hirooka Y., Ho H.M., Hoffmann K., Hofstetter V., Högnabba F., Hollingsworth P.M., Hong S.B., Hosaka K., Houbraken J., Hughes K., Huhtinen S., Hyde K.D., James T., Johnson E.M., Johnson J.E., Johnston P.R., Jones E.B.G., Kelly L.J., Kirk P.M., Knapp D.G., Kõljalg U., Kovács G.M., Kurtzman C.P., Landvik S., Leavitt S.D., Ligtentoffer A.S., Liimatainen K., Lombard L., Luangsa-ard J.J., Lumbsch H.T., Maganti H., Maharachchikumbura S.S.N., Martin M.P., May T.W., McTaggart A.R., Methven A.S., Meyer W., Moncalvo J.M., Mongkolsamrit S., Nagy L.G., Nilsson R.H., Niskanen T., Nyilasi I., Okada G., Okane I., Olariaga I., Otte J., Papp T., Park D., Petkovits T., Pino-Bodas R., Quaedvlieg W., Raja H.A., Redecker D., Rintoul T.L., Ruibal C., Sarmiento-Ramírez J.M., Schmitt I., Schüßler A., Shearer C., Sotome K., Stefani F.O.P., Stenroos S., Stielow B., Stockinger H., Suetrong S., Suh S.O., Sung G.H., Suzuki M., Tanaka K., Tedersoo L., Telleria M.T., Tretter E., Untereiner W.A., Urbina H., Vágvölgyi C., Vialle A., Vu T.D., Walther G., Wang Q.M., Wang Y., Weir B.S., Weiß M., White M.M., Xu J., Yahr R., Yang Z.L., Yurkov A., Zamora J.C., Zhang N., Zhuang W.Y. & Schindel D., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**(16), 6241–6246.
- Schöfl G., Heckel D.G. & Groot A.T., 2009. Time-shifted reproductive behaviours among fall armyworm (Noctuidae: *Spodoptera frugiperda*) host strains: Evidence for differing modes of

- inheritance. *J. Evol. Biol.* **22**(7), 1447–1459.
- Shah F.A. & Butt T.M., 2005. Influence of nutrition on the production and physiology of sectors produced by the insect pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**(2), 201–207.
- Shah P.A. & Pell J.K., 2003. Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**(5–6), 413–423.
- Shukla E., Thorat L.J., Nath B.B. & Gaikwad S.M., 2015. Insect trehalase: Physiological significance and potential applications. *Glycobiology* **25**(4), 357–367.
- Shylesha A.N., JALALI S.K., GUPTA A., VARSHNEY R., VENKATESAN T., SHETTY P., OJHA R., GANIGER P.C., NAVIK O., SUBAHARAN K., BAKTHAVATSALAM N., BALLAL C.R. & A. R., 2018. Studies on new invasive pest *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) and its natural enemies. *J. Biol. Control* **32**(3), 145–151.
- Simmons A.M. & Wiseman B.R., 1993. James Edward Smith - Taxonomic Author of the Fall Armyworm. *Florida Entomol.* **76**(2), 271.
- Sisay B., Simiyu J., Malusi P., Likhayo P., Mendesil E., Elibariki N., Wakgari M., Ayalew G. & Tefera T., 2018. First report of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), natural enemies from Africa. *J. Appl. Entomol.* **142**(8), 800–804.
- Sparks A.N., 1979. A Review of the Biology of the Fall Armyworm. *Florida Entomol.* **62**(2), 82–87.
- St.Leger R.J., Butt T.M., Goettel M.S., Staples R.C. & Roberts D.W., 1989. Production in vitro of appressoria by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Exp. Mycol.* **13**(3), 274–288.
- Su J., Wang Y.C., Zhang S.K. & Ren X.B., 2014. Antifungal agents against *Aspergillus niger* for rearing rice leafroller larvae (Lepidoptera: Pyralidae) on artificial diet. *J. Econ. Entomol.* **107**(3), 1092–1100.
- Tamura K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* **9**(4), 678–687.
- Thakur A., Kaur S., Kaur A. & Singh V., 2013. Enhanced Resistance to *Spodoptera litura* in Endophyte Infected Cauliflower Plants. *Environ. Entomol.* **42**(2), 240–246.
- Therneau T.M., 2021. survival: A Package for Survival Analysis in R. *R Packag. version 2.38*.
- Togola A., Meseka S., Menkir A., Badu-Apraku B., Boukar O., Tamò M. & Djouaka R., 2018. Measurement of pesticide residues from chemical control of the invasive *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in a maize experimental field in Mokwa, Nigeria. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **15**(5).
- Tumlinson J.H., Mitchell E.R., Teal P.E.A., Heath R.R. & Mengelkoch L.J., 1986. Sex pheromone of fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) - Identification of components critical to attraction in the field. *J. Chem. Ecol.* **12**(9), 1909–1926.
- Unbehend M., Hänniger S., Meagher R.L., Heckel D.G. & Groot A.T., 2013. Pheromonal Divergence Between Two Strains of *Spodoptera frugiperda*. *J. Chem. Ecol.* **39**(3), 364–376.
- Unbehend M., Hänniger S., Vásquez G.M., Juárez M.L., Reisig D., McNeil J.N., Meagher R.L., Jenkins D.A., Heckel D.G. & Groot A.T., 2014. Geographic variation in sexual attraction of *Spodoptera frugiperda* corn- and rice-strain males to pheromone lures. *PLoS One* **9**(2), 44–47.
- Vega F.E., 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *J. Invertebr. Pathol.* **98**(3), 277–279.
- Verheggen F.J. & Haubruge E., 2014. Les phéromones d'alarme dans le règne animal (January

