

REPUBLIQUE DU CAMEROUN

*Paix – Travail – Patrie*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

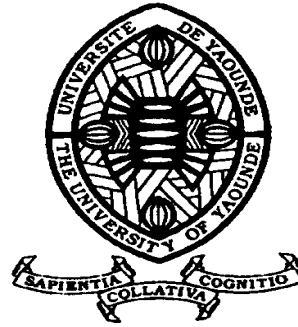
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET

PHYSIOLOGIE ANIMALES

\*\*\*\*\*

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE

ET ECOLOGIE



REPUBLIC OF CAMEROUN

*Peace – Work – Fatherland*

\*\*\*\*\*

UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF ANIMAL

BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

\*\*\*\*\*

LABORATORY OF

PARASITOLOGY AND ECOLOGY

**Utilisation des champignons entomopathogènes  
et des pièges à phéromones dans la lutte contre  
*Sahlbergella singularis* Haglund, 1895  
(Hemiptera : Miridae), bio-agresseur du  
cacaoyer au Cameroun**

THESE

Présentée en vue de l'obtention du  
Doctorat/Ph.D en Biologie des Organismes Animaux

Par : MAHOT Hermine Claudine

D.E.A. ès-sciences

Sous la direction de

**HANNA Rachid**

**Directeur de Recherche**

**IITA**

**BILONG BILONG Charles Félix**

**Professeur**

**Université de Yaoundé I**

**Année Académique : 2019**





DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

*DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY*

**ATTESTATION DE CORRECTION DE LA THESE**

Nous soussignés, membres du jury de soutenance de la **thèse de Doctorat/Ph.D** en Biologie des Organismes Animaux (Option Parasitologie) de Madame **Mahot Hermine Claudine**, matricule **98Q202**, soutenance autorisée par correspondance N° 20950/UYI/VREPDTIC/DAAC/DEPE/SPD/CB-AP du 10 juin 2020 du Recteur de l'Université de Yaoundé I, sur le sujet intitulé : «**Utilisation des champignons entomopathogènes et des pièges à phéromones dans la lutte contre *Sahlbergella singularis* Haglund, 1895 (Hemiptera : Miridae), bio-agresseur du cacaoyer au Cameroun**», attestons que les corrections demandées par les membres du jury ont été effectuées par la candidate et que le présent document peut être déposé sous sa forme actuelle pour exploitation ultérieure.

En foi de quoi la présente attestation est délivrée pour servir et valoir ce que de droit.

Fait à Yaoundé, le... **06 AUG 2020** .....

L'Examineur

C. Agnès Kouda


Le Président du jury

M. F. X. ETOA

Le Chef du Département de BPA



Charles Stélie  
Bilong Bilong  
Professeur

<b>UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I</b> <b>Faculté des Sciences</b> Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		<b>THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I</b> <b>Faculty of Science</b> Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs
<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS</b>		<b>LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF</b>

**ANNÉE ACADEMIQUE 2018/2019**  
 (Par Département et par Grade)  
**DATE D'ACTUALISATION 19 Février 2019**

**ADMINISTRATION**

**DOYEN** : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maitre de Conférences*  
**VICE-DOYEN / DPSAA** : DONGO Etienne, *Professeur*  
**VICE-DOYEN / DSSE** : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Maître de Conférences*  
**VICE-DOYEN / DRC** : ABOSSOLO Monique, *Maitre de Conférences*  
**Chef Division Administrative et Financière** : NDOYE FOE Marie C. F., *Maitre de Conférences*  
**Chef Division des Affaires Académiques, de la Scolarité et de la Recherche DAASR** : MBAZE MEVA'A Luc Léonard, *Professeur*

<b>1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (37)</b>			
N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
2	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
3	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département
4	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
5	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
6	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
7	ATOGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
8	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
9	BIGOGA DIAGA Jude	Maître de Conférences	En poste
10	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
11	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
12	FOKOU Elie	Maître de Conférences	En poste
13	KANSCI Germain	Maître de Conférences	En poste
14	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
15	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
16	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
17	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
18	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
19	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Chargé de Cours	En poste
20	BEBOY EDZENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
21	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
22	DJOKAM TAMO Rosine	Chargé de Cours	En poste
23	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Chargé de Cours	En poste
24	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargé de Cours	En poste
25	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste

26	EWANE Cécile Anne	Chargé de Cours	En poste
27	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
28	BEBEE Fadimatou	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargé de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargé de Cours	En poste
33	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Chargé de Cours	Inspecteur de Service
34	PACHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste
35	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
36	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Chargé de Cours	En poste
37	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
<b>2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (44)</b>			
1	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
2	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
3	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
4	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	<i>VDoyen/FMSB/UIYI</i>
5	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
6	KAMGANG René	Professeur	<i>C.S. MINRESI</i>
7	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
8	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
9	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
10	NOLA Moïse	Professeur	En poste
11	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
12	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service
13	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Maître de Conférences	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
14	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Maître de Conférences	En poste
15	FOTO MENBOHAN Samuel	Maître de Conférences	En poste
20	JATSA BOUKENG Hermine épouse	Maître de Conférences	En Poste
16	KEKEUNOU Sévilor	Maître de Conférences	En poste
17	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
18	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
19	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
21	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
22	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Maître de Conférences	En poste
23	ALENE Désirée Chantal	Chargé de Cours	En poste
24	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste
25	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
26	BILANDA Danielle Claude	Chargé de Cours	En poste
27	DJIOGUE Séfirin	Chargé de Cours	En poste
28	DONFACK Mireille	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargé de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Chargé de Cours	En poste
32	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
33	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
34	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargé de Cours	En poste
35	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
36	NGOATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
37	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste

38	NJUA Clarisse Yafi	Chargé de Cours	Chef Div. UBA
39	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargé de Cours	En poste
40	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste
43	ETEME ENAMA Serge	Assistant	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
<b>3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (27)</b>			
1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
4	YOUMBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
5	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
6	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste
7	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
8	DJOCGOUE Pierre François	Maître de Conférences	En poste
9	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
10	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
11	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/UDs
12	MBOLO Marie	Maître de Conférences	En poste
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	<i>CE / MINRESI</i>
14	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
15	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
16	GOMANDJE Christelle	Chargé de Cours	En poste
17	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
18	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
19	NGALLE Hermine BILLE	Chargé de Cours	En poste
20	NGOOU Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
22	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
23	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
24	NSOM ZAMO Annie Claude épouse PIAL	Chargé de Cours	<i>Expert</i>
25	TONFACK Libert Brice	Chargé de Cours	En poste
26	DJEUANI Astride Carole	Assistante	En poste
27	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Assistante	En poste
<b>4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (32)</b>			
1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Vice Recteur</i>
2	ELIMBI Antoine	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ.</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé de Miss. PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI/Chef de Département</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen UBda.</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
10	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
11	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
12	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
13	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste

14	KONG SAKEO	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
16	NGOMO Horace MANGA	Maître de Conférences	<i>Vice Chancellor/UB</i>
17	NJIOMOU C. épse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
18	NJOYA Dayirou	Maître de Conférences	En poste
19	YOUNANG Elie	Maître de Conférences	En poste
20	ACAYANKA Elie	Chargé de Cours	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	EMADACK Alphonse	Chargé de Cours	En poste
24	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NDI NSAMI Julius	Chargé de Cours	En poste
29	NEBA née NDOIRI Bridget NDOYE	Chargé de Cours	Inspecteur de Service MINFEM
30	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargé de Cours	En poste
31	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargé de Cours	En poste
32	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Chargé de Cours	En poste
<b>5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (32)</b>			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen / PSAA
2	GHOLOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDS
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	En poste
4	NKENGACK Augustin Ephreïm	Professeur	Chef de Département
5	NYASSE Barthélemy	Professeur	<i>Directeur/UN</i>
6	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP</i>
7	WANDJI Jean	Professeur	En poste
8	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	<i>DEPE/ Rectorat/UYI</i>
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	<i>Chef Service DPER</i>
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
11	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
13	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
14	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
15	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINRESI
17	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
18	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
20	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
21	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
22	AMBASSA Pantaléon	Chargé de Cours	En poste
23	FOTSO WABO Ghislain	Chargé de Cours	En poste
24	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
25	MVOT AKAK CARINE	Chargé de Cours	En poste
26	NGOMO Orléans	Chargé de Cours	En poste
27	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Chargé de Cours	En poste
28	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Chargé de Cours	Chef Service/MINESUP
29	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargé de Cours	En poste

30	TAGATSING FOTSING Maurice	Chargé de Cours	En poste
31	ZONDENDEGOUMBA Ernestine	Chargé de Cours	En poste
32	NGNINTEDO Dominique	Assistant	En poste
<b>6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)</b>			
1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div.MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA.MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	AMINOU Halidou	Chargé de Cours	En poste
5	DJAM Xaviera YOUHEP KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
6	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
7	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
8	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
10	ABESOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
11	KAMGUEU Patrick Olivier	Chargé de Cours	En poste
12	MONTHE DJIADEU Valery M.	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	C/D Enset. Ebolowa
14	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
15	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
16	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
17	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
18	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Assistant	En poste
19	EBELE Serge	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste
22	KAMDEM KENGNE Christiane	Assistante	En poste
23	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
25	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
<b>7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (28)</b>			
1	BITJONG NDOMBOL	Professeur	<i>En poste</i>
2	DOSSA COSSY Marcel	Professeur	En poste
3	AYISSI Raoult Domingo	Maître de Conférences	Chef de Département
4	EMVUDU WONO Yves S.	Maître de Conférences	<i>CD Info/ Chef division MINESUP</i>
5	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
6	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	En poste
7	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
8	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
9	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
10	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
11	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
12	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
13	KIANPI Maurice	Chargé de Cours	En poste
14	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
15	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
16	MBANG Joseph	Chargé de Cours	En poste



17	MBEHOU Mohamed	Chargé de Cours	En poste
18	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Chargé de Cours	En poste
19	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
20	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
21	NIMPA PEFOUNKEU Romain	Chargé de Cours	En poste
22	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
23	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
24	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste
25	TCHOUNDJA Edgar Landry	Chargé de Cours	En poste
26	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
27	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargé de Cours	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
<b>8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (12)</b>			
1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	DRV/IMPM
2	ETOA François Xavier	Professeur	Chef de Département/FS/UYI
3	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
4	NWAGA Dieudonné M.	Maître de Conférences	En poste
5	NYEGUE Maximilienne Ascension	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	ASSAM ASSAM Jean Paul	Chargé de Cours	En poste
9	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
10	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
11	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
12	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargé de Cours	En poste
13	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
<b>9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)</b>			
1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
3	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
4	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
5	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	<i>Sous Directeur/ MINRESI</i>
6	NJOMO Donatien	Professeur	En poste
7	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
8	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen Univ/Bda
9	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
10	WOAFO Paul	Professeur	En poste
11	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
12	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
13	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Maître de Conférences	En poste
14	EKOBENA FOUA Henri Paul	Maître de Conférences	<i>Chef Division. UN</i>
15	EYEBE FOUA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
16	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
17	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
18	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
19	NANA ENGO Serge Guy	Maître de Conférences	Director/Students/Affai
20	NANA NBENDJO Blaise	Maître de Conférences	En poste



21	NOUAYOU Robert	Maître de Conférences	En poste
22	SAIDOU	Maître de Conférences	Sous Directeur/Minresi
23	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
24	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
25	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
26	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	<i>Sous Directeur/ MINESUP</i>
27	ZEKENG Serge Sylvain	Maître de Conférences	En poste
28	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
29	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
30	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Chargé de Cours	En poste
31	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER
32	MBINACK Clément	Chargé de Cours	En poste
33	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
34	MEL'I Joelle Larissa	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
35	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
36	NDOP Joseph	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargé de Cours	En poste
29	CHAMANI Roméo	Assistant	En poste
<b>10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)</b>			
1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	KAMGANG Pierre	Professeur	En poste
4	MEDJO EKO Robert	Professeur	<i>Conseiller Technique/UYII</i>
5	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/UMa
10	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
11	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Maître de Conférences	En poste
12	NGOS III Simon	Maître de Conférences	DAAC/Uma
13	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
14	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	En poste
15	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
16	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	<i>En poste</i>
17	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
18	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste
21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste

26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargé de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	<i>En poste</i>
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	MOUAFO Lucas	Chargé de Cours	En poste
35	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargé de Cours	En poste
37	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargé de Cours	En poste
38	NGUEUTCHOUA Gabriel	Chargé de Cours	CEA/MINRESI
39	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
36	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
40	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Chargé de Cours	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
41	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
42	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
43	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste

## Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	5 (1)	12 (6)	19 (11)	1 (1)	<b>37 (19)</b>
BPA	12 (1)	10 (5)	20 (07)	2 (0)	<b>44 (13)</b>
BPV	5 (0)	10(2)	9 (04)	2(02)	<b>26 (9)</b>
CI	9(1)	9(2)	14 (3)	0 (0)	<b>32 (6)</b>
CO	7 (0)	14 (4)	10 (4)	1 (0)	<b>32(8)</b>
IN	2 (0)	1 (0)	13 (0)	10 (3)	<b>26 (3)</b>
MAT	2 (0)	4 (1)	19 (1)	2 (0)	<b>27 (2)</b>
MIB	2 (0)	5 (2)	5 (1)	0 (0)	<b>12 (3)</b>
PHY	10 (0)	17(2)	11 (3)	1 (0)	<b>39 (5)</b>
ST	7 (1)	15 (1)	21 (5)	1 (0)	<b>43(7)</b>
<b>Total</b>	<b>61 (4)</b>	<b>97 (25)</b>	<b>141 (39))</b>	<b>19( 6)</b>	<b>318 (75)</b>

Soit un total de **318 (75)** dont :

- Professeurs **61 (4)**
- Maîtres de Conférences **97(25)**
- Chargés de Cours **141 (39)**
- Assistants **18(5)**

( ) = Nombre de Femmes

## **DEDICACE**

**Je dédie ce travail à mes adorables parents Suzanne et Grégoire MAHOTH SIMB.**

**Je ne pourrai vous rendre ce que vous avez fait pour moi ; si je suis arrivée à ce niveau, c'est grâce à vos efforts multiformes et inconditionnels.**

**Que le Seigneur vous bénisse et qu'il vous accorde la santé et une longue vie.**

## REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pas vu son aboutissement sans les opportunités offertes par un certain nombre de laboratoires et projets. Je pense notamment aux Laboratoires d'Entomologie et de Pathologie de l'Institut Internationale d'Agriculture Tropical (IITA), de Lutte Biologique et de Microbiologie Appliquée de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD), enfin de Parasitologie et Ecologie de l'Université de Yaoundé I. Le projet pour l'augmentation de la productivité des petits producteurs et la réduction de la déforestation et de la dégradation des écosystèmes, dénommé Cocoa-Eco, et le Programme des Centres d'Innovations Vertes pour le Secteur Agro-alimentaire, dénommé Procisa, ont par les financements à moi octroyés été d'un appui indéfectible. L'achèvement de ce travail n'a été possible que grâce à la contribution des personnes à l'endroit desquelles je me dois d'exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude.

Ainsi j'adresse mes sincères remerciements :

- au Docteur HANNA Rachid, Directeur de Recherche à IITA, pour avoir participé à la conception et à l'encadrement de ce travail. Que son appui financier et technique, ses encouragements et ses conseils durant tout mon stage à l'IITA trouvent ici l'expression de mes sincères et distingués remerciements ;
- au Professeur BILONG BILONG Charles Félix, Chef du Laboratoire de Parasitologie et d'Ecologie et Chef du Département de Biologie et Physiologie Animales à la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I, pour avoir accepté, malgré ses multiples préoccupations, de superviser ce travail. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude et mon profond respect pour l'attention qu'il a portée à la réalisation de cette thèse et pour ses critiques constructives;
- aux Docteurs BEGOUDE BOYOGUENO Aimé-Didier, Directeur de Recherche à l'IRAD, FOTSO KUATE Apollin, Visiting Scientist à l'IITA, MAHOB Raymond et YEDE, tous deux Enseignants-Chercheurs au Département de Biologie et Physiologie Animales de la Faculté des sciences de l'Université de Yaoundé I, pour avoir accepté de suivre de près ce travail. Leur assistance technique, leur disponibilité ainsi que leurs multiples conseils et encouragements ont été déterminants dans l'aboutissement de cette thèse. Je leur dis sincèrement merci pour tout ;
- au Docteur BAGNY BEILHE Leïla, chercheur au Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), pour son enthousiasme, sa disponibilité et surtout ses conseils pendant la phase initiale de ce travail ;
- à tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales de la Faculté des sciences de l'Université de Yaoundé I, pour les enseignements, les conseils et l'encadrement qu'ils m'ont donnés ;

- à mes collègues de Laboratoire, Mesdames MEJANE EKANE Carole, MEMBANG Gertrude et NGO NGAMBI Anne Flore; Messieurs TONYE III Stéphane Daves, NANGA Samuel et DONGMO Arnaud Michel, pour leurs contributions diverses et/ou leurs critiques permanentes;
- A Messieurs NYIAWUNG Richard, BIYAGA Stéphane, ANDOUBA Javis Etoh pour leur accompagnement dans la collecte des données sur le terrain ;
- à ma famille au sens large et en particulier à mon fils MAHOT Ange Roland, mes filles MAHOT Suzanne Rolande Florenda et NGO MOOH Suzanne Marlyse, pour leur amour, leur présence à mes côtés et surtout pour leur patience ; mes sœurs MAHOT Marguerite et MAHOT Suzanne et mes frères SIMB Bertrand Flavien et MAHOT Marcellin pour leur attention, leur soutien multiforme et indéfectible ;
- à tous les personnels des Laboratoires d'Entomologie et de Pathologie de l'Institut Internationale d'Agriculture Tropical (IITA), de Parasitologie et Ecologie de l'Université de Yaoundé I, enfin de Lutte Biologique et de Microbiologie Appliquée de l'Institut de Recherche Agricole pour le Développement (IRAD) ;
- à toutes les équipes des projets Cocoa-Eco et Procisa pour l'appui technique et la bonne ambiance qui a toujours régné dans le groupe. Les multiples descentes que nous avons faites sur le terrain m'ont édifiée sur la vie en général et sur le travail en équipe ;

Je rends grâce à Dieu Tout Puissant et Miséricordieux de nous avoir donné une bonne santé, du courage, de la volonté et de la patience pour réaliser ce travail.

## SOMMAIRE

<b>LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS .....</b>	<b>i</b>
<b>DEDICACE .....</b>	<b>x</b>
<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>xi</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>xv</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xvii</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES .....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTES DES ANNEXES .....</b>	<b>xx</b>
<b>RESUME .....</b>	<b>xxi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE .....</b>	<b>6</b>
I.1. Cacaoyer ou <i>Theobroma cacao</i> Linné, 1753.....	7
I.1.1. Origine et historique du cacaoyer.....	7
I.1.2. Taxonomie du cacaoyer.....	7
I.1.3. Description et écologie du cacaoyer.....	8
I.1.4. Production mondiale et importance économique du cacao .....	10
I.2. Contraintes biotiques de la cacaoculture .....	10
I.2.1. Maladies du cacaoyer .....	10
I.2.2. Insectes ravageurs du cacaoyer .....	11
I.3. Miride du cacaoyer <i>Sahlbergella singularis</i> .....	13
I.3.1. Description de <i>Sahlbergella singularis</i> .....	14
I.3.2. Taxonomie de <i>Sahlbergella singularis</i> .....	14
I.3.3. Cycle de développement de <i>Sahlbergella singularis</i> .....	15
I.3.4. Comportement alimentaire de <i>Sahlbergella singularis</i> et dégâts causés au cacaoyer .....	15
I.3.6. Impact économique des mirides .....	17
I.3.7. Moyens de lutte contre <i>Sahlbergella singularis</i> .....	18
<b>CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>30</b>
II.1. Sites d'étude.....	31
II.2. Méthodologie .....	33
II.2.1. Collecte des données géographiques et météorologiques des sites de l'étude.....	33
II.2.2. Collecte et élevage des mirides .....	33
II.2.3. Ré-isollement de <i>Beauveria bassiana</i> et de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	34
II.2.4. Epreuves biologiques des champignons vis-à-vis des mirides .....	35



II.2.6. Criblage des formulations liquides .....	39
II.2.7. Tolérance des conidies dans les émulsions inverses vis-à-vis de quelques températures .....	41
II.2.8. Evaluation de la pathogénicité des champignons formulés vis-à-vis des mirides .....	41
II.2.9. Monitoring des mirides par les pièges à phéromones .....	43
II.3. Analyses des données.....	46
II.3.1. Epreuves biologiques .....	46
II.3.2. Evaluation de l'effet des différents adjuvants sur les isolats .....	46
II.3.3. Criblage des formulations .....	47
II.3.4. Evaluation de la pathogénicité des champignons formulés sur les mirides .....	47
II.3.5. Utilisation de pièges à phéromones .....	48
<b>CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>50</b>
III.1. Résultats.....	51
III.1.1. Epreuves biologiques.....	51
III.1.2. Mise au point des formulations fongiques.....	62
III.1.3. Evaluation de la pathogénicité des champignons formulés vis-à-vis des mirides.....	76
III.1.4. Pièges à phéromones.....	79
III.2. Discussion.....	86
III.2.1. Potentiel insecticide et virulence de <i>Beauveria bassiana</i> et de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	86
III.2.2. Transmission horizontale de <i>Beauveria bassiana</i> et de <i>Metarhizium anisopliae</i> .....	89
III.2.3. Effet des différents adjuvants sur les isolats.....	91
III.2.4. Evaluation de la viabilité des différentes formulations et thermo-tolérance des conidies formulées (émulsion inverses) dans différentes huiles.....	93
III.2.5. Evaluation de la pathogénicité des champignons formulés sur les mirides.....	95
III.2.6. Evaluation de l'attractivité des pièges à phéromones.....	99
III.2.7. Evaluation des populations et des dégâts de <i>Sahlbergella singularis</i> .....	100
<b>CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>107</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>136</b>

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cacaoyer (photo Mahot). .....	8
Figure 2 : Représentation schématique du développement du système racinaire du cacaoyer obtenu à partir d'un embryon (A) ou d'une bouture (B).....	9
Figure 3 : Adulte de <i>Sahlbergella singularis</i> : (A) vue dorsale, (B) vue latérale (photo Mahot).....	14
Figure 4 : Différents stades larvaires de <i>Sahlbergella singularis</i> selon Babin (2009) : L1 à L5 = stades larvaires de 1 à 5. ....	15
Figure 5 : Dégâts de mirides sur branchettes (A et B) et sur cabosses (C et D) de cacaoyer (photos Mahot). ....	16
Figure 6 : Aspect des conidiospores de <i>Beauveria bassiana</i> en microscopie à balayage électronique (De Kouassi, 2001). ....	22
Figure 7 : Aspect des conidies de <i>Metarhizium sp.</i> en microscopie optique (Benserradj, 2014). ....	23
Figure 8 : Quelques formes de pièges : A= Piège à entonnoir ; B= piège à sceau ; C= piège triangulaire ; D= piège lobos ; E= piège à disque collant; F= piège triangulaire ouvert (Cork, 2004). ....	27
Figure 9 : Carte de la localité de Konye dans le Sud-ouest et de celle d'Ayos dans le Centre. Source : ProCisa/IITA, 2016. ....	31
Figure 10 : Manchon de mousseline isolant un couple de mirides (mâle et femelle) sur une cabosse de cacao dans une cacaoyère (Photo Mahot). ....	34
Figure 11 : Cultures de <i>Beauveria bassiana</i> (A) et de <i>Metarhizium anisopliae</i> (B) âgées de 21 jours sur milieu PDA (Photo Mahot). ....	35
Figure 12 : Evaluation du diamètre de croissance fongique à l'aide d'une règle graduée (Photo Mahot). ....	38
Figure 13 : Différentes formulations des champignons entomopathogènes.....	41
Figure 14 : Pièges à phéromones rectangulaires de couleur verte, violette et blanche (Photo Mahot). ....	44
Figure 15: Disposition géographique des pièges dans une parcelle essai. ....	45
Figure 16 : Taux de mortalité corrigée des spécimens de <i>S. singularis</i> exposés par immersion et en fonction des concentrations des isolats fongiques testés. ....	51
Figure 17 : Taux de mortalité de <i>S. singularis</i> exposés par ingestion et en fonction des concentrations des isolats fongiques testés. ....	54
Figure 18 : Sporulation fongique sur <i>S. singularis</i> suite à l'infection par <i>B. bassiana</i> (A) et par <i>M. anisopliae</i> (B) (Photo Mahot). ....	57
Figure 19 : Taux de transmission de l'effet bioinsecticide des isolats (A : BIITAC 10.3.3, B : BIITAC6.2.2, C : MIITAC11.3.4, D : MIITAC6.2.2.) des mirides donneurs aux contaminés.....	61
Figure 20 : Diamètre moyen de croissance radiale fongique (mm) en présence des différents additifs ou adjuvants au jour 20 post-ensemencement.....	63
Figure 21 : Nombre de spores de <i>B. bassiana</i> (BIITAC6.2.2) et de <i>M. anisopliae</i> (MIITAC11.3.4) produites par millilitre de suspension en fonction des différents adjuvants. ....	65
Figure 22 : Mortalité et fréquence de la sporulation fongique sur les mirides au quatorzième jour d'infection.....	76

Figure 23 : Taux de réduction temporelle du nombre de mirides vivants dans les trois traitements. ....	77
Figure 24 : Persistance des conidies de <i>B. bassiana</i> sur les feuilles de cacaoyers en fonction du temps (en jours). ....	78
Figure 25 : Taux journalier de mortalité des mirides due à la persistance des conidies sur les cabosses soixante jours post-application du biopesticide en champ. ....	79
Figure 26 : Dynamique mensuelle de capture de <i>S. singularis</i> les pièges de différents couleurs dans les deux localités. ....	80
Figure 27 : Relation entre la variation du nombre de mirides capturés et les paramètres climatiques à Ayos. ....	82
Figure 28 : Relation entre la variation du nombre de mirides capturés et les paramètres climatiques à Konye. ....	83
Figure 29 : Prévalence des dégâts de <i>S. singularis</i> sur les cabosses les parcelles avec pièges et sans pièges dans les deux localités (A=Ayos et B=Konye) d'étude ....	84
Figure 30 : Sévérité moyenne des dommages de <i>S. singularis</i> enregistrée dans les champs traités et témoins d'Ayos (A) et de Konye (B). ....	85

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Quelques maladies du cacaoyer .....	11
Tableau II : Liste des plantes hôtes alternatifs de <i>Sahlbergella singularis</i> d'après Entwistle (1972) et Padi <i>et al.</i> , (1996) ; nomenclature mise à jour selon la classification phylogénétique Hinsley, (2008).....	17
Tableau III: Différents adjuvants utilisés pour les émulsions dans ce travail .....	40
Tableau IV : Population de mirides évaluée sur chaque cacaoyer a la veille des traitements.....	42
Tableau V: Notation des dégâts récents causés par les mirides aux cabosses de cacaoyer .....	46
Tableau VI : Effet de différents traitements (isolat-concentration) de <i>B. bassiana</i> et <i>M. anisopliae</i> sur les mortalités corrigées de <i>S. singularis</i> par immersion.....	52
Tableau VII: Probits des concentrations létales 50 des isolats de <i>B. bassiana</i> et <i>M. anisopliae</i> lors de leur application directe sur <i>S. singularis</i> .....	53
Tableau VIII: Temps létaux 50 (TL50) et 90 (TL90) des mirides exposés aux isolats de <i>B. bassiana</i> et <i>M. anisopliae</i> lors de leur application direct sur <i>S. singularis</i> .....	54
Tableau IX : Effet de différents traitements (isolat-concentration) sur les mortalités corrigées des larves de <i>S. singularis</i> exposés, pendant 14 jours, par ingestion des isolats de <i>B. bassiana</i> et <i>M. anisopliae</i> .....	55
Tableau X : Concentrations létales 50 (CL50) des isolats de <i>B. bassiana</i> et <i>M. anisopliae</i> par application indirect sur <i>S. singularis</i> 14 jours après l'essai.....	56
Tableau XI: TL50 et TL90 des isolats de <i>B. bassiana</i> et <i>M. anisopliae</i> appliqués par contact indirect à $3,2 \cdot 10^8$ conidies.mL <sup>-1</sup> .....	57
Tableau XII: Comparaisons des taux (moyennes $\pm$ ES) de mirides morts, suite à leur exposition par immersion aux différents traitements et présentant une sporulation .....	58
Tableau XIII : Comparaisons des taux (moyennes $\pm$ ES) de mirides morts, suite à leur exposition aux différents traitements par ingestion et présentant une sporulation.....	59
Tableau XIV : Effet des traitements sur la mortalité et la fréquence de sporulation sur les insectes (traités et non traités) morts .....	62
Tableau XV: Vitesse de croissance radiale (en cm/jour) de BIITAC6.2.2 de <i>B. bassiana</i> en présence des différents adjuvants .....	63
Tableau XVI: Vitesses de croissance radiale (en cm/jour) de MIITAC11.3.4 de <i>M. anisopliae</i> en présence des différents adjuvants.....	64
Tableau XVII: Biomasse fongique sèche (en g) de BIITAC6.2.2 de <i>B. bassiana</i> et MIITAC11.3.4 de <i>M. anisopliae</i> en présence des différents adjuvants.....	66
Tableau XVIII : Nombre de conidies viables de BIITAC6.2.2 (CFU/ml X 10 <sup>5</sup> $\pm$ Ecart-type) sous l'effet des différents additifs.....	66

Tableau XIX : Nombre de conidies viables de MIITAC11.3.4 (CFU/ml X $10^5 \pm$ Ecart-type) sous l'effet des différents additifs.....	67
Tableau XX: Nombre de conidies viables (CFU/ml x $10^5 \pm$ Ecart-type) de BIITAC6.2.2 dans différentes formulations à base d'huiles .....	68
Tableau XXI: Nombre de conidies viables (CFU/ml x $10^5 \pm$ Ecart-type) de MIITAC11.3.4 dans différentes formulations à base d'huiles.....	69
Tableau XXII : Nombre de conidies viables (CFU/ml x $10^5 \pm$ Ecart-type) de BIITAC6.2.2 dans les formulations de type EI à base de différentes huiles et à différentes températures.....	71
Tableau XXIII : Nombre de conidies viables (CFU/ml x $10^5 \pm$ Ecart-type) de MIITAC11.3.4 dans les formulations de type EI à base de différentes huiles et à différentes températures.....	74
Tableau XXIV: Réponse des couleurs de pièges à phéromones entre les deux sites (intersite) sur l'attractivité des mirides.....	80

## **LISTE DES ABREVIATIONS ET ACRONYMES**

JITAP: Joint Integrated Technical Assistance Program

ICCO: International Cocoa Organization

IITA: International Institute of Tropical Agriculture

IRAD: Institut de Recherche Agricole pour le Développement

ONCC: Office National du Cacao et du Café

HR : Humidité Relative

PR : Huile de palme Raffinée

PB : Huile de palme brute

S : Huile de Soja

C : Huile de Coton

FE : Formulation de type Emulsion

EI : Formulation de type Emulsion Inverse

PDA : Potato Dextrose Agar

## LISTES DES ANNEXES

Annexe 1 : Essai du test de pathogenicité .....	137
Annexe 2 : Préparation des formulations sous la hotte à flux laminaire .....	137
Annexe 3 : Procédure de filtration des milieux contenant les spores et le mycélium fongique .....	137
Annexe 4 : Effet des différentes formulations sur la viabilité des conidies de <i>B. bassiana</i> (A) et de <i>M. anisopliae</i> (B) toutes les deux semaines et pendant 18 semaines. ....	138
Annexe 5 : Effet de la temperature sur la viabilité des conidies de <i>B. bassiana</i> (A) et de <i>M. anisopliae</i> (B) formulées dans des émulsions inverses puis évaluée toutes les deux semaines et pendant 18 semaines. ....	139
Annexe 6 : Interaction entre la prévalence et de l'indice de sévérité des dommages de <i>S. singularis</i> dans tous les champs (Mai 2015- Septembre 2016).....	140
Annexe 7 : Liste des publications tirées de la thèse .....	140



## RESUME

Le cacao fait partie des produits qui font vivre plus de 3 millions de personnes au Cameroun. Malgré l'objectif gouvernemental qui vise 600.000 tonnes de fèves de cacao par an à l'horizon 2020, la production cacaoyère reste faible en raison de la pression des maladies et des ravageurs. Dans l'entomofaune nuisible associée au cacaoyer, les hémiptères et précisément les Miridae constituent le groupe d'insectes le plus préjudiciable. De nos jours, la recherche des alternatives à la lutte chimique contre les mirides est un challenge. Les champignons *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* et les pièges à phéromones suscitent de plus en plus d'espoirs et constituent des issues importantes en lutte biologique et en lutte semiochimique. Ce travail a évalué le pouvoir insecticide des isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* vis-à-vis de *Sahlbergella singularis* dans le but de mettre au point et sélectionner des formulations de biopesticides. Il a essentiellement évalué l'attractivité des pièges de différentes couleurs, appâtés aux phéromones, vis-à-vis de *S. singularis* et déterminé l'impact de ces pièges à phéromones sur sa densité et ses dégâts en milieu réel. Les isolats de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* testés avec la méthode par immersion et celle par ingestion ont montré un potentiel insecticide intéressant au laboratoire contre les larves de *S. singularis*. Ils ont causé des mortalités pouvant atteindre des taux de 100%. Les épreuves biologiques ont permis de retenir quatre des six isolats fongiques sur la base des concentrations létales 50 (CL50) ; des temps létaux 50 (TL50) et 90 (TL90) et deux isolats BIITAC6.2.2 et MIITAC11.3.4, après le test de transmission horizontale. Les paramètres croissance végétative, sporulation, germination et biomasse fongiques ont démontré que le glycérol, l'huile de soja, l'huile de palme raffinée et l'huile de coton ont une bonne compatibilité avec les souches de champignons sélectionnées. Ces mêmes paramètres ont servi à sélectionner la formulation de type Emulsion Inverse (EI), qui a mieux conservé la viabilité des spores de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* pendant 18 semaines d'une part et, d'autre part, la température de 25°C qui est la plus favorable à la conservation des formulations. Les toxicités des conidies de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* formulées en laboratoire avec l'huile de soja et avec l'huile de palme raffinée ont été avérées avec des taux moyens de mortalité des mirides compris entre 76% et 84%. L'espèce *B. bassiana* a montré un effet insecticide relativement plus élevé que *M. anisopliae*; la pathogénicité de ses conidies formulées a indiqué, en cacaoyère, une efficacité certaine. Ainsi, l'insecticide de *B. bassiana* formulé à base d'huile de soja a significativement réduit les populations de mirides comparé au témoin. Cette réduction a atteint un taux de 100% au bout du trente-sixième jour d'essai. La viabilité des conidies de *B. bassiana* sur les feuilles de cacaoyer se maintient et ne se perd considérablement qu'après un mois post-application, soit une perte de 72% au bout de deux mois. La persistance de l'activité insecticide de *B. bassiana* sur les cabosses de cacaoyer, au bout de deux mois post-application, a été induite malgré les conditions

abiotiques. Le type de formulation influence l'efficacité du champignon comme agent de bio-contrôle, sa facilité d'application et sa durée de conservation. Ces atouts, à prendre en compte dans la mise au point d'une formulation fongique, sont importants dans une stratégie phytosanitaire de contrôle de populations des insectes ravageurs. Parallèlement à l'investigation d'une stratégie de lutte biologique par ces champignons, l'optimisation de l'utilisation des pièges par l'intégration du paramètre « couleurs » a été menée à Ayos et à Konye. D'après les réactions comportementales des mirides, toutes les couleurs de pièges utilisées ont été attractives avec une préférence pour le piège vert. La préférence pour les pièges verts s'est expliquée par le mimétisme de la couleur du matériel végétal. En tout, 4191 mirides ont été échantillonnés dans les deux localités d'étude soit 3826 dans les parcelles avec pièges et 368 dans les parcelles sans pièges (témoin). Les profils des courbes de pluviométrie, de température et d'humidité relative n'ont pas toujours coïncidé avec celui de la dynamique de population de *S. singularis* qui n'a pas trouvé une explication directe par ces facteurs abiotiques. Ces derniers semblent influencer plutôt l'état physiologique du cacaoyer qui, à son tour, détermine la dynamique spatio-temporelle de *S. singularis* dans les plantations cacaoyères. La prévalence des dégâts sur la plante hôte (cabosses) dus à *S. singularis* a été moins élevée dans les parcelles avec pièges (essai) comparées aux parcelles témoins. Dans la localité d'Ayos, le taux moyen de cabosses affectées a été de 1,7 % dans les parcelles essais contre 3,6% dans les témoins tandis qu'à Konye, il a été de 1,3 % contre 5,5% respectivement. La sévérité des dégâts de *S. singularis* chez la plante hôte (cabosses) dans les parcelles témoins a été plus importante que celle dans les parcelles essais, soit 1,06% et 0,53% à Ayos contre 1,63% et 0,42% à Konye respectivement. Les niveaux élevés de prévalence des dégâts et de sévérité dans les parcelles témoins comparées aux parcelles traitées suggèrent que l'utilisation du piégeage réduit les dommages causés par les mirides sur les cabosses bien que le niveau de captures de *S. singularis* mâles dans les pièges appâtés, n'a pas montré une réduction considérable des dégâts sur les cabosses de cacaoyer.

**Mots clés :** Cacaoyer, *Sahlbergella singularis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, Lutte biologique, Pathogénicité, Optimisation, Pièges à phéromones, Couleur.

## ABSTRACT

Cocoa is one of the products that provide important incomes for more than 3 million people in Cameroon. Despite the government's target yield of 600,000 tons by 2020, cocoa production remains low due to diseases and pests. In the insect wildlife pest associated with cocoa trees, Hemiptera specially Miridae are the most damaging group of insects. Research for alternatives to chemical control of mirids has today become a challenge. The use of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and pheromone traps are increasingly of interest and are important output in biological and semiochemical control. This work has assessed the insecticidal potential of fungal isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* against *Sahlbergella singularis* to develop and select biopesticide formulations. It has specially evaluated the attractiveness of the baited colored traps by *S. singularis* and determined the impact of these pheromone traps on their density and their damages in natural environments. *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates tested through immersion and ingestion methods showed interesting insecticidal potential in the laboratory against *S. singularis* larvae. They have caused mirid death that could reach the average rates of 100%. Bioassays tests and the evaluation of lethal concentrations 50 (LC50) and lethal times 50 (TL50) and 90 (TL90) allowed the screening of four fungal isolates between the six tested. However, only two strains, namely BIITAC6.2.2 and MIITAC11.3.4 were transmitted horizontally. Fungal vegetative growth, sporulation, germination and biomass have shown that glycerol, soybean oil, refined palm oil and cottonseed oil have good compatibility with fungi. These same parameters also helped to select the Reverse Emulsion (EI) formulation, which better preserved the viability of *B. bassiana* and *M. anisopliae* spores for 18 weeks in one hand and in the other hand to choose the temperature of 25°C, which is the most favourable for the conservation of the formulations. Toxicity of *B. bassiana* and *M. anisopliae* conidia formulated in the laboratory with soybean oil and refined palm oil have been proven with the mirid mortality average rates ranged from 76% to 84%. *B. bassiana* was relatively more toxic to mirids than *M. anisopliae*; the pathogenicity of its formulated conidia has indicated an incontestable efficacy in cocoa field. The mycoinsecticide of *B. bassiana*, formulated with soybean oil, significantly reduced mirid populations compared to the control. This reduction reached an average rate of 100% after thirty-six days of product application. The viability of *B. bassiana* conidia on cocoa leaves is maintained and it is significantly lost only a month after application; either a losses of 72% after two months. The persistence of insecticidal activity of *B. bassiana* on cocoa pods two months after application was induced despite abiotic conditions. The type of formulation affects the efficacy of the fungus as a bio-control agent, its safe application and its shelf life. These assets are to be considered in the development of fungal formulation as it is essential in a phytosanitary strategy of insect pests population control. Beside the investigation of a

biological control strategy by *B. bassiana* and *M. anisopliae*, the optimization of trap using by color integration was also carried out in the localities of Ayos and Konye. According to the behavioral reactions of the mirids, all trap colours were attractive with preference for the green trap. The preference for green traps was explained by the imitation of the colour of the plant material. A total of 4191 mirids were sampled in the two study sites, 3826 in the plots with traps (treated) and 368 in the plots without traps (control). The profiles of the rainfall, temperature and relative humidity curves did not always coincided with those of the *S. singularis* population's dynamics which have not found a direct explanation in these abiotic factors variation. These abiotic factors seem to influence the physiological state of the cocoa tree, which could determine the spatio-temporal dynamics of *S. singularis* in cocoa plantations. The prevalence of host plant damage (pods) caused by *S. singularis* was lower in trap plots (treated) compared to control plots. In Ayos, the average rate of affected pods was 1.7% in treated plots compared to 3.6% in controls, while in Konye, it was 1.3% compared to 5.5% respectively. The severity of damage of *S. singularis* in the pods in control plots was greater than the one in treated plots, i.e. 1.06% and 0.53% in Ayos against 1.63% and 0.42% in Konye respectively. The high levels of damage prevalence and severity in the control plots compared to treated plots suggest that the use of trapping method reduce the damage caused by mirids on pods despite the fact that the level of catches of *S. singularis* male by pheromone traps did not shown a considerable reduction in damage of cocoa pods.

**Keywords:** Cocoa tree, *Sahlbergella singularis*, *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, Biological control, Pathogenicity, Optimization, Pheromone traps, Color.

# **INTRODUCTION**

Le cacao (*Theobroma cacao* L.) est une plante cultivée principalement pour ses fèves qui constituent une importante matière première pour les produits semi-finis tels que la pâte et le beurre de cacao et les produits finis tels que le chocolat liquide, le chocolat solide, le chocolat en poudre et le jus de cacao (Edoh Adabe et Ngo-Samnack, 2014). La fève de cacao est très appréciée pour son arôme et ses nutriments qui sont le phosphore, le magnésium, le fer, le zinc, le manganèse, le cuivre, le potassium, le sélénium et les vitamines B2 et B3. Bien fermentée et séchée, elle contient 50 à 57 % de lipides, 10 % de protéines, 12 % de fibres, 8 % de glucides de type amidon et environ 5 % de minéraux (Edoh Adabe et Ngo-Samnack, 2014). De plus, le cacao produit des polyphénols et des flavonoïdes qui sont impliqués dans la santé humaine, notamment dans la réduction du risque des maladies cardiovasculaires (Morand, 2013). Originaire d'Amérique latine, le cacaoyer fait son introduction en Afrique par le Ghana en 1879 puis il arrive au Cameroun par Limbé en 1887 (Mbondji, 2010). La production mondiale de fèves de cacao marchand a été estimée à 4600 millions de tonnes pour la campagne 2017-2018 (Pipitone, 2018 ; ICCO, 2019). Avec un apport de 3503 millions de tonnes de fèves de cacao, l'Afrique contribue à hauteur de 76% dans la production mondiale. Les 253510 tonnes de fèves de cacao marchand produites par le Cameroun lors de la campagne agricole 2017/2018 (ONCC, 2018) lui permettent de contribuer à hauteur de 7,2% dans la production africaine et le maintiennent au cinquième rang des producteurs de cacao après la Côte d'Ivoire, le Ghana, l'Indonésie et l'Equateur (ICCO, 2017). Au Cameroun, la cacaoculture s'étend sur une superficie estimée à environ 400.000 hectares (Bagal *et al.*, 2013). Ce produit occupe une place de choix parmi ceux d'exportation et fait partie des cultures agricoles traditionnelles qui emploient environ 620.000 planteurs, faisant vivre plus de 3 millions de personnes réparties dans environ 400.000 familles de producteurs (ONCC, 2007). Depuis 2016, la production nationale annuelle a dépassé l'objectif visé de 200.000 tonnes de fèves de cacao, fixé dans le plan stratégique sectoriel du MINADER de 2002 portant relance de la filière cacao (ICCO, 2017). Malgré cette embellie de production, les rendements restent faibles par rapport à l'objectif gouvernemental de 600.000 tonnes de fèves de cacao pour la fin de cette année 2020 tel que décliné dans la stratégie sectorielle du MINADER (Anonyme, 2014).