2011).

- Vértesy L., Fehlhauer H.-W. & Schulz A., 1994. The Trehalase Inhibitor Salbostatin, a Novel Metabolite from *Streptomyces albus*, ATCC21838. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **33**(18), 1844–1846.
- Visser D., 2017. Fall armyworm. *An Identif. Guid. Relat. to other common Cater. a South African Perspect.* <http://sana.co.za/wp-content/uploads/2017/06/Fall-Armyworm-Identification.-DAFF-Presentation-v1.2-secured-Published....pdf>
- Wang Q. & Xu L., 2012. Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: A short review. *Molecules* **17**(3), 2367–2377.
- Wang R., Jiang C., Guo X., Chen D., You C., Zhang Y., Wang M. & Li Q., 2020. Potential distribution of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) in China and the major factors influencing distribution. *Glob. Ecol. Conserv.* **21**, e00865.
- White T.J., Bruns T., Lee S. & Taylor J., 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal Rna Genes for Phylogenetics. *PCR Protoc.* (December 2015), 315–322.
- Wickham H., 2009. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* Springer-Verlag New York, Media, 211.
- Wickham H., Averick M., Bryan J., Chang W., McGowan L., François R., Grolemund G., Hayes A., Henry L., Hester J., Kuhn M., Pedersen T., Miller E., Bache S., Müller K., Ooms J., Robinson D., Seidel D., Spinu V., Takahashi K., Vaughan D., Wilke C., Woo K. & Yutani H., 2019. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* **4**(43), 1686.
- Wilfinger W.W., Mackey K. & Chomczynski P., 1997. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* **22**(3), 474–481.
- Witzgall P., Kirsch P. & Cork A., 2010. Sex pheromones and their impact on pest management. *J. Chem. Ecol.* **36**(1), 80–100.
- Wösten H.A.B., 2001. Hydrophobins: Multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 625–646.
- Wraight S.P., Ramos M.E., Avery P.B., Jaronski S.T. & Vandenberg J.D., 2010. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *J. Invertebr. Pathol.* **103**(3), 186–199.
- Yu S.J., Nguyen S.N. & Abo-Elghar G.E., 2003. Biochemical characteristics of insecticide resistance in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). *Pestic. Biochem. Physiol.*
- Zhang Z.-Q., 2011. Order Testudines Batsch, 1788. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa* **3148**(1), 61.
- Zheng Y.G., Jin L.Q. & Shen Y.C., 2004. Resin-catalyzed degradation of validamycin A for production of validoxylamine A. *Catal. Commun.* **5**(9), 519–525.
- Zhou W.W., Ma B., Tang Y.J., Zhong J.J. & Zheng X., 2012. Enhancement of validamycin A production by addition of ethanol in fermentation of *Streptomyces hygrosopicus* 5008. *Bioresour. Technol.* **114**, 616–621.



## 8 Annexes

### 8.1 Protocole d'extraction du kit DNeasy plant

Quick-Start Protocol (March 2016)

#### DNeasy® Plant Mini Kit

The DNeasy Plant Mini Kit (cat. nos. 69104 and 69106) can be stored at room temperature (15–25°C) for up to 1 year if not otherwise stated on label.

Further information :

- *DNeasy Plant Handbook*: [www.qiagen.com/HB-1166](http://www.qiagen.com/HB-1166)
- Safety Data Sheets: [www.qiagen.com/safety](http://www.qiagen.com/safety)
- Technical assistance: [support.qiagen.com](http://support.qiagen.com)

Notes before starting :

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If necessary, redissolve any precipitates in Buffer AP1 and Buffer AW1 concentrates.
- Add ethanol to Buffer AW1 and Buffer AW2 concentrates.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.

1. Disrupt samples ( $\leq 100$  mg wet weight or  $\leq 20$  mg lyophilized tissue) using the TissueRuptor®, the TissueLyser II or a mortar and pestle.

2. Add 400  $\mu$ l Buffer AP1 and 4  $\mu$ l RNase A. Vortex and incubate for 10 min at 65°C. Invert the tube 2–3 times during incubation.

**Note:** Do not mix Buffer AP1 and RNase A before use.

3. Add 130  $\mu$ l Buffer P3. Mix and incubate for 5 min on ice.

4. **Recommended:** Centrifuge the lysate for 5 min at 20,000 x g (14,000 rpm).

5. Pipet the lysate into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.

6. Transfer the flow-through into a new tube without disturbing the pellet if present. Add 1.5 volumes of Buffer AW1, and mix by pipetting.

7. Transfer 650  $\mu$ l of the mixture into a DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube. Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g ( $\geq 8000$  rpm). Discard the flow-through. Repeat this step with the remaining sample.

8. Place the spin column into a new 2 ml collection tube. Add 500  $\mu$ l Buffer AW2, and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000$  x g. Discard the flow-through.

9. Add another 500  $\mu$ l Buffer AW2. Centrifuge for 2 min at 20,000 x g.

**Note:** Remove the spin column from the collection tube carefully so that the column does not come into contact with the flow-through.

10. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube.

11. Add 100 µl Buffer AE for elution. Incubate for 5 min at room temperature (15–25°C). Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$ .

12. Repeat step 11.

## 8.2 Gels électrophorèses

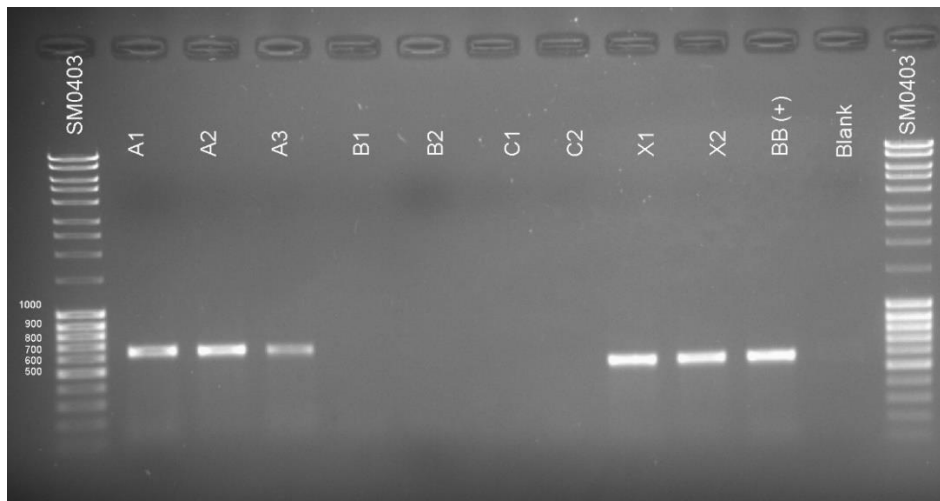


FIGURE 18 : Migration sur gel électrophorèse des amplicons obtenu après PCR classique avec les amorces ITS5 et ITS4 sur les échantillons d'ADN des champignons F3 ( A1, A2 et A3), F1 (B1 et B2), F2 (C1 et C2).et *Beauveria bassiana* GHA (x1,x2 et BB(+)) extrait selon la première méthode d'extraction. Gelred et SYBRsafe