La cacaoculture souffre, en général, d'un certain nombre de contraintes parmi lesquelles ; l'instabilité des prix des produits dérivés (fèves de cacao) au niveau du marché international, le faible pouvoir de négociation des planteurs face aux acheteurs même à l'échelle locale, le vieillissement des plantations et la faible productivité des cacaoyers (JITAP, 2006). Selon le rapport de JITAP, les faibles rendements annuels sont liés aux changements climatiques qui perturbent le calendrier agricole d'une part et, d'autre part, à la fréquence des maladies et des ravageurs souvent difficiles à contrôler par les producteurs. Concernant la pression parasitaire, au Cameroun la cacaoculture est confrontée aux maladies telles que la pourriture brune causée par

l'Oomycète *Phytophthora megakarya* (Brasier & Griffin 1979) et aux attaques d'insectes piqueurs de la famille des Miridae et du genre *Sahlbergella* (Yede *et al.*, 2012 ; Yede, 2016) et bien d'autres ravageurs tels les chenilles defoliatrices. L'insecte *Sahlbergella singularis* Haglund, 1895 pique les cabosses, les gourmands et les jeunes rameaux ; il cause leur dépérissement et laisse des portes d'entrée aux agents fongiques, bactériens et viraux à l'origine d'infections secondaires (Anonyme, 2002). Cet insecte est l'un des agents nuisibles et responsables d'une faible productivité des cacaoyers en Afrique centrale et de l'Ouest (Babin, 2018). En situation d'infestations massives et d'absence de traitements phytosanitaires adéquats, les pertes annuelles de production sont évaluées entre 10 et 80% au Nigeria et au Cameroun (Ojelade *et al.*, 2005 ; Anikwe, 2010; Yede *et al.*, 2012).

Face aux dommages occasionnés à la cacaoculture par les mirides et autres Hémiptères, plusieurs méthodes de lutte sont préconisées pour réduire leurs effets à un seuil économique acceptable (Lavabre, 1970). Il s'agit par exemple de la lutte culturale ou agronomique (Kumar, 1984 ; Babin *et al.*, 2010), de la lutte génétique (Sounigo *et al.*, 2003 ; Badegana *et al.*, 2004 ; Dibog *et al.*, 2008; N'Guessan *et al.*, 2008; Anikwe *et al.*, 2009a), de la lutte chimique (Nguyen-Ban, 1977 ; Anikwe *et al.*, 2009b ; Mahob *et al.*, 2014), de la lutte naturelle par l'utilisation des extraits aqueux de plantes naturelles (Mboussi *et al.*, 2018), de la lutte biologique par l'utilisation des insectes prédateurs (Yede, 2016 ; Bagny Beilhe *et al.*, 2018) ou de la lutte sémi chimique par l'utilisation des pièges à phéromones (Mahob *et al.*, 2011; Sarfo, 2013). Toutefois, parmi toutes ces méthodes suscitées, la lutte chimique s'avère la plus efficace et la plus utilisée. Cependant, les matières actives utilisées présentent de nombreux inconvénients liés principalement à leur toxicité, leur coût élevé et souvent leur mauvaise utilisation ou leur large spectre d'action qui inclut parfois des taxons non cibles (Tijani, 2006 ; Sonwa *et al.*, 2008 ; Geiger *et al.*, 2010). En outre, ces matières actives appliquées entraînent la diminution de la biodiversité animale, en général, et entomofaunique en particulier, la pollution des écosystèmes (terrestres et/ou aquatiques), les problèmes de santé publique aussi bien chez les planteurs/ouvriers que chez les consommateurs des produits dérivés (Tijani, 2006; Geiger *et al.*, 2010). L'une des méthodes conservatoires à laquelle recourent généralement les états/gouvernements ou l'OMS porte sur l'interdiction de l'utilisation des produits insecticides (Bateman, 2008). A titre illustratif, l'arrêté N°71/08/D/MINADER/SG/SDRP/SRP du 17 Juillet 2008 du gouvernement camerounais proscrit l'usage, en cacaoculture, de certains pesticides jugés très toxiques, à savoir le cartap, le diazinon, l'endosulfan, le fenobucarb, le malathion, le propoxur, etc... (Anonyme, 2013 ; Anonyme, 2015). Malheureusement, au cours d'une enquête menée auprès des producteurs dans les plus grands bassins de production au Cameroun, ces substances ont été recensées, pourtant près de 160 insecticides sont homologués au Cameroun (Mahob *et al.*, 2014 ; Anonyme, 2013). De nos jours,



les inquiétudes des consommateurs des produits à base de cacao, préalablement traités avec des produits chimiques homologués ou non, conduisent à recommander une alimentation biologique, qui les éloignerait de tout risque de maladie liée aux résidus de pesticides.

Dans la lutte biologique, les champignons entomopathogènes sont reconnus comme des agents de régulation naturelle d'un grand nombre d'insectes ravageurs. De nombreuses études ont rapporté la pathogénicité, l'efficacité et/ou la virulence des microorganismes Hyphomycètes, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912 et *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, 1883, vis-à-vis des Thysanoptères *Frankliniella occidentalis* Pergande, 1895 (Ugine *et al.*, 2005; Wang & Zheng, 2012) et *Megalurothrips sjostedti* Trybom, 1908 (Ngakou *al.*, 2008); des Coléoptères dont *Anthonomus signatus* Says, 1831, *Otiiorhynchus ovatus* Linnaeus, 1758 (Sabbahi 2008), *Sitophilus oryzae* Linnaeus, 1763 (Batta, 2004) et *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775 (Cherry *et al.*, 2005) ; de l'Orthoptère *Uvarovistia zebra* Uvarov, 1916 (Mohammadbeigi & Port, 2013) et de l'Hémiptère *Eurygaster integriceps* Puton, 1881 (Abdulhai *et al.*, 2010). Dans un travail préliminaire, nous avons montré la pathogénicité de certains isolats de *B. bassiana* vis-à-vis de *S. singularis* au Cameroun (Mahot *et al.*, 2006). Toutefois, leur efficacité et/ou virulence vis-à-vis des mirides restent à établir. Quant à l'utilisation des extraits de plantes, elle est considérée comme un moyen de lutte biologique pour les uns et comme un moyen de lutte sémi chimique pour les autres. Les extraits de plantes, à l'instar de ceux de *Azadirachta indica* A. Juss., 1830 (Adu-Acheampong, 1997 ; Mboussi *et al.*, 2018) et de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Mboussi *et al.*, 2018), ont montré des effets insecticides, anti-apétants et même répulsifs vis-à-vis de *S. singularis*. De nombreux travaux sur la lutte sémi chimique ont aussi révélé l'efficacité dans l'attractivité des insectes ravageurs par les pièges à phéromones sexuelles (Jansson *et al.*, 1992 ; Sugiyama *et al.*, 1996 ; Cork, 2004 ; Jackson & Bohac, 2006). L'avantage de cette approche réside dans son mode d'action qui permet : (a) la surveillance du seuil critique des populations d'insectes (Blackmer *et al.*, 2008 ; Boddum *et al.*, 2009 ; Cross & Hall, 2009 ; Sarfo, 2013), (b) l'évitement reproductif entre les mâles et les femelles (Cork, 2004) et (c) le piégeage de masse des populations d'insectes (Yang *et al.*, 2012). Pour tester l'efficacité de l'attractivité des pièges à phéromones vis-à-vis des mirides, l'accent a été mis sur l'effet de la forme et la disposition du piège et/ou la composition chimique de la phéromone sexuelle (Padi *et al.*, 2000 ; Padi & Sarfo, 2002 ; Mahob *et al.*, 2011 ; Sarfo, 2013). Toutefois, et à notre connaissance, aucune étude concernant l'effet de la couleur des pièges à phéromones sur l'attractivité des mirides n'a encore été effectuée. Pourtant, la couleur a un caractère hautement attractif pour un grand nombre de taxons d'insectes (Hassan & Mohammed, 2004 ; Mazzoni *et al.*, 2011 ; Thongjua *et al.*, 2015). Ainsi, la connaissance de la couleur la plus attractive pour les populations parasites permettrait d'optimiser la gestion et le

« monitoring » de *S. singularis* et, par conséquent, améliorerait le calendrier phytosanitaire actuel de lutte contre ce ravageur cible.

L'objectif principal de ce travail est donc de contribuer à l'amélioration de la lutte contre *S. singularis* via l'utilisation des champignons entomopathogènes et des pièges de couleurs appâtés. Pour ce faire, quatre objectifs spécifiques ont été définis à savoir :

- l'évaluation du pouvoir insecticide de trois isolats fongiques de *Beauveria bassiana* et de trois isolats de *Metarhizium anisopliae* ;
- la mise au point et la sélection des formulations de biopesticides ;
- l'évaluation de l'attractivité et de la préférence des pièges à couleurs appâtés vis-à-vis de *S. singularis* ;
- la détermination de l'impact de ces pièges à phéromones sur la densité et les dégâts de *S. singularis* en milieu réel.

La démarche entreprise dans ce travail se résume en trois chapitres. Après cette introduction, le premier chapitre ou revue de littérature présente les données bibliographiques relatives au cacaoyer, au miride ravageur *S. singularis*, aux champignons entomopathogènes *B. bassiana* et *M. anisopliae* et aux pièges à phéromones. Le second chapitre décrit les sites d'étude et les méthodes utilisées pour atteindre nos objectifs. Le troisième présente les différents résultats obtenus ainsi que leur discussion. Une conclusion, des recommandations et des perspectives précèdent la présentation des références bibliographiques qui clôturent ce travail.

## **CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE**

## **I.1. Cacaoyer ou *Theobroma cacao* Linné, 1753**

### **I.1.1. Origine et historique du cacaoyer**

Le peuple Maya au Mexique fut le premier à connaître et à cultiver le cacaoyer dont le nom scientifique, *Theobroma cacao* fut donné par Linné en 1753; ce nom rappelle une origine divine car il dérive des mots grecs Theos et broma qui signifient dieux et nourriture ; c'est-à-dire la nourriture des dieux. Par la suite, le cacaoyer a été cultivé par les Aztèques lorsque ceux-ci se sont emparés des terres des Maya au 15<sup>e</sup> siècle (Mbondji, 2010). C'est au 19<sup>e</sup> siècle que la culture du cacao est introduite en Afrique et plus précisément par le Ghana en 1879. De là, cette culture est arrivée en Côte-d'Ivoire, en 1880, où elle a connu un grand essor à partir de 1912 puis un ralentissement durant la guerre de 1914 à 1918. Ce n'est qu'en 1887 que les allemands introduisent le cacaoyer au Cameroun en passant par Limbé (Mbondji, 2010).

Pendant la période du protectorat allemand (1884-1916), le cacao est resté la principale culture d'exportation du Cameroun et sa production la principale activité des planteurs. Partant de Limbé, son extension a été faite dans les plaines côtières de la zone littorale, le long des fleuves Mounjo et Wouri, puis vers l'intérieur du pays. Au Cameroun, la culture du cacao a connu un grand boom à partir de 1925 jusqu'à la veille de la deuxième guerre mondiale. Durant cette période, elle a émigré vers les régions du Centre, du Sud et de l'Est où elle a trouvé des conditions écologiques plus favorables (Mbondji, 1984). Et depuis cette période, on a assisté à une stagnation de sa production pendant près de 40 ans (Nwaga, 1988).

### **I.1.2. Taxonomie du cacaoyer**

Les travaux de Cuatrecasas (1964) et Alverson (1999) rapportés par Whitlock *et al.* (2001) puis Silva *et al.* (2004) permettent de faire une classification du cacaoyer ainsi qu'il suit :

Domaine des Eukaryota

Règne Vegetal

Embranchement des Spermaphytes

Classe des Magnoliidae

Ordre des Malvales.

Famille des Malvacées

Sous-famille des Sterculiacées

Genre : *Theobroma* Linné, 1737

Espèce : *Theobroma cacao* Linné, 1753

Les caractéristiques morphologiques, génétiques et l'origine géographique de cette espèce végétale différencient deux grands groupes du cacaoyer: les Criollos et les Forasteros ; toutefois un troisième groupe, celui des Trinitarios les rassemble (Cuatrecasas, 1964 ; Efombagn *et al.*, 2009).

Les Criollos produisent des fruits allongés, avec une surface lisse ou rugueuse, rouge ou verte avant maturité et un cortex peu lignifié (Eskes & Lanaud, 1997). On les trouve à Madagascar puis du Mexique jusqu'en Colombie et au Venezuela. Ils ont une croissance lente et sont plus sensibles aux maladies et aux ravages d'insectes (Mossu, 1990).

Les Forasteros sont des arbres vigoureux dont les fruits, de couleur jaune à maturité et de forme très variable, sont en général plus courts et plus ovales que ceux des Criollos. Leurs fèves aplaties et d'un violet foncé donnent un cacao de qualité moyenne. C'est un groupe très diversifié de cacaoyers cultivés en haute Amazonie (Pérou, Equateur, Colombie), dans le bassin amazonien (Brésil), dans les Guyanes et le long de l'Orénoque au Venezuela (Eskes & Lanaud, 1997).

Les Trinitarios sont hybrides des deux types précédents. Les cabosses des Trinitarios présentent toutes les formes et toutes les colorations intermédiaires entre celles des Criollos et des Forasteros ; ils pèsent de 400 à 500g. L'intérieur de la fève est violet ou rose. Les Trinitarios sont aujourd'hui cultivés dans les pays d'Amérique centrale, dans certains pays du nord et du Sud de l'Amérique (Colombie, Venezuela, Équateur), ainsi que dans quelques pays d'Afrique et d'Asie du Sud-Est. Hybrides naturels très hétérogènes, ils offrent une bonne résistance aux maladies et représentent environ 20 à 25% de la production mondiale (Mossu, 1990 ; Solórzano, 2007).

### I.1.3. Description et écologie du cacaoyer

A l'état naturel, le cacaoyer *Theobroma cacao* L. (figure 1) pousse dans les étages inférieurs des forêts humides d'Amérique tropicale, entre 20° de latitude Nord et 20° de latitude Sud, à une altitude généralement inférieure à 1250 mètres. C'est une plante pérenne qui atteint 12 à 15 mètres et voire 25 mètres de haut à l'état sauvage mais sa taille est généralement maintenue entre 4 et 7 mètres afin de faciliter la récolte (Braudeau, 1969; Solórzano, 2007; Lachenaud *et al.*, 2007).



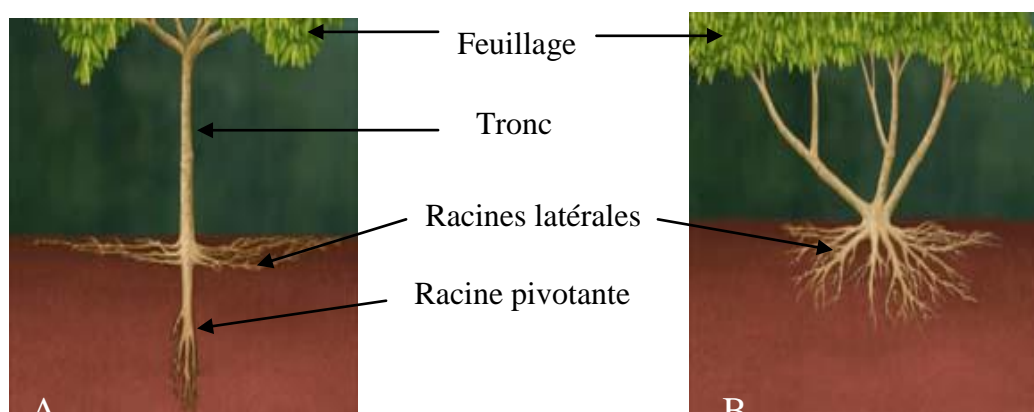
**Figure 1 :** Cacaoyer (photo Mahot).

Le tronc est généralement droit avec une écorce peu épaisse de couleur brun grisâtre ; son diamètre est de 20 cm ou plus légèrement à l'âge adulte. Les feuilles persistantes, simples et

elliptiques, sont molles et ont une coloration variant du vert très clair au rougeâtre à l'état jeune puis au vert foncé à maturité. Les inflorescences, portées sur le tronc (cauliflorie) ou sur les branches maîtresses (ramiflorie), apparaissent sur des coussinets floraux qui sont des renflements du tronc ou des branches (Swanson *et al.*, 2008). De petite taille, les fleurs sont hermaphrodites et formées de cinq sépales, cinq pétales et cinq étamines qui alternent avec cinq staminodes stériles (pentamères). Ces fleurs sont à ovaire supère et contiennent 30 à 60 ovules. L'arbre peut produire annuellement jusqu'à 100 000 fleurs dont seulement environ 1/500 donneront des fruits (Swanson *et al.*, 2008).

Le fruit du cacaoyer est une baie indéhiscente fusiforme appelée chérelle au jeune âge et cabosse à l'âge adulte. Ce fruit reste attaché à l'arbre par son pédoncule fortement lignifié. Une cabosse ouverte présente une placentation axillaire avec des graines disposées en cinq rangées, entourées d'une pulpe mucilagineuse. Son péricarpe est constitué, de l'extérieur vers l'intérieur, de l'épicarpe, du mésocarpe et de l'endocarpe. On dénombre 30 à 60 graines ou fèves par cabosse (Eskes & Lanaud, 1997; Santos *et al.*, 2012 ; Yédé *et al.*, 2012). Les graines, entourées d'une pulpe mucilagineuse sont reliées au placenta par des funicules. La période de maturation de la cabosse dépend des conditions climatiques et du génotype de la plante ; ainsi elle peut être d'environ 161 jours pour les Forasteros (SCA) et de 210 jours pour les Trinitarios (ICS) (Cilas, 1991 ; Soupi Nkeutcha, 2013).

Le système racinaire d'un cacaoyer, qui provient d'un semis, s'organise autour d'un pivot central qui peut s'enfoncer jusqu'à deux mètres de profondeur, offrant ainsi un solide ancrage à la plante. Des racines latérales prennent naissance sur la partie supérieure du pivot. Elles sont longues, sinueuses, ramifiées et garnies d'un chevelu qui explore l'horizon de surface riche en éléments minéraux libérés par la décomposition de la litière (figure 2A). Lorsqu'un cacaoyer ne provient pas d'un semis mais plutôt d'une bouture, son enracinement est fasciculé, c'est-à-dire qu'il ne possède pas de pivot mais il est formé de nombreuses racines (figure 2B).



**Figure 2** : Représentation schématique du développement du système racinaire du cacaoyer obtenu à partir d'un embryon (A) ou d'une bouture (B).

Source : <http://www.afd.be/~plantch/cacaoyer/conaiss/SRcacao.htm>.

#### **I.1.4. Production mondiale et importance économique du cacao**

Le cacaoyer est cultivé pour ses fèves qui constituent la matière première d'une importante industrie de fabrication de produits finis et semi-finis. Les coques de cacao sont également utilisées pour l'alimentation du bétail, dans la fabrication des engrais, en pharmacie et en savonnerie (Mossu, 1990).

Le cacao occupe une place importante dans l'économie des pays où il est cultivé. L'économie cacaoyère mondiale a, durant la deuxième moitié du 20<sup>e</sup> siècle, été marquée par de grands bouleversements de rangs entre les pays producteurs. Certains grands producteurs du cacao comme le Ghana, premier producteur mondial pendant plus de soixante ans, et le Brésil ont vu leurs tonnages baisser progressivement tandis que la Côte- d'Ivoire prenait le relai pour devenir le leader de la cacaoculture jusqu'à ce jour. De nos jours, la production mondiale du cacao est assurée, à près de 76%, par l'Afrique ; le Cameroun, cinquième plus grand producteur mondial, couvre 7,2% de cette production (ONCC, 2018). L'économie du Cameroun repose principalement sur l'agriculture et le cacao occupe une place de choix parmi les produits d'importance agricole. En effet cette denrée représente, avec le café, environ 28% des exportations non pétrolières et 40% des exportations du secteur primaire. C'est la principale source de revenus monétaires des masses rurales des régions du Centre, du Sud, du Sud-Ouest, de l'Est et du Littoral. Le secteur cacao compte pour environ 2 % du PIB national, 6 % du PIB primaire et à peu près 30 % du PIB du sous-secteur des produits agricoles destinés à l'exportation et à la transformation. Sur le plan social, environ 400.000 familles de producteurs tirent l'essentiel de leurs revenus du cacao ; ces revenus sont estimés à plus de 100 milliards de francs CFA (ONCC, 2007).

#### **I.2. Contraintes biotiques de la cacaoculture**

La culture du cacao est sujette à de nombreuses pressions. Il s'agit des problèmes dus aux maladies et aux insectes ravageurs.

##### **I.2.1. Maladies du cacaoyer**

Plante exotique dans plusieurs zones de production, le cacaoyer peut contracter un certain nombre de maladies contre lesquelles il ne dispose parfois d'aucun mécanisme de défense approprié. Comme maladies du cacaoyer, nous pouvons citer la pourriture brune des cabosses, la «Cocoa Swollen Shoot Disease» en abrégé CSSD, la moniliose, le balai de la sorcière et la «Vascular Streak Dieback» en abrégé VSD. Le tableau I apporte des informations sur les agents pathogènes responsables et la distribution géographique de quelques maladies.



**Tableau I:** Quelques maladies du cacaoyer

Maladie	Agent causal de la maladie	Distribution géographique	Références
<b>Pourriture brune des cabosses</b>	<i>Phytophthora</i> ( <i>P. palmivora</i> Butler, 1910, <i>P. megakarya</i> Brasier et Griffin, 1979, <i>P. capsici</i> Leonian, 1922 et <i>P. citrophthora</i> (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian, 1906	Afrique centrale et de l'Ouest	Lass (1985); Nwaga (1988) Anonyme (2003); Cilas & Despréaux (2004); Ndoumbè-Nkeng <i>et al.</i> (2004); Tondje <i>et al.</i> (2007); Deberdt <i>et al.</i> (2008); Pohe <i>et al.</i> (2013); Akrofi (2015)
<b>Cocoa Swollen Shoot</b>	Cocoa Swollen Shoot Virus (CSSV) du genre Badnavirus transmis par un insecte (cochenilles farineuse) de la famille des Pseudococcidae.	Afrique de l'Ouest	Anonyme (2003); Dongo & Orisajo (2007); Kouakou <i>et al.</i> (2011); N'guessan (2013); Kébé (2013); Dzahini-Obiatey & Adu Ampomah (2014);
<b>Moniliose</b>	<i>Moniliophthora roreri</i> Evans, 1978	Amérique du Sud	Anonyme (2003); Phillips-Mora and Wilkinson (2007); Phillips-Mora <i>et al.</i> (2010)
<b>Balai de sorcière</b>	<i>Crinipellis perniciosa</i> (Stahel) Singer (Singer, 1942) encore appelé <i>Moniliophthora perniciosa</i> (Stahel) Aime & Phillips-Mora, (2005)	Régions amazoniennes de l'Amérique du Sud	Anonyme (2003); Bateman <i>et al.</i> (2005); Anonyme (2007); Meinhart <i>et al.</i> (2008); Krauss <i>et al.</i> (2010)
<b>Vascular Streak Dieback (VSD)</b>	<i>Oncobasidium theobromae</i> Talbot et Keane, 1971 encore appelé <i>Ceratobasidium theobromae</i> Rogers, 1935	Asie du Sud-Est	Lass (1985); Efron <i>et al.</i> (2002); Anonyme (2003); Flood & Murphy (2004); Guest & Keane (2007); Keane (2010); Flood (2014); Ruseani (2015)

### I.2.2. Insectes ravageurs du cacaoyer

Comme pour les maladies, le cacaoyer est sujet aux attaques de nombreux insectes. Il s'agit généralement des insectes piqueurs-suceurs, des psyllophages, des foreurs de tiges, des foreurs de cabosses.

#### I.2.2.1. Psylle du cacaoyer

Le psylle (*Mesohomotoma tessmanni* Aulmann, 1912) parasite du cacaoyer a été découvert au Cameroun par Von Faber vers 1908 (Decazy, 1976). Son aire de distribution s'étend de la Sierra Leone en Zambie et en République du Congo (Entwistle, 1972 ; Mbondji, 2010). Longtemps considérés comme ennemis secondaires du cacaoyer, les psylles causent plutôt des dommages graves surtout aux jeunes plants de cacaoyers. Au moment de l'oviposition, leurs femelles provoquent des blessures du tissu végétal et leurs larves piquent les bourgeons, les jeunes feuilles et les rameaux lors des prélèvements alimentaires (Mbondji, 2010). Ces piqûres entraînent

généralement une défoliation des extrémités de rameaux, voire leur dessèchement en cas de forte attaque, et un ralentissement de la croissance des rameaux (Igboekwe, 1983). Comme moyens de lutte contre *M. tessmanni*, la lutte culturale par le réglage de l'ombrage et la lutte génétique par l'utilisation des arbres résistants jouent un rôle important pour prévenir les attaques ; la lutte chimique par les insecticides reste tout de même le moyen de lutte le plus utilisé (Kadje & Tondje, 1988).

#### **I.2.2.2. Punaise verte des cabosses du cacaoyer**

La punaise verte des cabosses de cacaoyer ou *Bathycoelia thalassina* Herrich-Schaffer, 1844 a, depuis quelques décennies, pris une importance grandissante un peu partout en Afrique centrale et occidentale. Owusu-manu (1976) a estimé que les pertes de production annuelles au Ghana dues à ce pentatomide s'élevaient à 18%. Cet insecte est répertorié pour la première fois au Cameroun en 1906 ; dans l'actuelle région du Sud-Ouest, des dégâts particulièrement graves ont été signalés dès 1963 avec des pertes en cabosses évaluées à près de 40% dans les localités d'Ikiliwindi et de Tombel (Mbondji, 2010).

Les piqûres de la cabosse par *B. thalassina* occasionnent un mûrissement prématuré, total ou partiel de celle-ci. Les fèves de telles cabosses s'atrophient et noircissent au niveau des malformations (Mbondji, 2010). L'emploi des insecticides s'est montré efficace contre la punaise *B. thalassina* ; de plus, certaines espèces de microhyménoptères ont permis un taux de parasitisme de près de 75% contre cet insecte au Ghana (Lodos, 1967).

#### **I.2.2.3. Foreurs des tiges et des cabosses de cacaoyer**

Les foreurs des tiges ont longtemps été considérés comme des déprédateurs mineurs du cacaoyer. Les plus connus dans ce groupe sont les coléoptères *Phosphorus virescens* Olivier, 1795 ; *Tragocephala castnia* Thomson, 1857 et *Apate monachus* Fabricius, 1775. L'espèce *Eulophonotus myrmeleon* Felder, 1874 (Lépidoptère : Cossidae) a été rapportée comme nuisible dans les pays producteurs d'Afrique de l'Ouest et centrale (Padi and Adu-Acheampong, 2000). Depuis les années 1990, les dégâts causés par ce lépidoptère sont devenus préoccupants pour les producteurs en Côte d'Ivoire (Caplong *et al.*, 1993 ; N'Guessan *et al.*, 2014 ; N'Guessan *et al.*, 2010a). Les foreurs de tige creusent des galeries dans le tronc et les branches des cacaoyers ; ils provoquent ainsi un écoulement abondant de la sève, des cassures des troncs et branches, un dépérissement des cacaoyers et une réduction du potentiel de production de l'arbre attaqué (Okelana, 1989). Pour limiter les dégâts de ce foreur, et bien que la lutte mécanique qui consiste à boucher les trous occasionnés par cet insecte soit le moyen le plus utilisé, l'emploi des insecticides assure un contrôle satisfaisant des larves de *E. myrmeleon* et réduit significativement le taux d'attaques de ce ravageur dans les cacaoyères (Kouassi, 2005 ; Danho *et al.*, 2014).

Le foreur de cabosses *Conopomorpha cramerella* Snellen, 1904 est largement répandu à travers l'Asie du Sud-Est, précisément en Malaisie, en Indonésie, aux Philippines et en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Awang & Lamin 2014). Il a été rapporté comme le ravageur le plus grave du cacao en Asie du Sud-Est (Mumford, 1986 ; Saripah *et al.*, 2007). Les cabosses infestées par les larves de ce lépidoptère présentent des taches jaunes avant la maturation et des fèves agrégées souvent difficiles, voire impossibles, à extraire (Azhar, 1986). La gestion de *C. cramerella* est généralement faite par les applications de pesticides (Saripah *et al.*, 2007) mais des moyens de lutte mécanique, génétique et biologique ont déjà été testés (Anonyme, 2003).

#### **I.2.2.4. Mirides du cacaoyer dans le monde**

Parmi les insectes ravageurs du cacaoyer, les mirides constituent de loin la première préoccupation des producteurs du cacao (Lavabre, 1977a). Ces organismes appartiennent à la sous-famille des Bryocorinae, à la famille des Miridae et se rangent en deux tribus : les Odoniellini et les Monaloniini (Lavabre, 1977b). Les Odoniellini sont caractérisés par un corps massif d'une couleur qui tend à passer du brun au noir et d'une tête deux fois plus large que longue. Les Monaloniini, quant à eux, ont une tête rétrécie, des pattes et des antennes longues et minces, enfin un corps plutôt allongé (Lavabre, 1977b).

Cinq genres de mirides (*Sahlbergella* Haglund, 1895 ; *Distantiella* Distant, 1909 ; *Bryocoropsis* Schumacher, 1917 ; *Daniela* et *Helopeltis* Signoret, 1858) appartenant aux deux tribus sus-évoquées attaquent principalement le cacaoyer en Afrique centrale et de l'Ouest (Lavabre, 1977a). Dans ces régions deux espèces, *Sahlbergella singularis* (Haglund) et *Distantiella theobromae* (Distant) ont un impact économique majeur sur la culture du cacaoyer et ont toujours été considérées comme les insectes nuisibles les plus dommageables dans les pays producteurs (Lavabre, 1977a ; N'Guessan et Coulibaly, 2000). Ces insectes causent des dégâts très importants et réduisent considérablement le rendement du cacaoyer avec des pertes de l'ordre de 30 à 40 % chaque année (Lavabre, 1977a) ainsi que le revenu du paysan.

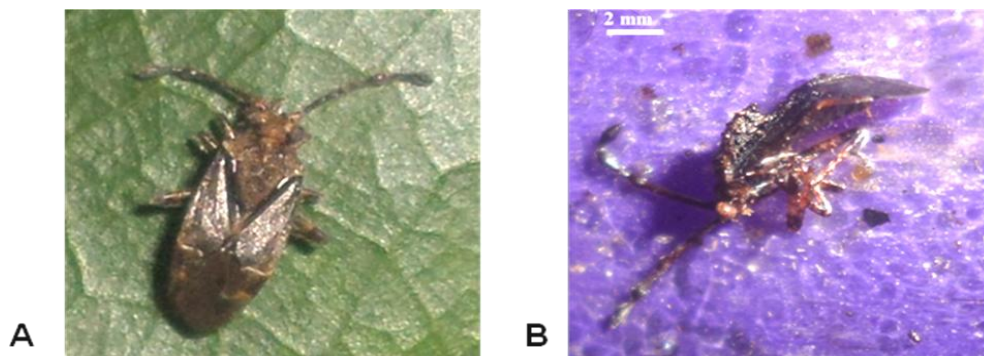
#### **I.3. Miride du cacaoyer *Sahlbergella singularis***

Des deux espèces de mirides les plus préjudiciables au cacaoyer en Afrique, *Sahlbergella singularis* est la plus commune et la plus répandue au Cameroun (Babin, 2009). Cet insecte est observé pour la première fois sur le cacaoyer au Cameroun par Warburg en 1902 puis au Ghana en 1908, au Nigeria en 1913, en Sierra Leone en 1917, en Côte d'Ivoire en 1928 (Babin, 2009). Originaire de la zone forestière d'Afrique de l'ouest et d'Afrique centrale, son aire de distribution comprend : la Sierra Leone, le Liberia, la Côte d'Ivoire, le Ghana, le Togo, le Bénin, le Nigeria, le Cameroun, la République centrafricaine, la République Démocratique du Congo, la République de

Congo, le Gabon, la Guinée équatoriale et São Tomé-et-Principe (Entwistle, 1972 ; Lavabre, 1977a).

### I.3.1. Description de *Sahlbergella singularis*

Selon Lavabre (1977a), l'adulte de *S. singularis* (figure 3) mesure 8 à 9 mm de long pour le mâle et de 9 à 10 mm pour la femelle. Il a une couleur généralement marron qui rappelle celle de la vieille écorce du cacaoyer. Sa tête, légèrement plus claire que l'ensemble du corps, porte des yeux proéminents et des antennes plus allongées que la moitié du corps. Ces antennes comportent chacune quatre articles et sont recouvertes d'une fine pilosité. Le thorax et le scutellum sont couverts de protubérances tuberculaires brillantes. Le corselet (pronotum) est plus large que long et présente, antérieurement, un bourrelet assez net limité par un sillon transverse. En arrière de ce sillon se trouvent deux petites plaques lisses appelées «cali». Les pattes sont recouvertes de poils courts et les tibias sont rectilignes. Les larves de coloration plutôt rose foncé ont une forme générale arrondie et globuleuse. Les segments abdominaux sont marqués par de gros tubercules arrondis disposés transversalement sur chaque segment. Les derniers stades larvaires (L4 et L5) présentent des ébauches des ailes (Lavabre, 1977b).



**Figure 3 :** Adulte de *Sahlbergella singularis*: (A) vue dorsale, (B) vue latérale (photo Mahot).

### I.3.2. Taxonomie de *Sahlbergella singularis*

En considérant les classifications de Lavabre (1977b), Delvare & Aberlenc (1989), Wheeler (2001), la position systématique de *S. singularis* peut être résumée comme suit :

Domaine : Eukaryota

Règne : Animal

Embranchement : Arthropoda

Classe : Insectes

Ordre : Hemiptera

Sous-ordre : Heteroptera

Infra-Ordre : Cimicomorpha

Super-famille : *Incertae sedis*

Famille : Miridae

Genre : *Sahlbergella* Haglund, 1895

Espèce : *Sahlbergella singularis* Haglund, 1895.

### I.3.3. Cycle de développement de *Sahlbergella singularis*

Le cycle biologique de *S. singularis* a été décrit pour la première fois par Cotterell en 1926. Les mâles et les femelles atteignent tour à tour la maturité sexuelle en 2 jours et en 3 à 7 jours après la dernière mue nymphale (Collingwood, 1977 ; Babin *et al.*, 2008). L'accouplement de *S. singularis* est favorisé par les phéromones sexuelles (Padi *et al.*, 2002 ; Sarfo, 2013). Après cet accouplement, l'oviposition de la femelle commence entre les quatrième et onzième jours ; elle continue jusqu'au trentième voire quarantième jour. Les œufs pondus individuellement, ou plus rarement par deux, sont insérés dans le cortex des cabosses ou sous l'écorce des jeunes branches, des gourmands, dans les pédoncules de feuilles et cabosses. La fécondité moyenne de *S. singularis* est comprise entre 30 et 50 œufs par femelle ; sa valeur moyenne journalière est proche de 4 œufs par femelle (Williams, 1953). Ces œufs incubent en 20 jours en moyenne (Babin *et al.*, 2006 ; Sarfo, 2013). Le cycle de développement de *S. singularis* comprend un stade embryonnaire, cinq stades larvaires et un stade adulte (figure 4).



**Figure 4** : Différents stades larvaires de *Sahlbergella singularis* selon Babin (2009) : L1 à L5 = stades larvaires de 1 à 5.

### I.3.4. Comportement alimentaire de *Sahlbergella singularis* et dégâts causés au cacaoyer

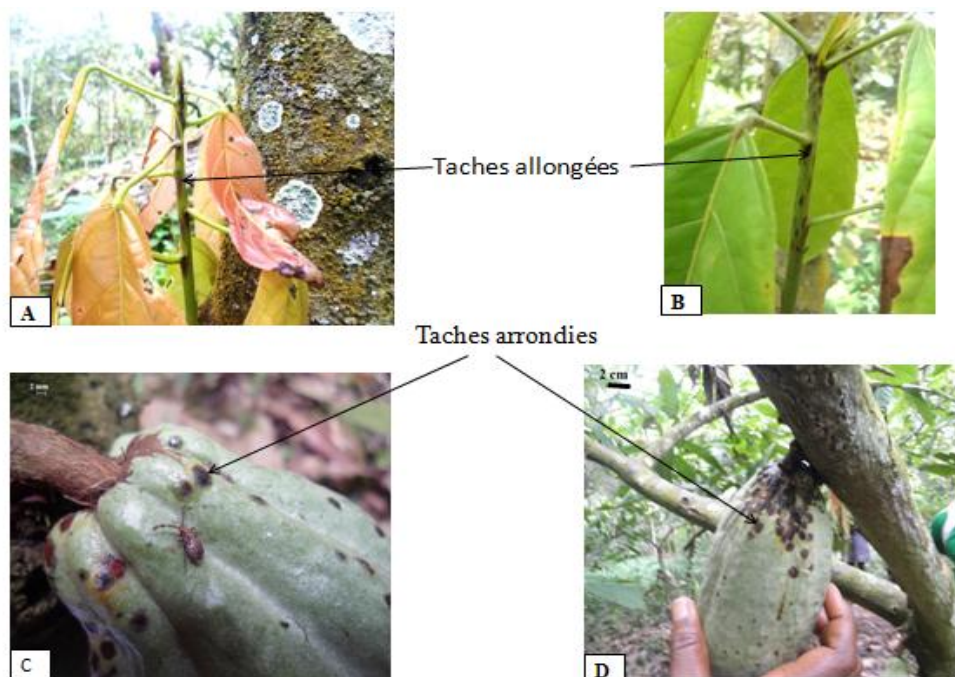
Les adultes et les larves de *S. singularis* trouvent sur les cacaoyers plus âgés un environnement plus adapté à leur mode de vie, notamment de nombreux refuges dans les anfractuosités de l'écorce qui leur permettent de fuir la lumière et d'échapper à leurs prédateurs. Toutes les parties du cacaoyer, à l'exception des feuilles et des racines, sont attaquées par cette



espèce de miride. Les fruits (chérelles et cabosses), les rameaux et les jeunes gourmands sont les organes préférés des mirides (Youdeowei, 1973 ; Babin, 2009). Deux types de dégâts sont occasionnés par *S. singularis* sur le cacaoyer.

Le premier dégât, qualifié de primaire, est l'action directe de la piqûre. *Sahlbergella singularis* pique les différents organes du cacaoyer pour sucer la sève. Au moment de la piqûre, l'insecte insère son stylet dans les tissus végétaux ; il y injecte sa salive toxique qui induit des necroses autour du point de piqûre. Les blessures occasionnées entraînent la formation de taches rondes sur les cabosses, mais allongées sur les branchettes (figure 5). Les piqûres sur les chérelles entraînent leur dessèchement, leur déformation et parfois leur chute précoce. Quant aux cabosses, elles poursuivent généralement leur maturation (Babin, 2009 ; Sarfo, 2013 ; Yédé, 2016). En cas d'attaque massive, les feuilles brunissent et plus tard on assiste à une défoliation complète du cacaoyer attaqué, lorsque les larves qui s'alimentaient sur les cabosses sont contraintes de se déplacer à l'extrémité des branches pour se nourrir aux détriments des jeunes pousses (Babin, 2009 ; Mahob, 2013).

Les dégâts secondaires de *S. singularis* sont dus à l'envahissement des parties piquées par les champignons cryptogamiques tels que *Calonectria rigidiuscula* (Berk. & Broome) Sacc. 1999 (Williams, 1953), *Fusarium* sp. et *Lasiodiplodia* sp (Adu-Acheampong *et al.*, 2012). Ces champignons jouent un important rôle dans la formation des chancres, qui s'accumulent sur les branches et le tronc des arbres qu'ils fragilisent. L'action combinée des piqûres de mirides et des champignons conduit à une dégradation partielle ou totale de la cacaoyère et à une réduction du potentiel de production des arbres (Babin, 2009 ; Kouamé *et al.*, 2014 ; Kouamé *et al.*, 2015).



**Figure 5 :** Dégâts de mirides sur branchettes (A et B) et sur cabosses (C et D) de cacaoyer (photos Mahot).

### I.3.5. Plantes hôtes alternatives de *S. singularis*

*Sahlbergella singularis* est une espèce oligophage, qui se nourrit principalement aux dépens de plantes ligneuses, arbustives ou arborées, de l'ordre des Malvales et plus précisément des familles des Sterculiaceae, des Malvaceae, des Tiliaceae et des Bombacaceae. Le tableau II fournit la liste des plantes hôtes alternatifs de *S. singularis* proposée par Entwistle (1972) et Padi *et al.* (1996). En 1996, au Ghana, des larves et des adultes de *S. singularis* ont été découverts sur des fruits de *Desplatsia dewevrei* (De Wild & Th. Dur.). Ce petit arbre de la zone forestière d'Afrique tropicale appartient à la famille des Malvaceae et à la sous-famille des Grewioideae (Hinsley, 2008). Les espèces cultivées de colatiers, principalement *Cola nitida* (Vent.) Schott & Endl., 1832 et *C. acuminata* (P. Beauv.) Schott & Endl., 1832, sont régulièrement associées aux cacaoyères et certains auteurs supposent que cette association aurait pu contribuer à l'introduction et à la dispersion des mirides dans l'ensemble des zones de culture du cacaoyer en Afrique (Piart, 1977).

**Tableau II :** Liste des plantes hôtes alternatifs de *Sahlbergella singularis* d'après Entwistle (1972) et Padi *et al.*, (1996) ; nomenclature mise à jour selon la classification phylogénétique Hinsley, (2008)

Famille	Sous-famille	Nom scientifique	Pays
Malvaceae	Brownlowioidea	<i>Berrya ammonilla</i> Roxb.	Sierra Leone, Ghana
	Bombacoideae	<i>Bombax buonopozense</i> P.Beauv.	République du Congo
		<i>Ceiba pentandra</i> (L.) Gaertn.	Ghana, Cameroun, République du Congo
	Sterculioideae	<i>Cola acuminata</i> (P. Beauv.) Schott & Endl.	Nigeria, Ghana
		<i>Cola diversifolia</i> De Wild. & T.Durand	République du Congo
		<i>Cola gigantea</i> A. Chev. var. <i>glabrescens</i>	Ghana
		<i>Cola lateritia</i> K. Schum. var. <i>maclaudi</i>	Ghana
		<i>Cola millenii</i> K. Schum	Côte d'Ivoire, Ghana
		<i>Cola nitida</i> (Vent.) Schott. & Endl.	Nigeria
		<i>Sterculia foetida</i> L.	Ghana
	<i>Sterculia rhinopetala</i> K. Schum.	Ghana	
	Malvoideae	<i>Gossypium</i> sp.	Ghana
	Dombeyoideae	<i>Nesogordonia papaverifera</i> (A. Chev.) Capuron	Ghana
	Byttnerioideae	<i>Theobroma bicolor</i> Bonpl.	Ghana
		<i>Theobroma microcarpum</i> Mart.	Ghana
		<i>Theobroma speciosum</i> Willd. ex Spreng.	Ghana
	Grewioideae	<i>Desplatsia dewevrei</i> De Wild & Th. Dur.	Ghana

### I.3.6. Impact économique des mirides

A l'exception des îles Caraïbes, partout où s'est développée la cacaoculture, les dommages causés par les punaises représentent l'un des principaux facteurs limitant de sa production. Au Cameroun, leur importance économique est telle que ces hémiptères ont été déclarés fléau national

et toute une structure de lutte phytosanitaire a été créée en 1962 pour limiter leur incidence. Il s'est agi de la Lutte Phytosanitaire AntiCapside (LPAC) (Mbondji, 2010). L'importance économique des mirides s'est accrue au fur et à mesure que la culture du cacao s'étendait et que le continent africain prenait une place prépondérante dans la production mondiale. En 1953, les pertes dues aux mirides étaient estimées à 25% au Ghana, à 30% au Nigeria et dans les années 60 à 30% en Côte-d'Ivoire (Lavabre, 1977a). Dans plusieurs régions du Cameroun, l'activité cacaoyère s'est imposée comme principale source de revenus des ménages. Pourtant, avec une reprise timide du cours du cacao, les producteurs font face à de nombreuses difficultés parmi lesquelles figurent les dégâts causés par les mirides (Mbondji, 2010).