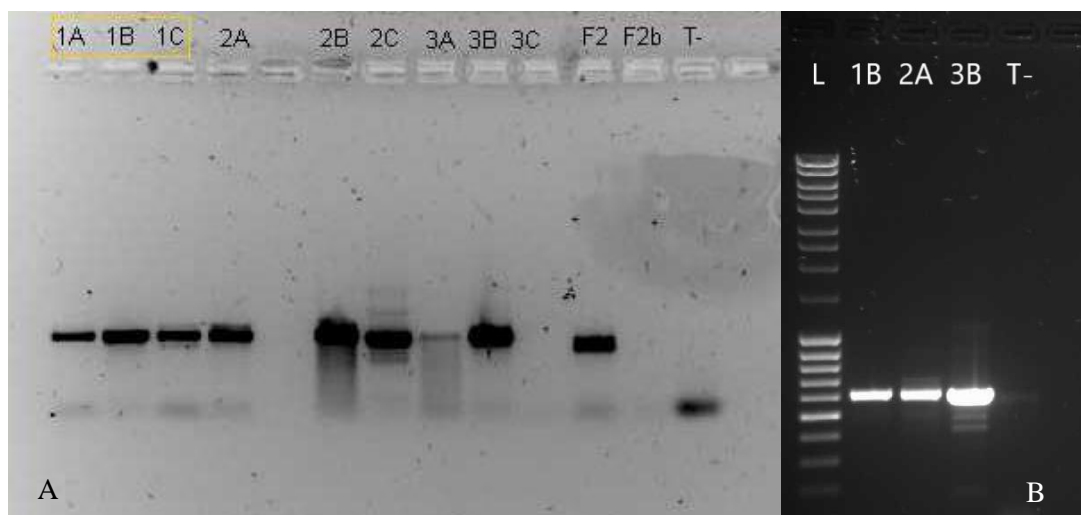


FIGURE 19 : Migration sur gel électrophorèse des amplicons obtenu après PCR classique avec les amorces its5 et its4 sur les échantillons d'ADN des champignons F1(1A, 1B, 1C), F2 (2A, 2B, 2C) et F4 (3A, 3B, 3C) extrait avec le kit QIAGEN DNeasy plant (L, ladder ; 1B, F1 ; 2A, F2 ; 3B, F4). A: Vérification de la qualité des extraction d'ADN. B:Vérification de la taille des amplicons sélectionnés pour le séquençage (~600bp)