### **I.3.7. Moyens de lutte contre *Sahlbergella singularis***

Plusieurs méthodes de lutte sont utilisées pour réduire ce ravageur à un seuil de nuisance acceptable dans les plantations. Celles couramment utilisées sont : la lutte agronomique, la lutte génétique et la lutte chimique.

#### **I.3.7.1. Lutte agronomique**

La méthode agronomique consiste à mettre en pratique certaines techniques culturales. Il s'agit notamment :

- du nettoyage régulier des plantations pour éliminer les mauvaises herbes qui constituent des réservoirs de plusieurs insectes nuisibles ;
- de l'élimination des gourmands qui constituent les principaux sites de ponte des mirides ;
- d'éviter l'utilisation des plantes hôtes alternatifs des mirides comme arbre d'ombrage ;
- de la création temporaire de l'ombrage sur les jeunes plantes et de la maintenance d'un couvert végétal complet (Kouamé *et al.*, 2015 ; Babin, 2009).

Cependant, il convient de noter que le réglage de l'ombrage est une pratique assez délicate car un excès d'ombrage pourrait être à l'origine des maladies fongiques à l'instar de la pourriture brune (Nyassé *et al.*, 1999 ; Ndoumbè-Nkeng & Sache, 2003).

#### **I.3.7.2. Lutte génétique**

A ce jour, plusieurs études ont été faites en Afrique sur la lutte génétique contre les mirides. Au Nigeria, l'évaluation de l'attractivité ou non par certains génotypes de cacaoyers par la technique des microtests en laboratoire a permis de déceler l'existence de clones résistants aux attaques de mirides. Les clones locaux, certains hybrides et certains clones sélectionnés testés se sont montrés moins attractifs vis-à-vis des mirides (Anikwe *et al.*, 2009a). En Côte-d'Ivoire, Sounigo *et al.* (2003) ont évalué la sensibilité des différents clones de cacaoyer vis-à-vis des



mirides. Les clones parentaux T79/501, UPA402, NA32, PA150 et T60/887 ont révélé, au laboratoire, leur résistance vis-à-vis de *Sahlbergella singularis* (N'Guessan *et al.*, 2010b). Au Cameroun, les travaux de sélection des clones de cacao ont débuté avec la création de la station de Nkoemvone en 1949. Les microtests faits en laboratoire ont permis de déceler que le clone Na33 est hautement attractif vis-à-vis de *Sahlbergella singularis*, alors que les clones ICS100, IFC100, Sca12 et Na32 le sont peu (Badegana *et al.*, 2004). Récemment, quelques efforts consentis dans la génétique du cacaoyer, par l'utilisation des techniques de sélection ont permis de déceler de nouveaux clones de cacao résistants aux mirides (Efombagn *et al.*, 2011).

### **I.3.7.3. Lutte chimique**

Les traitements insecticides demeurent le principal moyen de lutte contre les mirides et les périodes d'application tiennent compte des variations saisonnières des populations de ces déprédateurs. Cependant, pour des raisons d'économie évidentes et d'équilibre biologique, ces traitements ne devraient être entrepris que lorsqu'ils sont indispensables, c'est-à-dire dans des zones où une pullulation d'insectes menace effectivement de se déclencher (Lavabre, 1970). Aujourd'hui, les traitements chimiques s'avèrent inefficaces dans la plupart des régions productrices de cacao, du fait non seulement des changements climatiques, qui sont intervenus depuis quelques années et qui ont entraîné des déplacements des pics de pullulation dans le temps, mais également du développement rapide des formes de résistances (Kouamé *et al.*, 2015).

Depuis les années 1940, de nombreux insecticides appartenant aux familles des organochlorés, des organophosphorés, des carbamates, des pyréthrinoïdes et des nicotinoïdes, ont été utilisés dans la lutte contre les mirides. Il s'est agi, par exemple, du lindane, du dichlorodiphényl-trichloroéthane (DDT), de l'endosulfan, du malathion, du dioxocarb, du promecarb, du propoxur, de la diméthrine, de la cyperméthrine, de la bifenthrine, de la deltaméthrine, de la nicotine et de l'imidacloprid (Sarfo, 2013). A la suite de plusieurs travaux visant à évaluer l'efficacité et à vérifier certaines propriétés désirables des insecticides au rang desquelles l'innocuité vis-à-vis de l'utilisateur et du consommateur, la volatilité du produit, la spécificité aux mirides et la non rémanence des résidus dans les fèves (Sarfo, 2013), il s'est avéré qu'un bon nombre des molécules bien qu'efficaces ne satisfont pas les critères recherchés mais favorisent même l'émergence de parasites plus résistants.

En effet, mal utilisés, les insecticides à large spectre d'action peuvent entraîner dans certains cas la rupture des équilibres biologiques dans les plantations (Nguyen Ban, 1977). L'usage massif d'une molécule entraîne souvent l'apparition de populations de mirides résistantes, ce qui occasionne dans bien des cas un renforcement des traitements insecticides, préjudiciable à l'environnement et à la santé des hommes (Babin, 2009).

Au Cameroun, la filière cacao a, au cours des années 1980, constitué l'une des mamelles nourricières qui finançait le fonctionnement des institutions du pays. Après cette décennie, la production cacaoyère a baissé de manière drastique ; l'une des principales causes de ce déclin a été le désengagement de l'Etat vis-à-vis du secteur agricole et sa libéralisation. En quelques années, l'assistance matérielle et technique apportée aux planteurs par la Société de Développement du Cacao (SODECAO) et par l'Office National de Commercialisation des Produits de Base (ONCPB) a été interrompue. Depuis lors, la lutte anti-miride est intégralement à la charge des planteurs qui, malheureusement, n'ont généralement ni les connaissances techniques ni les moyens financiers pour la mener à bien (Sonwa *et al.*, 2002 ; Sonwa *et al.*, 2005 ; Sonwa *et al.*, 2008). Par conséquent, la lutte chimique contre les mirides a montré ses limites au Cameroun.

#### **I.3.7.4. Lutte naturelle à base d'extraits de plantes**

Il existe un grand nombre de produits obtenus d'une seule plante ou d'une association de plantes, qui offrent une alternative dans la lutte contre les maladies et ravageurs des plantes en jouant un rôle répulsif ou toxique. C'est l'exemple de l'ail et du piment utilisés seuls ou en association ; ils sont efficaces contre un certain nombre d'insectes ravageurs de cultures tels que les chenilles des crucifères et la mouche de chou (Weill et Duval, 2009). Depuis plus d'une trentaine d'années, les effets antiparasitaires des extraits de graines du neem, *Azadirachta indica*, ont été largement étudiés à travers le monde (Bélanger & Musabyimana, 2008). Ces extraits ont révélé leur efficacité dans le contrôle de plus de 400 espèces d'arthropodes nuisibles et de certaines maladies des cultures. Les dérivés de graines de neem ont montré un effet positif sur le comportement et la physiologie du coléoptère *Cosmopolites sordidus* Germar, 1824 (Musabyimana *et al.*, 2001). Au Ghana, Adu-Acheampong (1997) a trouvé une efficacité de plus de 80% des extraits de graines de neem au laboratoire sur *D. theobroma*. Au Cameroun, Mboussi *et al.* (2018) ont démontré les effets répulsif et insecticide du neem vis-à-vis de *S. singularis*.

#### **I.3.7.5. Lutte biologique**

Tous les organismes vivants peuvent subir l'action des parasites, pathogènes et des prédateurs. Ces ennemis naturels sont en partie responsables de la régulation naturelle des populations d'insectes et peuvent intervenir dans la lutte biologique. Cette lutte est l'utilisation des parasites/pathogènes et des prédateurs pour maintenir la population d'un autre organisme en deçà du seuil de nuisance (Debach, 1964). En d'autres termes, c'est l'utilisation, par l'homme, d'un organisme vivant pour supprimer ou contrôler les populations d'un autre organisme vivant donné en le rendant moins dangereux (Lavabre, 1970; Eilenerg *et al.*, 2001 ; Lazarovists *et al.*, 2007). Ces organismes vivants peuvent être des virus, des bactéries, des nématodes, des insectes ou des champignons.

Les champignons pathogènes des insectes sont particuliers dans ce sens que, contrairement aux autres, ils n'ont pas toujours besoin d'être ingérés par l'hôte pour agir mais ils peuvent directement l'envahir par sa cuticule et l'infecter. Ils sont considérés comme des agents de lutte biologique prometteurs pour contrôler des pestes ; ils sont intéressants dans la mesure où ils peuvent devenir une alternative à la lutte chimique (Clarkson & Charnley, 1996; Shah & Pell, 2003; Maniania *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2008). Dans les conditions appropriées, les champignons entomopathogènes sont capables de causer une épizootie au sein des insectes au point d'en éliminer les populations (Tanada & Kaya, 1993).

La classification des champignons entomopathogènes est généralement basée sur leur cycle de vie, leurs caractéristiques morphologiques et leurs caractéristiques moléculaires. Ces organismes appartiennent le plus souvent aux phylums des Zygomycètes, des Ascomycètes, des Basidiomycètes et des Chytridiomycètes (Castrillo *et al.*, 2005). Dans l'ensemble, leurs cycles de vie sont assez complexes avec des stades de développement asexués et des stades sexués. Toutefois, certains des champignons entomopathogènes manquent d'un stade sexué connu et, de ce fait, ne sont considérés que comme des formes asexuées. Ces champignons sont classés parmi les Deutéromycètes dits champignons imparfaits (Mohammadbeigi, 2012).

Plus de 700 espèces de champignons, appartenant à près de 90 genres sont connues comme pathogènes des insectes. Parmi les champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, 1912, *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin, 1883 et *Paecilomyces fumosoroseus* Wize Brown & Smith, 1929 (Ascomycota: Eurotiales) sont plus connus et largement utilisés dans la lutte biologique contre des ravageurs (Wraight *et al.*, 2000 ; Feng *et al.*, 2004 ; Pu *et al.*, 2005). Dans la suite de ce texte, nous nous concentrerons sur la littérature concernant *B. bassiana* et *M. anisopliae* qui font l'objet de notre travail.

### ➤ **Les champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae***

Les champignons, *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*, sont des organismes anamorphes, c'est-à-dire qui se reproduisent de manière asexuée. Ils sont cosmopolites avec un large spectre d'actions (Roy *et al.*, 2006). Ces deux espèces appartiennent à la classe des Hyphomycètes, à l'ordre des Clavicipitaceae et à la famille des Hypocréales. Depuis plusieurs années, des pesticides biologiques commercialisés ont été développés à partir de ces deux champignons. Il s'agit, par exemple, de Naturalis-L, de Proecol, de Boverin, de Boverol et de BotaniGard faits à base de *B. bassiana* et de Metaquino, de Bio-Path et de Cobican faits à base de *M. anisopliae* (Butt & Copping, 2000).

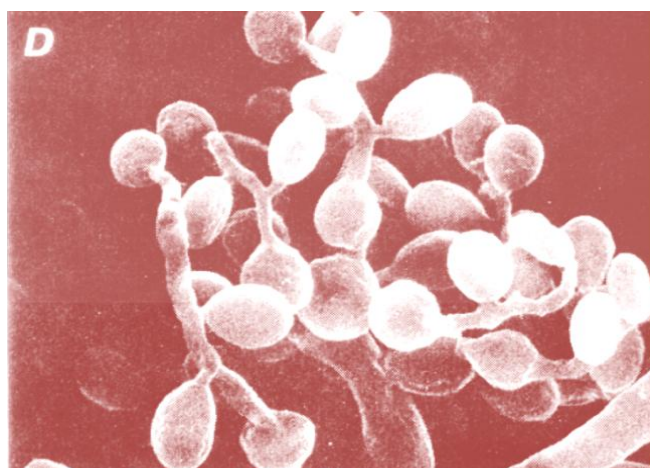
- ***Beauveria bassiana***

Originellement connu sous le nom de *Tritirachium shiotae* (Kuru) Langeron, 1947, ce champignon a été renommé par l'italien Agostino Bassi en 1835 lors de ses recherches sur la muscardine blanche des vers (Ainsworth, 1956). Découvert il y a près de 200 ans, *B. bassiana* présente plusieurs caractéristiques avantageuses qui font de lui l'un des principaux microorganismes dans la recherche des pathologies fongiques des insectes (Steinhaus, 1963). Il dispose d'un large spectre d'insectes hôtes chez lesquels il cause une mycose, la muscardine blanche, qui envahit l'hôte de l'intérieur vers l'extérieur (Mohammadbeigi, 2012). Ce champignon peut être isolé à partir des insectes ou du sol à l'aide des milieux de culture (Beilharz *et al.*, 1982).

*Beauveria bassiana* est considéré comme l'un des champignons les plus entomopathogènes pour plusieurs raisons :

- il a une distribution cosmopolite ;
- il a une capacité à infecter tous les stades de développement de ses hôtes ;
- il est plus polyphage, capable d'infecter un plus grand nombre d'insectes cibles comparativement aux autres Ascomycètes.

De nature poudreuse, *B. bassiana* produit des conidies de couleur blanche à jaunâtre soutenues par de longs filaments transparents, cloisonnés et tubulaires avec un diamètre de 2,5 à 25 µm appelés hyphes (Sabbahi, 2008). Les conidies, dont le diamètre varie de 2 à 4 µm, sont unicellulaires, de forme globuleuse ou ovale ; elles germent habituellement en forme de coude en zigzag comme le montre la figure 6 (Larone, 2002).



**Figure 6 :** Aspect des conidiospores de *Beauveria bassiana* en microscopie à balayage électronique (De Kouassi, 2001).

- ***Metarhizium anisopliae***

*Metarhizium anisopliae* est l'un des champignons entomopathogènes les plus étudiés et appliqués contre les insectes en agriculture et ceux qui sont vecteurs de maladies humaines (Alston *et al.*, 2005 ; Lazzarini *et al.*, 2006). Initialement connu sous le nom de *Entomophthora anisopliae*,

ce champignon a été décrit pour la première fois à partir des larves infectées de *Anisoplia austriaca* Herbst (Coleoptère: Scarabaeidae) en 1879 par Elie Metchnikoff. Il a été renommé *Metarhizium anisopliae* par Sorokin en 1883.

*Metarhizium anisopliae* est à l'origine de la muscardine verte des insectes. Comme *B. bassiana*, ce champignon est pathogène pour un grand nombre d'espèces d'insectes (Mohammadbeigi, 2012). En 1993, l'Environmental Protection Agency (EPA) a enregistré ce champignon pour la lutte biologique contre les mouches et les cafards (Mohammadbeigi, 2012). Il est facilement identifiable par ses chaînes de colonies blanches à l'état jeune et vertes à vert foncé après sporulation et maturation. Ses conidiophores sont simples ou doublés (figure 7). La taille des conidies varie de 4,8 à 7,2  $\mu\text{m}$  de long et de 1,6 à 3,5  $\mu\text{m}$  de large (Mohammadbeigi, 2012). Il existe deux variétés de *M. anisopliae* dont la différence se situe au niveau de la taille des conidies : la forme *M. anisopliae* var. *anisopliae* dont les conidies sont environ deux fois plus longues (10 à 14  $\mu\text{m}$ ) que celles de *M. anisopliae* var. *majus* qui a des conidies de 5 à 8  $\mu\text{m}$  de long (Sabbahi, 2008 ; Mouatcho, 2010 ; Mohammadbeigi, 2012).



**Figure 7** : Aspect des conidies de *Metarhizium sp.* en microscopie optique (Benserradj, 2014).

#### ➤ **Mode d'action de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae***

*Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* présentent des cycles de vie dimorphes. Si l'insecte hôte est absent, ces champignons adoptent une vie végétative asexuée (phase saprophyte) mais en général, lorsque l'insecte hôte est présent dans le milieu, ils deviennent pathogènes. Bien qu'ils puissent infecter leurs hôtes par ingestion (Mohammadbeigi, 2012), dans la plupart des cas, ils le font par voie percutanée. Le processus d'infection se fait en quatre étapes (Clarkson & Chamley, 1996 ; Mohammadbeigi, 2012) :

- l'adhésion ou l'attachement à l'hôte ;
- la germination ou la différenciation des spores ;
- la pénétration ;
- la dissémination.

**L'adhésion**, première étape du processus de l'infection est caractérisée par un mécanisme de reconnaissance et de compatibilité des spores avec les cellules tégumentaires de l'insecte hôte (Tanada & Kaya, 1993). Cette étape se scinde en deux phases distinctes. Au cours de la première phase, dite passive, les spores entrent en contact avec l'insecte à l'aide d'agents naturels tels que le vent et l'eau. Toutefois, les spores peuvent aussi entrer dans l'hôte par voie buccale et par voie respiratoire (Clark *et al.*, 1968 ; Mohammadbeigi, 2012 ; Benserradj, 2014). La seconde phase est active et caractérisée par la production d'un mucilage hygroscopique par les spores. Ce mucilage crée une modification épicuticulaire, qui aboutit à la germination des spores, et un environnement favorable aux enzymes libérées par ces dernières (Boucias *et al.*, 1991).

**La germination** dépend des conditions environnantes de température et d'humidité, des conditions physiologiques de l'hôte (composition biochimique de sa cuticule) et de la susceptibilité de ce dernier qui peuvent la favoriser ou l'inhiber (Benserradj, 2014). Cette étape est caractérisée par la différenciation des spores avec production de tubes germinatifs encore appelés appressoria. Ces structures terminales servent de points d'ancrage et favorisent la pénétration des spores.

**La pénétration** dans l'hôte est généralement faite à travers les orifices naturels, la cuticule ou bien par l'ingestion (Sabbahi, 2008 ; Benserradj, 2014). Elle a lieu grâce à la combinaison de pressions mécaniques et de processus enzymatiques (Goettel *et al.*, 1989). Les hyphes fongiques secrètent des enzymes extracellulaires telles que les protéases, les lipases et les chitinases, qui attaquent la cuticule et permettent aux spores de la franchir et de se développer dans le corps de l'insecte hôte (Charnley & St Leger, 1991).

**La dissémination** intervient lorsque les spores ont traversé avec succès la cuticule de l'insecte. La colonisation de l'hôte a lieu lorsque le champignon parvient à surmonter les mécanismes immunitaires de défense de l'insecte puis envahit l'hémolymphe. Les spores entrent dans le système lymphatique de l'insecte et envahissent l'hémocœle. Le champignon se multiplie à l'intérieur de tous les organes et s'accroît sous forme de blastopores (Sabbahi, 2008 ; Benserradj, 2014).

La mort des insectes infectés survient après la colonisation de l'hémolymphe qui se produit, en principe, au bout de trois à six jours lorsque les conditions sont favorables. Toutefois, le temps nécessaire pour que ces champignons tuent leur hôte dépend de la durée des différentes étapes (Mohammadbeigi, 2012). De manière générale, la réussite de l'infection dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels on peut citer les conditions ambiantes, les caractéristiques des isolats utilisés, les caractéristiques et le stade de développement de l'hôte. Lorsque les conditions de température et d'humidité sont favorables, les spores et les hyphes émergent à la surface de l'hôte après sa mort (Mouatcho, 2010 ; Mohammadbeigi, 2012).

### **I.3.7.6. Lutte éthologique et piégeage olfactif**

Cette méthode de contrôle est un moyen de lutte sémiachimique car les organismes vivants produisent des substances qui interviennent dans la communication entre les individus de la même espèce ou d'espèces différentes. Lorsque la médiation est interspécifique, elle utilise des substances allélochimiques telles que les kairomones, les allomones et les synomones (Briand, 2009 ; Heuskin, 2011 ; Sarfo, 2013). Les kairomones sont des substances produites ou acquises par un organisme, qui induisent une réponse comportementale ou physiologique favorable au récepteur et non à l'émetteur. Les allomones sont bénéfiques à l'émetteur et non à l'organisme récepteur ; quant aux synomones, le récepteur et l'émetteur en profitent puisque les interactions sont mutuelles. Lorsque la communication est intraspécifique, elle recourt aux phéromones (Heuskin, 2011). Celles-ci sont définies comme des substances sécrétées par un individu A et qui, reçues par un individu B de la même espèce, provoquent une réaction spécifique, un comportement ou une modification biologique chez ce dernier (Briand, 2009). Deux types de phéromones interviennent dans la communication chimique des insectes. Il s'agit des phéromones incitatrices qui agissent sur le comportement, c'est-à-dire des phéromones d'agrégation, d'alarme et sexuelles d'une part et, d'autre part, des phéromones modificatrices qui agissent sur la biologie, par exemple, sur la synchronisation de la maturité des individus au sein d'une population (Cork, 2004). Les phéromones sexuelles sont généralement produites par des femelles dans le but d'attirer les mâles de leur espèce. Ce sont des substances organiques, d'un ou de plusieurs composé(s) ou groupe(s) de composés associés ou non, dont les groupements fonctionnels sont des esters, des aldéhydes, des alcools ou des cétones (Cork, 2004).

L'identification des phéromones d'insectes a donné l'impulsion pour leur utilisation dans la surveillance et le contrôle des ravageurs d'importance économique. Celle des phéromones de mirides a conduit à la surveillance de l'incidence des ravageurs de cultures et à la détermination du seuil d'infestation (Smith *et al.*, 1991) ainsi qu'à l'implémentation du piégeage de masse et de la confusion sexuelle (Kakizaki, 2004 ; Sarfo *et al.*, 2007). L'emploi des phéromones sexuelles, envisagé pour remplacer les insecticides synthétiques toxiques afin de réduire les risques causés à l'environnement, exige l'utilisation d'un piège pour les capturer. Les phéromones sexuelles ont pour objectif de perturber le comportement de recherche de partenaire et d'accouplement (Briand, 2009) ; elles sont utilisées pour trois stratégies de lutte bien différentes : le monitoring, le piégeage de masse et la confusion sexuelle (Mahob, 2013; Sarfo, 2013).

#### **➤ Monitoring**

Le monitoring, ou surveillance des populations d'insectes, a généralement trois objectifs: détecter la présence d'organismes nuisibles envahissants, estimer leur densité relative dans un site spécifique donné et indiquer la première apparition de l'espèce nuisible dans une zone donnée

(Heuskin, 2011 ; Sarfo, 2013). Cette surveillance des populations d'insectes nuisibles permet de savoir si le seuil critique d'infestation de la plantation est atteint puis d'orienter et d'optimiser les périodes de traitements insecticides (Mahob, 2013).

La réalisation des objectifs du contrôle des mirides dépend d'un piégeage efficace du ravageur qui est influencé, notamment par la formulation de la phéromone synthétique, les diffuseurs de phéromones, la gamme active du leurre, la forme du piège et le caractère saisonnier de l'insecte (Mahob, 2013 ; Sarfo, 2013). Le monitoring est considéré réussi lorsque la substance attractive est libérée à un taux constant et pendant une longue période ; toutefois, cette réussite dépend aussi du diffuseur utilisé pour les formulations de phéromones. Des diffuseurs inappropriés provoquent la libération trop lente ou trop rapide des composants chimiques et peut empêcher que la cible soit atteinte (Sarfo, 2013).

#### ➤ **Piégeage de masse**

Le piégeage de masse d'un ravageur vise à réduire directement sa population et, indirectement, les dégâts du parasite en champ et dans les produits stockés à un seuil économiquement acceptable (Downham *et al.*, 2004). Il s'agit d'une action de commande mécanique qui consiste à éliminer un grand nombre de parasites dans une zone après l'étape de surveillance. La méthode directe a été appliquée dans le contrôle de plusieurs ravageurs tels que les lépidoptères (Zhang *et al.*, 2002), les coléoptères (Allou *et al.*, 2006) et les diptères (Suckling *et al.*, 2007). L'optimisation du taux de mélange des composants phéromonaux, leur dosage et leur libération contribuent à la réussite du piégeage de masse en augmentant la compétitivité de l'attractif par rapport aux sources naturelles d'attraction (Sarfo, 2013).

L'écologie, la biologie du ravageur, ainsi que la disposition des cultures peuvent d'une manière ou d'une autre déterminer le succès ou l'échec du piégeage de masse. Plusieurs méthodes permettent d'évaluer le succès ou l'efficacité du piégeage de masse ; il s'agit, par exemple, du déclin des populations prises dans les pièges lors du monitoring (Suckling *et al.*, 2007 ; Sarfo, 2013) et de la réduction des dommages sur les cultures (Zhang *et al.*, 2008 ; Allou *et al.*, 2006 ; Suckling *et al.*, 2007). Comme pour le monitoring, le piégeage de masse est également affecté par la forme du piège, la plus intéressante étant celle qui retient un plus grand nombre d'insectes.

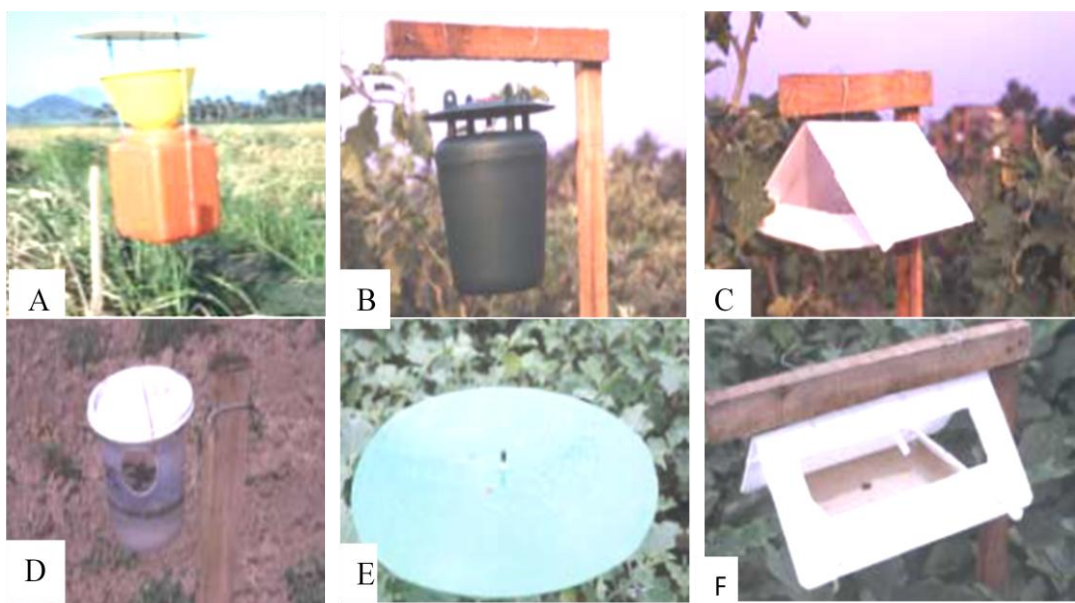
#### ➤ **Confusion sexuelle**

La confusion sexuelle est une approche qui consiste à contrôler les populations des bio-agresseurs des cultures en perturbant leur comportement de reproduction (Cardé & Minks, 1995 ; Cork, 2004). Le phénomène d'attraction du mâle par une phéromone sexuelle spécifique à son espèce est la base de cette lutte. La confusion sexuelle correspond à une perturbation de l'orientation du mâle dans sa recherche de partenaire (Sanders, 1997). Plusieurs hypothèses des mécanismes mis en jeu sont proposées telles que la compétition entre une femelle et une source



synthétique, le camouflage du faisceau phéromonal naturel, le déséquilibre sensoriel ou l'habituation et l'adaptation sensorielle (Miller *et al.*, 2006). Toutefois, l'occupation du mâle à la poursuite de fausses traces phéromonales serait le premier comportement qui entre en jeu dans l'efficacité de la confusion sexuelle. En général, le faisceau phéromonal de la femelle se mêle à la phéromone synthétique ; le mâle se trouve alors confondu et réalise un vol orienté ; il poursuit le faisceau synthétique émis par un diffuseur sans pouvoir retrouver sa partenaire, ce qui limite les accouplements (Sarfo, 2013). Le succès de ce mécanisme dépend de trois facteurs. Premièrement, l'attractivité de chaque diffuseur doit être au moins équivalente à celle d'une femelle en appel pour entrer en compétition avec les sources naturelles. Deuxièmement, il doit y avoir suffisamment de diffuseurs pour que la probabilité de rencontre d'une femelle soit nettement inférieure à celle de rencontrer un diffuseur ; enfin troisièmement le diffuseur doit être suffisamment attractif pour occuper longtemps le mâle en direction ou face à la source afin de diminuer la probabilité de rencontrer un faisceau phéromonal naturel (Sanders, 1997).

Pour une utilisation efficace des systèmes à base de phéromones dans le suivi et la lutte contre les insectes ravageurs de culture, il importe que le piège soit bien conçu. En effet, un piège est un dispositif de détection et de surveillance continue des insectes. Il capture une large gamme d'espèces d'insectes dans leurs stades mobiles, c'est-à-dire les larves et/ou les adultes qui rampent ou volent. Au fil des années, de nombreux modèles de pièges ont été mis au point et chacun présentant des avantages et des inconvénients. La figure 8 montre les photos de quelques pièges selon Cork (2004).



**Figure 8** : Quelques formes de pièges : A= Piège à entonnoir ; B= piège à seau ; C= piège triangulaire ; D= piège lobos ; E= piège à disque collant; F= piège triangulaire ouvert (Cork, 2004).

Dans un cas idéal, un piège devrait permettre une entrée facile aux insectes cibles et perturber, le moins possible, l'odeur de la phéromone (Sarfo, 2013). L'augmentation de la zone d'entrée accroît l'efficacité du piège (Cork *et al.*, 2001). Dès l'entrée des insectes dans le piège, ils doivent être capturés et tués. Certains modèles de pièges pouvant laisser les insectes s'échapper, il est nécessaire d'utiliser une substance destructrice telle que les insecticides ou des mixtures nocives (Cork *et al.*, 2001). D'autres pièges possèdent plutôt des surfaces collantes pour retenir les insectes. Dans ce cas, la capacité de la matière collante à retenir les insectes est capitale pour l'efficacité du piège. En général, les adhésifs sont spécifiques à chaque type d'insectes et doivent être résistants à la lumière du soleil et hydrofuges (Cork, 2004). Les pièges collants sont plus efficaces lorsque les populations de ravageurs sont de faible taille car ils deviennent saturés par les insectes lorsque leur pression démographique est forte (Cork *et al.*, 2001 ; Cork, 2004). Pour déterminer l'aptitude du piégeage des mirides de cacaoyers, trois modèles de pièges à phéromones ont été testés par le Cocoa Research Institute of Ghana (CRIG). Il s'agit des pièges collants triangulaires et rectangulaires conçus par le Natural Resources Institute (NRI) et le CRIG, et du piège en entonnoir. Les pièges collants se sont avérés plus efficaces dans la capture des mirides comparés au piège en entonnoir (Padi & Sarfo, 2002). La disposition des pièges ainsi que leur hauteur dans la canopée constituent également un facteur très important de leur efficacité dans la capture des insectes (Edde *et al.*, 2005 ; Sarfo *et al.*, 2007 ; Sarfo, 2013).

En résumé, on peut retenir de cette littérature que les mirides sont d'importants ravageurs des cultures en général et, en particulier, du cacaoyer dans le monde. Les pertes économiques qu'ils causent en Afrique ont motivé, dès les années 1950, une politique volontariste des gouvernements en matière de lutte phytosanitaire. Depuis plusieurs années, la lutte contre ces ravageurs a été presque uniquement réalisée par l'utilisation des pesticides chimiques de synthèse, systémiques et de contact. Malheureusement l'emploi abusif et intempestif de ces produits chimiques présente de nombreux inconvénients. L'utilisation régulière de pesticides chimiques peut entraîner de manière fâcheuse une élimination des ennemis naturels (prédateurs et parasites qui servent d'agents de contrôle naturel des populations d'insectes ravageurs) et un développement d'une entomofaune résistante. De plus, ces insecticides chimiques sont, par leur effet rémanent, à l'origine de la pollution de l'environnement ; leurs résidus s'accumulent dans les eaux et, plus tard, dans les chaînes alimentaires exposant ainsi la santé humaine. Le souci de maintenir et même d'accroître le rendement en cacao-culture conduit à intégrer de nouvelles méthodes de gestion des ravageurs, qui sont respectueuses de l'environnement et de la santé humaine (Padin *et al.*, 2002 ; Hendrawan & Ibrahim, 2006 ; Mahdeshin *et al.*, 2009).

Depuis quelques décennies, un accent est porté sur le développement de nouvelles méthodes de lutte contre les mirides. Malheureusement, ces recherches ne sont guère assez avancées pour

proposer une réelle alternative à la lutte chimique. Tout de même, la lutte biologique et la lutte sémiachimique semblent représenter des stratégies durables pour l'environnement. C'est dans cette optique que nous avons opté de mener la présente étude pour tester la virulence de potentiels champignons entomopathogènes et pour évaluer l'utilisation des pièges à phéromones de différentes couleurs dans la réduction des populations de mirides.

Notre hypothèse de travail est qu'il est possible de contrôler efficacement les populations de mirides en cacaoculture par l'utilisation des champignons entomopathogènes et des pièges à phéromones colorés. Plus précisément, nous supposons que :

- certains isolats, par exemple, de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae* peuvent réduire significativement les populations mirides en laboratoire et en milieu réel ;
- les pièges à phéromones sont attractifs pour les mâles de *Sahlbergella singularis*. Une fois que ces insectes mâles sont attirés et capturés par les pièges, les taux d'accouplement et donc la taille de populations sont par ce fait réduits.

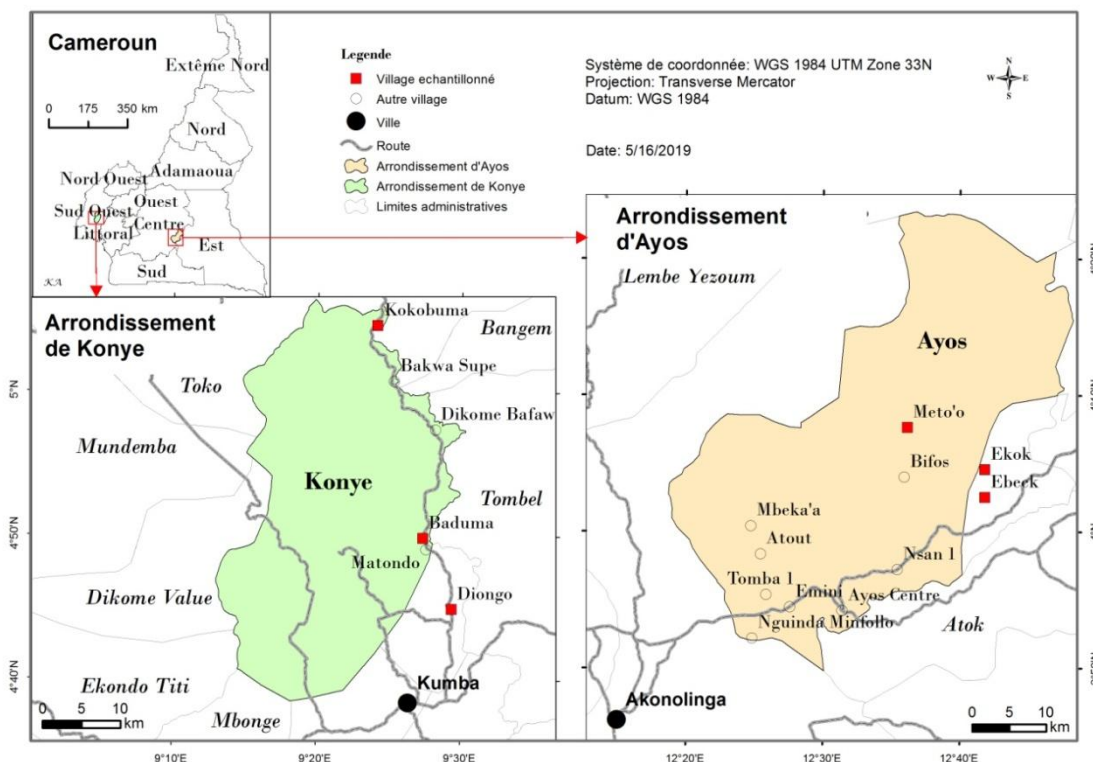
Pour vérifier nos hypothèses, nous nous sommes fixés l'objectif général de contribuer à l'amélioration de la lutte contre *S. singularis* grâce aux champignons entomopathogènes et à l'optimisation de l'attractivité des pièges à phéromones colorés vis-à-vis de *S. singularis*. Afin de répondre aux attentes de ce travail, nous avons défini quatre objectifs spécifiques :

- l'évaluation du pouvoir insecticide de trois isolats fongiques de *Beauveria bassiana* et de trois de *Metarhizium anisopliae* ;
- la mise au point et la sélection des formulations de biopesticides ;
- l'évaluation de l'attractivité et de la préférence des pièges à couleurs appâtés vis-à-vis de *S. singularis* ;
- la détermination de l'impact de ces pièges à phéromones sur la densité et les dégâts de *S. singularis* en milieu réel.

## **CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES**

## II.1. Sites d'étude

Le pouvoir entomopathogène des champignons a été testé au laboratoire de pathologie de l'Institut International d'Agriculture Tropicales (IITA) de Nkolbisson (11°5'N et 3°8'E), une banlieue de la ville de Yaoundé, dans le 7<sup>ème</sup> arrondissement du département du Mfoundi. Il a été testé dans les parcelles cacaoyères expérimentales de l'IITA pour des raisons logistiques et techniques (ressources humaines). L'attractivité des pièges à phéromones a été évaluée en champs dans deux localités appartenant aux grands bassins de production cacaoyère à savoir : Ayos dans la région du Centre et Konye dans le Sud-ouest du Cameroun (figure 9).



**Figure 9** : Carte de la localité de Konye dans le Sud-ouest et de celle d'Ayos dans le Centre.  
Source : ProCisa/IITA, 2016.

La localité d'Ayos (3°90'N, 12°52'E, 705m d'altitude) est située à 138 Km de Yaoundé. Elle se trouve dans le bassin du Nyong dont le climat équatorial est de type guinéen. Cette localité est sous l'influence d'une pluviométrie bimodale avec des précipitations annuelles qui varient de 1500 à 2000 mm en moyenne. En raison de son altitude relativement élevée, le climat y est frais et doux avec des moyennes de température variant de 24°C à 26°C et une humidité relative de 75% à 80% (Olivry, 1986). La localité d'Ayos est caractérisée par un climat à quatre saisons bien marquées: une petite saison sèche de juillet à août, une grande saison sèche de décembre à mars, une petite saison de pluies d'avril à juin et une grande saison de pluie de septembre à novembre (IRAD, 2008 ; Anonyme, 2016). En fonction de la diversité de ses conditions pédo-climatiques, Ayos se trouve dans la zone agro-écologique V d'après la subdivision faite par l'IRAD en 1996. Dans cette

zone, qui couvre tout le plateau sud camerounais, de Yaoundé à Yokadouma, d'Eboulawa à Ambam et Moloundou, pousse une végétation faite d'une forêt dense humide, semi-décidue et sempervirente, de type héli-ombrophile congolaise caractérisée par une certaine caducité périodique du feuillage des arbres (Olivry, 1986 ; IRAD, 2008). Le caractère semi-caducifolié de cette forêt est un trait dominant, avec des espèces arborescentes distinctives telles que les Sterculiacées (Olivry, 1986). Située dans le grand Sud-Cameroun, l'orographie d'Ayos montre, en général, un paysage composé de nombreuses petites collines séparées par des ruisseaux à débit lent et régulier. Les sols de type ferrallitique sont argileux et de couleur rouge (Olivry, 1986 ; Anonyme, 2016).

Quant à la localité de Konye (4°56'N, 9°28'E, 271 m d'altitude), elle est située à 116,71 km de Buea, en passant par Kumba dans le Sud-ouest Cameroun. Konye appartient à la zone agro-écologique IV ; elle se trouve dans le bassin de la Mémé sous l'influence d'un climat équatorial côtier de type monomodal à une saison pluvieuse avec des précipitations abondantes de 2500 à 4000 mm et une saison sèche parfois non existante, aux températures moyennes de l'ordre de 22,5°C en moyenne (Olivry, 1986 ; IRAD, 2008 ; Anonyme, 2016). L'humidité relative y est très élevée et varie entre 85% et 90% ; la végétation est de type forêt dense dans cette localité mais se transforme en mangrove au contact de l'océan. Cette zone présente également des pâturages à graminées gazonnantes ou stolonifères avec de nombreuses espèces qui évoquent celles des régions tempérées, ce qui leur confère un caractère subalpin (Olivry, 1986). Les sols, de types andosols bruns et eutrophes et situés sur ou dans les roches volcaniques, sont jeunes avec un profil homogène (Olivry, 1986). Ils sont très fertiles en raison du volcanisme fréquent dans cette aire géographique ; ils constituent par conséquent des terres arabes riches à haut potentiel agricole (Olivry, 1986 ; Anonyme, 2016).

La station de l'IITA de Nkolbisson à Yaoundé (3°51'N, 11°30'E, 760 m d'altitude) se trouve, comme Ayos, dans la zone agro-écologique V. La localité de Nkolbisson est sous l'influence d'un climat de type équatorial de transition à quatre saisons (Olivry, 1986) : une petite saison sèche de juillet à août, une grande saison sèche de décembre en mars, une petite saison de pluies d'avril à juin et une grande saison de pluies de septembre à novembre. A cause de son altitude relativement élevée (760m), le climat de Nkolbisson de type yaoundéen est frais et doux températures constantes et des précipitations variant entre 1500 et 3000mm. (IRAD, 2008 ; Anonyme, 2016).

## **II.2. Méthodologie**

### **II.2.1. Collecte des données géographiques et météorologiques des sites de l'étude**

Dans le cadre de ce travail, les données géographiques ont été collectées à l'aide du GPS (Global Positioning System) de marque Garmin (Garmin International, Inc, 1200 East 151<sup>st</sup> Street, Olathe, Kansas, 66062, USA). Les données climatiques nous ont été offertes gracieusement par le projet ProCISA, en charge de les collecter dans les grands bassins de production cacaoyère au Cameroun en vue d'évaluer l'impact de changements climatiques sur la productivité des cacaoyers.

### **II.2.2. Collecte et élevage des mirides**

Les mirides ont été localisés par examen minutieux à l'œil nu des différents organes de cacaoyer puis capturés à l'aide d'un pinceau dans la parcelle cacaoyère du Centre de Recherche de l'IITA-Cameroun, entre 6H30' et 10H30' du matin, en raison de leur forte activité à cette période de la journée (Bisseleua *et al.*, 2011 ; Mahob *et al.*, 2015). Une fois capturés, les spécimens ont été conservés dans des boîtes de dimension 9 x 7 x 1,5 cm<sup>3</sup>, contenant un segment de branchette fraîche de cacaoyer comme ressource alimentaire. Ces boîtes ont été préalablement perforées afin de permettre une aération de l'enceinte pendant le transport des mirides vers la salle d'élevage (insectarium) caractérisée par une température de 24,7 ± 0,9° C, une humidité relative (HR) de 64,9 ± 9,73% et une photopériode de 12:12 L.D (Babin *et al.*, 2008). Une fois à l'insectarium les larves collectées en champ sont transférées sur des cabosses de cacao mures et déposées dans les seaux en plastique tapissés de papier absorbant et aérés, de dimension 24x19x26 cm<sup>3</sup>.