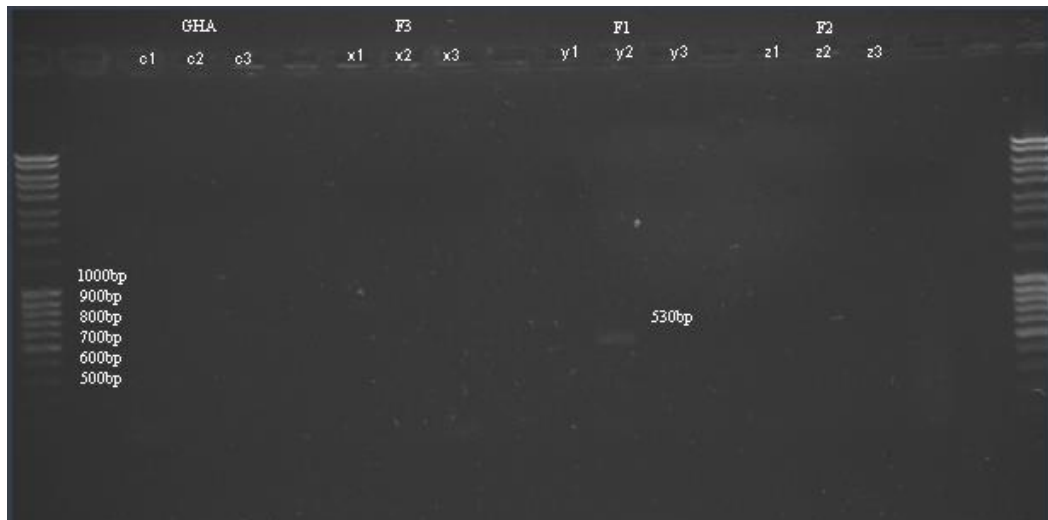


FIGURE 20 : Migration sur gel électrophorèse des produits d'amplification du gène de la Calmoduline (Cam) avec la première méthode d'extraction

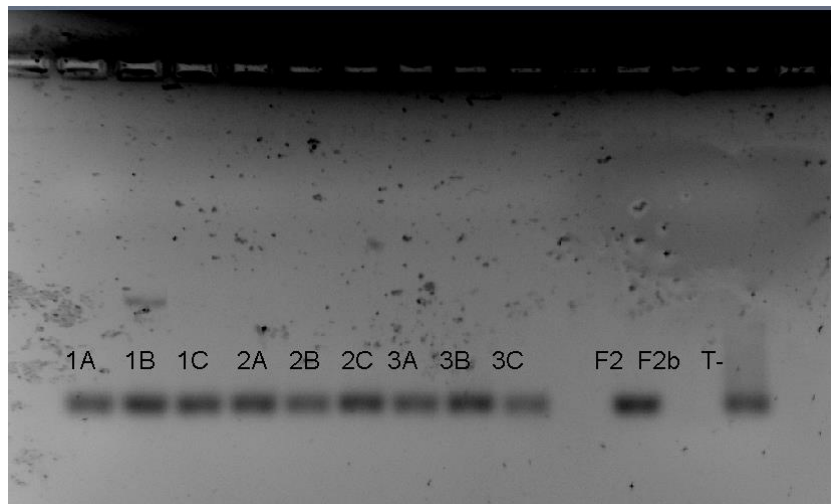


FIGURE 21 : Migration sur gel electrophorèse des primer(résultats négatifs) du gene de la Calmoduline (CaM) sur les échantillon d'ADN extrait avec le kit QIAGEN DNeasy plant

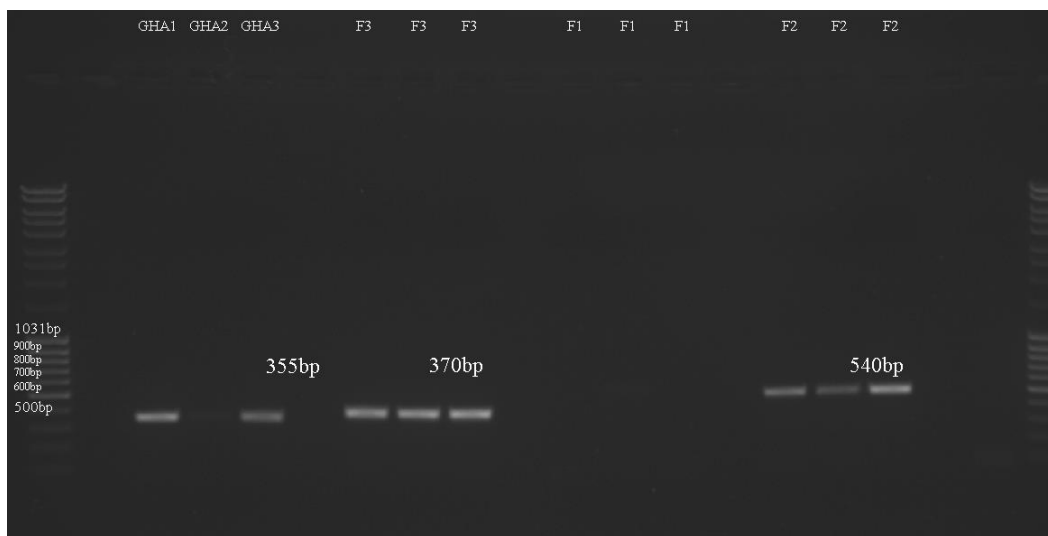


FIGURE 22 : Migration sur gel électrophorèse des produits d'amplification du gène de la beta-tubuline (Ben/Tub2) avec la première méthode d'extraction