L'élevage de mirides a été réalisé grâce au protocole mis au point par Babin *et al.* (2008), qui recommande une alternance des spécimens (larves et imagos) entre l'insectarium et le milieu naturel (parcelle cacaoyère). En effet, les femelles adultes ont été transférées des seaux vers les boîtes sus-décrites pendant 5 jours afin de leur permettre d'atteindre la maturité sexuelle. Pour la même raison, les mâles ont également été soumis à ce traitement pendant 2 jours seulement. A la maturité sexuelle, des couples adultes de mirides (mâle et femelle) ont été formés dans d'autres boîtes pour favoriser leur accouplement. Vingt-quatre heures post accouplement, chaque couple a été transféré en champs et mis en contact avec une cabosse saine. L'ensemble a été recouvert d'un manchon en tissu de mousseline (figure 10) pour confiner ces insectes sur la cabosse d'une part, et les protéger contre les prédateurs d'autre part. Seize jours après l'installation du dispositif, des visites journalières ont été effectuées pour rechercher des larves. Dès observation de celles-ci, la cabosse a été récoltée et ramenée à l'insectarium pour élever ces larves de mirides jusqu'au stade imaginal puis le cycle a recommencé. La ressource alimentaire (cabosse de cacao) a été remplacée tous les deux jours pour éviter des mortalités des mirides liées à la mauvaise qualité des aliments. Les larves de quatrième (L4) et de cinquième stades (L5) obtenues ont été utilisées pour les

travaux ultérieurs à cause de la vulnérabilité de celles des stades L1 à L3 et de la mobilité extrême des imagos.



**Figure 10** : Manchon de mousseline isolant un couple de mirides (mâle et femelle) sur une cabosse de cacao dans une cacaoyère (Photo Mahot).

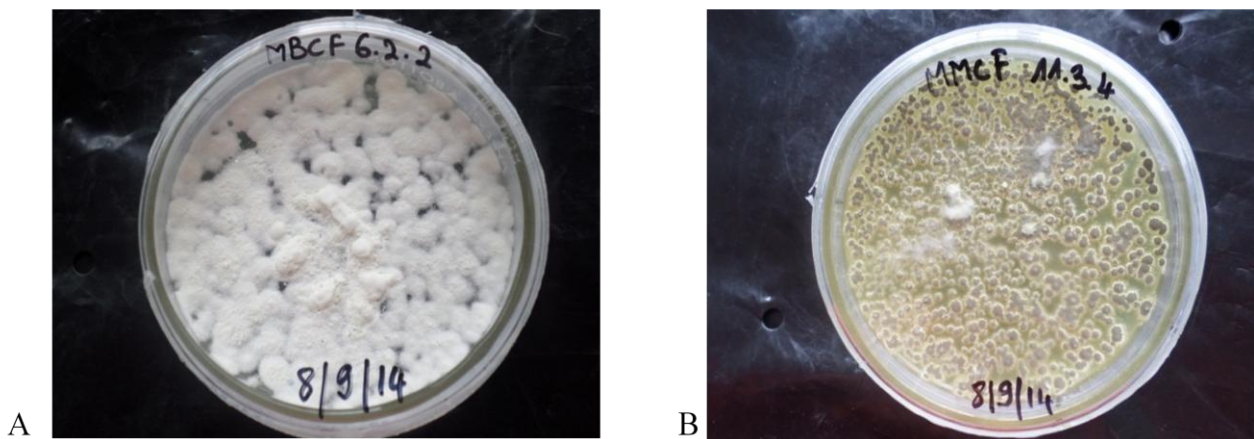
### **II.2.3. Ré-isolément de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae***

Trois souches de *Beauveria bassiana* (BIITAC8.1.5 ; BIITAC6.2.2 et BIITAC10.3.3) et trois autres de *Metarhizium anisopliae* (MIITAC6.2.2 ; MIITAC11.3.4 et MIITAC6.4.2) ont été utilisées dans ce travail. Isolés à partir des échantillons de sol des bananeraies de la Région du Centre, ces champignons sont conservés dans la mycothèque du Laboratoire de Pathologie de IITA-Cameroun (Membang, 2013). Ce laboratoire les a mis à notre disposition pour des essais de pathogénicité contre les mirides dans le cadre de notre thèse.

Pour vérifier leur pouvoir pathogène potentiel, ces champignons ont été ré-isolés à partir des spécimens de mirides. Ces insectes ont été plongés dans des suspensions d'isolats pendant 5 secondes. Ensuite, ils ont été déposés dans des boîtes d'élevage susdécrites. Dès la mort de ces individus, leur paroi a été stérilisée à l'aide d'une solution d'hypochlorite de sodium à 1% pendant une minute ; trois rinçages successifs de 10 secondes chacun dans de l'eau distillée stérile ont suivi. Ces insectes ont ensuite été immergés dans de l'éthanol 70% pendant 15 secondes et rincés dans de l'eau distillée stérile pendant 10 secondes (Inglis *et al.*, 2012). Enfin, ils ont été séchés sur du papier filtre stérile sous une hotte à flux et transférés sur un milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Lab M Limited 1 Quest Park, Moss Hall Road, Heywood, Lancashire BL97 JJ, United Kingdom) supplémenté d'antibiotiques (pénicilline 0,03% et streptomycine 0,08%) pour éliminer toute éventuelle croissance bactérienne. Les boîtes de Pétri ont été scellées et incubées dans le noir à 25°C, HR 64,85±9,73% (Inglis *et al.*, 2012).

Les champignons obtenus ont été repiqués dans d'autres boîtes de Pétri et purifiés (figure 11) ; ensuite, ils ont servi à la réalisation des tests de pathogénicité.





**Figure 11** : Cultures de *Beauveria bassiana* (A) et de *Metarhizium anisopliae* (B) âgées de 21 jours sur milieu PDA (Photo Mahot).

## II.2.4. Epreuves biologiques des champignons vis-à-vis des mirides

### II.2.4.1. Préparation des suspensions

Les suspensions des deux espèces de champignons ont été préparées suivant le protocole de Inglis *et al.* (2012), chaque isolat ayant préalablement été cultivé sur le milieu PDA supplémenté d'antibiotiques comme indiqué plus haut. A l'aide d'un scalpel, les cultures de 21 jours ont été raclées du milieu PDA puis mélangées à de l'eau distillée stérile et au Tween 80 (0,1 %) (Lobachimie). Le mélange a été agité au vortex pendant trois minutes afin de détacher les conidies les unes des autres. A travers un tissu en mousseline, les suspensions ont été filtrées pour séparer les conidies du mycélium. Pour calibrer la suspension de conidies, 20  $\mu\text{l}$  du filtrat ont été déposés sur une cellule de MALASSEZ et observés au microscope optique à l'objectif 40. Une série de quatre concentrations  $1 \times 10^7$ ;  $1 \times 10^8$ ;  $3,2 \times 10^8$  et  $1 \times 10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup> a été utilisée pour la suite des manipulations (Mahot, 2006 ; Abdulhai *et al.*, 2010 ; Mohammadbeigi & Port, 2013).

### II.2.4.2. Evaluation du potentiel insecticide et de la virulence de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae*

L'évaluation du potentiel insecticide des champignons a consisté à tester leur pouvoir pathogène sur des populations de *S. singularis*. En s'inspirant des travaux de Liu *et al.* (2002) et de Sabbahi (2008), la série de concentrations sus-retenues a été adoptée pour chaque isolat de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*. Deux types de contaminations, à savoir le contact direct ou immersion et le contact indirect ou ingestion ont été utilisés. La contamination par contact direct a consisté à immerger les mirides individuellement dans 1 ml de suspension de conidies pendant 5 secondes. Ensuite, ces insectes ont été placés dans de petites boîtes aérées de 19,5 X 13 X 4,5 cm<sup>3</sup> contenant, chacune, une chérelle comme support alimentaire. Pour le test par contact indirect, les chérelles ont plutôt été immergées dans les suspensions fongiques pendant 5 minutes. Pour les deux expériences, les boîtes ont été placées à une température de  $24,7 \pm 0,9^\circ\text{C}$ , HR de  $64,9 \pm 9,73\%$  et

une photopériode de 12:12 L : D. Pour chaque expérience, des observations journalières de mortalité des spécimens ont été faites pendant 14 jours. Le traitement témoin a consisté à mélanger de l'eau distillée stérile au Tween 80 (0,1%). Cinq répétitions, de 7 insectes chacune, ont été effectuées pour chaque traitement testé à savoir l'isolat à une concentration précise et selon un type de contamination.

La virulence des différents isolats vis-à-vis des mirides a été estimée en déterminant les concentrations létales 50 (CL50) et les temps létaux 50 et 90 (TL50 et TL90). La CL50 est la concentration qui cause une mortalité de 50% d'insectes au sein d'une population et le temps léthal 50 (ou 90) est celui au bout duquel un isolat est capable de causer une mortalité de 50% (ou de 90%) au sein d'une population (Hajek *et al.*, 2012).

Au cours d'une visite journalière de l'essai, les insectes morts ont été retirés des boîtes d'expérimentation et traités comme indiqué au paragraphe II.2.3 (page 34) dans le but d'éliminer toute poussée de champignons opportunistes et de confirmer que la mortalité observée a réellement été induite par l'isolat testé. Au bout de 7 jours post-incubation des spécimens, ceux ayant présenté la muscardine blanche ou verte sur la paroi de leur corps ont été considérés comme atteints et/ou morts des suites d'une mycose ; ce qui a confirmé le pouvoir pathogène de l'isolat testé vis-à-vis des mirides.

#### **II.2.4.3. Transmission horizontale de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae***

Pour le test de transmission horizontale ou contamination d'un individu par contact avec un autre infecté, deux isolats de *B. bassiana* et deux de *M. anisopliae* qui ont révélé une activité insecticide plus importante ont été utilisés. En considérant les résultats acquis lors de l'évaluation du pouvoir insecticide et de la virulence des isolats fongiques aux différentes concentrations, ce test a été réalisé par la technique d'immersion à la concentration  $1 \times 10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup>. La contamination a été faite à trois niveaux :

- par un traitement à 20%, c'est-à-dire que 20% de mirides traités ont été mis dans le même environnement que 80% d'insectes non traités (ratio 2 : 8);
- par un traitement à 50% soit un ratio 5 : 5;
- par un traitement à 80% soit un ratio 8 : 2.

Quatre répétitions, de 10 insectes chacune, ont été effectuées pour chacun des trois niveaux de contamination.

#### **II.2.5. Mise au point des formulations des isolats de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae***

##### **II.2.5.1. Production massive des isolats fongiques**

Le screening par les tests du pouvoir pathogène et de transmission ont permis de retenir, pour la suite du travail, deux isolats à savoir pour *B. bassiana* l'isolat BIITAC6.2.2, et pour *M. anisopliae* l'isolat MIITAC11.3.4. En général, la production massive des champignons permet d'en obtenir des quantités importantes pour des travaux ultérieurs.

Les échantillons de ces deux isolats ont fait l'objet d'une multiplication à grande échelle par l'Unité de Production de l'IITA-Benin, par un procédé diphasique (liquide, solide) selon Cherry *et al.* (1999). La recherche de la forme sous laquelle le champignon sera appliqué en champ, afin de protéger les conidies contre les rayons UV et d'assurer un bon contact entre la spore et la cuticule de l'insecte, nous a conduit à la mise au point de formulations à base des différents adjuvants.

### **II.2.5.2. Effet des différents adjuvants sur les isolats fongiques**

L'une des étapes importantes dans le développement d'une formulation de mycoinsecticide est l'évaluation de l'effet de ses composants sur la viabilité des conidies ; il est alors question de sélectionner des produits compatibles avec les conidies. Ainsi, il s'est avéré nécessaire d'évaluer la compatibilité des composants de la formulation avec les conidies pour confirmer leur utilisation dans nos formulations (Gatarayiha *et al.*, 2010; Lotfi Mola and Afkari, 2012 ; Boruah *et al.*, 2015). Pour cela, des associations ont été faites entre chaque adjuvant et 0,5 g de la poudre de l'isolat de *B. bassiana* et de celui de *M. anisopliae*. Ces mélanges ont été conservés à l'obscurité à une température de 25°C et une HR  $64,9 \pm 9,73\%$ . Ainsi, 20 ml des différents adjuvants suivants ont été utilisés :

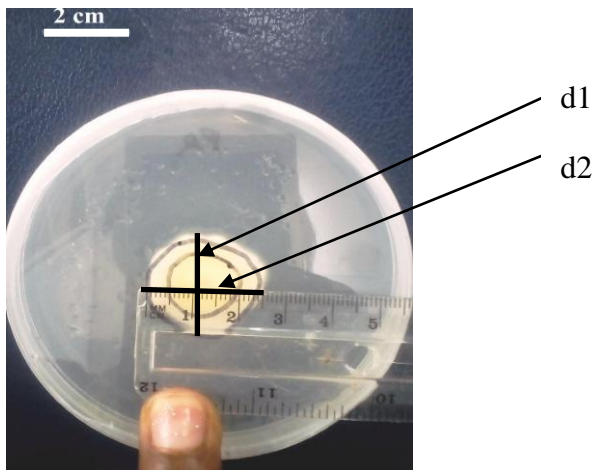
- 20 ml d'huile de palme raffinée ;
- 20 ml d'huile de soja ;
- 20 ml d'huile de coton ;
- 20 ml d'huile de palme brute ;
- 20 ml de Glycérol ;
- 20 ml de Tween20 ;
- 20 ml de TEA (TriEthanolAmine) ;
- 20ml d'eau distillée stérile.

Pour déterminer l'effet des différents adjuvants sur les conidies, la croissance radiale, la sporulation, la biomasse fongique et la viabilité des spores ont été évaluées selon Inglis *et al.* (2012), Otgonjargal *et al.* (2015) et Rodrigues *et al.* (2017). La concentration de chaque suspension mère préparée a été de  $98,8 \times 10^8$  spores/ml.

#### **➤ Croissance radiale ou végétative des champignons sur milieu de culture**

Pour étudier la croissance végétative des champignons, nous avons d'abord procédé à une recherche des disques de culture. Des milieux de culture nutritifs (PDA) ont été préparés et coulés

dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. Après leur séchage, des adjuvants contenant des conidies ont été étalés dans cinq boîtes. Au bout de quatre jours post-inoculation des milieux de culture, des disques de culture de 4 mm de diamètre ont été découpés sous une hotte-à-flux à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Par la suite, de nouvelles boîtes de Pétri contenant du PDA ont étéensemencées en leur centre à l'aide de l'implant de 4 mm de diamètre obtenu tel que décrit ci-dessus. Ces dernières boîtes de Pétri ont été scellées et incubées à l'obscurité, à une température de 25°C et une HR  $64,9 \pm 9,73\%$ . Pendant 20 jours, et à un intervalle d'observations de cinq jours, le diamètre moyen de croissance fongique a été mesuré (figure 12).



**Figure 12 :** Evaluation du diamètre de croissance fongique à l'aide d'une règle graduée (Photo Mahot).

Cette opération a été répétée trois fois pour chaque adjuvant et chaque isolat de champignon. Le diamètre moyen de croissance de la culture a été calculé en millimètre par la formule suivante:

$$D = \frac{d1+d2}{2} , \text{ où } D \text{ est le diamètre moyen de poussée du}$$

champignon, d1 est le diamètre selon l'axe 1 et d2 est le diamètre selon l'axe 2.

### ➤ **Sporulation des champignons**

La sporulation des champignons a été déterminée par le nombre de conidies produites au bout de vingt jours par chaque adjuvant. Au 20<sup>ème</sup> jour de l'évaluation de la croissance radiale, 10 ml d'eau distillée stérile ont été ajoutés à chaque boîte de Pétri ; les cultures ont ensuite été soigneusement raclées à l'aide d'une spatule stérile. Les suspensions obtenues avec ces raclures ont été transférées dans des Erlenmeyer contenant 10 ml d'eau distillée stérile et des billes de verre pour agitation. Après une série de dilutions, les conidies présentes dans les suspensions ont été comptées au microscope optique à l'objectif x40 (LEICA DMLS 11501200) à l'aide d'une cellule de Malassez et d'un compteur manuel.

### ➤ **Biomasse fongique**

La biomasse a été évaluée suivant le protocole modifié de Otgonjargal *et al.* (2015), qui a permis d'estimer la production des spores et du mycélium dans chaque adjuvant. Pour chaque isolat et chaque adjuvant, trois tubes à essai ont été utilisés pour préparer 20 ml de milieu de culture liquide PDB (Potato Dextrose Broth). Ainsi, 1 ml de la suspension composée de l'adjuvant et des conidies concentrées à  $10^6$  spores/ml a été inoculé dans chaque tube. Ces tubes ont ensuite été conservés dans la chambre d'incubation à l'obscurité, à une température de 25°C et une HR  $64,9 \pm 9,73\%$ . Au dixième jour d'incubation, les milieux ont été filtrés à travers un papier filtre buvard. Les résidus de spores et du mycélium ont été pesés sur une balance (High Precision Milligram Jewelry Scale, Smart Weigh, made in China, Lot No A15-299) pour déterminer leur biomasse après avoir passé 12 h dans un incubateur réglé à 45°C (Otgonjargal *et al.*, 2015). Cinq répétitions ont été faites pour chaque adjuvant.

### ➤ **Viabilité des spores de champignons**

La viabilité des conidies dans les adjuvants a été évaluée par la technique de décompte des colonies ou Colony Forming Units (CFU) de Alves & Moraes (1998) citée par Oliveira *et al.* (2015). Elle stipule qu'une spore est capable de former une colonie sous l'influence de certaines conditions de l'essai telles que le milieu de culture, la température, l'oxygénation du milieu... Une colonie peut provenir d'une seule spore (cellule) ou d'un groupe de spores qui ne se sont pas séparées (Sriram & Savitha, 2011). Selon cette méthode, chaque suspension du mélange (adjuvant + isolat) préparé et conservé à une température de 25°C et une HR  $64,9 \pm 9,73\%$ , a été étalée sur un milieu de culture à l'aide d'une spatule stérile. Toutes les deux semaines, et pendant dix-huit semaines, une série de dilutions ont été faites pour ces suspension mélanges ; ensuite un échantillon de 50µL à  $10^4$  conidies/mL a été étalé sur du milieu PDA dans des boîtes de Pétri de 4,5 cm de diamètre. Le comptage de colonies a été fait le septième jour post-inoculation dans des boîtes de Pétri. Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque type de mélange.

### **II.2.6. Criblage des formulations liquides**

Le développement d'une formulation appropriée est essentiel pour optimiser l'utilisation des mycoinsecticides. Butt *et al.* (2001) ont rapporté que la capacité des spores de champignons à persister dans un environnement est un important facteur pour leur succès comme agent de lutte biologique. Ainsi, les facteurs qui limitent l'utilisation des champignons comme mycoinsecticides sont abiotiques tels que la température, l'humidité, l'ensoleillement et l'aptitude à se propager (Bateman *et al.*, 1993 ; Lotfi Mola & Afkari, 2012 ). De nombreuses formulations peuvent affecter la viabilité des conidies, ce qui se traduit par une courte durée de conservation (Moore & Prior,

1993). Une formulation d'agents pathogènes dans de l'huile augmente l'infectuosité de ces dernières comparativement aux formulations à base d'eau classique.

Les huiles sont utilisées comme adjuvants pour protéger les champignons des facteurs environnementaux et pour augmenter leur activité sur les insectes cibles (Fargues & Luz, 1998 ; Hong *et al.*, 2005 ; Gatarayiha *et al.*, 2010). Deux types de formulations huileuses ont été mises au point : les émulsions et les émulsions inverses. La composition des formulations s'est inspirée des travaux antérieurs (1997 ; Batta, 2007 ; Sabbahi, 2008 ; Batta *et al.*, 2011 ; Ummidi & Vadlamani, 2014). Les émulsions ont été composées avec de l'huile végétale, du glycérol, du lait écrémé, de l'argile, du carbonate de sodium et du Tween 20. L'huile est généralement un adhésif qui favorise le contact entre les conidies et la cuticule lipophile de l'hôte ; l'argile protège des rayons UV ; le glycérol joue les rôles d'humectant, de nutriment et d'adhésif ; le lait servirait de nutriment ; le carbonate de sodium est un surfactant alors que le Tween 20 est un stabilisateur (Goettel & Inglis, 1997 ; Jenkins *et al.*, 1998 ; Burgues, 1998 ; Poprawski & wraight 2000). Au cours de ce travail, la préparation des émulsions a consisté à mélanger des ingrédients consignés dans le tableau III.

**Tableau III:** Différents adjuvants utilisés pour les émulsions dans ce travail

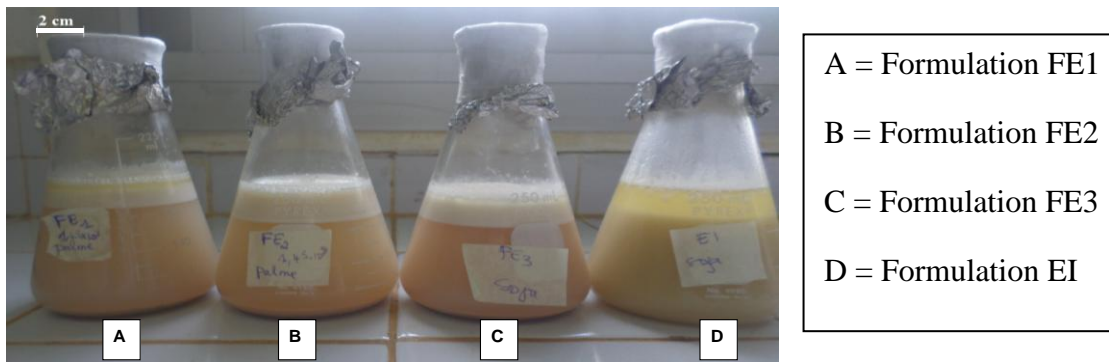
Adjuvant	Emulsion (FE1)	Emulsion (FE2)	Emulsion (FE3)
Huile	(10%)	(10%)	(10%)
Glycérol	1%	2%	0%
Lait	1%	0%	2%
Carbonate de sodium	1%	1%	1%
Argile	1%	1%	1%
Tween 20	1%	1%	1%
Suspension de conidies	85%	85%	85%

Pour la préparation des émulsions inverses (EI), deux phases ont d'abord été apprêtées :

- 50% d'une phase aqueuse constituée de 44% d'eau distillée stérile, de 4% glycérol et de 1% de TriEthanolAmine (TEA) qui joue le rôle d'émulsifiant ;

- 50% d'une phase huileuse constituée de 47% d'huile et de 2% de Tween 20.

Une fois les deux phases bien mélangées par agitation à la main, 2% de la poudre de spores y ont été ajoutées (figure 13). Quel que soit le type d'émulsion, une sélection a été faite entre l'huile de palme raffinée (PR), l'huile de soja (S), l'huile de coton (C) et l'huile de palme brute (PB). Les mélanges ont été réalisés dans un environnement stérile sous une hotte à flux laminaire. Ainsi, les formulations à base des deux isolats retenus (BIITAC6.2.2 et MIITAC11.3.4) ont été préparées et quantifiées grâce à une Cellule de Malassez, puis conservées à l'obscurité à 25°C et  $64,9 \pm 9,73\%$  HR.



**Figure 13 :** Différentes formulations des champignons entomopathogènes

Après avoir préparé les formulations, leur criblage a consisté à évaluer leur capacité à maintenir des conidies viables des conidies de la matière active. Cette évaluation a été faite toutes les deux semaines et pendant dix-huit semaines par la technique de décompte des colonies CFU (Oliveira *et al.*, 2015) sur un milieu PDA. Des séries de dilutions ont régulièrement été faites pour faciliter ce décompte de colonies. Quatre répétitions ont été effectuées pour chaque type de formulations (FE1, FE2, FE3 et EI) et pour chaque huile (de Palme Raffinée noté PR, de Palme Brute noté PB, de Soja noté S et de Coton noté C).

### II.2.7. Tolérance des conidies dans les émulsions inverses vis-à-vis de quelques températures

L'évaluation de la viabilité des conidies dans différentes formulations à 25°C a permis de choisir des formulations inverses pour la suite du travail. La tolérance des Emulsions Inverses (EI) à différentes températures a été mesurée par le protocole de Luz & Fargues (1997) modifié, afin de sélectionner la température de conservation ultérieure des formulations et une huile pour la suite des tests. Ainsi, chaque formulation EI préparée a été quantifiée et répartie dans cinq tubes stériles, placés dans des incubateurs pendant dix-huit semaines : le premier à 4°C, le second à 15°C, le troisième à 22°C, le quatrième à 25°C et le cinquième à 30°C. Toutes les deux semaines, un échantillon de 50µL d'une formulation, prélevé dans chaque tube à l'aide d'une pipette et préalablement dilué à  $10^4$  conidies/mL, a été étalé sur une boîte Pétri de 4,5 cm de diamètre contenant un milieu de culture PDA. Au bout de sept jours, les colonies ayant germé dans chaque boîte de Pétri ont été dénombrées. Trois répétitions ont été effectuées pour chaque huile.

### II.2.8. Evaluation de la pathogénicité des champignons formulés vis-à-vis des mirides

#### II.2.8.1. Bio-essai des formulations au laboratoire

Les essais d'évaluation de la viabilité et de la tolérance à différentes températures des conidies formulées ont permis de sélectionner les formulations EI et deux huiles (de soja et de palme raffinée). Les formulations de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*, faites à base de ces deux huiles et à la concentration de  $10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup> ont été utilisées pour les tests *in vitro* de bio-efficacité. Cette concentration a montré les taux de mortalité les plus élevés lors des tests de pathogénicité avec les suspensions. Chaque spécimen *S. singularis* a été immergé dans une

formulation essai à l'aide d'une pince molle. Pour chaque isolat et chaque formulation, les insectes contaminés ont été placés dans des boîtes rectangulaires aérées de 19,5 x 13 x 4,5 cm<sup>3</sup>, contenant chacune une cherelle comme support alimentaire. Ces boîtes ont par la suite été conservées dans la salle d'incubation à une température de 25°C, HR de 64,9 ± 9,73% et une photopériode de 12 : 12 L.D. Des observations journalières ont été effectuées pendant 14 jours et les mortalités des insectes dénombrées. Le test témoin a été fait par un traitement avec une formulation indemne d'agent pathogène. Cinq répétitions ont été réalisées par isolat et par formulation ; un total de dix individus a été utilisé par répétition.

### II.2.8.2. Bio-essai des formulations de bio-insecticide en champ

Cet essai a été réalisé à la suite de celui mené au laboratoire. Trois traitements, à savoir : (1) avec une formulation du biopesticide de *B. bassiana* à base d'huile de soja, (2) un insecticide chimique le 20g/L imidachlopride + 20g/L lambdacyhalotrine et (3) le témoin non traité, ont été effectués dans une parcelle cacaoyère de l'IITA de superficie 0,25 ha à l'aide d'un pulvérisateur à dos à pression entretenue de 15L. Seule la formulation de *B. bassiana* à base d'huile de soja a été préparée faute du coût de l'expérimentation et des contraintes liées aux ressources financières. Pour chaque traitement, 27 cacaoyers sur lesquels la population de mirides avait préalablement été évaluée la veille (un jour avant) ont été répartis en trois blocs complets de manière aléatoire. Le nombre de mirides évalués avant les traitements est consigné dans le tableau IV. En raison de la taille de la parcelle cacaoyère, chaque bloc ne comptait que 9 arbres. De plus, deux lignes de cacaoyers ont régulièrement séparé deux blocs consécutifs afin d'éviter une interaction entre les différents traitements. Le cacaoyer a été traité dans son entièreté, c'est-à-dire toutes ses parties aériennes : le tronc, les branches, les fruits et feuilles. Le décompte des mirides morts et vivants a été effectué tous les trois jours pendant deux mois. Au bout d'un mois (30 jours), les mêmes traitements ont été appliqués sur les mêmes arbres dans tous les blocs.

**Tableau IV** : Population de mirides évaluée sur chaque cacaoyer a la veille des traitements

Type traitements	Blocs	Nombre d'arbres (répétitions) / bloc	Nombre de mirides / bloc
Formulation de <i>B. bassiana</i>	1	9	21
	2	9	225
	3	9	42
	Sous total	27	288
Insecticide Parastar (témoin positif)	1	9	52
	2	9	45
	3	9	27
	Sous total	27	124
Témoin négatif	1	9	15
	2	9	65
	3	9	42
	Sous total	27	122
<b>Total</b>		<b>81cacaoyers</b>	<b>534 mirides</b>



### **II.2.8.3. Persistance de la viabilité des conidies du bioinsecticide en milieu réel**

La persistance de la viabilité des conidies du bioinsecticide en milieu réel a été évaluée sur les feuilles et sur les cabosses de cacaoyers. La viabilité des conidies des champignons sur les feuilles a été déterminée par la technique des «Colony Forming Units» (Sabbahi, 2008 ; Oliveira *et al.*, 2015). En effet, 2 feuilles ont été prélevées de manière aléatoire de chaque arbre traité avec la formulation aux 20<sup>ème</sup>, 40<sup>ème</sup> et 60<sup>ème</sup> jours post-traitement. Un emporte-pièce en cuivre stérilisé a été utilisé pour découper les disques des feuilles échantillonnées ; les conidies y ont été détachées par la technique de lavage décrite par Inglis *et al.* (1993). Sous une hotte-à-flux laminaire stérile, chaque feuille a été découpée en disque de 15 mm de diamètre. Dix disques d'une même feuille ont été lavés dans 20 ml d'eau distillée stérile contenant du Tween 80 à 0,1% et des billes de verre. Un millilitre de la suspension obtenue après le lavage a été inoculé et étalé sur le milieu de culture PDA supplémenté avec la streptomycine (0,1g/l), le chloramphénicol (0,1g/l) et la tétracycline (0,1g/l). Au bout de sept jours post-inoculation, les colonies ont été comptées et la densité de conidies a été déterminée par unité de surface foliaire (Sabbahi, 2008).

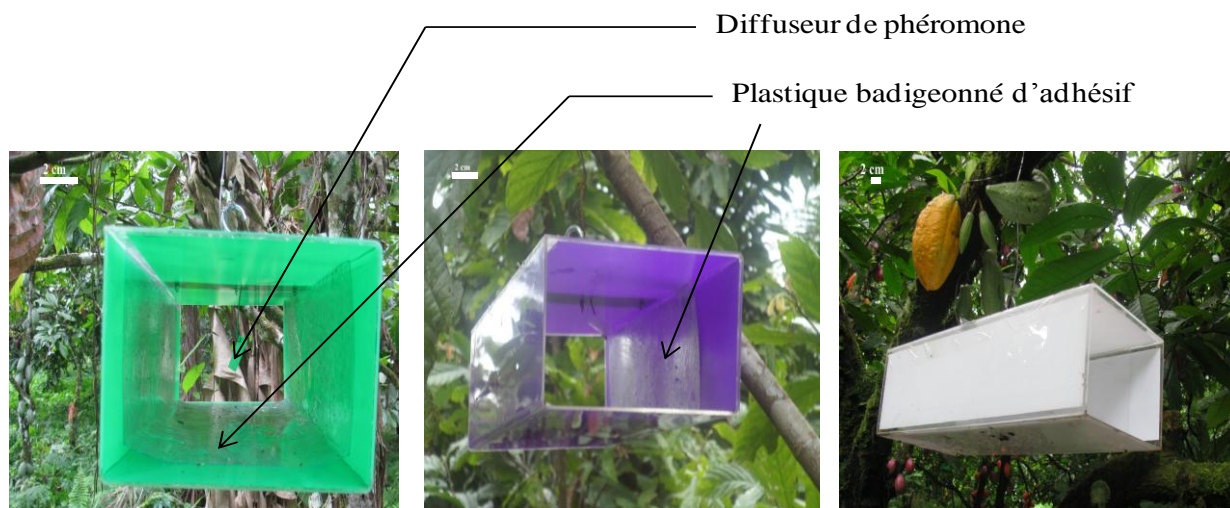
L'évaluation de la persistance des conidies sur les cabosses a consisté à déterminer la période pendant laquelle l'agent pathogène (conidies fongiques) reste létal ou infectieux pour les populations de mirides. La technique de Sabbahi (2008) modifiée a été utilisée à cet effet. Des cabosses, récoltées après deux mois post-application des propagules fongiques, ont été exposées pendant 14 jours aux mirides pour leur alimentation. Ce test a été réalisé en cinq répétitions avec sept mirides par répétition. Le témoin a consisté à alimenter les insectes avec des cabosses indemnes de la formulation de *B. bassiana*. Le nombre de mirides morts a été noté quotidiennement pendant toute la période d'essai ; seuls les insectes morts présentant une poussée de *B. bassiana* sur leur paroi corporelle ont été considérés comme ayant succombé des suites de l'infection fongique.

### **II.2.9. Monitoring des mirides par les pièges à phéromones**

#### **II.2.9.1. Dispositif expérimental**

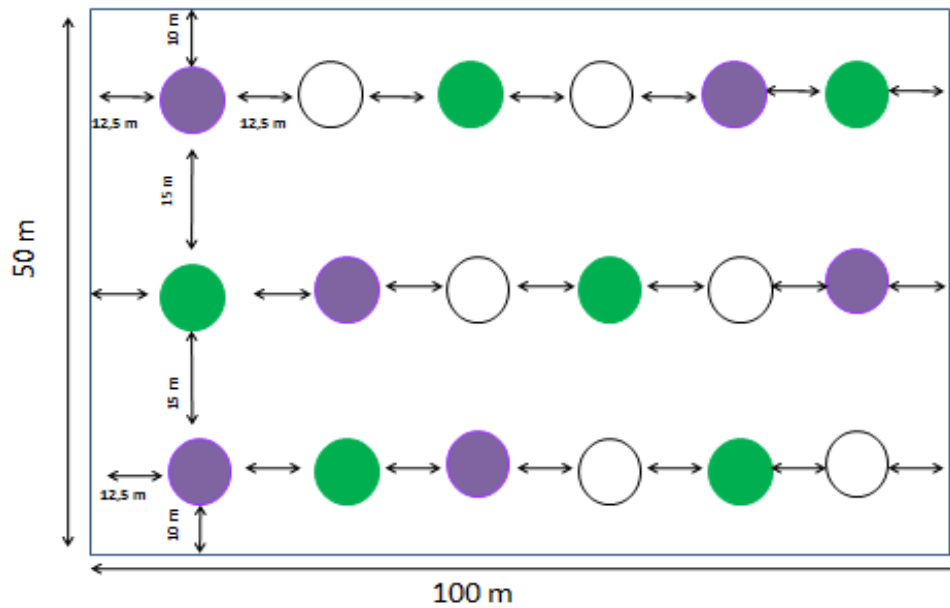
Des parcelles de 0,5 ha chacune et plantées de 600 pieds de cacaoyers en moyenne ont été choisies dans des plantations n'ayant reçu aucun traitement insecticide au cours des cinq dernières années. Cette précaution a évité tout effet rémanent desdits produits chimiques sur les mirides. Les cacaoyères prospectées étaient généralement de type traditionnel, c'est-à-dire avec la présence des arbres fruitiers et des arbres forestiers comme arbres d'ombrage. Ce type de cacaoyères ne respecte pas en général les espacements recommandés entre les pieds soit 3 x 3 m ou 2,5 x 2,5 m (Anonyme, 2002). Au total 16 parcelles, dont huit avec pièges à phéromones et huit témoins (parcelles sans pièges à phéromones) à Ayos, et 14 parcelles dont sept avec pièges à phéromones et sept témoins à Konye, ont été sélectionnées sur la base du critère « absence du traitement insecticide ». Des pièges

à phéromones rectangulaires, de couleurs verte, violette et blanche (figure 14), fabriqués avec du matériel local (plexiglass de 2 mm d'épaisseur, 40 cm de longueur x 15 cm de largeur x 10 cm de hauteur) ont servi dans cet essai. Le diffuseur de phéromone était suspendu au centre du piège dont les surfaces internes étaient tapissées d'un plastique badigeonné de colle. Les pièges suspendus aux cacaoyers étaient disposés dans le champ à 2 m de hauteur au plus par rapport au niveau du sol.



**Figure 14** : Pièges à phéromones rectangulaires de couleur verte, violette et blanche (Photo Mahot).

Au total 18 pièges ont été disposés dans chaque parcelle traitée, à raison de six pièges par couleur suivant le schéma de la figure 15. Une fois tous les deux mois, le dispositif badigeonné de colle a été changé pour éviter la saturation du piège en mirides. A la même occasion, les phéromones supposées déjà inefficaces ont été changées dans les pièges (Sarfo, 2013). Pour ne pas confondre le caractère «préférence d'une couleur par les mirides» avec l'abondance de ces derniers dans une poche à mirides d'une parcelle, les positions des pièges ont été interchangées chaque mois tout en évitant de laisser côte-à-côte deux pièges de même couleur. Pour évaluer directement la taille de la population de mirides présents sur un cacaoyer ainsi que l'ampleur de leurs dégâts, 30 pieds ont été marqués de façon aléatoire pour les futures inspections.



**Figure 15:** Disposition géographique des pièges dans une parcelle d'essai.

### II.2.9.2. Evaluation de l'attractivité des mirides par les pièges à phéromones

L'évaluation de l'attractivité des mirides par les pièges à phéromones a consisté à collecter tous les spécimens capturés, toutes les deux semaines et ceci pendant deux années consécutives de septembre 2014 à août 2016. Lors de chaque descente sur le terrain, les nombre de mirides et d'autres insectes capturés par piège et par couleur ont été enregistrés. Ces insectes ont été extraits du piège pour éviter tout biais et conservés dans des pots de 40 ml contenant de l'alcool à 70° pendant leur transport vers le laboratoire. Au laboratoire, les spécimens récoltés ont été identifiés à l'aide des clés dichotomiques de Delvare & Aberlenc (1989).

### II.2.9.3. Impact des pièges sur la population de *Sahlbergella singularis* et sur leurs dégâts

Pour déterminer l'impact des pièges sur la taille de la population de *S. singularis* ainsi que sur leurs dégâts, nous avons comparé les dégâts d'une part et les abondances de mirides d'autre part entre les parcelles avec et ceux/celles sans pièges à phéromones.

L'évaluation de la taille d'une population de mirides a été réalisée par un comptage direct à vue des spécimens présents sur l'arbre pendant la période d'essai allant de septembre 2014 à août 2016. Ce comptage a été effectué une fois par mois, entre 6H30' et 10H30' du matin, en raison de leur forte activité à cette période de la journée (Bisseleua *et al.*, 2011 ; Mahob *et al.*, 2015) ; en effet, en dehors de cette période, les mirides se cachent sous la canopée, sous les pédoncules des cabosses de cacao et dans les zones de contact entre les cabosses et le tronc. Les observations directes ont été effectuées à une hauteur de moins de 3 m du sol en raison des limites du pouvoir séparateur de l'œil au-delà de cette altitude.

Pour l'évaluation des dégâts de *S. singularis*, nous avons procédé par une notation des dommages sur la plante hôte, une fois par mois et pendant la période d'essai mai 2015 à août 2016.

Nous inspirant des travaux de Brun *et al.* (1997), Sounigo *et al.* (2003), Anikwe *et al.* (2009b), Mahob (2013) et Mahob *et al.* (2015), les dégâts récents des mirides ont été enregistrés sur les cabosses de tout stade de développement, à l'aide d'une échelle de notation de dégâts variant entre 0 et 3 (tableau V). Cette évaluation a généralement été faite à moins de 3 m du sol pour la même raison que celle sus-évoquée.

**Tableau V:** Notation des dégâts récents causés par les mirides aux cabosses de cacaoyer

Echelle des dégâts			
0	1	2	3
Absence de piquûres	Moins de 25% de la surface de la cabosse piquée	25% à 50% de la surface de la cabosse piquée	Lésions observées sur plus de 50% de la surface de la cabosse

### II.3. Analyses des données

#### II.3.1. Epreuves biologiques

Pour déterminer le potentiel insecticide et la transmission horizontale des agents pathogènes testés, les mortalités cumulées ont été corrigés selon Abbott (1925) et transformés par la fonction :  $\text{Arcsin}\sqrt{\text{Proportion}}$  selon Zar (1996) afin d'atteindre la condition de normalité. Une analyse de variances à deux facteurs (isolat et concentration) a été faite. Les mortalités de mirides et les fréquences des spécimens sur lesquels le champignon a sporulé, ont été comparés grâce au test post-hoc de Tukey, lorsque la comparaison multiple a révélé l'existence d'une différence significative entre les facteurs testés ( $p < 0,05$ ) et ceci à l'aide du logiciel JMP 8.0.2. Par ailleurs, le test de corrélation de Pearson  $r$  a permis d'estimer le degré de relation linéaire qui existerait entre les mortalités cumulées de mirides et les concentrations des suspensions fongiques testées. Le temps nécessaire pour avoir 50 et 90% de mortalité de mirides, encore appelé respectivement temps létal 50 (TL50) et temps létal 90 (TL90), et la concentration de la suspension fongique la plus efficace, c'est-à-dire celle pour laquelle on enregistre 50% de mortalité de mirides (CL50), ont été estimés 14 jours après le traitement, en utilisant les probits et à l'aide du logiciel SPSS 20.0.

#### II.3.2. Evaluation de l'effet des différents adjuvants sur les isolats

L'effet des différents adjuvants sur les isolats fongiques a été évalué par la vitesse de croissance ( $V$ ) des champignons en mm/jour d'après la formule suivante:

$$V = \frac{\text{Diamètre moyen de croissance}}{\text{Nombre de Jours}}$$

Les valeurs moyennes de la vitesse de croissance, du taux de sporulation sur le milieu de culture PDA et de la biomasse sèche de champignon ont été analysées grâce à un Modèle Linéaire

Généralisé (GLM), afin d'apprécier si elles étaient influencées par les différents adjuvants utilisés. En cas de différence significative ( $P < 0,05$ ) obtenue lors de la comparaison multiple des, des comparaisons deux à deux ont été effectuées à l'aide du test de Student-Newman-Keuls (SNK) grâce au logiciel SAS 9.2.

Pour la viabilité, le nombre de colonies comptées a été transformé en CFU (Colony Forming Unit) suivant la formule de Inglis *et al.* (2012) :

$$CFU = \frac{N \times FD}{\text{Volume de suspension ensemencé sur milieu de culture}}, \text{ où } N \text{ est le nombre de colonies comptées et } FD \text{ le facteur de dilution de la suspension fongique.}$$

Les données de comptage étant très dispersées, le Modèle Linéaire Généralisé (GLM) suivant la loi Quasipoisson a été utilisé avec pour fonction de lien la fonction « log » suivie de l'ANOVA (m, test= « F »). Pour comparer deux à deux les valeurs moyennes des CFU, le test de Tukey HSD a été utilisé. Le logiciel R version 3.4.3 nous a servi dans cette analyse.

### II.3.3. Criblage des formulations

La normalité des valeurs de CFU obtenues à la suite de l'évaluation de la viabilité des spores, dans différentes formulations et à différentes températures, a été vérifiée par le test de Shapiro-Wilk. Lorsque cette normalité n'était pas respectée et que les données de CFU étaient dispersées, l'analyse a été faite de la même façon que celle expliquée dans le paragraphe ci-dessus.

### II.3.4. Evaluation de la pathogénicité des champignons formulés sur les mirides

#### II.3.4.1. Bio-essai des formulations au laboratoire et en milieu réel

Les mortalités des mirides et les taux de sporulation fongique sur les cadavres de ces insectes obtenus au laboratoire ont été cumulés. Les mortalités causées par la formulation du biopesticide et par l'insecticide ont été corrigées avec la formule suivante de Henderson-Tilton (Püntener, 1981) :

$$MC(\%) = 1 - \frac{(n_1 \times n_2)}{n_3 \times n_4} \times 100, \text{ où } MC = \text{mortalité Corrigée}, n_1 = \text{taille de la population d'insectes dans le lot témoin (Co) avant le traitement}, n_2 = \text{taille de la population d'insectes dans le lot d'insectes traités (T) après le traitement}, n_3 = \text{taille de la population d'insectes dans le lot témoin (Co) après le traitement}, n_4 = \text{taille de la population d'insectes dans le lot d'insectes traités (T) avant le traitement}.$$

Les taux de réduction de la population vivante ont été calculés selon Adu-Acheampong (1997) :  $\text{Taux de Réduction}(\%) = \frac{(\text{Nombre de mirides vivants à } J_0 - \text{Nombre de mirides vivants à } J_i)}{\text{Nombre de mirides vivants à } J_0} \times 100$ , où,  $J_0$  est le jour avant le traitement et  $J_i$  le jour  $i$  après le traitement.

En absence de normalité et d'homoscedasticité des données vérifiées grâce au test de Shapiro-Wilk, les tests de Kruskal-Wallis puis de Dunn ont permis de rechercher une différence éventuelle entre les taux de réduction de la taille de la population vivante par traitement (biopesticide, insecticide et témoin) en fonction du temps. Le logiciel R version 3.4.3 a été utilisé pour ces analyses statistiques.

### **II.3.4.2. Persistance des conidies sur les feuilles et sur les cabosses**

Le nombre de colonies de spores comptées dans les boîtes de Pétri a été transformé en CFU par unité de surface foliaire suivant la formule de Inglis *et al.* (2012) :

$$CFU = \frac{N \times FD}{\text{Volume de suspension} \times \text{Surface foliaire}}, \text{ où } N \text{ est le nombre de colonies}$$

comptées et FD le facteur de dilution de la suspension fongique.

Par la suite, les taux de réduction de viabilité des spores ont été calculés par la formule d'Adu-Acheampong (1997) modifiée :

$$\text{Taux de Réduction}(\%) = \frac{(CFU \text{ à } J_{20} - CFU \text{ à } J_n)}{CFU J_i} \times 100, \text{ où } CFU \text{ est le nombre de colonies}$$

formées par unité foliaire,  $J_{20}$  est le 20<sup>e</sup> jour post-traitement avec la formulation,  $J_n$  le jour n de l'échantillonnage avec n=40 ou 60 jours post-traitement avec la formulation selon les cas. L'étude de la persistance de l'effet insecticide de la formulation du biopesticide sur les cabosses a été menée en calculant les taux moyens de mortalité journalière.

### **II.3.5. Utilisation de pièges à phéromones**

#### **II.3.5.1. Evaluation de l'attractivité des différentes couleurs des pièges à phéromones**

Pour obtenir les décomptes mensuels de mirides, les données sur les nombres de mirides capturés ont été cumulées - pour chaque village - par couleur de pièges, par mois et chaque année d'échantillonnage. La comparaison de l'attractivité des mirides par les différentes couleurs de pièges a été faite à deux niveaux : d'abord à l'intérieur d'un même village puis entre les deux localités d'Ayos et de Konye. Les données de captures ne respectant pas la loi normale, le Modèle Linéaire Généralisé (GLM) a été utilisé suivant la loi de poisson avec pour fonction de lien la fonction « log » suivie de l'ANOVA (m, test= « Chisq ») pour déceler une probable différence entre les couleurs des pièges. Lorsque cette situation s'est présentée, le test de Tukey HDS a été utilisé pour comparer l'effet des couleurs deux à deux.

#### **II.3.5.2. Evaluation des dégâts causés par *Sahlbergella singularis***

Seules les données allant du mois de mai 2015 à août 2016 ont été prises en compte en raison du changement de la méthode d'échantillonnage au cours de l'expérimentation. Ces données

sur la sensibilité des cabosses aux infestations des mirides en parcelles traitées (avec pièges) et en parcelles témoins (sans pièges) ont permis de calculer les prévalences des dégâts et leur sévérité.

Le taux d'expansion des dégâts de mirides sur les cabosses, ou encore prévalence des dégâts selon Bush *et al.* (1997), a été calculé pour chaque arbre suivant la formule de d'Aka *et al.* (2009):

$$I = \frac{\text{Nombre de cabosses piquées par } S. \textit{singularis}}{\text{Nombre total de cabosses}} \times 100$$

La sévérité des dommages de mirides sur les cabosses de cacao, ou encore intensité des dommages de mirides selon Bush *et al.* (1997) et Ambang *et al.* (2007); a été calculée par la formule de Tchoumakov & Zaharova (1990) :

$$IS = \frac{\sum ab}{neN} \times 100, \text{ où IS : Indice de Sévérité des dégâts, a : nombre de}$$

cabosses endommagées, b : degré ou intensité de l'infection correspondant (notation des dommages), *ne* : note la plus élevée dans la notation des dommages, N : nombre total de cabosses examinées

### **II.3.5.3. Impact de l'utilisation des pièges à phéromones sur les populations de *Sahlbergella singularis* et sur leurs dégâts**

La prévalence et la sévérité des dégâts des mirides ne suivant pas une distribution normale et les parcelles sites étant indépendantes, le test de Mann-Whitney W a permis de comparer les valeurs moyennes de ces paramètres entre les parcelles traitées et les parcelles témoins. Le test de Spearman a permis de rechercher de probables corrélations entre la prévalence et la sévérité d'une part et, d'autre part, entre le nombre de mirides piégés et les dégâts causés. Toutes les analyses statistiques liées aux expérimentations sur les pièges à phéromones ont été réalisées avec le logiciel R version 3.4.3 ; l'erreur consentie était de 5%.

## **CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION**



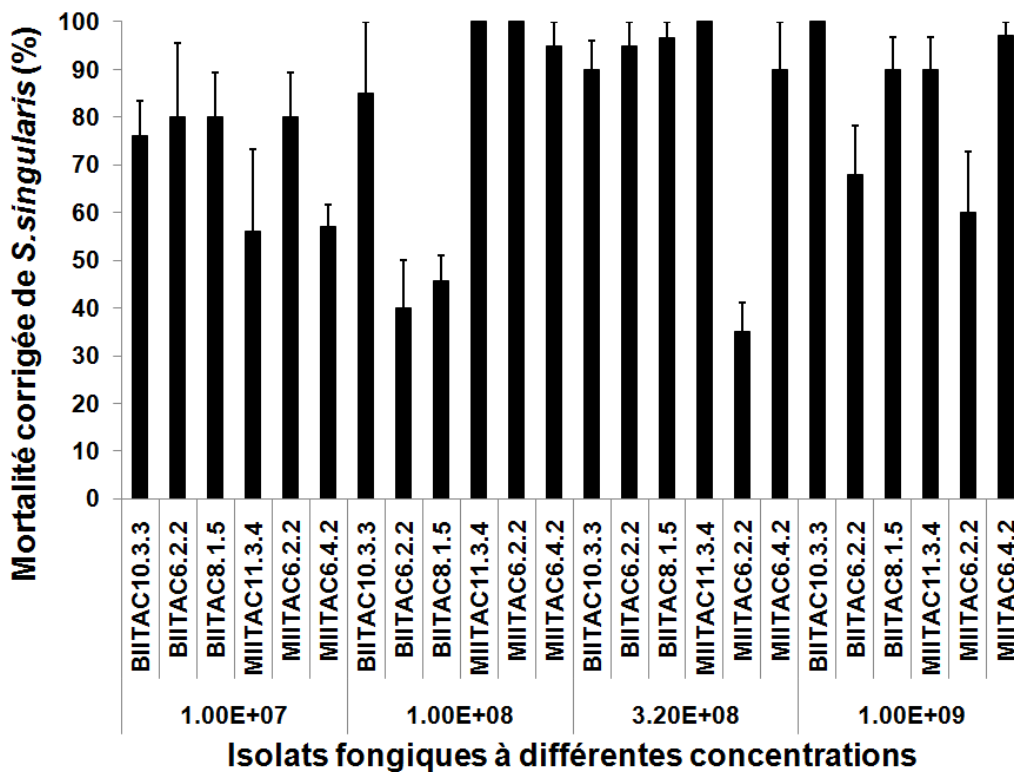
### III.1. Résultats

#### III.1.1. Epreuves biologiques

##### III.1.1.1. Evaluation du potentiel insecticide et de la virulence de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*

###### ➤ Par contact direct (ou par immersion)

Nos investigations indiquent que les effets pathogènes des isolats de *B. bassiana* (BIITAC8.1.5 ; BIITAC6.2.2 et BIITAC10.3.3) et de *M. anisopliae* (MIITAC6.2.2 ; MIITAC11.3.4 et MIITAC6.4.2) testés vis-à-vis de *S. singularis* varient en fonction des concentrations et des isolats fongiques utilisés. Les mortalités oscillent entre 40 à 100% pour les isolats de *B. bassiana* et de 35 à 100% pour ceux de *M. anisopliae* (figure 16).



**Figure 16 :** Taux de mortalité corrigée des spécimens de *S. singularis* exposés par immersion et en fonction des concentrations des isolats fongiques testés.

L'analyse de variances a montré une différence significative des mortalités des mirides aussi bien au sein des deux effets (ddl = 5 ; F = 3,3 ; P = 0,008 pour les isolats ; ddl = 3 ; F = 3,9 ; P = 0,01 pour les concentrations) (tableau VI) que pour l'interaction isolats\*concentrations (ddl = 15 ; F = 6,4 ; P <0,0001). Toutefois, l'isolat MIITAC11.3.4 aux concentrations  $3,2 \times 10^8$  et  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> a montré la même pathogénicité vis-à-vis de *S. singularis* que les isolats BIITAC10.3.3 à  $1 \times 10^9$  et MIITAC6.2.2 à  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup>. De même, les traitements MIITAC6.4.2 à  $1 \times 10^9$  et  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup>, BIITAC8.1.5 à  $3,2 \times 10^8$  et BIITAC6.2.2 à  $3,2 \times 10^8$  ont

révélé la même pathogénicité vis-à-vis des mirides (tableau VI). Ces deux groupes de traitements ont induit les meilleures pathogénicités alors que MIITAC6.2.2 à  $3, 2 \times 10^8$  et BIITAC6.2.2 à  $1 \times 10^8$  ont révélé les plus faibles taux de pathogénicité. Dans l'ensemble, les mortalités des mirides aux différentes concentrations fongiques ont été significativement différentes ( $P = 0,0106$ ) en formant sept groupes homogènes.

Par ailleurs, nos résultats ont montré une corrélation positive et hautement significative entre les mortalités corrigées de mirides dues aux champignons et les concentrations fongiques testées ( $r = 0,57$ ; ddl = 22;  $p = 0,004$ ). En considérant seulement le test de pathogénicité, les concentrations  $1 \times 10^8$ ,  $3,2 \times 10^8$  et  $1 \times 10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup> des six isolats ont eu un effet plus significatif vis-à-vis de *S. singularis* que la concentration  $1 \times 10^7$  conidies.mL<sup>-1</sup>.

**Tableau VI :** Effet de différents traitements (isolat-concentration) de *B. bassiana* et *M. anisopliae* sur les mortalités corrigées de *S. singularis* par immersion

Traitement (Isolats - Concentration des suspensions fongiques)	Taux moyens de mortalité ( $\pm$ ES) de mirides
MIITAC11.3.4 à $1 \times 10^8$	100,0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
BIITAC10.3.3 à $1 \times 10^9$	100,0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
MIITAC6.2.2 à $1 \times 10^8$	100,0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
MIITAC11.3.4 à $3, 2 \times 10^8$	100,0 $\pm$ 0 <sup>a</sup>
MIITAC6.4.2 à $1 \times 10^9$	97,1 $\pm$ 2,8 <sup>ab</sup>
BIITAC8.1.5 à $3, 2 \times 10^8$	96,7 $\pm$ 3,3 <sup>ab</sup>
MIITAC6.4.2 à $1 \times 10^8$	95,0 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>
BIITAC6.2.2 à $3, 2 \times 10^8$	95,0 $\pm$ 5 <sup>ab</sup>
MIITAC6.4.2 à $3, 2 \times 10^8$	90,0 $\pm$ 1 <sup>abc</sup>
BIITAC8.1.5 à $1 \times 10^9$	90,0 $\pm$ 6,7 <sup>abc</sup>
MIITAC11.3.4 à $1 \times 10^9$	90,0 $\pm$ 6,7 <sup>abc</sup>
BIITAC10.3.3 à $1 \times 10^8$	85,0 $\pm$ 15 <sup>abc</sup>
BIITAC10.3.3 à $3, 2 \times 10^8$	90,0 $\pm$ 6,12 <sup>abc</sup>
BIITAC6.2.2 à $1 \times 10^7$	80,0 $\pm$ 15,5 <sup>abcd</sup>
MIITAC6.2.2 à $1 \times 10^7$	80,0 $\pm$ 9,3 <sup>abcd</sup>
BIITAC8.1.5 à $1 \times 10^7$	80,0 $\pm$ 9,3 <sup>abcd</sup>
BIITAC10.3.3 à $1 \times 10^7$	76,0 $\pm$ 7,5 <sup>abcd</sup>
BIITAC6.2.2 à $1 \times 10^9$	68,0 $\pm$ 10,2 <sup>abcd</sup>

MIITAC6.2.2 à $1 \times 10^9$	60,0±12,7 <sup>abcd</sup>
MIITAC6.4.2 à $1 \times 10^7$	57,1±4,5 <sup>bcd</sup>
MIITAC11.3.4 à $1 \times 10^7$	56,0±17,2 <sup>bcd</sup>
BIITAC8.1.5 à $1 \times 10^8$	45,7±5,3 <sup>cd</sup>
BIITAC6.2.2 à $1 \times 10^8$	40,0±10 <sup>d</sup>
MIITAC6.2.2 à 3, $2 \times 10^8$	35,0±6.12 <sup>d</sup>

\* Les valeurs moyennes de mortalités des mirides suivies par la même lettre à l'intérieur de la colonne ne diffèrent pas significativement au seuil de 5%, selon le test de Tukey.

Les concentrations létales 50 (CL50), les temps létaux 50 et 90 (TL50 et TL90) des six isolats fongiques sont rendus dans les tableaux VII et VIII. L'analyse par les probits a montré l'existence d'une relation significative ( $P < 0.05$ ) entre le logarithme de la concentration et le probit de la mortalité (tableau VII). Avec la plus faible valeur de CL50 ( $8,97 \times 10^5$  conidies.ml<sup>-1</sup>), l'isolat BIITAC10.3.3 de *B. bassiana*, et celui MIITAC6.4.2 de *M. anisopliae* ( $3,69 \times 10^6$  conidies.mL<sup>-1</sup>), auraient tous les deux un meilleur potentiel insecticide vis-à-vis des mirides par rapport aux autres isolats fongiques testés (tableau VII). En revanche, les isolats BIITAC8.1.5 ( $1,15 \times 10^7$ ) de *B. bassiana* et MIITAC6.2.2 ( $2,18 \times 10^7$ ) de *M. anisopliae* seraient moins efficaces/pathogènes pour *S. singularis* que leurs homologues (tableau VII).

**Tableau VII:** Probits des concentrations létales 50 des isolats de *B. bassiana* et *M. anisopliae* lors de leur application directe sur *S. singularis*

Isolats		CL <sub>50</sub> (conidie.ml <sup>-1</sup> )	Paramètres de Probit ± SE		X <sup>2</sup>
			Intercept	Pente	
<i>B. bassiana</i>	BIITAC6.2.2	$4,32 \times 10^6$	-3,54±0,78	0,535±0,98	24,92
	BIITAC8.1.5	$1,15 \times 10^7$	-5,15±0,78	0,729±0,98	2,00
	BIITAC10.3.3	$8,97 \times 10^5$	-3,49±0,92	0,586±0,12	7,185
<i>M. anisopliae</i>	MIITAC11.3.4	$7,16 \times 10^6$	-6,998±0,96	1,021±0,12	8,178
	MIITAC6.2.2	$2,18 \times 10^7$	-8,678±0,91	1,182±0,12	5,895
	MIITAC6.4.2	$3,69 \times 10^6$	-2,756±0,74	0,420±0,09	18,518

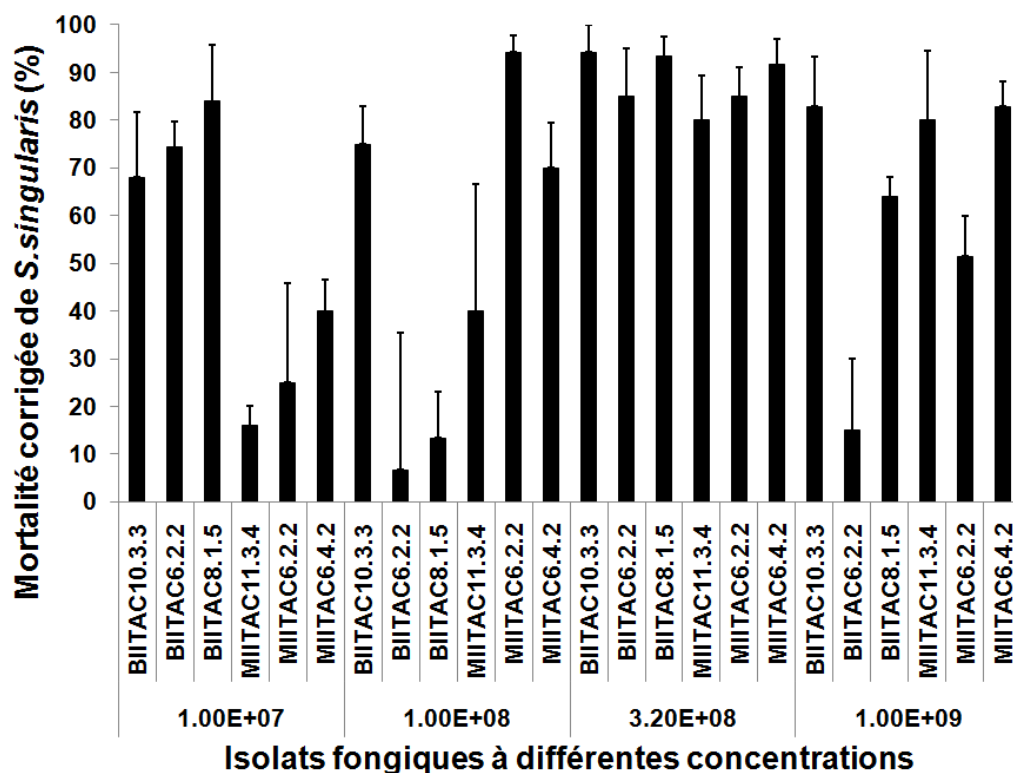
La mortalité journalière maximale des mirides a varié en fonction des isolats testés. Les valeurs des temps létaux 50 et 90, notées LT50 et LT90, pour les isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* sont consignées dans le tableau VIII. Parmi les isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* testés, BIITAC10.3.3 et MIITAC11.3.4 ont eu une meilleure virulence vis-à-vis des mirides, avec des valeurs moyennes respectives de LT50 et LT90 de 4,2 et 8,7 pour BIITAC10.3.3 et de 4,1 et 7,5 pour MIITAC11.3.4.

**Tableau VIII:** Temps létaux 50 (TL50) et 90 (TL90) des mirides exposés aux isolats de *B. bassiana* et *M. anisopliae* lors de leur application direct sur *S. singularis*

Isolats	TL50 (jour)	95% intervalle de confiance		TL90 (jour)	95% intervalle de confiance	
		Borne inférieure	Borne supérieure		Borne inférieure	Borne supérieure
BIITAC6.2.2	5,1	4,4	5,8	13,2	11,2	16,6
BIITAC8.1.5	4,4	3,2	5,5	11,0	8,6	16,7
BIITAC10.3.3	4,2	3,0	5,2	8,7	6,9	12,6
MIITAC11.3.4	4,1	3,7	4,5	7,5	6,8	8,5
MIITAC6.2.2	4,7	4,1	5,2	12,6	11,0	15,1
MIITAC6.4.2	5,5	4,2	6,7	15,1	11,5	25,1

➤ **Par contact indirect (ou ingestion)**

Les résultats des essais d'infection par ingestion ont présenté une pathogénicité variable des isolats fongiques vis-à-vis des mirides. Les mortalités des insectes ont varié de 6,7 à 94,3% pour les isolats de *B. bassiana* et de 16 à 94,3% pour ceux de *M. anisopliae* (figure 17).



**Figure 17 :** Taux de mortalité de *S. singularis* exposés par ingestion et en fonction des concentrations des isolats fongiques testés.

L'analyse de variances a révélé une différence significative des mortalités des mirides en fonction du facteur concentration (ddl = 3 ; F = 10,0, P <0,0001) et de l'interaction isolats\*concentrations (ddl = 15; F = 3,5; P <0,0001). Les plus fortes mortalités ont été obtenues

avec les traitements avec BIITAC10.3.3, BIITAC6.2.2, BIITAC8.1.5 et MIITAC6.4.2 à  $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> puis MIITAC6.2.2 à  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> (tableau IX). Les traitements les moins pathogènes étaient ceux avec BIITAC6.2.2 à  $1 \times 10^9$  et MIITAC11.3.4 à  $1 \times 10^7$  conidies.mL<sup>-1</sup>. Une corrélation significative et positive a été notée entre les taux de mortalité corrigée due aux six microorganismes et la concentration des suspensions fongiques ( $r = 0,55$ ;  $R^2 = 0,30$ ; ddl= 22;  $p = 0,005$ ). Les taux de mortalité ont en général augmenté avec l'augmentation de la concentration de conidies dans la suspension. Sur la base du résultat de cet essai par ingestion, BIITAC10.3.3, BIITAC8.1.5, BIITAC6.2.2, MIITAC6.4.2 et MIITAC6.2.2 ont été considérés comme des isolats prometteurs pour la pathogénicité ; de plus la concentration  $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> pourrait être retenue pour les essais suivants (tableau IX).

**Tableau IX :** Effet de différents traitements (isolat-concentration) sur les mortalités corrigées des larves de *S. singularis* exposés, pendant 14 jours, par ingestion des isolats de *B. bassiana* et *M. anisopliae*

Traitement (Isolats - Concentration des suspensions fongiques)	Taux moyens de mortalité ( $\pm$ ES) de mirides
BIITAC10.3.3 à $3,2 \times 10^8$	94,3 $\pm$ 5,7 <sup>a</sup>
MIITAC6.2.2 à $1 \times 10^8$	94,3 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>
BIITAC8.1.5 à $3,2 \times 10^8$	93,3 $\pm$ 4 <sup>a</sup>
MIITAC6.4.2 à $3,2 \times 10^8$	91,7 $\pm$ 5,3 <sup>a</sup>
BIITAC6.2.2 à $3,2 \times 10^8$	85,0 $\pm$ 10 <sup>ab</sup>
BIITAC8.1.5 à $1 \times 10^7$	84,0 $\pm$ 11,7 <sup>abc</sup>
MIITAC6.2.2 à $3,2 \times 10^8$	85,0 $\pm$ 6,1 <sup>abc</sup>
MIITAC11.3.4 à $1 \times 10^9$	80,0 $\pm$ 14,5 <sup>abc</sup>
BIITAC10.3.3 à $1 \times 10^9$	82,8 $\pm$ 10,5 <sup>abc</sup>
MIITAC11.3.4 à $3,2 \times 10^8$	80,0 $\pm$ 9,5 <sup>abcd</sup>
MIITAC6.4.2 à $1 \times 10^9$	82,8 $\pm$ 5,3 <sup>abcd</sup>
BIITAC10.3.3 à $1 \times 10^8$	75,0 $\pm$ 8 <sup>abcd</sup>
BIITAC10.3.3 à $1 \times 10^7$	68,0 $\pm$ 13,7 <sup>abcd</sup>
BIITAC6.2.2 à $1 \times 10^7$	74,3 $\pm$ 5,3 <sup>abcd</sup>
MIITAC6.4.2 à $1 \times 10^8$	70,0 $\pm$ 9,3 <sup>abcd</sup>
MIITAC11.3.4 à $1 \times 10^8$	40,0 $\pm$ 26,7 <sup>abcd</sup>
BIITAC8.1.5 à $1 \times 10^9$	64,0 $\pm$ 4 <sup>abcd</sup>
MIITAC6.2.2 à $1 \times 10^9$	51,4 $\pm$ 8,6 <sup>abcd</sup>
BIITAC6.2.2 à $1 \times 10^8$	6,7 $\pm$ 28,7 <sup>abcd</sup>

MIITAC6.4.2 à $1 \times 10^7$	40,0±6,7 <sup>abcd</sup>
MIITAC6.2.2 à $1 \times 10^7$	25,0±21 <sup>abcd</sup>
BIITAC8.1.5 à $1 \times 10^8$	13,3±9,7 <sup>bcd</sup>
BIITAC6.2.2 à $1 \times 10^9$	15,0±15 <sup>cd</sup>
MIITAC11.3.4 à $1 \times 10^7$	16,0±4 <sup>cd</sup>

\* Les valeurs moyennes de mortalités des mirides suivies par la même lettre à l'intérieur de la colonne ne diffèrent pas significativement au seuil de 5%, selon le test de Tukey.

Les concentrations létales 50 (CL50) estimées pour chacun des isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* sont consignées dans le tableau X. Ces résultats indiquent une relation significative ( $P < 0,05$ ) entre la dose logarithmique des suspensions fongiques et le probit des taux moyens de mortalité. Il apparaît clairement que, parmi tous les isolats de *B. bassiana*, BIITAC10.3.3 a donné la plus petite valeur de CL50 ( $6,45 \times 10^5$  conidies.mL<sup>-1</sup>) ; il a ainsi un meilleur potentiel insecticide que BIITAC6.2.2 et BIITAC8.1.5. En tenant compte de la CL50 de *M. anisopliae*, le meilleur potentiel insecticide a été attribué à l'isolat MIITAC6.4.2 avec une valeur de CL50 égale à  $2,09 \times 10^7$  conidies.mL<sup>-1</sup>.

**Tableau X :** Concentrations létales 50 (CL50) des isolats de *B. bassiana* et *M. anisopliae* par application indirect sur *S. singularis* 14 jours après l'essai

Isolats	CL50 (conidies.ml <sup>-1</sup> )	Paramètres de Probit ± SE		X <sup>2</sup>	
		Intercept	Pente		
<i>B. bassiana</i>	BIITAC6.2.2	$1,46 \times 10^8$	-8,490±0,841	1,040±0,103	33,876
	BIITAC8.1.5	$5,71 \times 10^7$	-7,912±0,814	1,020±0,100	9,989
	BIITAC10.3.3	$6,45 \times 10^5$	-2,266±0,786	0,390±0,098	3,427
<i>M. anisopliae</i>	MIITAC11.3.4	$9,47 \times 10^7$	-8,013±0,818	1,005±0,100	7,097
	MIITAC6.2.2	$7,55 \times 10^7$	-10,49±0,905	1,335±0,112	47,471
	MIITAC6.4.2	$2,09 \times 10^7$	-5,697±0,772	0,778±0,096	0,056

La régression binomiale des probits a permis d'évaluer la mortalité des mirides en fonction du temps dans la méthode par ingestion des résidus contaminés. En prenant en compte les différents TL50 des isolats de *B. bassiana*, on note que BIITAC6.2.2 a eu la plus petite valeur, soit 7,6, tandis que BIITAC8.1.5 et BIITAC10.3.3 ont enregistré les plus petits TL90 (tableau XI). Les valeurs de TL50 de 4,0 et de TL90 de 10,8 de l'isolat MIITAC6.2.2 de *M. anisopliae* ont été les plus faibles et donc semblent être les plus intéressantes. Les valeurs de TL50 ont montré que les isolats MIITAC6.2.2 et MIITAC6.2.2 pourraient être choisis du fait de leur virulence plus avérée sur les insectes.

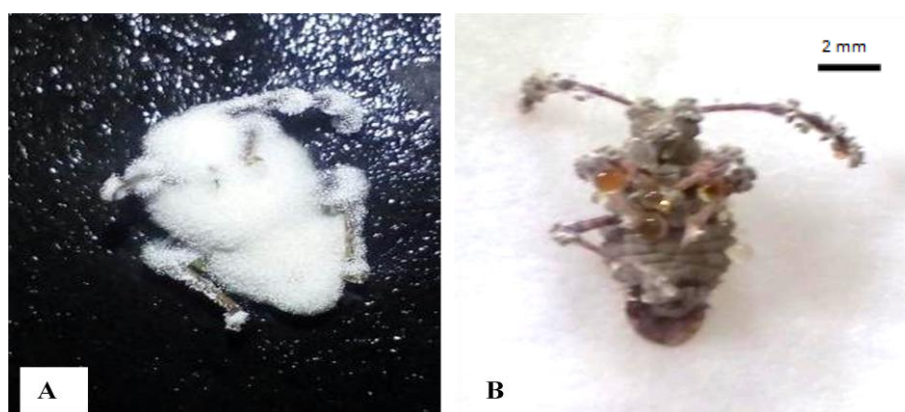
**Tableau XI:** TL50 et TL90 des isolats de *B. bassiana* et *M. anisopliae* appliqués par contact indirect à  $3,2 \cdot 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup>

Isolats	TL50 (jour)	95% intervalle de confiance		TL90 (jour)	95% intervalle de confiance	
		Borne inférieure	Borne supérieure		Borne inférieure	Borne supérieure
BIITAC6.2.2	7,6	6,2	9,5	30,9	20,6	68,4
BIITAC8.1.5	9,6	9,2	10,0	19,0	17,4	21,3
BIITAC10.3.3	9,0	8,6	9,4	19,4	17,6	21,9
MIITAC11.3.4	11,3	9,4	15,7	24,7	17,2	63,1
MIITAC6.2.2	4,0	3,4	4,5	10,8	9,4	13,2
MIITAC6.4.2	7,8	7,4	8,2	18,0	16,4	20,2

En général pour *B. bassiana*, la méthode d'infection des mirides par immersion a pu causer jusqu'à 100% de mortalité avec l'isolat BIITAC10.3.3 à  $1 \times 10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup>, tandis que *M. anisopliae* a atteint une mortalité maximale avec les isolats MIITAC11.3.4 à  $3,2 \times 10^8$  et  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> puis MIITAC6.2.2 à  $1 \times 10^8$ . Le test de Tukey a révélé que quel que soit l'isolat fongique, les taux moyens de mortalité calculés à la concentration  $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> ont toujours été significativement plus importants que ceux obtenus avec les autres concentrations ( $P = 0,01$  pour la contamination par immersion et  $P < 0,0001$  pour la contamination par ingestion).

#### ➤ Test de Confirmation de l'infection fongique

Les taux d'insectes morts et présentant une sporulation fongique des deux espèces *B. bassiana* et *M. anisopliae* (figure 18) ont également varié en fonction des isolats et des méthodes d'application.



**Figure 18 :** Sporulation fongique sur *S. singularis* suite à l'infection par *B. bassiana* (A) et par *M. anisopliae* (B) (Photo Mahot).

En immersion, *B. bassiana* a présenté des taux de sporulation sur des insectes, rangés entre 22,8 et 97,1% contre 42,8 et 97,1% pour le *M. anisopliae*. Les taux d'apparition de spores ont significativement été influencés par les concentrations (ddl=3 ; F=27,6 ;  $P < 0,001$ ) et les isolats (ddl=5 ; F=13,4 ;  $P < 0,001$ ). L'interaction entre ces deux facteurs (isolat\*concentration) a également été significative (ddl=15 ; F=6,0 ;  $P < 0,001$ ). L'isolat BIITAC8.1.5 aux concentrations  $1 \times 10^7$  et

$1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> s'est montré moins sporulant sur les mirides morts. En revanche, les traitements MIITAC11.3.4 ( $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup>), MIITAC6.2.2 ( $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup>), BIITAC10.3.3 ( $1 \times 10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup>), BIITAC6.2.2 ( $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup>) et MIITAC11.3.4 ( $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup>) se sont révélés plus sporulants chez les populations hôtes (tableau XII).

**Tableau XII:** Comparaisons des taux (moyennes  $\pm$  ES) de mirides morts, suite à leur exposition par immersion aux différents traitements et présentant une sporulation

Isolats	Concentration des suspensions fongiques	Taux moyens ( $\pm$ ES) de mirides morts présentant une sporulation
MIITAC11.3.4	$1 \times 10^8$	97,1 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>
MIITAC6.2.2	$1 \times 10^8$	97,1 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>
BIITAC10.3.3	$1 \times 10^9$	97,1 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>
BIITAC6.2.2	$3,2 \times 10^8$	88,6 $\pm$ 7,0 <sup>ab</sup>
MIITAC11.3.4	$3,2 \times 10^8$	91,4 $\pm$ 3,3 <sup>ab</sup>
BIITAC10.3.3	$3,2 \times 10^8$	88,6 $\pm$ 2,8 <sup>abc</sup>
BIITAC8.1.5	$1 \times 10^9$	74,3 $\pm$ 11,4 <sup>abcd</sup>
BIITAC10.3.3	$1 \times 10^8$	77,1 $\pm$ 8,5 <sup>abcd</sup>
MIITAC6.4.2	$3,2 \times 10^8$	71,4 $\pm$ 12,0 <sup>abcde</sup>
MIITAC11.3.4	$1 \times 10^9$	74,3 $\pm$ 5,3 <sup>abcdef</sup>
BIITAC6.2.2	$1 \times 10^9$	74,3 $\pm$ 5,3 <sup>abcdef</sup>
MIITAC6.2.2	$1 \times 10^9$	74,3 $\pm$ 5,3 <sup>abcdef</sup>
BIITAC8.1.5	$3,2 \times 10^8$	62,8 $\pm$ 5,7 <sup>bcdefg</sup>
MIITAC6.2.2	$3,2 \times 10^8$	62,8 $\pm$ 3,55 <sup>bcdefg</sup>
MIITAC6.2.2	$1 \times 10^7$	54,3 $\pm$ 8,3 <sup>bcdefg</sup>
BIITAC6.2.2	$1 \times 10^8$	48,6 $\pm$ 7,3 <sup>cdefg</sup>
MIITAC11.3.4	$1 \times 10^7$	45,7 $\pm$ 8,3 <sup>defg</sup>
MIITAC6.4.2	$1 \times 10^9$	42,8 $\pm$ 7,8 <sup>defg</sup>
MIITAC6.4.2	$1 \times 10^8$	42,8 $\pm$ 7,8 <sup>defg</sup>
BIITAC6.2.2	$1 \times 10^7$	40,0 $\pm$ 5,3 <sup>defg</sup>
BIITAC10.3.3	$1 \times 10^7$	40,0 $\pm$ 5,3 <sup>defg</sup>
MIITAC6.4.2	$1 \times 10^7$	28,6 $\pm$ 4,5 <sup>efg</sup>
BIITAC8.1.5	$1 \times 10^7$	31,4 $\pm$ 12,3 <sup>fg</sup>
BIITAC8.1.5	$1 \times 10^8$	22,8 $\pm$ 5,7 <sup>g</sup>

\* Les valeurs moyennes de mirides morts avec sporulation suivies par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne diffèrent significativement au seuil de 5%, selon le test de Tukey  $P < 0,05$ .



Avec la méthode d'ingestion des aliments contaminés, le taux d'insectes morts et présentant une sporulation a varié de 11,4 à 88,6 % pour les isolats de *B. bassiana* contre 22,8 et 68,6% pour ceux de *M. anisopliae*. L'ANOVA a montré une différence significative des taux de mirides morts avec sporulation tant en fonction des facteurs concentration (ddl=3 ; F=30,3 ; P<0,0001) et isolats (ddl=5 ; F=7,8; P<0,0001) que pour l'interaction entre les deux (ddl=15 ; F=6,4 ; P<0,0001). Les traitements de BIITAC6.2.2 à  $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> et ceux de BIITAC10.3.3 à  $1 \times 10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup> puis à  $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> se sont montrés plus inducteurs de la sporulation. Cependant, les traitements BIITAC8.1.5 à  $1 \times 10^7$  puis à  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> ont été moins efficaces à sporuler chez les populations individus morts (tableau XIII).

**Tableau XIII :** Comparaisons des taux (moyennes  $\pm$  ES) de mirides morts, suite à leur exposition aux différents traitements par ingestion et présentant une sporulation

Isolats	Concentration des suspensions fongiques	Taux moyens ( $\pm$ ES) de mirides morts présentant une sporulation
BIITAC6.2.2	$3. 2 \times 10^8$	88,5 $\pm$ 7,0 <sup>a</sup>
BIITAC10.3.3	$1 \times 10^9$	77,1 $\pm$ 8,5 <sup>ab</sup>
BIITAC10.3.3	$3. 2 \times 10^8$	77,1 $\pm$ 5,7 <sup>ab</sup>
BIITAC10.3.3	$1 \times 10^8$	74,3 $\pm$ 5,3 <sup>abc</sup>
MIITAC11.3.4	$3. 2 \times 10^8$	68,6 $\pm$ 5,3 <sup>abcd</sup>
MIITAC6.2.2	$3. 2 \times 10^8$	62,8 $\pm$ 3,5 <sup>bcde</sup>
MIITAC6.2.2	$1 \times 10^8$	62,8 $\pm$ 3,5 <sup>bcde</sup>
MIITAC11.3.4	$1 \times 10^9$	57,1 $\pm$ 11,0 <sup>bcde</sup>
BIITAC8.1.5	$1 \times 10^9$	54,3 $\pm$ 5,3 <sup>bcdef</sup>
BIITAC8.1.5	$3. 2 \times 10^8$	51,4 $\pm$ 9,7 <sup>bcdef</sup>
MIITAC6.4.2	$1 \times 10^9$	48,6 $\pm$ 7,3 <sup>bcdef</sup>
MIITAC6.4.2	$1 \times 10^8$	48,6 $\pm$ 7,3 <sup>bcdef</sup>
MIITAC6.4.2	$3. 2 \times 10^8$	45,7 $\pm$ 7,0 <sup>bcdef</sup>
MIITAC6.2.2	$1 \times 10^7$	42,5 $\pm$ 4,5 <sup>bcdef</sup>
MIITAC11.3.4	$1 \times 10^8$	37,1 $\pm$ 7,3 <sup>cdefg</sup>
BIITAC6.2.2	$1 \times 10^7$	34,3 $\pm$ 3,5 <sup>cdefg</sup>
BIITAC6.2.2	$1 \times 10^8$	34,3 $\pm$ 3,5 <sup>cdefg</sup>
MIITAC6.2.2	$1 \times 10^9$	28,6 $\pm$ 4,5 <sup>defg</sup>

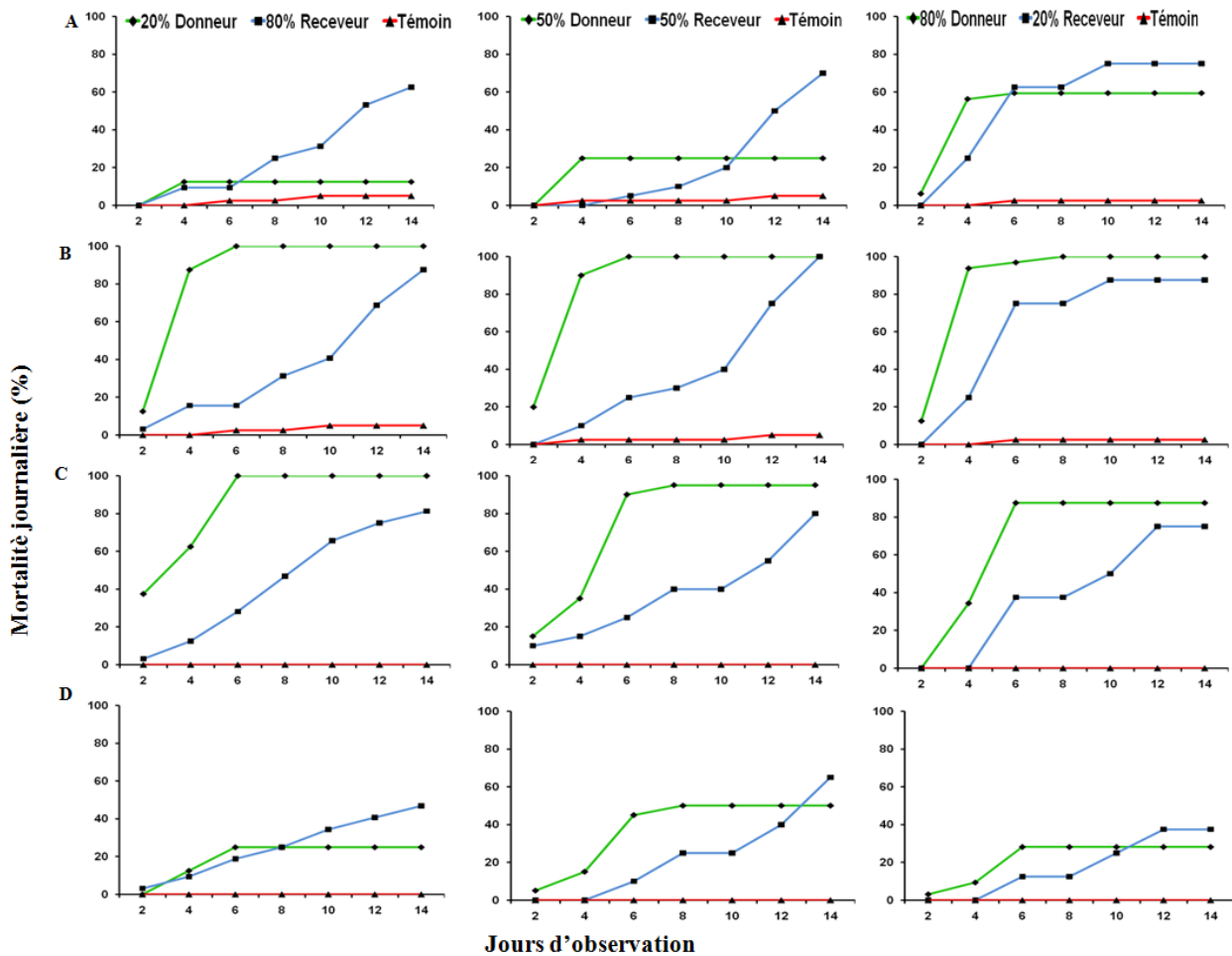
BIITAC6.2.2	1x10 <sup>9</sup>	28,6±4,5 <sup>defg</sup>
MIITAC6.4.2	1x10 <sup>7</sup>	22,8±3,5 <sup>efg</sup>
MIITAC11.3.4	1x10 <sup>7</sup>	22,8±5,7 <sup>fg</sup>
BIITAC10.3.3	1x10 <sup>7</sup>	25.7±7,0 <sup>fg</sup>
BIITAC8.1.5	1x10 <sup>7</sup>	20.0±3,5 <sup>fg</sup>
BIITAC8.1.5	1x10 <sup>8</sup>	11,4±5,3 <sup>g</sup>

\* Les valeurs moyennes de mirides morts avec sporulation suivies par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne diffèrent significativement au seuil de 5%, selon le test de Tukey.

### III.1.1.2. Transmission horizontale de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae*

Quel que soit l'isolat de champignon et le niveau de contamination, la mortalité des insectes testés a été observée à partir du deuxième jour de l'expérimentation, exception faite pour quelques traitements (figures 19 A, B, C et D). La mort des insectes contaminés (receveurs) n'a pas toujours débuté après celle de tous les spécimens contamineurs.

La transmission horizontale des champignons (*B. bassiana* et *M. anisopliae*), exprimée en taux de mortalité de mirides, a varié entre les isolats testés. La mortalité des mirides contamineurs ou donneurs (traités et mis en contact avec les insectes non traités), causée par BIITAC6.2.2 au ratio 5 : 5 ou 1 : 1 ou encore 50% de mirides traités et 50% non traités d'une part et, par MIITAC11.3.4 au ratio 2 : 8 ou 1 : 4 ou encore à 20% de mirides traités et 80% non traités d'autre part, a rapidement atteint son maximum, soit 100%, au bout de six jours post-traitement/exposition (figures 19 B et C). En revanche, les isolats BIITAC10.3.3 et MIITAC6.2.2 ont été responsables des plus faibles taux de mortalité au sein des groupes donneurs (figures 19 A et D). Les insectes traités ou contamineurs ont transmis l'infection à leurs congénères, indemnes de champignons au départ, leur causant un taux de mortalité de l'ordre de 37,5% à 100%. Les résultats ont révélé des taux de transmission de 46,87 à 87,5% pour le ratio 1 : 4, de 65 à 100% pour le ratio 1 : 1 et de 37,5 à 87,5% pour le ratio 4 : 1.



**Figure 19** : Taux de transmission de l'effet bioinsecticide des isolats (A : BIITAC 10.3.3, B : BIITAC6.2.2, C : MIITAC11.3.4, D : MIITAC6.2.2.) des mirides donneurs aux contaminés.

Au bout des quatorze jours d'observation les taux de transmission, évalués en taux de mortalité, les plus élevés ont été de 100% et 87,5% avec les traitements BIITAC6.2.2 au ratio 1 : 1 et 1 : 4 puis 4 :1 contre 81,25% avec MIITAC11.3.4 au ratio 1 : 4. La transmission effective de l'infection a été confirmée par la sporulation sur la paroi des mirides contaminés (receveurs) avec des fréquences rangées entre 25% et 75% (tableau XIV). Les insectes morts dans le traitement témoin n'ont pas présenté de sporulation fongique.