## 8.3 Arbres phylogénétiques

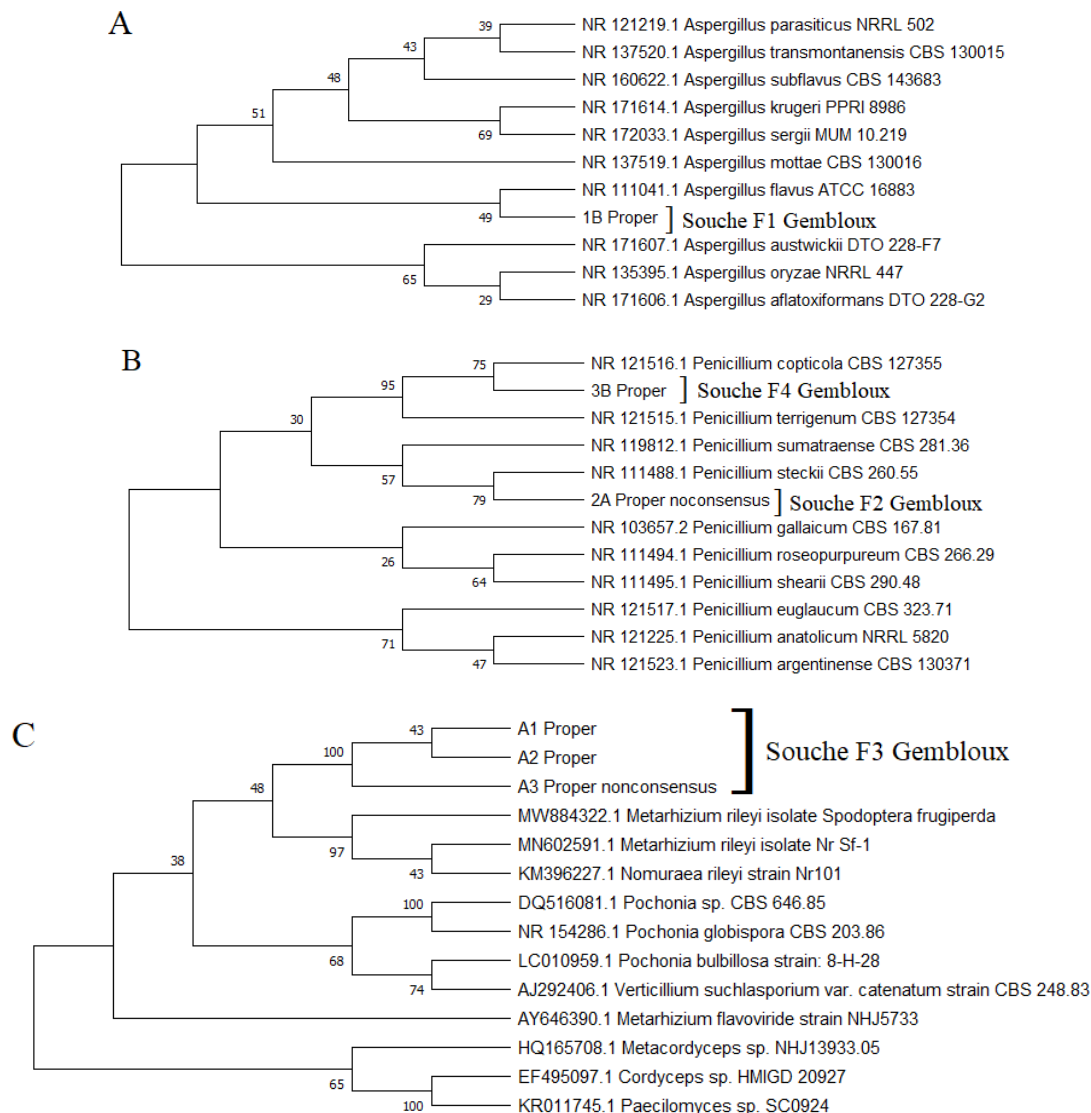


FIGURE 23 : Arbres phylogénétiques représentés ont été construit selon la méthode du maximum de vraisemblance. Le modèle de substitution choisi pour la construction des arbres A et B est le modèle à 3 paramètres de Tamura (source Tamura). Le modèle de substitution à 2 paramètres de Kimura a été choisi pour la construction de l'arbre C. Les arbres initiaux utilisés pour la recherche heuristique des arbres A et B ont été obtenus en appliquant la méthode Neighbor-Joining à une matrice de distances par paire estimées avec le modèle à 3 paramètres de Tamura. Les arbres initiaux utilisés pour la recherche heuristique ont été obtenus en appliquant la méthode de Neighbor-Joining à une matrice de distances par paires estimées à l'aide de l'approche MCL (Maximum Composite Likelihood). Une distribution Gamma discrète a été utilisée pour modéliser les différences de taux d'évolution entre les sites (5 catégories (+G, paramètre = 0,1380)). Pour tous les