Le test de Tukey a montré des différences significatives des taux de mortalité de mirides au sein des lots contaminés entre les isolats (ddl=3 ; F=11,3 ; P<0,001) et entre les ratios ou traitements (ddl=3 ; F=68,5 ; P<0,001). L'interaction « isolat\*ratio » a été significative (ddl=9 ; F=3,2 ; P<0,004). Quatre groupes homogènes bien différents les uns des autres se sont révélés. Les fréquences de sporulation sur les insectes contaminés et morts ont aussi été très différentes entre les isolats (ddl=3 ; F=3,1 ; P<0,033) et entre les ratios (ddl=3 ; F=57,5 ; P<0,001). Ces fréquences ont permis de classer les isolats fongiques en trois groupes homogènes ; les isolats BIITAC6.2.2 et

MIITAC11.3.4 ont, au ratio 4 :1, donné les fréquences de sporulation les plus élevées sur mirides tandis le taux de mortalité causée par MIITAC6.2.2 au ratio 4 :1 a été semblable à celui du témoin (tableau XIV).

**Tableau XIV** : Effet des traitements sur la mortalité et la fréquence de sporulation sur les insectes (traités et non traités) morts

Isolat*Traitement	Mirides contamineurs (donneurs)		Mirides contaminés (receveurs)	
	Taux moyen mortalité	Fréquence moyenne de sporulation	Taux moyen mortalité	Fréquence moyenne de sporulation
20%BIITAC6.2.2	100±0,0 <sup>a</sup>	100±0,0 <sup>a</sup>	87,5±8,8 <sup>a</sup>	62,5±8,8 <sup>a</sup>
20%BIITAC10.3.3	12,5±12,5 <sup>d</sup>	12,5±12,5 <sup>bc</sup>	62,5±13,5 <sup>a</sup>	34,37±9,4 <sup>a</sup>
20%MIITAC11.3.	100±0,0 <sup>a</sup>	87,5±12,5 <sup>a</sup>	81,5±8,0 <sup>a</sup>	59,4±10,7 <sup>a</sup>
20%MIITAC6.2.2	25±2 <sup>cd</sup>	25±2 <sup>bc</sup>	46,9±11,8 <sup>ab</sup>	31,3±11,9 <sup>a</sup>
50%BIITAC6.2.2	100±0,0 <sup>a</sup>	85±9,6 <sup>a</sup>	100±0,0 <sup>a</sup>	50±19,1 <sup>a</sup>
50%BIITAC10.3.3	25±9,6 <sup>abcd</sup>	25±9,6 <sup>ab</sup>	70±5,8 <sup>a</sup>	25±12,6 <sup>a</sup>
50%MIITAC11.3.	95±5 <sup>a</sup>	85±5 <sup>a</sup>	80±14,1 <sup>a</sup>	70±12,9 <sup>a</sup>
50%MIITAC6.2.2	50±20,8 <sup>abcd</sup>	35±17,0 <sup>ab</sup>	65±9,6 <sup>a</sup>	55±5 <sup>a</sup>
80%BIITAC6.2.2	100±0,0 <sup>a</sup>	100±0,0 <sup>a</sup>	87,5±12,5 <sup>a</sup>	75±14,4 <sup>a</sup>
80%BIITAC10.3.3	59,37±12,9 <sup>abc</sup>	59,37±12,9 <sup>a</sup>	75±14,4 <sup>a</sup>	62,5±12,5 <sup>a</sup>
80%MIITAC11.3.	87,5±8,8 <sup>ab</sup>	81,25±8,0 <sup>a</sup>	75±14,4 <sup>a</sup>	75±14,4 <sup>a</sup>
80%MIITAC6.2.2	28,12±3,1 <sup>abcd</sup>	25±5,10 <sup>ab</sup>	37,5±23,9 <sup>b</sup>	37,5±23,9 <sup>ab</sup>
0%BIITAC6.2.2	-	-	5,58±1,6 <sup>b</sup>	0±0,0 <sup>b</sup>
0%BIITAC10.3.3	-	-	5,58±1,6 <sup>b</sup>	0±0,0 <sup>b</sup>
0%MIITAC11.3.4	-	-	0±0,0 <sup>c</sup>	0±0,0 <sup>b</sup>
0%MIITAC6.2.2	-	-	0±0,0 <sup>c</sup>	0±0,0 <sup>b</sup>

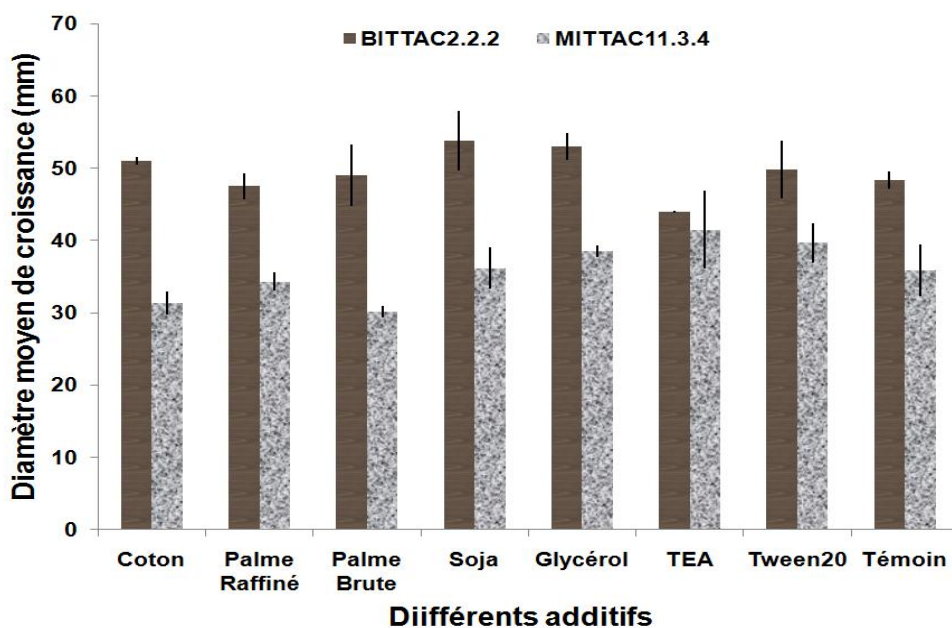
\*Les Taux moyens des mortalités et les fréquences de sporulation cumulées (±ES) suivis de lettres différentes à l'intérieur de la colonne diffèrent significativement au seuil de 5%, selon le test de Tukey.

### III.1.2. Mise au point des formulations fongiques

#### III.1.2.1. Influence des différents adjuvants sur les spores des isolats fongiques

##### ➤ Croissance radiale ou végétative de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* en présence des adjuvants

Dans l'ensemble, les diamètres moyens de la croissance des champignons sur le milieu de culture PDA ont varié en fonction des additifs utilisés et des isolats. Les diamètres moyens de croissance les plus importants pour *B. bassiana* ont été notés avec les adjuvants huile de soja, huile de coton et glycérol, alors que pour *M. anisopliae* ils ont été enregistrés avec le TEA, le tween 20 et le glycérol (figure 20).



**Figure 20 :** Diamètre moyen de croissance radiale fongique (mm) en présence des différents additifs ou adjuvants au jour 20 post-ensemencement.

Trois, quatre et deux groupes homogènes des adjuvants sont définis aux jours 5, 10 et 15 respectivement. Quel que soit le jour d'observation, la vitesse de croissance radiale de l'isolat BITTAC6.2.2 de *B. bassiana* sur le PDA a significativement varié en fonction des adjuvants, sauf au jour 20 (tableau XV). A bout de ce temps, aucune différence n'a été notée entre les vitesses de croissance en présence des adjuvants ; toutefois, avec l'huile de soja et le glycérol ces vitesses ont été un peu plus élevées.

**Tableau XV:** Vitesse de croissance radiale (en cm/jour) de BITTAC6.2.2 de *B. bassiana* en présence des différents adjuvants

Adjuvants utilisés	Temps d'observation			
	Jour 5	Jour 10	Jour 15	Jour 20
<b>Huile de Coton</b>	3,83±0,14 <sup>ab</sup>	2,91±0,09 <sup>b</sup>	2,54±0,01 <sup>b</sup>	2,55±0,02 <sup>a</sup>
<b>Huile palme brute</b>	3,90±0,10 <sup>ab</sup>	2,93±0,13 <sup>b</sup>	2,71±0,04 <sup>b</sup>	2,45±0,20 <sup>a</sup>
<b>Huile palme raffinée</b>	3,33±0,06 <sup>b</sup>	2,76±0,03 <sup>cb</sup>	2,37±0,17 <sup>b</sup>	2,37±0,09 <sup>a</sup>
<b>Huile de soja</b>	3,96±0,06 <sup>ab</sup>	3,26±0,01 <sup>a</sup>	3,11±0,02 <sup>a</sup>	2,69±0,00 <sup>a</sup>
<b>Glycérol</b>	3,63±0,12 <sup>b</sup>	2,91±0,04 <sup>b</sup>	2,60±0,15 <sup>b</sup>	2,65±0,21 <sup>a</sup>
<b>TEA</b>	3,33±0,16 <sup>b</sup>	2,78±0,06 <sup>cb</sup>	2,53±0,10 <sup>b</sup>	2,20±0,20 <sup>a</sup>
<b>Tween20</b>	5,06±0,83 <sup>a</sup>	2,68±0,14 <sup>cb</sup>	2,53±0,05 <sup>b</sup>	2,49±0,05 <sup>a</sup>
<b>Témoin</b>	2,80±0,26 <sup>b</sup>	2,5±0,00 <sup>c</sup>	2,28±0,04 <sup>b</sup>	2,41±0,08 <sup>a</sup>
<b>Valeurs statistiques</b>	p=0,008 ; F= 4,15 ; ddl=7	p<0,001 ; F= 7,37 ; ddl=7	p<0,001 ; F= 6,89 ; ddl=7	p=0,306 ; F= 1,31 ; ddl=7

\*Les vitesses moyennes de croissance fongique (± ES) sur milieu PDA suivies par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne différent significativement au seuil de 5%, selon le test de Student-Newman-Keuls.

Quant à l'isolat MIITAC11.3.4 de *M. anisopliae*, aucune différence significative n'a été révélée entre les vitesses de croissance en présence des différents adjuvants et celle du témoin (tableau XVI). De même, entre les adjuvants, la vitesse de croissance fongique n'a montré aucune différence significative. Toutefois, l'huile de coton aux jours 5 et 15, le glycérol et le TEA aux jours 10 et 20, respectivement, ont permis d'obtenir les vitesses de croissance les plus importantes, tandis qu'avec le Tween20 au jour 5, l'huile de palme brute aux jours 10 et 20, l'huile de palme raffinée et le TEA au jour 15, les vitesses de croissance fongique ont été plus faibles (tableau XVI).

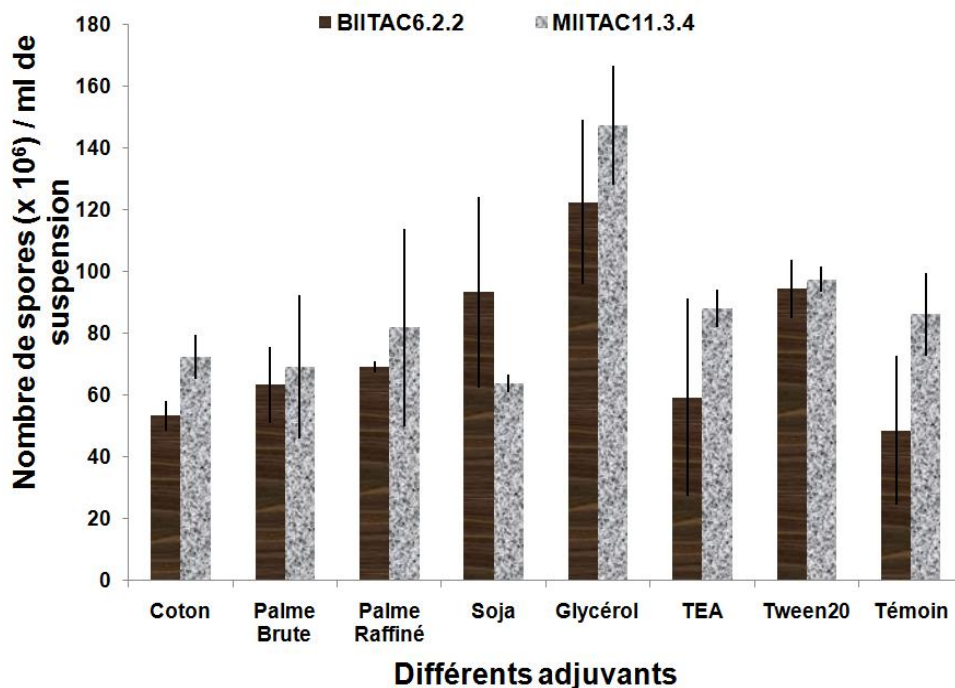
**Tableau XVI:** Vitesses de croissance radiale (en cm/jour) de MIITAC11.3.4 de *M. anisopliae* en présence des différents adjuvants

Adjuvants utilisés	Temps d'observation			
	Jour 5	Jour 10	Jour 5	Jour 20
<b>Huile de Coton</b>	2,63±0,21 <sup>a</sup>	2,08±0,04 <sup>a</sup>	1,66±0,01 <sup>a</sup>	1,56±0,07 <sup>a</sup>
<b>Huile palme brute</b>	2,13±0,03 <sup>a</sup>	1,83±0,17 <sup>a</sup>	1,60±0,12 <sup>a</sup>	1,50±0,14 <sup>a</sup>
<b>Huile palme raffinée</b>	2,30±0,11 <sup>a</sup>	1,85±0,12 <sup>a</sup>	1,54±0,05 <sup>a</sup>	1,71±0,04 <sup>a</sup>
<b>Huile de soja</b>	2,60±0,15 <sup>a</sup>	1,93±0,19 <sup>a</sup>	1,58±0,09 <sup>a</sup>	1,80±0,26 <sup>a</sup>
<b>Glycérol</b>	2,46±0,12 <sup>a</sup>	2,10±0,02 <sup>a</sup>	1,64±0,02 <sup>a</sup>	1,92±0,03 <sup>a</sup>
<b>TEA</b>	2,00±0,15 <sup>a</sup>	1,90±0,15 <sup>a</sup>	1,54±0,04 <sup>a</sup>	2,07±0,13 <sup>a</sup>
<b>Tween20</b>	1,93±0,23 <sup>a</sup>	1,95±0,17 <sup>a</sup>	1,56±0,07 <sup>a</sup>	1,98±0,18 <sup>a</sup>
<b>Témoin</b>	2,40±0,32 <sup>a</sup>	2,18±0,06 <sup>a</sup>	1,66±0,06 <sup>a</sup>	1,79±0,06 <sup>a</sup>
<b>Valeurs statistiques</b>	p=1,119 ; F=1,99 ; ddl=7	p=0,591 ; F=0,81 ; ddl=7	p=0,821 ; F=0,50 ; ddl=7	p=0,124 ; F=1,97 ; ddl=7

\*Les vitesses moyennes de croissance fongique ( $\pm$ ES) sur PDA suivies par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne diffèrent significativement au seuil de 5%, selon le test de Student-Newman-Keuls.

### ➤ Sporulation de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* en présence des adjuvants

De tous les adjuvants utilisés, le glycérol a fourni une plus grande production de spores quelle que soit l'espèce fongique utilisée (figure 21).



**Figure 21** : Nombre de spores de *B. bassiana* (BIITAC6.2.2) et de *M. anisopliae* (MIITAC11.3.4) produites par millilitre de suspension en fonction des différents adjuvants.

Quel que soit l'isolat fongique, aucune différence significative n'a été observée entre les différentes valeurs de production de spores en présence des adjuvants (*B. bassiana* : ddl=7 ; F= 1,47; P=0,245 ; *M. anisopliae* : ddl=7 ; F=2,48 ; P=0,062). Tout de même, dans le glycérol, le Tween20 et l'huile de soja, l'espèce fongique *B. bassiana* a produit un plus grand nombre de spores alors que dans l'huile de coton, elle en a produit le plus faible nombre. Dans le glycérol, le Tween20 et le TEA *M. anisopliae* a eu une sporulation plus importante alors que dans l'huile de soja, le nombre de spores produites a été moins important même comparé au témoin.

#### ➤ **Biomasse de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* en présence des adjuvants**

La biomasse fongique sèche a été affectée par les différents adjuvants utilisés. Pour l'espèce fongique *B. bassiana*, une différence très significative a été révélée entre les réponses des différents adjuvants (tableau XVII). Quatre groupes sont distinguables entre les biomasses évaluées en présence des adjuvants. L'huile de soja a favorisé la production fongique la plus importante, tandis qu'avec le Tween20 le résultat n'a pas différé du témoin qui a été plus important que celui avec l'huile de palme brute et le TEA. Pour *M. anisopliae* aucune différence significative n'a été notée entre les effets des adjuvants et le témoin. Néanmoins, l'huile de soja et le glycérol ont semblé permettre une plus grande production de *M. anisopliae* (tableau XVII).

**Tableau XVII:** Biomasse fongique sèche (en g) de BIITAC6.2.2 de *B. bassiana* et MIITAC11.3.4 de *M. anisopliae* en présence des différents adjuvants

Adjuvants utilisés	BIITAC6.2.2	MIITAC11.3.4
Huile de Coton	0,018±0,000 <sup>ab</sup>	0,015±0,007 <sup>a</sup>
Huile palme brute	0,001±0,000 <sup>c</sup>	0,004±0,002 <sup>a</sup>
Huile palme raffinée	0,017±0,005 <sup>ab</sup>	0,004±0,004 <sup>a</sup>
Huile de soja	0,023±0,000 <sup>a</sup>	0,029±0,013 <sup>a</sup>
Glycérol	0,014±0,002 <sup>ab</sup>	0,022±0,011 <sup>a</sup>
TEA	0,002±0,002 <sup>c</sup>	0,000±0,00 <sup>a</sup>
Tween20	0,010±0,002 <sup>bc</sup>	0,010±0,010 <sup>a</sup>
Témoin	0,010±0,003 <sup>bc</sup>	0,003±0,003 <sup>a</sup>
Valeurs statistiques	P=0,0001 ; F= 9,16; ddl=7	P=0,174 ; F= 1,72 ; ddl=7

\*Les taux moyens de biomasse sèche (± ES) suivis par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne diffèrent significativement au seuil de 5%, selon le test de Student-Newman-Keuls.

➤ **Viabilité de *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* en présence des adjuvants**

Dans l'ensemble, la viabilité des spores de *B. bassiana* (isolat BIITAC6.2.2) a significativement varié entre les différents adjuvants testés (tableau XVIII). Avec le Tween 20 et l'huile de soja, les spores ont plus germé durant toute l'expérimentation. Cette viabilité des spores a graduellement diminué avec le temps pour s'annuler à partir de la douzième semaine pour le témoin, les huiles de coton et de palme raffinée puis à la dix-huitième semaine pour l'huile de palme brute.

**Tableau XVIII :** Nombre de conidies viables de BIITAC6.2.2 (CFU/ml X 10<sup>5</sup> ± Ecart-type) sous l'effet des différents additifs

Adjuvants utilisés	Semaine 2	Semaine 6	Semaine 12	Semaine 18	Valeurs statistiques
Huile de Coton	40±0,0 <sup>aA</sup>	13,3±9,4 <sup>eB</sup>	0,0±0,0 <sup>tC</sup>	0,0±0,0 <sup>eC</sup>	P<0,001; F=55,04 ; ddl=3
Huile de palme brute	40±0,0 <sup>aA</sup>	16,9±12,6 <sup>dB</sup>	0,8±0,8 <sup>eC</sup>	0,0±0,0 <sup>eD</sup>	P<0,001; F=32,1 ; ddl=3
Huile de palme raffinée	40±0,0 <sup>aA</sup>	23,0±3,7 <sup>cB</sup>	0,0±0,0 <sup>tC</sup>	0,0±0,0 <sup>eC</sup>	P<0,001 ; F=614,7 ; ddl=3
Huile de soja	40±0,0 <sup>aA</sup>	24,9±16,3 <sup>bB</sup>	2,9±1,6 <sup>bC</sup>	1,0 ±1,2 <sup>bD</sup>	P<0,001 ; F=21,3 ; ddl=3
Glycérol	34,8±9,0 <sup>bA</sup>	8,5±3,9 <sup>tB</sup>	1,0±0,8 <sup>dC</sup>	0,2±0,2 <sup>dD</sup>	P<0,001 ; F=54,1 ; ddl=3
TEA	26,0±3,2 <sup>dA</sup>	7,9±3,0 <sup>sB</sup>	1,7±0,9 <sup>cC</sup>	0,4 ±0,0 <sup>cD</sup>	P<0,001 ; F=86,5 ; ddl=3
Tween20	40±0,0 <sup>aA</sup>	31,2±6,0 <sup>aB</sup>	10,3±1,0 <sup>aC</sup>	2,0±0,8 <sup>aD</sup>	P<0,001 ; F=5,41 ; ddl=3



<b>Témoin</b>	31,5±5,4 <sup>cA</sup>	6,7±1,5 <sup>hB</sup>	0,0±0,0 <sup>iC</sup>	0,0±0,0 <sup>eC</sup>	<b>P&lt;0,001 ; F=218,8 ; ddl=3</b>
<b>Valeurs statistiques</b>	<b>P=0,002 ; F=5,41 ; ddl=7</b>	<b>P=0,013 ; F=3,75 ; ddl=7</b>	<b>P&lt;0,001 ; F=32,1 ; ddl=7</b>	<b>P&lt;0,001 ; F=12,8 ; ddl=7</b>	

\*Les taux moyens des CFU suivis par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne (lettre minuscule) et à l'intérieur de la ligne (lettre majuscule) sont significativement différents au seuil de 5%, selon le test de Tukey entre les adjuvants.

La viabilité des spores a également diminué avec le temps pour l'isolat MIITAC11.3.4 de *M. anisopliae*. Dès la douzième semaine, exception faite pour l'huile de soja, l'huile de palme raffinée et du témoin, elle s'est annulée et les spores n'ont plus germé (tableau XIX).

**Tableau XIX** : Nombre de conidies viables de MIITAC11.3.4 (CFU/ml X 10<sup>5</sup> ± Ecart-type) sous l'effet des différents additifs

<b>Adjuvants utilisés</b>	<b>Semaine 2</b>	<b>Semaine 6</b>	<b>Semaine 12</b>	<b>Semaine 18</b>	<b>Valeurs statistiques</b>
<b>Huile de Coton</b>	24,3±14,0 <sup>cA</sup>	0,2±0,5 <sup>eB</sup>	0±0,0 <sup>cC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	<b>P&lt;0,001 ; F=28,9 ; ddl=3</b>
<b>Huile de palme brute</b>	40±0,0 <sup>aA</sup>	2,1±3,6 <sup>bB</sup>	0±0,0 <sup>cC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	<b>P&lt;0,001 ; F=62,4 ; ddl=3</b>
<b>Huile de palme raffinée</b>	40±0,0 <sup>aA</sup>	0,4±0,4 <sup>dB</sup>	0,13±0,2 <sup>bC</sup>	0±0,0 <sup>aD</sup>	<b>P&lt;0,001 ; F=530,5 ; ddl=3</b>
<b>Huile de soja</b>	37,5±4,3 <sup>bA</sup>	7,8±2,0 <sup>aB</sup>	0,8±1,3 <sup>aC</sup>	0±0,0 <sup>aD</sup>	<b>P&lt;0,001 ; F=90,4 ; ddl=3</b>
<b>Glycérol</b>	6,1±5,0 <sup>dA</sup>	0,6±1,1 <sup>cB</sup>	0±0,0 <sup>cC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	<b>P=0,005 ; F=9,3 ; ddl=3</b>
<b>TEA</b>	1,5±1,0 <sup>fA</sup>	0,4±0,7 <sup>dB</sup>	0±0,0 <sup>cC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	<b>P=0,01 ; F=7,5 ; ddl=3</b>
<b>Tween20</b>	0,0±0,0 <sup>gB</sup>	2,1±1,5 <sup>bA</sup>	0±0,0 <sup>cB</sup>	0±0,0 <sup>aB</sup>	<b>P&lt;0,001 ; F=22,0 ; ddl=3</b>
<b>Témoin</b>	4,5±4,2 <sup>eA</sup>	2,1±1,0 <sup>bB</sup>	0,13±0,2 <sup>bC</sup>	0±0,0 <sup>aD</sup>	<b>P&lt;0,001 ; F=35,7 ; ddl=3</b>
<b>Valeurs statistiques</b>	<b>P&lt;0,001 ; F=35,7 ; ddl=7</b>	<b>P=0,005 ; F=4,6 ; ddl=7</b>	<b>P=0,029 ; F=3,07 ; ddl=7</b>	<b>P=1 ; F=0 ; ddl=7</b>	

\*Les taux moyens des CFU suivis par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne (lettre minuscule) et à l'intérieur de la ligne (lettre majuscule) sont significativement différents au seuil de 5%, selon le test de Tukey entre les adjuvants.

### III.1.2.2. Criblage des formulations

La viabilité des spores fongiques dans les formulations de biopesticides a été influencée par l'huile utilisée et dans le temps. La germination des spores des isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* sur le milieu de culture PDA, évaluée par le nombre de colonies formées (CFU), a graduellement diminué avec le temps.

Quelle que soit l'huile utilisée, les conidies de BIITAC6.2.2 de *B. bassiana* ont été viables sur une période plus importante dans la formulation de type Emulsion Inverse (EI) comparées aux autres formulations (FE1, FE2 et FE3), exception faite pour FE3 à base d'huile de palme brute à la dix-huitième semaine. Au sein des formulations EI, celles à base d'huiles de soja et de palme

raffinée ont plus maintenu la viabilité des spores avec le temps comparées à celles à base d'huiles de coton et de palme brute, excepté à la semaine 1 (tableau XX).

**Tableau XX:** Nombre de conidies viables (CFU/ml x 10<sup>5</sup> ± Ecart-type) de BIITAC6.2.2 dans différentes formulations à base d'huiles

Formulation	Semaine 2	Semaine 6	Semaine 12	Semaine 18	Valeurs statistiques
<b>EIS</b>	34,5±2,8 <sup>ca</sup>	24,7±4,4 <sup>ab</sup>	7,2±5,6 <sup>bc</sup>	0,4±5,6 <sup>cd</sup>	P<0,0001 ; F=47,11 ; ddl=3
<b>EIPR</b>	35,1±7,2 <sup>ba</sup>	22,5±3,0 <sup>bb</sup>	10,4±5,2 <sup>ac</sup>	4,4±1,3 <sup>ad</sup>	P<0,0001 ; F=35,6 ; ddl=3
<b>EIC</b>	40,0±0,0 <sup>aa</sup>	16,9±12,8 <sup>cb</sup>	3,5±2,4 <sup>dc</sup>	0,1±0,2 <sup>ed</sup>	P<0,0001 ; F=171,6 ; ddl=3
<b>EIPB</b>	33,0±8,5 <sup>da</sup>	7,9±6,1 <sup>db</sup>	5,3±1,6 <sup>cc</sup>	0±0,0 <sup>fd</sup>	P<0,0001 ; F=40,1 ; ddl=3
<b>FE3S</b>	22,5±8,9 <sup>ca</sup>	6,0±1,9 <sup>eb</sup>	0,8±0,9 <sup>ic</sup>	0,1±0,2 <sup>ed</sup>	P<0,0001 ; F=42,7 ; ddl=3
<b>FE2PR</b>	14,6±2,8 <sup>ta</sup>	3,9±0,7 <sup>ib</sup>	0,8±1,0 <sup>ic</sup>	0,1±0,2 <sup>ed</sup>	P<0,0001 ; F=63,4 ; ddl=3
<b>FE1PR</b>	13,0±6,6 <sup>ga</sup>	3,7±0,6 <sup>jb</sup>	1,2±1,5 <sup>ic</sup>	0±0,0 <sup>fd</sup>	P<0,0001 ; F=22,9 ; ddl=3
<b>FE3PR</b>	13,0±7,0 <sup>ga</sup>	9,0±1,0 <sup>qb</sup>	0,4±0,6 <sup>mc</sup>	0±0,0 <sup>fd</sup>	P<0,0001 ; F=26,5 ; ddl=3
<b>FE3PB</b>	12,7±9,8 <sup>ha</sup>	4,1±1,0 <sup>hb</sup>	1,3±0,9 <sup>hc</sup>	0,5±0,5 <sup>bd</sup>	P<0,0001 ; F=11,3 ; ddl=3
<b>FE2C</b>	9,0±5,5 <sup>ia</sup>	4,3±1,7 <sup>gb</sup>	0,7±0,4 <sup>kc</sup>	0,0±0,0 <sup>fd</sup>	P<0,0001 ; F=22,9 ; ddl=3
<b>FE2PB</b>	9,2±2,5 <sup>ia</sup>	3,2±0,7 <sup>kb</sup>	1,3±0,4 <sup>hc</sup>	0,0±0,0 <sup>fd</sup>	P<0,0001 ; F=86,4 ; ddl=3
<b>FE1PB</b>	7,9±2,8 <sup>ka</sup>	1,5±0,9 <sup>nb</sup>	0,5±0,0 <sup>ic</sup>	0,0±0,0 <sup>fd</sup>	P<0,0001 ; F=43,5 ; ddl=3
<b>FE3C</b>	7,1±1,6 <sup>la</sup>	4,5±2,3 <sup>ib</sup>	2,9±2,2 <sup>ec</sup>	0,0±0,0 <sup>fd</sup>	P<0,001 ; F=17,0 ; ddl=3
<b>FE1C</b>	6,7±4,3 <sup>ma</sup>	1,8±1,0 <sup>mb</sup>	0,5±0,2 <sup>ic</sup>	0,0±0,0 <sup>fd</sup>	P<0,0001 ; F=19,4 ; ddl=3
<b>FE2S</b>	5,8±1,0 <sup>na</sup>	2,7±3,3 <sup>ib</sup>	2,1±1,0 <sup>gc</sup>	0,0±0,0 <sup>fd</sup>	P=0,002 ; F=9,1 ; ddl=3
<b>Temoin</b>	3,9±8,7 <sup>oa</sup>	1,1±1,0 <sup>ob</sup>	0,5±0,3 <sup>ic</sup>	0,2±0,2 <sup>ed</sup>	P=0,01 ; F=5,2 ; ddl=3
<b>FE1S</b>	2,5±2,9 <sup>pa</sup>	1,0±0,5 <sup>pb</sup>	2,3±2,2 <sup>ic</sup>	0,1±0,2 <sup>ed</sup>	P=0,02 ; F=4,4 ; ddl=3
<b>Valeurs statistiques</b>	P<0,05; F=21,5; ddl=16	P<0,05; F=32,7; ddl=16	P<0,05; F=11,5; ddl=16	P<0,05; F=26,4; ddl=16	

\*Les taux moyens des CFU suivis par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne (lettre minuscule) et à l'intérieur de la ligne (lettre majuscule) sont significativement différents au seuil de 5%, selon le test de Tukey entre les adjuvants.

**EIS** : Emulsion Inverse à base d'huile de Soja ; **EIPR** : Emulsion Inverse à base d'huile de Palme Raffinée ; **EIC** : Emulsion Inverse à base d'huile de Coton ; **EIPB** : Emulsion Inverse à base d'huile de Palme Brute ; **FE1S** : Emulsion 1 à base d'huile de Soja ; **FE1PR** : Emulsion 1 à base d'huile de Palme Raffinée ; **FE1C** : Emulsion 1 à base d'huile de Coton ; **FE1PB** : Emulsion 1 à base d'huile de Palme Brute ; **FE2S** : Emulsion 1 à base d'huile de Soja ; **FE2PR** : Emulsion 1 à base d'huile de Palme Raffinée ; **FE2C** : Emulsion 1 à base d'huile de Coton ; **FE2PB** : Emulsion 1 à base d'huile de Palme Brute ; **FE3S** : Emulsion 1 à base d'huile de Soja ; **FE3PR** : Emulsion 1 à base d'huile de Palme Raffinée ; **FE3C** : Emulsion 1 à base d'huile de Coton ; **FE3PB** : Emulsion 1 à base d'huile de Palme Brute.

Les résultats sur la viabilité des conidies de l'isolat MIITAC11.3.4 de *M. anisopliae* se rapprochent de ceux de l'isolat de *B. bassiana*. Le nombre de spores viables a été plus élevé dans

les formulations de type Emulsion Inverse (EI) avec chacune des huiles comparées aux autres formulations (FE1, FE2 et FE3), exception faite pour EI à base d'huile de coton à la semaine douze. Les spores de MIITAC11.3.4 ont été bien plus viables dans le témoin que dans toutes les formulations aux semaines six et douze, excepté pour EI à base d'huile de soja (EIS) à la semaine six. Aux semaines six et douze, dans les formulations EI, les huiles de soja et de palme raffinée ont plus maintenu la viabilité des spores comparées aux huiles de coton et de palme brute (tableau XXI).

**Tableau XXI:** Nombre de conidies viables (CFU/ml  $\times 10^5 \pm$  Ecart-type) de MIITAC11.3.4 dans différentes formulations à base d'huiles

Formulation	Semaine 2	Semaine 6	Semaine 12	Semaine 18	Valeurs statistiques
<b>EIS</b>	40,0 $\pm$ 0,0 <sup>aA</sup>	29,6 $\pm$ 3,0 <sup>aB</sup>	4,0 $\pm$ 0,0 <sup>cC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=47,11 ; ddl=3
<b>EIPR</b>	40,0 $\pm$ 0,0 <sup>aA</sup>	22,0 $\pm$ 3,0 <sup>cB</sup>	5,0 $\pm$ 5,2 <sup>bC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=30,6 ; ddl=3
<b>EIC</b>	40,0 $\pm$ 0,0 <sup>aA</sup>	3,0 $\pm$ 3,0 <sup>eB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>gC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=106,3 ; ddl=3
<b>EIPB</b>	40,0 $\pm$ 0,0 <sup>aA</sup>	4,5 $\pm$ 6,1 <sup>dB</sup>	1,0 $\pm$ 1,6 <sup>dC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=70,7 ; ddl=3
<b>FE3S</b>	14,4 $\pm$ 3,8 <sup>gA</sup>	0,1 $\pm$ 1,9 <sup>mB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>gC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=154,1 ; ddl=3
<b>FE2PR</b>	9,3 $\pm$ 3,5 <sup>kA</sup>	1,2 $\pm$ 0,7 <sup>jB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>gC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=42,9 ; ddl=3
<b>FE1PR</b>	23,3 $\pm$ 19,4 <sup>eA</sup>	2,1 $\pm$ 0,6 <sup>hB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>gC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aC</sup>	P=0,001 ; F=17,0 ; ddl=3
<b>FE3PR</b>	11,0 $\pm$ 3,4 <sup>jA</sup>	0,0 $\pm$ 1,0 <sup>nB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>gB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aB</sup>	P<0,0001 ; F=149,1 ; ddl=3
<b>FE3PB</b>	14,1 $\pm$ 6,1 <sup>iA</sup>	0,0 $\pm$ 1,0 <sup>nB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>gB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aB</sup>	P<0,0001 ; F=77,3 ; ddl=3
<b>FE2C</b>	18,6 $\pm$ 4,6 <sup>iA</sup>	1,0 $\pm$ 1,7 <sup>kB</sup>	0,1 $\pm$ 0,4 <sup>iC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=43,7 ; ddl=3
<b>FE2PB</b>	40,0 $\pm$ 0,0 <sup>aA</sup>	2,4 $\pm$ 0,7 <sup>gB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>gC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=87,4 ; ddl=3
<b>FE1PB</b>	40,0 $\pm$ 0,0 <sup>aA</sup>	0,0 $\pm$ 0,9 <sup>nB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>gB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aB</sup>	P<0,0001 ; F=1,4 $\times 10^{18}$ ;
<b>FE3C</b>	31,4 $\pm$ 2,5 <sup>bA</sup>	2,8 $\pm$ 2,3 <sup>iB</sup>	0,8 $\pm$ 2,2 <sup>eC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=64,9 ; ddl=3
<b>FE1C</b>	29,9 $\pm$ 7,1 <sup>cA</sup>	0,2 $\pm$ 1,0 <sup>lB</sup>	0,1 $\pm$ 0,2 <sup>iC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=180,5 ; ddl=3
<b>FE2S</b>	14,6 $\pm$ 9,0 <sup>hA</sup>	1,7 $\pm$ 3,3 <sup>iB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>gC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=20,1 ; ddl=3
<b>Témoin</b>	40,0 $\pm$ 0,0 <sup>aA</sup>	22,6 $\pm$ 1,0 <sup>bB</sup>	7,4 $\pm$ 0,3 <sup>aC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=32,6 ; ddl=3
<b>FE1S</b>	24,9 $\pm$ 10,7 <sup>dA</sup>	0,1 $\pm$ 0,5 <sup>mB</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>gC</sup>	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=72,7 ; ddl=3
<b>Valeurs statistiques</b>	P<0,05; F=15,21; ddl=16	P<0,05; F=24,18; ddl=16	P<0,05; F=23,3; ddl=16	P=1; F=0; ddl=16	

\*Les taux moyens des CFU suivis par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne (lettre minuscule) et à l'intérieur de la ligne (lettre majuscule) sont significativement différents au seuil de 5%, selon le test de Tukey entre les adjuvants.

### **III.1.2.3. Tolérance des conidies dans les Emulsions Inverses vis-à-vis de quelques températures**

La tolérance des spores a varié dans le temps et entre les différentes températures testées quels que soient l'isolat fongique et l'huile utilisés.

Cela a été le cas pour les spores de BIITAC6.2.2 de *B. bassiana*, sauf à la dix-huitième semaine pour l'huile de palme brute. Aux sixième et douzième semaines, les spores de BIITAC6.2.2 formulées dans les huiles de coton, de palme brute, de palme raffinée et de soja ont été plus viables à 25°C, 30°C, 22°C et 15°C respectivement. Toutefois, à la douzième semaine, les spores de BIITAC6.2.2 ont aussi toléré la température de 30°C en présence des huiles de palme; à la dix-huitième semaine, seule la température de 25°C a pu conserver les spores, excepté avec l'huile de palme brute (tableau XXII).

**Tableau XXII :** Nombre de conidies viables (CFU/ml x10<sup>5</sup>± Ecart-type) de BIITAC6.2.2 dans les formulations de type EI à base de différentes huiles et à différentes températures

Huile	Température (°C)	Semaine 2	Semaine 6	Semaine 12	Semaine 18	Valeurs statistiques
Coton	4	20000,0±0,0 <sup>aA</sup>	1,06±0,36 <sup>bB</sup>	0,002±0,0 <sup>cC</sup>	0,0±0,0 <sup>bD</sup>	P<0,0001; F=1757425 ; ddl=3
	15	18200,0±3117,7 <sup>bA</sup>	0,008±0,002 <sup>dB</sup>	0,013±0,023 <sup>bB</sup>	0,0±0,0 <sup>bB</sup>	P<0,0001 ; F=377,9 ; ddl=3
	22	20000,0±0,0 <sup>aA</sup>	0,15±0,041 <sup>cB</sup>	0,0±0,0 <sup>cC</sup>	0,0±0,0 <sup>bC</sup>	P<0,0001 ; F=1962016 ; ddl=3
	25	2,00±0,0 <sup>cA</sup>	10,66±1,22 <sup>aB</sup>	4,33±2,9 <sup>aC</sup>	0,066±0,11 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=70,7; ddl=3
	30	20000,0±0,0 <sup>aA</sup>	0,0±0,0 <sup>eB</sup>	0,0±0,0 <sup>cC</sup>	0,0±0,0 <sup>bD</sup>	P<0,0001 ; F=1,3x10 <sup>21</sup> ; ddl=3
	Valeurs statistiques	P <0,0001 ; F=243,8 ; ddl=4	P<0,0001 ; F=397,6 ; ddl=4	P<0,0001 ; F=26,06 ; ddl=4	P=0,033 ; F=4,02 ; ddl=4	
Palme Brute	4	20000,0±0,0 <sup>aA</sup>	0,47±0,34 <sup>cB</sup>	0,05±0,03 <sup>cC</sup>	0±0,0 <sup>aD</sup>	P=0,001 ; F=838289 ; ddl=3
	15	20000,0±0,0 <sup>aA</sup>	0,06±0,040 <sup>dB</sup>	0,006±0,011 <sup>cC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=475286 ; ddl=3
	22	12600,0±6630,2 <sup>bA</sup>	0,12±0,075 <sup>dB</sup>	0,0±0,0 <sup>cB</sup>	0±0,0 <sup>aB</sup>	P<0,0001 ; F=40,0 ; ddl=3
	25	15,33±4,16 <sup>cA</sup>	4,26±1,51 <sup>bB</sup>	2,47±0,95 <sup>bC</sup>	0±0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=49,6 ; ddl=3
	30	3,51±0,67 <sup>dA</sup>	5266,66±1792,5 <sup>aB</sup>	400,0±692,8 <sup>aC</sup>	0±0,0 <sup>aD</sup>	P=0,0001 ; F=28,2 ; ddl=3
	Valeurs statistiques	P <0,0001 ; F=59,8 ; ddl=4	P <0,0001 ; F=103,63 ; ddl=4	P =0,035; F=3,958 ; ddl=4	P =1; F=0 ; ddl=4	
Palme Raffinée	4	3,55±0,8 <sup>cA</sup>	1,31±0,99 <sup>dB</sup>	0,18±0,10 <sup>cC</sup>	0±0,0 <sup>bD</sup>	P=0,0001 ; F=27,3 ; ddl=3

Tableau XXII, suite

	<b>15</b>	20000,0±0,0 <sup>aA</sup>	0,01±0,023 <sup>eB</sup>	0±0,0 <sup>dC</sup>	0±0,0 <sup>bC</sup>	P<0,0001; F=554514 ; ddl=3
	<b>22</b>	20000,0±0,0 <sup>aA</sup>	3133,3±611,01 <sup>aB</sup>	66,66±115,4 <sup>aC</sup>	0±0,0 <sup>bC</sup>	P<0,0001; F=554514 ; ddl=3
	<b>25</b>	19,27±1,27 <sup>bA</sup>	8,27±0,64 <sup>eB</sup>	6,1±2,20 <sup>bC</sup>	1,86±1,6 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=31,6 ; ddl=3
	<b>30</b>	20000,0±0,0 <sup>aA</sup>	733,3±642,9 <sup>bB</sup>	66,66±115,4 <sup>aC</sup>	0±0,0 <sup>bD</sup>	P<0,0001 ; F=264,1 ; ddl=3
	<b>Valeurs statistiques</b>	P <0,0001; F=872058; ddl=4	P <0,0001 ; F=47,06 ; ddl=4	P <0,0001 ; F=32,10 ; ddl=4	P <0,001; F=16,34 ; ddl=4	
<b>Soja</b>	<b>4</b>	20000±0,0 <sup>aA</sup>	1,17±0,96 <sup>dB</sup>	0,13±0,030 <sup>dC</sup>	0±0,0 <sup>bD</sup>	P<0,0001 ; F=274264 ; ddl=3
	<b>15</b>	20000±0,0 <sup>aA</sup>	200,0±0,0 <sup>aB</sup>	66,67±115,47 <sup>aC</sup>	0±0,0 <sup>bD</sup>	P<0,0001 ; F=1061 ; ddl=3
	<b>22</b>	17066,6±5080,6 <sup>cA</sup>	0,001±0,0003 <sup>eB</sup>	3,33±5,77 <sup>bC</sup>	0±0,0 <sup>bC</sup>	P<0,0001 ; F=72,7 ; ddl=3
	<b>25</b>	17,13±1,7 <sup>dA</sup>	11,47±1,66 <sup>eB</sup>	2,33±0,42 <sup>cC</sup>	0,2±0,34 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=32,6 ; ddl=3
	<b>30</b>	19466,6±923,7 <sup>bA</sup>	66,67±115,47 <sup>bB</sup>	0±0,0 <sup>eC</sup>	0±0,0 <sup>bC</sup>	P<0,0001 ; F=873,8 ; ddl=3
	<b>Valeurs statistiques</b>	P<0,0001 ; F=872058; ddl=4	P =0,0022; F=9,11 ; ddl=4	P =0,057; F=3,28 ; ddl=4	P =0,033; F=4,023 ; ddl=4	

\*Les taux moyens des CFU suivis par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne (lettre minuscules) et à l'intérieur de la ligne (lettre majuscule) sont significativement différents au seuil de 5%, selon le test de Tukey.