arbres construits, toutes les positions présentant une couverture de site inférieure à 95% ont été éliminées (i.e. Les lacunes d'alignement < 5%, les données manquantes et les bases ambiguës étaient autorisées à toutes positions) (option : Pairwise deletion). L'ensemble des données finales de A, B et C comportes 429, 411 et 334 positions nucléotidiques respectivement. La construction des arbres A, B et C résulte de l'analyse de 11, 12 et 13 séquences nucléotidiques respectivement. L'arbre A représente les relations phylogénétiques entre 11 organismes appartenant au genre *Aspergillus* de la section Flavi. L'arbre B représente les relations phylogénétiques entre 12 organismes du genre *Penicillium* de la section Citrina. L'arbre C représente les relations phylogénétiques entre la souche F3 (*Metarhizium rileyi*) et les 10 organismes proches sélectionnés dans la base de données NCBI.

## 8.4 Photo

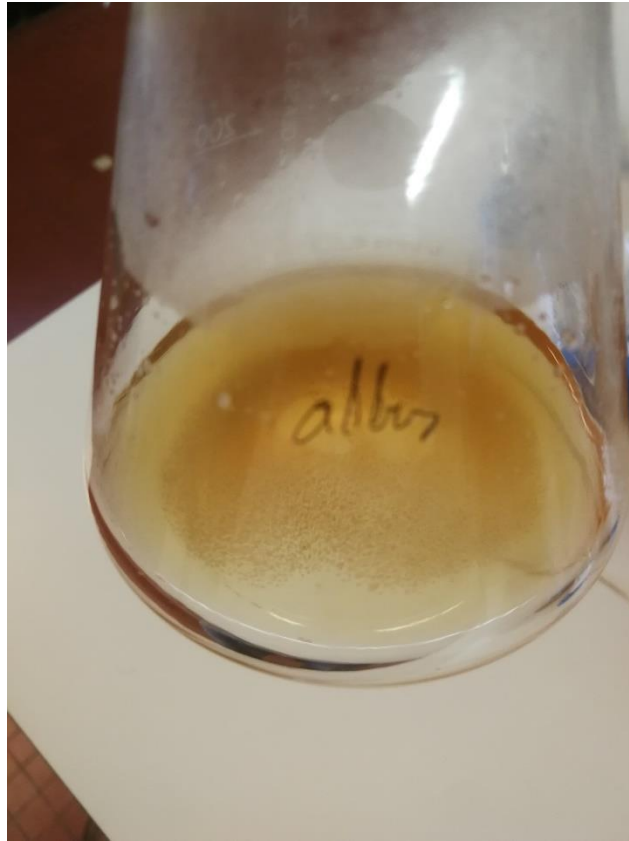


FIGURE 24 : Fermentation liquide de *Streptomyces albus* après 5 jours à 37°C