Comme pour *B. bassiana*, les résultats obtenus avec MIITAC11.3.4 de *M. anisopliae* montrent que la température a significativement influencé la germination des spores conservées dans de l'huile végétale. Aux sixième et douzième semaines, ces spores de MIITAC11.3.4 formulées dans les huiles de coton, de palme brute et de soja ont été plus viables à 25°C. Formulées dans l'huile de palme raffinée, elles ont été plus viables à 25°C à la sixième semaine et à 15°C à la douzième semaine. En revanche, MIITAC11.3.4 n'a toléré aucune température dès la 18<sup>ème</sup> semaine (tableau XXIII).

**Tableau XXIII** : Nombre de conidies viables (CFU/ml  $\times 10^5 \pm$  Ecart-type) de MITAC11.3.4 dans les formulations de type EI à base de différentes huiles et à différentes températures

Huile	Température (°C)	Semaine 2	Semaine 6	Semaine 12	Semaine 18	Valeurs statistiques
Coton	4	0,027±0,01 <sup>dA</sup>	0,026±0,011 <sup>bB</sup>	0,0±0,0 <sup>bC</sup>	0,0±0,0 <sup>aC</sup>	P=0,0002; F=24,3 ; ddl=3
	15	13533,3±7422,4 <sup>aA</sup>	0,001±0,0023 <sup>cB</sup>	0,0±0,0 <sup>bB</sup>	0,0±0,0 <sup>aB</sup>	P<0,0001 ; F=36,9 ; ddl=3
	22	186,67±1331,6 <sup>bA</sup>	0,0±0,0 <sup>cB</sup>	0,0±0,0 <sup>bB</sup>	0,0±0,0 <sup>aB</sup>	P=0,0003 ; F=21,8 ; ddl=3
	25	20,0±0,0 <sup>cA</sup>	14,0±2,0 <sup>aB</sup>	3,0±1,0 <sup>aC</sup>	0,0±0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=230,6; ddl=3
	30	0,0±0,0 <sup>dA</sup>	0,0±0,0 <sup>cA</sup>	0,0±0,0 <sup>bA</sup>	0,0±0,0 <sup>aA</sup>	P=1 ; F=0 ; ddl=3
	<b>Valeurs statistiques</b>	P<0,0001 ; F=28,346 ; ddl=4	P <0,0001 ; F=569,2 ; ddl=4	P<0,0001 ; F=108,64 ; ddl=4	P =1 ; F=0 ; ddl=4	
Palme Brute	4	0,00213±0,0013 <sup>dA</sup>	0,0±0,0 <sup>dB</sup>	0,0±0,0 <sup>bB</sup>	0±0,0 <sup>aB</sup>	P=0,0001; F=28,5 ; ddl=3
	15	0,048±0,003 <sup>dA</sup>	0,006±0,0005 <sup>cB</sup>	0,0±0,0 <sup>bC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=1451,3 ; ddl=3
	22	0,33±0,02 <sup>cA</sup>	0,014±0,0013 <sup>bB</sup>	0,0±0,0 <sup>bC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=1929,5 ; ddl=3
	25	20,0±0,0 <sup>bA</sup>	3,0±1,0 <sup>aB</sup>	0,66±1,15 <sup>aC</sup>	0±0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=71,5 ; ddl=3
	30	66,66±115,47 <sup>aA</sup>	0,0±0,0 <sup>dB</sup>	0,0±0,0 <sup>bB</sup>	0±0,0 <sup>aB</sup>	P=0,06 ; F=3,7 ; ddl=3
	<b>Valeurs statistiques</b>	P =0,05; F=3,39 ; ddl=4	P=3,78x10 <sup>-8</sup> ; F=106,23 ; ddl=4	P =0,03; F=4,023 ; ddl=4	P =1; F=0 ; ddl=4	
Palme Raffinée	4	0,03±0,006 <sup>eA</sup>	0,012±0,005 <sup>bB</sup>	0,013±0,023 <sup>bC</sup>	0±0,0 <sup>aD</sup>	P=0,03 ; F=4,5 ; ddl=3



Tableau XXIII, suite

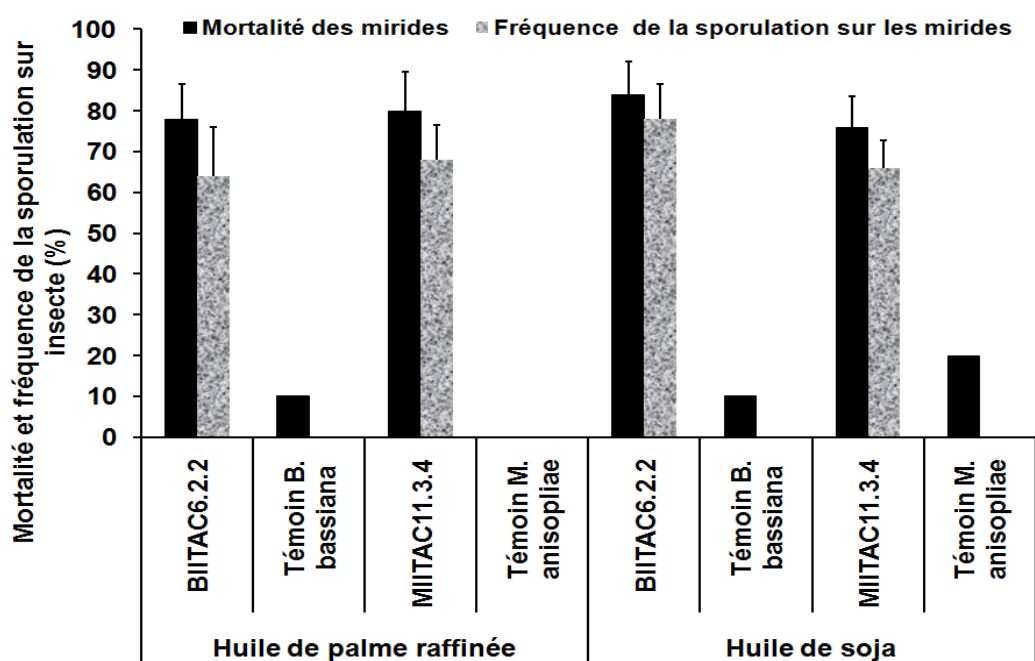
	<b>15</b>	3733,3±901,8 <sup>bA</sup>	0,0013±0,0016 <sup>cB</sup>	0,66±1,15 <sup>aC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=188,1 ; ddl=3
	<b>22</b>	15866,6±1361,3 <sup>aA</sup>	0,0±0,0 <sup>cB</sup>	0,0±0,0 <sup>cB</sup>	0±0,0 <sup>aB</sup>	P<0,0001; F=1506,5 ; ddl=3
	<b>25</b>	20,0±0,0 <sup>dA</sup>	2,0±2,0 <sup>aB</sup>	0,0±0,0 <sup>cC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=95,9 ; ddl=3
	<b>30</b>	2333,3±986,5 <sup>cA</sup>	0,0±0,0 <sup>cB</sup>	0,0±0,0 <sup>cB</sup>	0±0,0 <sup>aB</sup>	P<0,0001 ; F=62,0 ; ddl=3
	<b>Valeurs statistiques</b>	P<0,0001 ; F=181,52; ddl=4	P =0,0008; F=11,808 ; ddl=4	P =0,04; F=3,78 ; ddl=4	P =1; F=0 ; ddl=4	
<b>Soja</b>	<b>4</b>	0,05±0,0058 <sup>bA</sup>	0,015±0,013 <sup>cB</sup>	0,0±0,0 <sup>bC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	P<0,0001 ; F=40,9 ; ddl=3
	<b>15</b>	0,04±0,007 <sup>cA</sup>	4,0±6,92 <sup>bB</sup>	0,0±0,0 <sup>bC</sup>	0±0,0 <sup>aC</sup>	P=0,06 ; F=3,6 ; ddl=3
	<b>22</b>	0,0±0,0 <sup>dA</sup>	0,0±0,0 <sup>dA</sup>	0,0±0,0 <sup>bA</sup>	0±0,0 <sup>aA</sup>	P=1 ; F=0 ; ddl=3
	<b>25</b>	20,0±0,0 <sup>aA</sup>	16,0±3,46 <sup>aB</sup>	2,66±0,98 <sup>aC</sup>	0±0,0 <sup>aD</sup>	P<0,0001 ; F=137,5 ; ddl=3
	<b>30</b>	0,0±0,0 <sup>dA</sup>	0,0±0,0 <sup>dA</sup>	0,0±0,0 <sup>bA</sup>	0±0,0 <sup>aA</sup>	P=1 ; F=0 ; ddl=3
	<b>Valeurs statistiques</b>	P<0,0001 ; F=144226; ddl=4	P<0,0001; F=12,97 ; ddl=4	P<0,0001; F=88,18 ; ddl=4	P =1; F=0 ; ddl=4	

\*Les taux moyens des CFU suivis par des lettres différentes à l'intérieur de la colonne (lettre minuscules) et à l'intérieur de la ligne (lettre majuscule) sont significativement différents au seuil de 5%, selon le test de Tukey.

### III.1.3. Evaluation de la pathogénicité des champignons formulés vis-à-vis des mirides

#### III.1.3.1. Bio-essai au laboratoire

L'étude de la pathogénicité des isolats testés a rendu des taux de mortalité de mirides de 78% pour BIITAC6.2.2 de *B. bassiana* et 80% pour MIITAC11.3.4 de *M. anisopliae* avec l'huile de palme raffinée, contre 84% et 76% pour BIITAC6.2.2 et MIITAC11.3.4 respectivement avec l'huile de soja. La virulence, exprimée en fréquence de sporulation fongique chez les insectes morts, a donné des valeurs de 64% avec l'isolat de *B. bassiana* et de 68% avec celui de *M. anisopliae* pour l'huile de palme raffinée, contre 78% et 66% pour les isolats de *B. bassiana* et *M. anisopliae*, respectivement, avec l'huile de soja (figure 22).



**Figure 22 :** Mortalité et fréquence de la sporulation fongique sur les mirides au quatorzième jour d'infection.

Le test H de Kruskal Wallis a révélé une différence significative entre les mortalités de mirides ( $H=9,91$  ;  $ddl=3$  ;  $P=0,019$ ) et entre les fréquences de sporulation fongique sur mirides morts ( $H=9,93$  ;  $ddl=3$  ;  $P=0,019$ ) quelle que soit l'huile utilisée. Toutefois, les comparaisons (test de Dunn) par paire ont révélé que les taux de mortalité des mirides et les fréquences de sporulation fongique diffèrent significativement ( $P<0,05$ ) entre les traitements (BIITAC6.2.2 et MIITAC11.3.4) et les témoins, indépendamment de l'huile utilisée. De même, quel que soit l'isolat considéré, aucune différence de mortalités de mirides ( $P>0,05$ ) et/ou de fréquences de sporulation fongique ( $P=0,63$ ) n'a été trouvée entre les traitements/formulations à base d'huile de palme raffinée et de soja. Seule la formulation EI

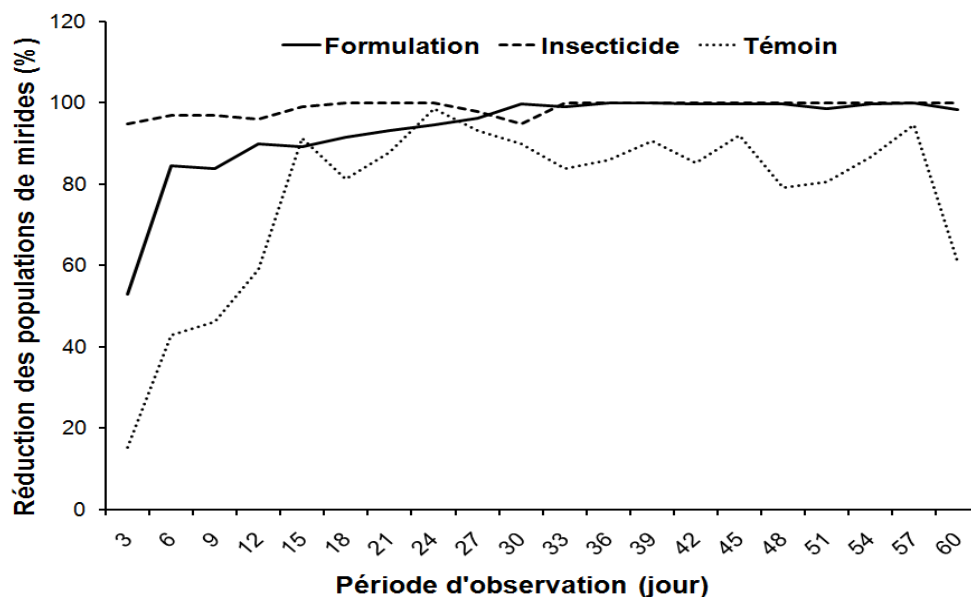
de *B. bassiana* BIITAC6.2.2 à base de l'huile de soja a été testée par la suite en champ en raison de sa disponibilité et de son efficacité.

### III.1.3.2. Bio-essai en milieu réel de la pathogénicité de *B. bassiana* formulé sur les populations de mirides

Les résultats montrent que les populations de mirides vivants ont diminué dans chacun des traitements : formulation de biopesticide à base de *B. bassiana*, insecticide ou témoin positif et témoin négatif (aucun traitement).

En effet, dès le sixième jour post-traitement à base de la formulation de biopesticide, on a noté une chute rapide des populations de mirides allant de 296 à 46 individus. Le taux de réduction de la population vivante par rapport au jour pré-traitement a atteint 100% dès le trente-sixième jour post-application du biopesticide. Concernant le traitement insecticide ou témoin positif, après la phase de chute brutale du nombre des mirides vivants, soit un passage de 97 à 5 mirides au troisième jour, on a enregistré un taux de réduction de la population vivante de 100% au jour 18. Quant au témoin négatif, le nombre de mirides vivants est passé de 149 avant le traitement à 58 mirides à soixante jours post-application. Le taux de réduction dans ce témoin négatif a évolué en dents de scie et a donné une valeur maximale de 94,6% au jour cinquante-sept (figure 23).

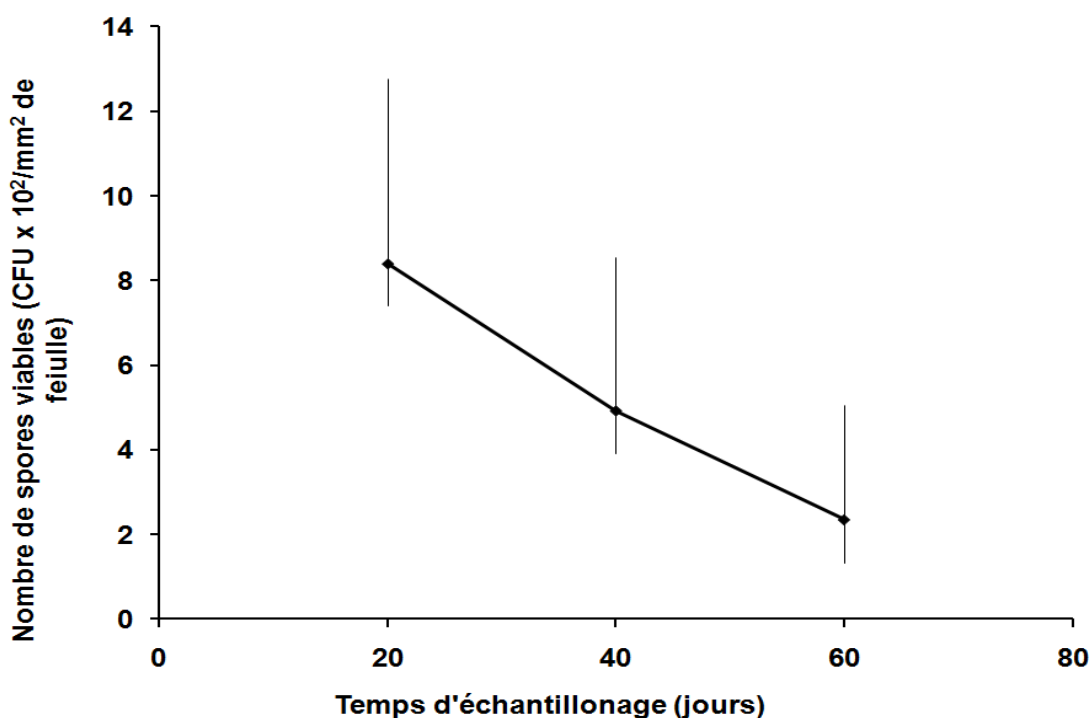
Le test de Dunn a révélé une différence hautement significative ( $H = 32,8$  ;  $ddl = 2$  ;  $P < 0,001$ ) entre les taux de réduction de mirides vivants causés par les trois traitements.



**Figure 23** : Taux de réduction temporelle du nombre de mirides vivants dans les trois traitements.

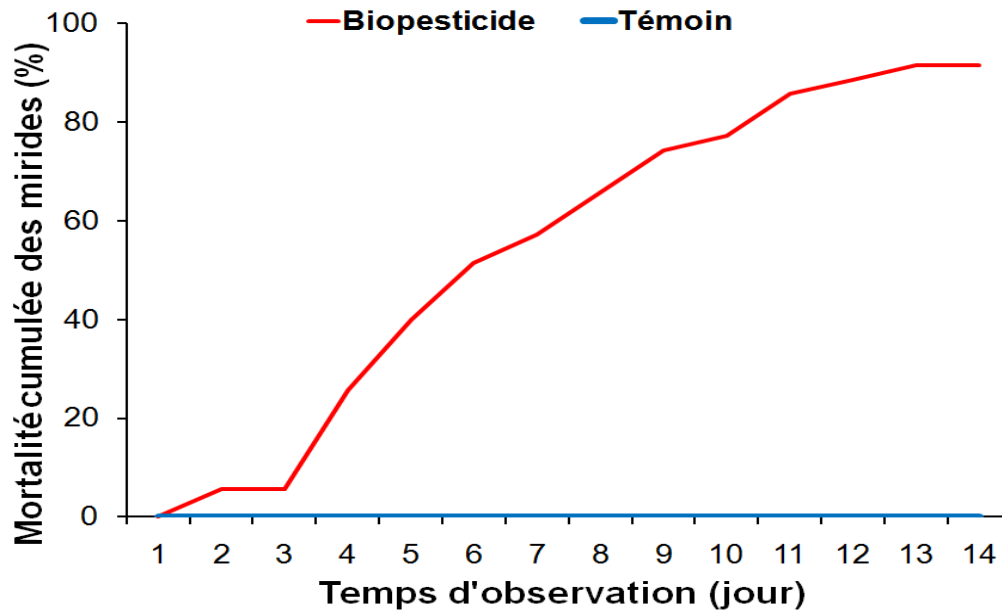
### III.1.3.3. Rémanence de l'effet insecticide du bioinsecticide en milieu réel

Le nombre de spores viables évalué sur les feuilles de cacaoyers traités en champ avec le biopesticide formulé, a considérablement diminué avec le temps. Les résultats ont révélé  $8,4 \times 10^{+2}$  spores viables par  $\text{mm}^2$  de feuille au jour 20 ;  $4,92 \times 10^{+2}$  au jour 40 et  $2,34 \times 10^{+2}$  au jour soixante post-application de la formulation en champ (figure 24). Le taux de réduction moyen du nombre de conidies a été de l'ordre de 41,3% au jour quarante et de 72,0% au sixantième jour, respectivement, par rapport au jour vingt post-application du biopesticide en champ.



**Figure 24 :** Persistance des conidies de *B. bassiana* sur les feuilles de cacaoyers en fonction du temps (en jours).

La persistance de l'action du bioinsecticide formulé, évaluée en termes de taux de mortalité des mirides exposés aux cabosses traitées et récoltées 2 mois post-traitement, a donné un taux optimal de 91,4% dès le 13<sup>e</sup> jour de l'essai contre 0% de mortalité de miride dans le lot témoin (figure 25).



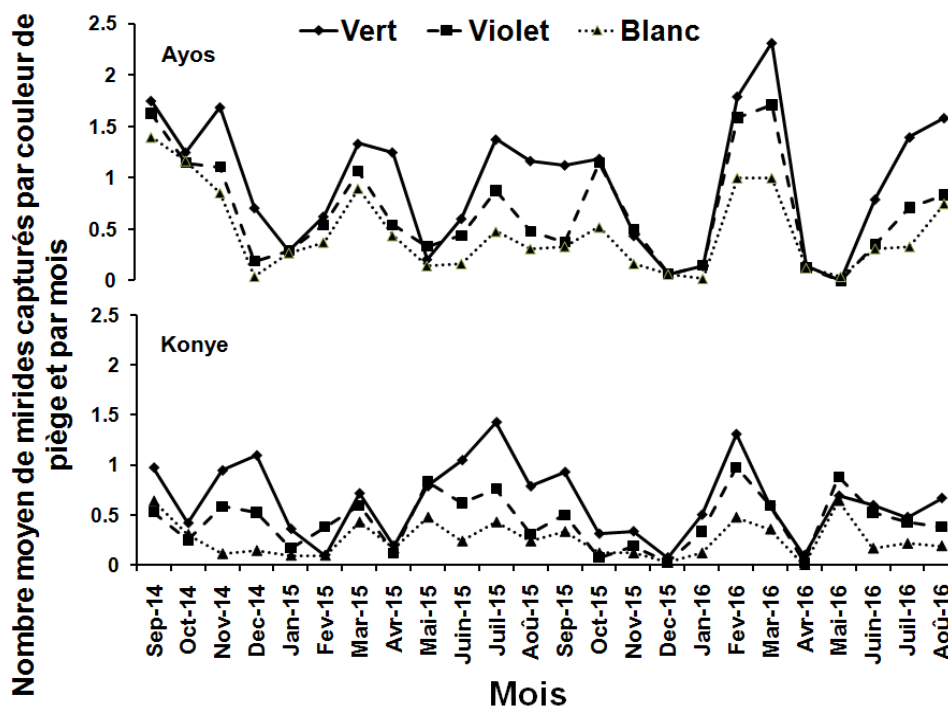
**Figure 25 :** Taux journalier de mortalité des mirides due à la persistance des conidies sur les cabosses soixante jours post-application du biopesticide en champ.

### III.1.4. Pièges à phéromones

#### III.1.4.1. Evaluation de l'attractivité des mirides par les pièges à phéromones

Au total, 3750 mirides ont été capturés par les pièges dans les deux localités d'étude, soit 2429 à Ayos, avec une moyenne de  $0,70 \pm 0,019$  miride par mois et par piège, et 1321 à Konye, avec une moyenne de  $0,44 \pm 0,015$  par mois et par piège. A Ayos, pendant la première année d'essai, 1316 spécimens ont été capturés, soit en moyenne  $1,02 \pm 0,05$  ;  $0,71 \pm 0,04$  et  $0,54 \pm 0,03$  mirides ont été pris par mois, par piège vert, violet et blanc respectivement. Au courant de la deuxième année d'expérimentation, 1113 individus ont été capturés, soit en moyenne  $0,91 \pm 0,06$  ;  $0,63 \pm 0,05$  et  $0,38 \pm 0,03$  mirides par mois et par piège vert, violet et blanc respectivement. A Konye, 722 ont été capturés pendant la première année de l'essai, soit en moyenne  $0,73 \pm 0,05$  ;  $0,47 \pm 0,04$  et  $0,27 \pm 0,03$  par mois, par piège vert, violet et blanc respectivement. Au cours de la deuxième année, 599 mirides ont été pris soit en moyenne  $0,54 \pm 0,04$  ;  $0,41 \pm 0,04$  et  $0,23 \pm 0,02$  par mois et par piège vert, violet et blanc respectivement.

Les courbes du suivi mensuel des captures de mirides par les pièges ont quasiment les mêmes profils durant les deux années d'étude dans la même localité. Elles sont polymodales, non cycliques ; les performances de captures de mirides sont dans l'ordre suivant : piège vert > piège violet > piège blanc (figure 26).



**Figure 26 :** Dynamique mensuelle de capture de *S. singularis* les pièges de différents couleurs dans les deux localités.

En rassemblant les données des deux localités, il apparaît que l'attractivité des mirides a été significativement influencée par la couleur du piège (ddl=5 ;  $P < 0,001$ ). Le temps n'a pas affecté l'effet des couleurs, les réponses observées ayant presque suivi la même tendance quelle que soit l'année. Grâce au test de Tukey, cinq groupes de performance de captures de mirides par piège de différentes couleurs ont été définis au courant de chaque année (tableau XXIV).

**Tableau XXIV:** Réponse des couleurs de pièges à phéromones entre les deux sites (intersite) sur l'attractivité des mirides

Année 1 : Septembre 2014-Aout 2015		Année 2 : Septembre 2015- Août 2016	
Couleur du piège/Site	Nombre moyen de mirides/piège $\pm$ SE	Couleur du piège/Site	Nombre moyen de mirides/piège $\pm$ SE
Vert _Ayos	0,91 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>	Vert_Ayos	0,94 $\pm$ 0,06 <sup>A</sup>
Vert _Konye	0,81 $\pm$ 0,05 <sup>AB</sup>	Violet_Ayos	0,67 $\pm$ 0,04 <sup>B</sup>
Violet _Ayos	0,61 $\pm$ 0,04 <sup>BC</sup>	Vert_Konye	0,55 $\pm$ 0,05 <sup>BC</sup>
Violet _Konye	0,54 $\pm$ 0,04 <sup>CD</sup>	Blanc_Ayos	0,42 $\pm$ 0,03 <sup>CD</sup>
Blanc _Ayos	0,37 $\pm$ 0,03 <sup>D</sup>	Violet_Konye	0,41 $\pm$ 0,03 <sup>CD</sup>
Blanc _Konye	0,34 $\pm$ 0,03 <sup>D</sup>	Blanc_Konye	0,23 $\pm$ 0,02 <sup>D</sup>

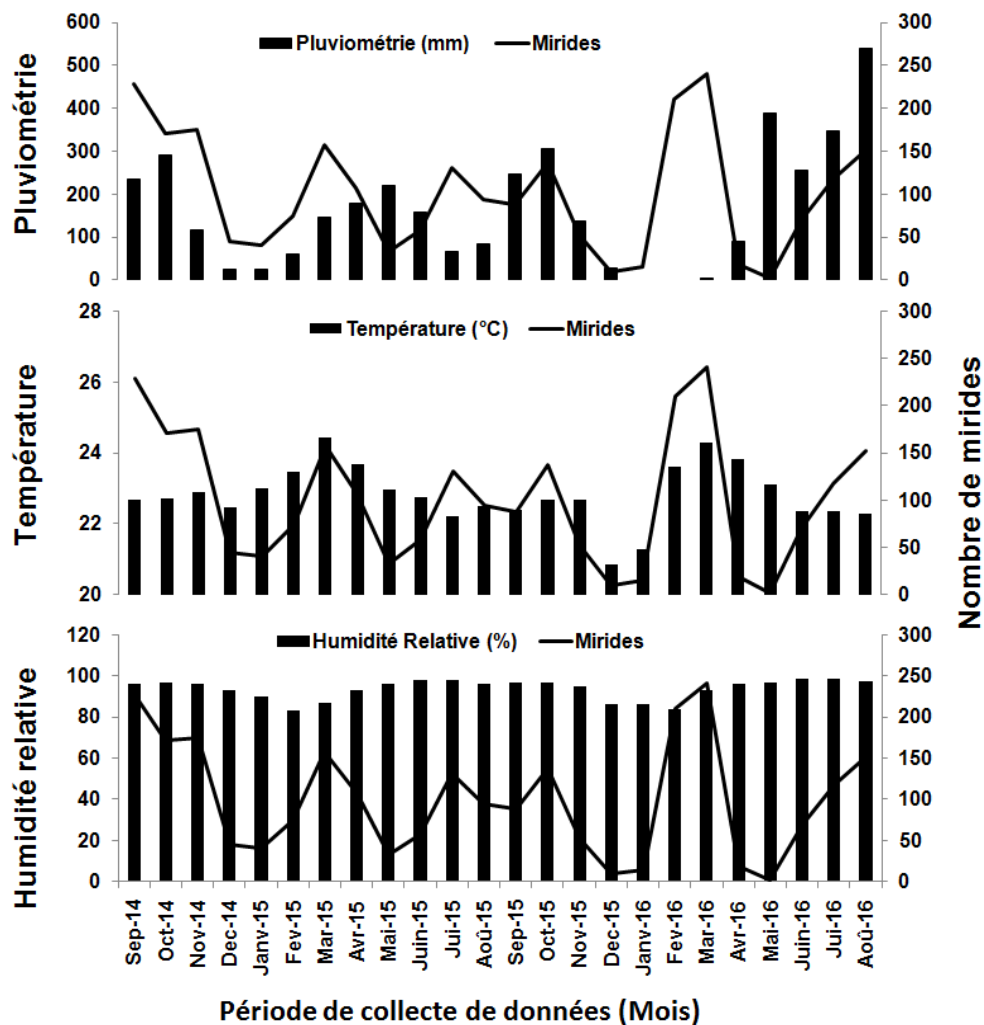
\*Les nombres moyens par mois et par couleur de piège suivis par des lettres différentes sont significativement différents au seuil de 5%, selon le test de Tukey

### III.1.4.2. Variation mensuelle des populations de *Sahlbergella singularis* dans les parcelles d'étude

Durant toute la période de l'expérimentation, 4191 mirides ont été échantillonnés dans les deux localités d'étude soit 3826 dans les parcelles avec pièges (2474 à Ayos et 1352 à Konye) et 368 dans les parcelles sans pièges (263 à Ayos et 105 à Konye).

A Ayos, la variation mensuelle du nombre de *S. singularis* s'est avérée presque similaire pour les deux années (année 1 et année 2). Cinq phases se sont clairement distinguées (figure 27). Pour l'année 1, dans la première phase du profil qui s'étend de septembre 2014 à mi-janvier 2015, on assiste à une diminution graduelle du nombre d'individus de *S. singularis*. L'augmentation de ce nombre à partir de mi-janvier avec un pic au mois de mars 2015 constitue la seconde phase. Lors de la troisième phase, qui court de mi-mars à mi-mai 2015, le nombre de mirides décline progressivement. La quatrième phase, allant de mi-mai à mi-juillet 2015 et caractérisée par une légère augmentation de la population de mirides, est suivie de la cinquième phase qui est marquée par une diminution de la population jusqu'en août 2015. Pour l'année 2, la phase d'augmentation de la population de mirides de septembre à mi-octobre 2015 est suivie de sa décroissance de mi-octobre 2015 à mi-janvier 2016. La troisième phase commence en mi-janvier et forme un pic en mi-mars. De mi-mars à mi-mai, on assiste à une phase de déclin de la population de mirides qui précède la cinquième phase caractérisée par sa croissance jusqu'en août 2015 (figure 27).

Durant les deux années, la pluviométrie a permis de noter l'existence des saisons de pluies (quatre grandes et deux petites), et une saison sèche qui s'est étendue de décembre 2015 à mars 2016. Les températures les plus basses et les plus élevées ont été enregistrées en décembre et en mars 2015 respectivement. Les mois de février 2015 et juin 2016 ont été marqués par une humidité relative plus basse et plus élevée respectivement (figure 27). Le nombre de mirides collectés a été très faiblement et positivement corrélé avec les facteurs climatiques (pluviométrie ( $P=0,62$  ;  $r=0,1$  ;  $R^2=0,01$ ) ; humidité relative ( $P=0,67$  ;  $r=0,08$  ;  $R^2=0,007$ ) ; température ( $P=0,06$  ;  $r=0,4$  ;  $R^2=0,14$ ).

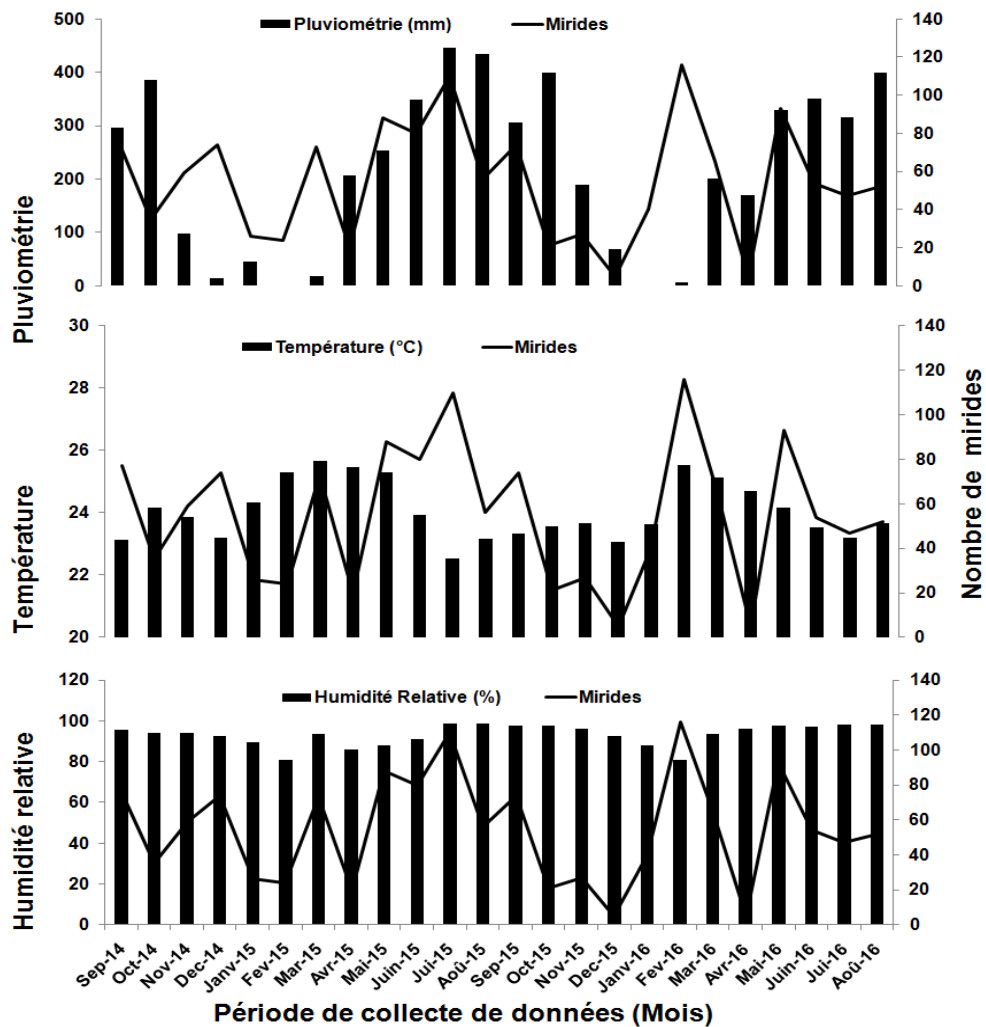


**Figure 27** : Relation entre la variation du nombre de mirides capturés et les paramètres climatiques à Ayos.

Quant à Konye, la variation mensuelle du nombre de *S. singularis* semble suivre sept phases lors l'année 1 et cinq autres au cours de l'année 2 (figure 28). Pour l'année 1, dans la première phase du profil on assiste à une diminution du nombre de *S. singularis* de septembre à mi-octobre 2014. Ensuite vient une augmentation de ce nombre de mi-octobre à mi-décembre 2014 puis sa diminution, qui court de mi-décembre 2014 à mi-février 2015. L'augmentation de l'abondance de mirides de mi-février à mi-mars 2015 suivie de sa décroissance de mi-mars à mi-avril 2015 représentent respectivement les quatrième et cinquième phases du profil. Les sixième et septième phases montrent une augmentation graduelle de la population de mirides, à partir de mi-avril et atteignant un pic en mi-juillet 2015, qui précède sa diminution jusqu'en août 2015. Au cours de l'année 2, la première phase est marquée par une diminution du nombre de mirides de septembre à mi-décembre 2015. Une phase d'augmentation rapide vient ensuite de mi-décembre 2015 à mi-février 2016. Elle est suivie d'une diminution brusque de mi-février à mi-avril 2016. Les quatrième et



cinquième phases du profil des variations mensuelles du nombre de mirides présentent respectivement une croissance brusque de mi-avril à mi-mai 2016 et une croissance à partir de mi-mai jusqu'en août 2016 (figure 28). Dans la localité de Konye, le caractère monomodal du climat a été clairement marqué. Durant les deux années d'essai, on a assisté à trois saisons de pluies et deux saisons sèches. Le mois de juillet 2015 a été caractérisé par les précipitations les plus importantes. Les températures les plus faibles et les plus élevées ont été enregistrées aux mois de juillet et mars 2015 respectivement. Le plus faible taux d'humidité relative a été noté aux mois de février 2015 et 2016 et le plus élevé en juillet 2015 (figure 28). Le nombre de mirides collectés a été très faiblement et positivement corrélé avec la pluviométrie ( $P=0,41$  ;  $r=0,2$ ;  $R^2=0,04$ ) et l'humidité Relative ( $P=0,74$  ;  $r=0,03$ ;  $R^2=0,001$ ) et négativement avec la température à Konye ( $P=0,92$  ;  $r= - 0,1$  ;  $R^2=0,0003$ ).

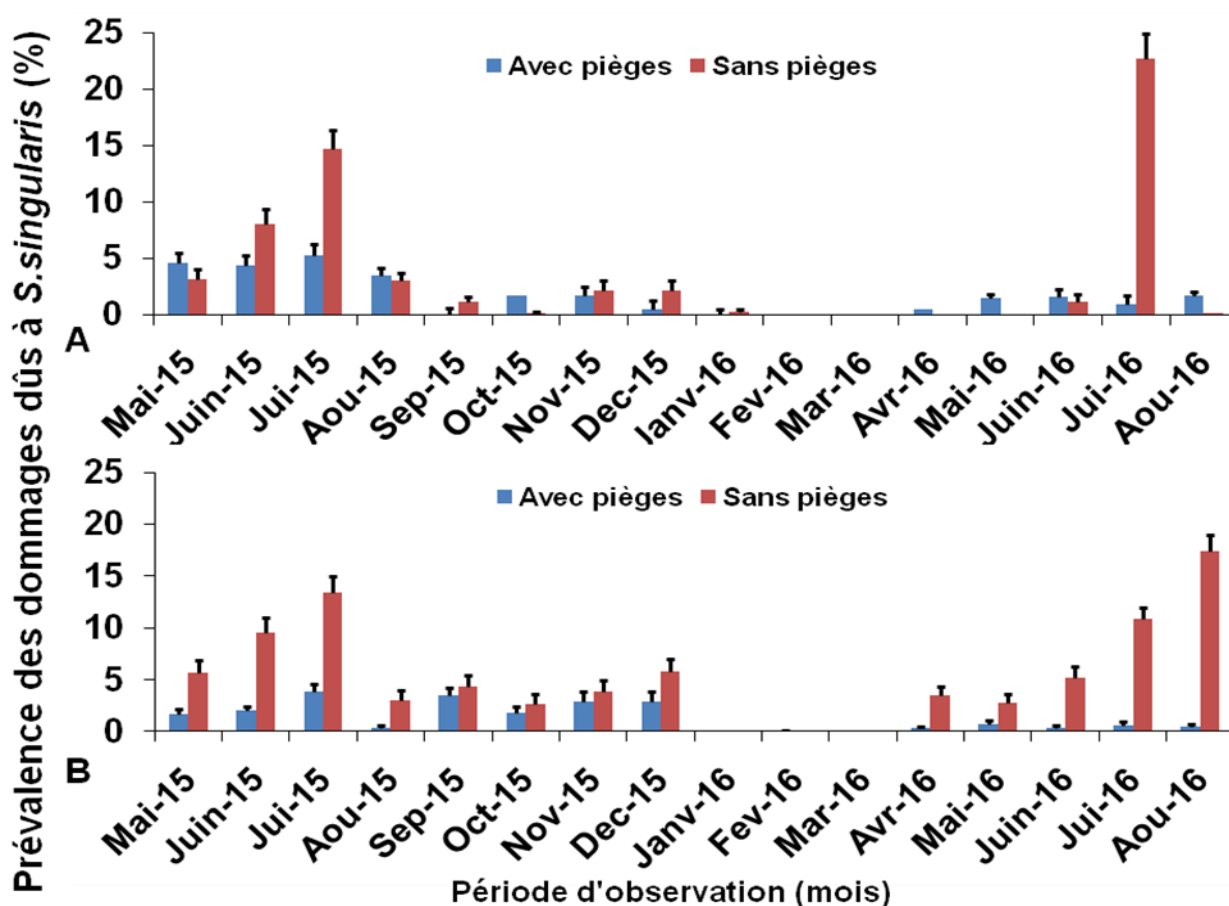


**Figure 28** : Relation entre la variation du nombre de mirides capturés et les paramètres climatiques à Konye.

### III.1.4.3. Evaluation des dégâts de *Sahlbergella singularis*

#### ➤ Prévalence des dégâts de *S. singularis* sur les cabosses

Indépendamment de la localité d'étude, l'infestation des organes hôtes (cabosses) par *S. singularis* s'est révélée moins élevée dans les parcelles essai comparées aux parcelles témoins. Dans la localité d'Ayos, le taux moyen de cabosses affectées a été de 1,7 % dans les parcelles essai contre 3,6% dans les témoins tandis qu'à Konye, il a été de 1,3 % contre 5,5% respectivement. En outre, la prévalence des dégâts de *S. singularis* sur les cabosses a été plus importante aux mois de juillet 2015 et 2016 à Ayos contre juillet 2015 et août 2016 à Konye dans les parcelles témoins. En revanche, dans les parcelles essai, le maximum de dégâts a été observé en juillet 2015 à Ayos contre juillet 2015 et Août 2016 à Konye (figure 29A & B).

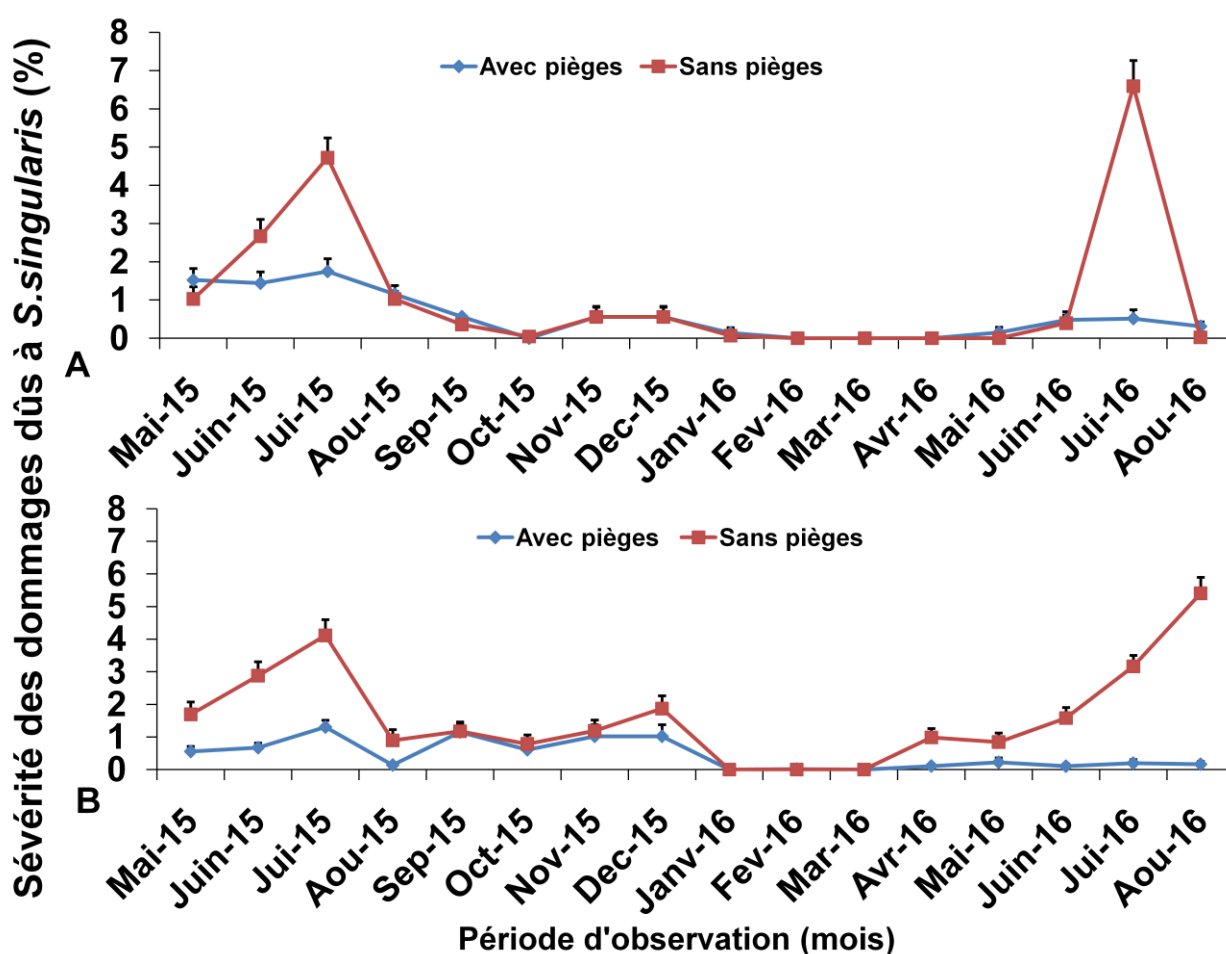


**Figure 29** : Prévalence des dégâts de *S.singularis* sur les cabosses les parcelles avec pièges et sans pièges dans les deux localités (A=Ayos et B=Konye) d'étude

Le test W de Wilcoxon a révélé que les rangs moyens des dommages de *S. singularis* sur les cabosses ont été significativement différents (ddl= 1, P <0,0001) entre les parcelles essai et témoins.

➤ **Sévérité des dégâts de *S. singularis* sur cabosses**

La sévérité des dégâts de *S. singularis* sur les organes hôtes (cabosses) observée dans les parcelles témoins a été plus importante que celle observée dans les parcelles essai, soit 1,06% et 0,53% à Ayos contre 1,63% et 0,42% à Konye respectivement. Les courbes relatives à la sévérité des dommages de *S. singularis* sur les cabosses présentent des profils différents entre les deux localités d'étude. A Ayos, la sévérité des dégâts parasitaires due à *S. singularis* sur les cabosses est nettement faible dans les parcelles essai comparées aux parcelles témoins. Ces profils de sévérité de dégâts sont similaires et caractérisés par des courbes bimodales, avec des pics correspondant aux mois de juillet 2015 et 2016 pour les parcelles essai et juillet 2015 puis juin-juillet 2016 pour les parcelles témoins (figure 30A). En revanche, dans la localité de Konye, les profils ont montré deux pics (en juillet et décembre 2015) puis une augmentation de la sévérité des dégâts dus à *S. singularis* dans les parcelles témoins alors que l'on a observé trois pics mais plus faibles en juillet, septembre puis novembre - décembre 2015 dans les parcelles essai (figure 30 B).



**Figure 30 :** Sévérité moyenne des dommages de *S. singularis* enregistrée dans les champs traités et témoins d'Ayos (A) et de Konye (B).

Les rangs moyens des dégâts de *S. singularis* sur les cabosses ont été significativement différents suivant le test W de Wilcoxon (ddl= 1 ; P <0,001) entre les parcelles essai et témoins.

Le test de Spearman a montré l'existence d'une forte corrélation positive entre la prévalence des dommages et leur sévérité ( $p < 0,0001$  ;  $r = 0,97$  ;  $R^2 = 95,3\%$ ). Le modèle de régression linéaire utilisé indique que 95,3 % de la variation de la sévérité des dommages de mirides sur les cabosses est expliquée par sa prévalence. Lorsque l'on s'intéresse aux populations de mirides capturées dans les pièges et aux dégâts enregistrés sur les cabosses dans les parcelles d'étude, nos investigations révèlent l'existence d'une corrélation négative entre ces deux paramètres, que ce soit sur la base de la prévalence ( $P = 0,04$  ;  $r = -0,03$  ;  $R^2 = 0,0009$ ) ou sur celle de la sévérité : ( $P = 0,04$  ;  $r = -0,03$  ;  $R^2 = 0,0009$ ).

## III.2. Discussion

### III.2.1. Potentiel insecticide et virulence de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae*

Dans la nature, la régulation des insectes peut se faire par l'utilisation des champignons entomopathogènes. En ce qui concerne les pestes du cacao, peu d'études ont examiné l'action nocive de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* sur les mirides (Tong-Kwee *et al.*, 1989). Dans la présente étude, le potentiel entomopathogène de plusieurs isolats de ces deux especs fongiques a été évalué contre des nymphes de *Sahlbergella singularis*. Les épreuves biologiques réalisées ont montré que les isolats utilisés peuvent infecter et induire la mort des individus de *S. singularis* par contact et par ingestion dans les conditions de laboratoire. Les taux de mortalité de 76,0 à 80,0% obtenus et induits par *B. bassiana* appliqué par immersion de *S. singularis* à  $1 \times 10^7$  conidia.mL<sup>-1</sup> diffèrent de ceux rendus par Abdulhai *et al.* (2010), soit 86 à 100% en immergeant l'Hémiptère *Eurygaster integriceps* dans des suspensions de certaines souches de *B. bassiana* à  $1 \times 10^6$  conidie.mL<sup>-1</sup>. Cette différence pourrait se justifier soit par la variabilité génétique des souches de *B. bassiana* employées, soit par la différence entre les espèces d'Hémiptères ciblées. Khashaveh *et al.* (2011) ont trouvé 100% de mortalité d'un échantillon du Coléoptère *Trogoderma granarium* Everts, 1899 seulement 10 jours post-immersion dans une suspension de *M. anisopliae* à  $1 \times 10^9$  conidie.mL<sup>-1</sup>. Ce résultat se rapproche du nôtre avec les isolats de *M. anisopliae* à  $1 \times 10^9$  conidie.mL<sup>-1</sup> avec la méthode d'immersion qui a donné des taux de mortalité atteignant 97,1%. Les taux de mortalité de *S. singularis* de près de 95% acquis, par la méthode d'ingestion, se rangent dans la gamme de

35,7 à 100% obtenue par Mahot (2006) ; ils confirment que ces champignons peuvent effectivement infecter les mirides par ingestion et causer leur mort.

Le taux de mortalité a généralement augmenté avec la concentration de l'inoculum qui est un facteur important pour la pathogénicité des champignons entomopathogènes (Demirci *et al.*, 2011). Parker *et al.* (2003) ont en effet démontré que lorsque le champignon *Isaria farinosa* (Holmskjold) Fries, 1832 est appliqué aux concentrations  $1 \times 10^6$  conidies.mL<sup>-1</sup>,  $1 \times 10^7$  conidies.mL<sup>-1</sup> et  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup>, les taux de mortalité de *E. integriceps* augmentent avec la concentration de l'inoculum. La même tendance émerge de la présente étude, à l'exception des isolats BIITAC6.2.2 et MIITAC6.2.2 avec la méthode par immersion, et BIITAC8.1.5, BIITAC6.2.2 et MIITAC6.2.2 à  $1 \times 10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup> avec la méthode par ingestion. Ce résultat suggère que le stade physiologique de l'insecte a pu être responsable de cette déviance. L'efficacité des champignons a varié avec les isolats. En effet, il est connu que différents isolats d'une même espèce fongique n'ont pas toujours le même potentiel pathogène vis-à-vis de la même cible (Altre *et al.*, 1999). Les différences de toxicité potentielle observées entre les isolats ici étudiés pourraient dépendre de leurs propriétés physiologiques et enzymatiques (Leland & Behle, 2005), la pathogénicité fongique étant un processus complexe qui tient compte des caractéristiques à la fois de l'agent pathogène et de l'hôte.

La capacité d'un agent pathogène donné à provoquer une maladie est essentielle dans le screening des souches de champignons entomopathogènes. Un paramètre important dans la sélection d'une souche entomopathogène est sa virulence ; il s'agit de la quantité de l'inoculum d'un agent pathogène pour causer une maladie dans un groupe d'insectes (Inglis *et al.*, 2001). La quantité de conidies doit être suffisamment élevée pour qu'un insecte soit en contact avec ce stade infectieux et pour dépasser le seuil d'inoculum et provoquer la mort dudit insecte (Inglis *et al.*, 2001). Etant donné qu'un agent fongique pathogène très virulent nécessite moins de propagules pour induire la maladie (Inglis *et al.*, 2001), la CL50 peut être utilisée comme paramètre d'évaluation de la virulence d'un agent de lutte biologique. Sabbahi (2008) signale aussi que la CL50 sert à révéler le potentiel insecticide des champignons entomopathogènes. Ainsi, dans ce travail, la plus faible CL50 estimée avec la méthode par immersion, à 14 jours post-traitement, a été de  $8,97 \times 10^5$  conidies.mL<sup>-1</sup> et  $3,69 \times 10^6$  conidies.mL<sup>-1</sup> pour les isolats BITTAC10.3.3 et MIITAC6.4.2 de *B. bassiana* et *M. anisopliae*, respectivement. Pour la méthode par ingestion, les valeurs de la CL50 les plus faibles ont été de  $6,45 \times 10^5$  conidies.mL<sup>-1</sup> et de  $2,09 \times 10^7$  conidies.mL<sup>-1</sup>, respectivement pour ces mêmes isolats. Ces résultats sont quelque peu proches de ceux de Liu *et al.* (2002) et de

Ziani (2008). En effet, Liu *et al.* (2002) ont montré que des concentrations de certains isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*, allant de  $0,8 \times 10^5$  à  $5,0 \times 10^5$  conidies.mL<sup>-1</sup>, sont nécessaires pour causer, en 8 jours, 50% de mortalité de *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois), un autre miride. Ziani (2008) a, quant à lui, démontré que les isolats de *B. bassiana* INRS-IP et INRS-CFL ont une CL50 de l'ordre de  $8,0 \times 10^5$  et  $1,7 \times 10^4$  conidies.mL<sup>-1</sup> pour *L. lineolaris* en 6 jours. Les temps létaux 50 et 90 (TL50 et TL90) étant liés à la CL50, ils peuvent également servir d'indice de mesure de la virulence (Benserradj, 2014 ; Eberle *et al.*, 2012). Les isolats INRS-IP et INRS-CFL ont tué 50% des nymphes en moyenne en 4,77 et 5,03 jours respectivement à  $1 \times 10^6$  conidies.mL<sup>-1</sup> (Zihani, 2008), alors que pour nos isolats de *B. bassiana*, le TL50 a varié entre 4,1 à 5,1 jours à  $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> avec la méthode par immersion. Liu *et al.* (2002) ont aussi révélé une sensibilité des nymphes de *L. lineolaris* à certains isolats de champignons. Ainsi, à la concentration  $2 \times 10^7$  conidies.mL<sup>-1</sup>, ils ont obtenu des valeurs de TL50 de 2,5 ; 2,7 ; 3,4 et 4 jours pour les isolats de *B. bassiana* ARSEF5665, ARSEF1394, ARSEF3769 et ARSEF0353, respectivement, et de 2,9 jours pour l'isolat de *M. anisopliae* ARSEF3540. La différence entre les résultats de ces auteurs et les nôtres pourrait se justifier par les différentes origines des isolats fongiques et des insectes hôtes bien qu'ils soient tous des Hémiptères, et par la durée de l'expérimentation. Il faut aussi noter que la structure de la cuticule des insectes peut jouer un certain rôle. En effet, les types de cuticules de divers insectes diffèrent par leur composition en protéines et leur degré de sclérotisation (Charnley, 2003). La cuticule d'un insecte semble influencer toutes les étapes du processus d'infection de celui-ci, à savoir l'adhésion, la germination et la différenciation appressorium (Butt *et al.*, 2001).

La virulence des isolats fongiques peut également être attribuée à leur capacité à germer, croître et proliférer à l'intérieur et à l'extérieur d'un l'insecte. L'excroissance des champignons permet généralement de confirmer qu'un insecte a réellement succombé du fait d'une mycose (Inglis *et al.*, 2012) ; elle peut également révéler la virulence des isolats fongiques et aider à leur screening. Pendant leur croissance et leur prolifération, les isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* colonisent rapidement tous les tissus et organes, tout en produisant des toxines (immunosuppresseurs) qui peuvent endommager les hémocytes et causer la paralysie puis la mort des insectes (Flores-Villegas *et al.*, 2016). Ces effets sont probablement dus à la capacité de ces champignons à produire une couche de collagène qui masque la reconnaissance des  $\beta$ -1,3-glucanes, puissants immunomodulateurs du système immunitaire de l'insecte (Sabbahi, 2008 ; Flores-Villegas *et al.*, 2016). La prolifération fongique sur la cuticule d'un insecte n'est pas toujours prise en compte pour tester la

virulence d'un champignon, étant donné que les insectes peuvent bien mourir d'une mycose mais ne pas être colonisés par le champignon en raison de la compétition avec d'autres microorganismes saprophytes (Inglis *et al.*, 2012). Toutefois, cette colonisation de la cuticule reste importante dans le choix de l'isolat le plus contagieux d'un insecte à l'autre. La différence des fréquences de sporulation observées entre les isolats de *B. bassiana* d'une part et, d'autre part, de *M. anisopliae* pourrait être attribuée (1) à la différence d'agressivité entre les isolats fongiques utilisés, (2) au stade physiologique de l'hôte et à celui du substrat alimentaire. Les valeurs de CL50, TL50, TL90 et la fréquence de sporulation sur la cuticule des insectes morts permettent de retenir les isolats fongiques BIITAC10.3.3, BIITAC6.2.2, MIITAC6.2.2 et MIITAC11.3.4 pour la suite des manipulations.

Lorsqu'un biopesticide est appliqué en champ, l'organisme nuisible cible peut être affecté par un contact direct à travers sa cuticule ou par l'ingestion de la source alimentaire contaminée par l'agent infectieux. Sur le plan pratique, le mode de contamination par ingestion serait le meilleur moyen de protection des cacaoyers étant donné que les mirides, parfois absents au moment du traitement, peuvent provenir des cacaoyères environnantes.

### **III.2.2. Transmission horizontale de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae***

La transmission horizontale d'une infection fongique des insectes contaminés aux insectes indemnes par l'accouplement ou le contact physique a fait l'objet de plusieurs travaux chez des arthropodes parmi lesquels on peut citer les Diptères *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Quesada-Moraga *et al.*, 2008 ; Dimbi *et al.*, 2013), *Anastrepha ludens* Loew, 1873 (Toledo *et al.*, 2007), les Lépidoptères *Diatraea saccharalis* Fabricius, 1794 (Svedese *et al.*, 2013); les Isoptères *Microcerotermes diversus* Silvestri (Cheraghi *et al.*, 2012); les Coléoptères *Cosmopolites sordidus* (Lopes *et al.*, 2011) et les Hémiptères *Triatoma infestans* Klug, 1834 (Forlani *et al.*, 2011). La capacité des champignons entomopathogènes à être transmis horizontalement est un attribut/avantage qui peut contribuer à leur succès comme agents de lutte biologique (Cheraghi *et al.*, 2012 ; Dimbi *et al.*, 2013).

Dans ce travail, des insectes contamineurs (insectes donneurs) ont pu transmettre leur infection à d'autres insectes indemnes (receveurs) et entraîner leur mort. La mortalité des receveurs, avant celle de tous les donneurs, se justifierait par le comportement grégaire des mirides qui a facilité les contacts physiques et donc la dissémination de l'agent pathogène dans la population. Les isolats BIITAC6.2.2 et MIITAC11.3.4 ont présenté les taux de transmission les plus élevés et, de ce fait, seraient plus efficaces dans la réduction de la

population de mirides. Cheraghi *et al.* (2012) ont relevé que la transmission mécanique des conidies de champignons entomopathogènes peut être considérée comme un paramètre assez important de l'évaluation de l'efficacité des souches fongiques. Statistiquement parlant, les trois ratios ont eu des réponses similaires dans le lot des insectes receveurs. Toutefois, le ratio donneur : receveur 1 : 1 a présenté, des taux de mortalité relativement plus élevés que le ratio 1 : 4 indépendamment de l'isolat. Ce résultat s'expliquerait par le fait que lorsque, le nombre d'individus indemnes augmente, la mortalité chute également. Cette mortalité des insectes non-contaminés serait étroitement liée au ratio insecte donneur : insecte receveur. Ceci est clairement justifié par Kreutz *et al.* (2004) qui ont montré que le coléoptère *Ips typographus* Linnaeus, 1758 peut transmettre l'infection à *B. bassiana* (Boverol®) et causer des taux de mortalité de 96% ; 90% ; 83% ; 77% et 75% respectivement aux ratios 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10 et 1 : 20. De même, Quesada-Moraga *et al.* (2008) ont démontré qu'avec les ratios donneur : receveur de 1 : 1, 1 : 2, 1 : 5, 1 : 10 et 1 : 20 des mouches de l'espèce *C. capitata*, les taux de transmission de *M. anisopliae* s'élevaient respectivement à 100% ; 96,9% ; 90% ; 62,5% et 42,5%. La similarité entre les réponses enregistrées pour le taux de mortalité de 80% dû à MIITAC6.2.2 au ratio 4 : 1 et celui du témoin expliquerait le manque performance de cet isolat par rapport aux autres. Les fréquences de sporulation fongique sur les insectes non receveurs et morts se sont avérées plus importantes pour les isolats BIITAC6.2.2 et MIITAC11.3.4 quel que soit le ratio de la contamination. La fréquence de sporulation sur les insectes receveurs a été plus importante pour le ratio 4 : 1. La sporulation étant une preuve incontestable d'une mortalité survenue à la suite d'une infection fongique, il serait intéressant de prendre en compte ce résultat qui corrobore celui de Cheraghi *et al.* (2012), qui ont montré que les ratios 30% et 50% sont plus efficaces que le ratio 10%.

La capacité de transmission horizontale des champignons pathogènes entre les insectes est un paramètre essentiel dans le choix d'une stratégie de lutte contre ces derniers (Dimbi *et al.*, 2013). La présence d'insectes infectés par un champignon et morts dans un champ peut permettre de reconnaître des foyers de mycose et, de cette façon, d'augmenter la mortalité des insectes. La transmission est également un paramètre fondamental qui encourage le maintien de l'inoculum dans l'environnement (Svedese *et al.*, 2013). Le succès de la transmission horizontale de *B. bassiana* est indicateur que la procédure de lutte biologique par son emploi pourrait être adoptée comme stratégie de contrôle des nuisibles (Svedese *et al.*, 2013). Les résultats acquis dans ce travail peuvent être bénéfiques pour les applications en champ car le comportement social des mirides favorise la création des conditions épizootiques. La transmission horizontale est de ce fait extrêmement importante



pour l'application du champignon entomopathogène sur un terrain où de fortes densités d'insectes sont rencontrées.

### III.2.3. Effet des différents adjuvants sur les isolats

Daoust *et al.* (1983) argumentent que le développement d'une formulation appropriée est essentiel pour une utilisation réussie de biopesticides commerciaux. Cependant, il est connu que de nombreuses formulations peuvent affecter la viabilité des conidies, se traduisant par une courte durée de conservation (Moore & Prior, 1993). Il s'avère donc nécessaire d'évaluer soigneusement la compatibilité des composants d'une formulation avec les conidies avant son utilisation. Par conséquent, la première étape dans le développement d'une formulation de biopesticide consiste à évaluer l'influence de ses composants sur la viabilité des conidies, afin de sélectionner les produits compatibles avec les conidies fongiques.

Dans ce travail, la différence de la croissance végétative a été très significative avec le glycérol et l'huile de soja pour *B. bassiana* et avec le TEA, le tween 20 et le glycérol pour *M. anisopliae*. Quant à la formation des spores ou sporulation, le glycérol qui joue un rôle nutritif et humectant s'est montré favorable pour les deux souches de champignons. Dans le processus d'infection, le champignon entomopathogène a pour challenge la production d'une importante quantité de spores viables qui constituent l'agent infectieux (Mora *et al.*, 2017). En étudiant la compatibilité des huiles végétales avec le champignon *Paecilomyces farinosus* Holmskjold A.H.S. Brown & G. Smith, 1957, Visalakshy *et al.* (2006) ont suggéré que l'addition d'huiles de noix de coco, de neem et de tournesol accélère la croissance végétative et la sporulation de cet entomopathogène tout en augmentant son infectuosité chez l'insecte cible. La différence observée dans le présent travail entre les taux de sporulation des champignons dans les différents additifs utilisés s'expliquerait par l'existence possible d'une interaction entre ces champignons et ces additifs. Un certain nombre d'études ont révélé diverses interactions possibles entre les additifs et les champignons telles que des synergies et des antagonismes. Les additifs tels que le glycérol, les huiles de coton, de soja et de palme raffinée ont facilité l'obtention d'une masse importante de germes sur le milieu de culture liquide. Cette masse contient à la fois les spores et le mycélium ; toutefois le caractère infectieux du mycélium de *B. bassiana* et *M. anisopliae* n'a pas encore été élucidé. L'huile de soja est apparue comme l'huile qui aurait le meilleur effet positif sur la multiplication des spores en vue de l'obtention d'une masse importante de champignons. Boruah *et al.* (2015) ont récemment démontré que le traitement au glycérol permet une production plus importante

de la biomasse fongique comparé à l'huile d'arachide. Ces auteurs ont expliqué ce résultat par l'atout qu'a le glycérol de fournir de l'humidité au champignon qui maintiendrait la qualité et la vigueur des spores nécessaires pour leur germination. La germination et la formation des colonies par les spores est aussi un facteur de viabilité important dans le processus d'infection.

Le Tween 20, le glycérol, l'huile de soja et le TEA se sont révélés plus performants pour *B. bassiana* alors que seules les huiles de soja et de palme raffinée ont été pour *M. anisopliae* avec un nombre élevé de spores montrant une importante germination. En partie nos résultats sont soutenus par l'étude de Luz & Batagin (2005) qui ont rapporté un effet relativement moins toxique des surfactants non ioniques tels que le Tween 20 sur les spores de *B. bassiana*. De plus, Kollmann *et al.* (2003) ont indiqué une stimulation de la production de spores et de la germination avec un surfactant non ionique chez *Fusarium oxysporum* Wollenw, 1935. Le Tween 20 améliorerait le développement de l'inoculum en raccourcissant la période de latence pendant la croissance de la culture (Woertz & Kinney, 2004 ; Mishra *et al.*, 2013). La présente étude ressort que le glycérol et l'huile de soja seraient les adjuvants les plus compatibles avec les deux espèces fongiques. Une explication possible des différences apparentes de compatibilité entre les adjuvants et les conidies résiderait dans les propriétés physicochimiques de ces dernières. Les surfaces des spores de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* sont lipophiles ce qui leur permet d'être en suspension dans les huiles (Devi & Hari, 2009). La nature lipophile des conidies, qui sont les spores asexuées, leur confère l'atout d'adhérer à l'épicuticule de leur hôte cible par une combinaison de forces hydrophobes passives, de forces électrostatiques et les interactions de protéines entre les spores et l'épicuticule (San Aw & Mun Hue, 2017).

Le TEA d'une part et, d'autre part, les huiles de coton, de palme brute et de palme raffinée ont inhibé de la croissance radiale de *B. bassiana* et de *M. anisopliae* respectivement. Cet effet inhibiteur serait attribué à la présence des composés antifongiques dans ces additifs (Mora *et al.*, 2017). L'impact négatif de certains additifs, tels l'huile de palme brute, sur les microorganismes pourrait trouver son explication dans l'augmentation de la perméabilité cellulaire des spores. Cette dernière entraînerait la fuite des acides aminés à travers la membrane interne et probablement l'impossibilité de multiplication des spores (Tanuja *et al.*, 2010).

#### **III.2.4. Evaluation de la viabilité des différentes formulations et thermo-tolérance des conidies formulées (émulsion inverses) dans différentes huiles**

Les isolats ayant une pathogénicité avérée et pouvant être appliqués en tant que biopesticides devraient pouvoir être conservés pendant un certain temps (Mohammadbeigi, 2012). Les résultats de ce travail ont révélé que les huiles de palme raffinée, de coton et de soja n'influencent pas négativement la croissance et la germination des spores de champignons entomopathogènes. Pour un mycoinsecticide actif, la production de spores dans un milieu et le maintien de leur viabilité pendant le stockage sont essentiels (Mohammadbeigi, 2012). Les isolats les plus virulents avec une bonne transmission horizontale (BIITAC6.2.2 et MIITAC11.3.4) pourraient être appliqués en milieu réel ; toutefois au préalable, ils devraient être formulés en mycoinsecticides et être bien conservés dans des formulations.

La présente étude a montré une diminution, dans le temps, de la germination des spores de ces deux isolats lorsqu'ils sont conservés dans différents milieux de stockage. On peut en général s'attendre à une diminution de la germination lors du stockage dans des milieux artificiels. Seulement, cette diminution peut dépendre de divers facteurs tels que l'incompatibilité avec les produits de la formulation (Alves *et al.*, 1998, Faria *et al.*, 2009), l'incompatibilité avec le milieu de culture (Devi *et al.*, 2005) et la conservation à long terme et à des températures inconvenables (Alves *et al.*, 1996 ; McClatchie *et al.*, 1994 ; Moore *et al.*, 1995 ; Luz & Fargues, 1998). La différence observée dans la production de spores par les champignons entre le début et la fin de la conservation indique que cette production a certainement été influencée par le temps de stockage dans les différents produits. Pour l'isolat de *B. bassiana*, la germination des spores à la 18<sup>e</sup> semaine a nettement été plus importante dans l'huile de palme raffinée mais elle a été très réduite pour le champignon stocké dans de l'eau. Ce résultat s'accorde avec celui de Borman *et al.* (2006) qui stipulent que, bien que l'utilisation de l'eau stérile soit une méthode facile et peu coûteuse pour la conservation de la plupart des champignons, elle peut entraîner une perte des taux de sporulation des champignons, ainsi que des changements dans leurs caractéristiques morphologiques. Comparées à *B. bassiana*, la croissance et la germination de *M. anisopliae* ont été négativement influencées par les diverses formulations ; ceci serait probablement lié à une différence génétique entre les isolats. Toutefois, nos résultats montrent que la viabilité des conidies formulées ou non et conservées à 25°C se perd considérablement en trois mois en général. Dans cet ordre d'idées, Alves *et al.* (1996) ont démontré que les conidies de *B. bassiana*, conservées dans des conditions ambiantes (15 à 38°C) ne peuvent pas maintenir

une viabilité de 100% pendant une période de plus de cinq mois, quelle que soit la formulation.

Outre la formulation de conservation, d'autres facteurs tels que la température, l'humidité et la lumière, peuvent avoir un impact sur la stabilité des conidies des champignons entomopathogènes pendant la production et le stockage des formulations (Clerk & Madelin, 1965). Les supports utilisés pour le stockage, tels que l'huile à des températures variables peuvent avoir des avantages ou des inconvénients. Il est connu que la conservation en congélation profonde à long terme est une méthode acceptable pour les isolats fongiques (Borman *et al.*, 2006). Cette étude prouve clairement que la température de 25°C fournit de manière générale la meilleure réponse sur la germination des spores. Ceci est en accord avec Luz & Fargues (1997) pour qui la germination des spores peut se produire à des températures comprises entre 15 et 35°C, avec des optima allant de 25 à 30°C. D'autres travaux ont souligné que les conidies formulées et maintenues au réfrigérateur à  $6 \pm 2^\circ\text{C}$  et/ou au congélateur entre -7 et -10°C peuvent garder 100% de leur viabilité pendant 7 ans (Alves *et al.*, 1998). Les températures élevées retarderaient donc le processus de germination des spores de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*. En évaluant l'effet des formulations à base des huiles végétales sur la thermotolérance et la durée de la conservation de *B. bassiana*, Lotfi Mola & Afkari (2012) ont aussi conclu que (1) la viabilité des spores diminue significativement avec le temps de conservation et en fonction des huiles et (2) la germination est plus importante à 25°C. Dans le présent travail, l'isolat de *M. anisopliae* comparé à *B. bassiana* a été moins tolérant aux températures élevées. Cette différence de thermotolérance ou résistance à la chaleur des conidies fongiques de ces deux espèces est certainement corrélée non seulement à leurs différences génétiques mais aussi à leurs origines géographiques (Vidal *et al.*, 1997). A ce sujet, Ekesi *et al.* (1999) précisent que la variabilité de la thermotolérance entre les isolats entomopathogènes met en évidence l'importance d'étudier l'interaction entre les agents pathogènes, les hôtes et l'environnement afin de sélectionner des candidats potentiels pour le contrôle biologique. La température est l'un des principaux facteurs limitant l'utilisation des champignons comme insecticides (Staters *et al.*, 1996). La formulation de l'agent pathogène dans de l'huile améliore son pouvoir infectieux par rapport aux formulations classiques à base d'eau (Prior *et al.*, 1988 ; Bateman *et al.*, 1993).

De manière générale, les microorganismes jouent un rôle important dans la productivité agricole, la conservation des sols et le contrôle biologique des maladies et ravageurs en Afrique subsaharienne (Nwaga *et al.*, 2010). Il s'agit par exemple des

champignons mycorhiziens, des rhizobiums, des bactéries solubilisatrices de phosphore et de *Metarhizium anisopliae*. Toutefois, Nwaga et al., (2010) rappellent que le stress environnemental influence significativement l'activité et l'efficacité de ces microorganismes.

### III.2.5. Evaluation de la pathogénicité des champignons formulés sur les mirides

#### ➤ Bio-essai des formulations au laboratoire

Les taux de mortalité élevés dans les différents traitements ainsi que les fréquences de sporulation sur les insectes morts ont une fois de plus démontré la pathogénicité et l'efficacité des isolats de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*. Les taux moyens de mortalité de mirides due à l'isolat BIITAC6.2.2 formulé avec de l'huile, supérieurs à 77%, relèvent que l'addition des adjuvants aux conidies de *B. bassiana* pourrait rehausser l'effet pathogène de ce champignon vis-à-vis des larves de *S. singularis*, bien que la mort des insectes soit directement liée à l'agent infectieux et non aux additifs. Certains adjuvants, notamment les huiles végétales et minérales, sont généralement utilisées pour protéger les conidies des conditions environnementales et maximiser leur performance virulente (Camargo et al. (2012).

Les résultats acquis avec *B. bassiana* sont en accord avec ceux rapportés par un certain nombre d'auteurs. Des travaux sur les formulations de type émulsion inverse de deux isolats de *B. bassiana* (BGI et BFI) ont été à l'origine des taux de mortalité très élevées du Coléoptère *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758, soit 96,6%, comparées aux suspensions aqueuses de conidies à 40% (Batta et al., 2010). Camargo et al. (2012) ont aussi montré que les larves de *Rhipicephalus microplus* peuvent à 100% mourir au 20<sup>e</sup> jour post-traitement avec des formulations de *B. bassiana* à base d'huile, alors que les suspensions aqueuses causent seulement 27,4% de mortalité. De même, des taux de mortalité plus élevées pour *M. anisopliae* formulé par rapport à sa simple suspension aqueuse ont été enregistrés. Ce résultat est aussi en accord avec celui de Camargo et al. (2012) qui ont souligné que les conidies de *M. anisopliae* formulées avec l'huile minérale ont causé près de 100% de mortalité des larves de *R. microplus* au 5<sup>e</sup> jour alors que ces mêmes conidies non-formulées ont causé que 2% de mortalité.

La différence notable entre la virulence des champignons formulés avec de l'huile et ceux non formulés peut se justifier par une bonne adhésion du produit sur la cuticule de l'insecte. Cette adhérence s'explique par la présence de certains additifs, tels que l'huile dans la formulation, qui auraient des propriétés chitinophiles (Prior et al., 1988). Par contre dans les suspensions simples, les conidies adhèrent difficilement ou faiblement à la cuticule de

l'hôte. A cet effet, Prior *et al.* (1988) relèvent aussi le caractère hydrophobe de la cuticule de bon nombre d'arthropodes. Dans le présent travail, les propriétés chitinophiles des huiles auraient donc accéléré le processus d'infection des isolats utilisés et leur pathogénicité.

➤ **Bio-essai des formulations en milieu réel**

L'important taux de mortalité des mirides, soit 90%, enregistré dès le 3<sup>e</sup> jour avec le traitement insecticide trouve son explication dans la rapidité d'action de telles substances en général. En évaluant l'efficacité de huit insecticides commercialisés vis-à-vis de l'Hémiptère *Cimex lectularius* Linnaeus, 1758, Donahue *et al.* (2015) ont récemment démontré que certains insecticides peuvent causer plus de 94% de mortalité dudit insecte en 24 heures. Le rapport de la FAO en 2004 souligne à cet effet que la molécule d'imidaclopride a une action rapide. Le taux de réduction maximale, soit 100%, de la population de mirides a été plus rapidement atteint dans le traitement à l'insecticide comparé au traitement biopesticide. Ceci indique clairement que le traitement à l'insecticide de synthèse est nettement plus efficace que celui au biopesticide. Cette différence se justifierait par le fait que les organismes entomopathogènes sont de nature à agir lentement dans le temps (Ayalew, 2016).

Bien que l'effet de l'insecticide de synthèse se soit avéré plus significatif que celui du biopesticide, nos résultats prouvent toutefois l'efficacité de ce dernier avec 99,7% de réduction de la population de mirides au 30<sup>e</sup> jour post-traitement. Ces résultats suivent d'ailleurs les mêmes tendances que ceux de Ngakou *et al.*, (2008) qui ont obtenu, en milieu réel et sur trois sites, des taux de réduction de la population de *M. sjostedti* atteignant 97% et 58% suite aux traitements à base de deltaméthrine et de biopesticide de *M. anisopliae* respectivement. Les réponses assez importantes des deux traitements appliqués dans nos travaux pourraient être justifiées par une bonne couverture des plantes lors de la pulvérisation couplée à l'effet des composés volatiles des différentes matières actives. Crespo *et al.* (2006) ont rapporté pour la première fois la présence des composés organiques volatiles chez le champignon *B. bassiana* qui, avec leur effet répulsif ou attractif, auraient une interaction avec sa virulence. Le faible taux de réduction de la population de mirides dans le traitement témoin par rapport au traitement par le biopesticide se rapproche des résultats de Qazzaz *et al.* (2015) ; ces auteurs déclarent que les souches de *B. bassiana* P.Bv32 et P.Bv39 formulées à partir de l'huile de maïs, d'eau distillée stérile et de Tween 20 puis appliquées en champ, réduisent significativement les mouches de fruit par rapport au témoin.

Le présent travail a aussi montré par des oscillations du taux de réduction des populations de mirides avec le temps, indépendamment du traitement. Ces oscillations

pourraient être expliquées par le fait que les insectes cibles volent et déménagent de temps en temps d'un arbre à un autre. Ainsi, la réduction de la population de mirides dans le traitement témoin serait due au fait que les mirides volants ont pu se déplacer des parcelles témoins vers d'autres parcelles. En général, le comportement des organismes nuisibles peut énormément affecter l'efficacité des traitements. A titre d'exemple, deux espèces de pucerons *Myzus persicae* Sulzer, 1776 et *Aphis gossypii* Glover, 1877 ont été déclarés sensibles au champignon *Verticillium Lecanii* R. Zare & W. Gams, 2001; cependant, le contrôle de *A. gossypii* a été nettement inférieur à celui de *M. persicae* (Hall & Burges, 1979). Cet effet a été attribué à la mobilité de *M. persicae* entraînant un contact fréquent avec les spores fongiques.

Les insectes infectés et morts ont montré une croissance mycélienne sur la surface de leur cuticule. Cette sporulation confirme que ces insectes ont effectivement été infectés et sont morts du fait du biopesticide. Les formulations à base des isolats de *B. bassiana* apparaissent comme des agents prometteurs du bio-contrôle contre les mirides du cacao en milieu réel. Toutefois, il faudrait signaler qu'il existe de nombreuses autres contraintes biotiques et abiotiques qui pourraient influencer les capacités pathogènes d'un agent fongique (Sabbahi, 2008). Parmi elles, on peut citer les microorganismes antagonistes de *B. bassiana* se trouvant dans l'environnement, les conditions physiologiques de l'hôte, l'ensoleillement, la température et l'humidité (Inglis *et al.*, 2001). L'utilisation avec succès des champignons entomopathogènes comme agents de contrôle microbien dépendra de l'utilisation de l'inoculum approprié, formulé de manière optimale et appliqué au bon moment à un hôte susceptible (Burges, 1998).

#### ➤ **Persistance de la viabilité des conidies de *Beauveria bassiana* sur les feuilles et sur les cabosses de cacaoyer**

Des taux de réduction des conidies viables de *B. bassiana* BIITAC6.2.2 sur le feuillage ont été observés quarante et soixante jours post-application du biopesticide en champ. Inglis *et al.* (1993) ont noté que le nombre de colonies a diminué jusqu'à 47% et 81% respectivement sur les feuilles de luzerne et de blé, quatre jours après l'application la formulation de *B. bassiana* isolat GHA. Lors de l'application de *B. bassiana* contre *L. lineolaris*, Ziani (2008) a trouvé une réduction de 67% et 54% pour les deux isolats de *B. bassiana* INRS-IP et INRS-CFL au troisième jour post-application. Six jours après l'application, les diminutions ont été de l'ordre de 95% et 97% pour INRS-IP et pour INRS-CFL respectivement. Sabbahi (2008) quant à lui a publié des taux de réduction de 60% et

71% trois jours après l'application de ces mêmes souches de *B. bassiana*. Six jours plus tard ces taux ont à nouveau atteint des valeurs de 90% et 94%.

Cette diminution du nombre de conidies semble associée à leur exposition aux facteurs abiotiques. En effet, McCoy *et al.* (1990) pensent que la lumière du soleil affecte la persistance des conidies sur le matériel végétal et peut directement influencer leur structure génétique. Le rayonnement ultraviolet serait le principal facteur limitant la viabilité des conidies sur le feuillage. C'est dans ce cadre que Cagan & Svercell (2001) ont révélé que les rayons ultraviolets avaient une incidence indirecte mais significative sur la mortalité des larves d'*Ostrinia nubilalis* Hübner, 1796 (ravageur du maïs) exposées aux conidies de *B. bassiana*. Pour ces auteurs, les rayons ultraviolets pourraient interférer avec les propriétés physiologiques des champignons. Wenzel *et al.* (2016) ont d'ailleurs récemment souligné qu'une exposition prolongée des conidies pures de *B. bassiana* aux rayons ultraviolets diminue significativement leur viabilité mais qu'elle ne les affecte pas lorsqu'elles sont formulées. Par contre, dans le présent travail, les conidies, même formulées, ont subi une perte de viabilité de 72% au bout de soixante jours. Ce contraste s'expliquerait par le fait que les conidies ici ont été formulées avec de simples additifs liquides alors que Wenzel *et al.* (2016) les ont encapsulées, les protégeant ainsi des facteurs environnementaux.

Des variables autres que le rayonnement ultraviolet, telles que les précipitations, l'humidité relative et la température, peuvent également avoir un impact significatif sur la survie et la persistance des conidies (Furlong & Pell, 1997 ; Goettel *et al.*, 2000). La température et l'humidité relative affectent la capacité des champignons à survivre, à sporuler, à infecter et même à tuer les hôtes cibles (Goettel *et al.*, 2000; McCoy *et al.*, 2003). Ces facteurs jouent un rôle important dans la survie des champignons entomopathogènes telluriques (Hussein *et al.*, 2010 ; Hsia *et al.*, 2014) ; les précipitations, elles, peuvent provoquer le lessivage des conidies (McCoy *et al.*, 1990). Les radiations solaires affectent la persistance des conidies en réduisant leur survie (Inglis *et al.* 1995, 2001). Le micro-habitat dans lequel les champignons sont déployés influencerait la persistance de leurs conidies. Leland & Behle (2005) précisent à cet effet que l'utilisation de *B. bassiana* sur le terrain exige la résistance de ses conidies à la lumière ultraviolette, à une faible humidité et sa capacité à persister sur le matériel végétal. Deux mois après l'application de la formulation du biopesticide à base de *B. bassiana* en champ, l'activité insecticide de ses conidies a été maintenue, ce qui s'est matérialisé par une mortalité croissante des mirides au laboratoire qui a atteint un taux de 91,42% dès le 13<sup>e</sup> jour. Ce résultat montre clairement que les conidies de l'isolat BIITAC6.2.2 peuvent persister et infecter les populations de mirides jusqu'à 60 jours



après application sur les cabosses. La mortalité des mirides, causée par l'ingestion des cabosses traitées deux mois plus tôt, traduit le fait que le contact entre les gouttelettes du biopesticide et la cuticule de l'insecte pendant la pulvérisation n'est pas le seul moyen d'infection de ce dernier. Autrement dit, l'insecte peut aussi s'infecter en se nourrissant d'un substrat contaminé. Ce résultat est en accord avec ceux de Wright & Chandler (1992), Liu et al. (2002) et Mohammadbeigi (2012), qui ont prouvé des infections d'insectes par *B.bassiana* et *M. anisopliae* par contact indirect (ou ingestion) d'un substrat souillé. Ainsi les formulations de biopesticides peuvent conserver leur potentiel insecticide en milieu réel pendant plusieurs semaines.

### **III.2.6. Evaluation de l'attractivité des pièges à phéromones**

Toutes les couleurs des pièges testées ont attiré les mirides mâles de *S. singularis* avec une préférence pour la couleur verte, pour laquelle les effectifs d'insectes ont été plus élevés. Ce résultat sur l'attractivité sélective des couleurs de pièges envers les insectes corrobore ceux obtenus par plusieurs auteurs parmi lesquels on peut citer Hassan et al. (2004) ; Ventura & Panizzi (2004) ; Ranamukhaarachchi & Wickramarachchi (2007) ; Blackmer et al. (2008) ; Mazzoni et al. (2011) ; Thongjua et al. (2015). Ces auteurs ont étudié la réponse des couleurs vis-à-vis des Hémiptères pour les uns et des Thysanoptères pour les autres. La variabilité des niveaux de capture de mirides dans les pièges à phéromones de différentes couleurs suggère que l'effet couleur jouerait un rôle essentiel dans l'attractivité.

Dans le présent travail, l'attractivité décroissante des pièges verts suivie des violets et des blancs est bien marquée. On aurait pu s'attendre à une préférence du violet par rapport au vert, en raison de la réflectance de ces deux couleurs aux longueurs d'onde respectives 400 nm et 510 nm. Une couleur avec courte longueur d'onde et une fréquence élevée attire plus les insectes qu'une couleur avec longueur d'onde élevée et une faible fréquence ; en effet, les longueurs d'onde plus courtes sont plus facilement identifiables par les ocelles, cellules visuelles des insectes (Ashfaq et al., 2005). La contradiction du résultat acquis, avec celui de Ashfaq et al. (2005) serait certainement attribuée au fait que la réponse de l'insecte à une couleur semble spécifique à l'espèce (Blackmer et al., 2008). Cette spécificité est étayée par les résultats de nombreuses études qui ont montré des préférences aux diverses couleurs (Ranamukhaarachchi & Wickramarachchi, 2007 ; Thongjua et al., 2015 ; Mazzoni et al., 2011). Il a été établi que comparé aux couleurs rouge, blanche et bleue, le vert attire plus l'hémiptère *Neomegalotomus parvus* Westwood, 1842 (Ventura & Panizzi, 2004). Pendant les saisons d'automne 2004, d'été et d'hiver 2005, les hémiptères *Lygus* spp. ont été

préférentiellement attirés par les pièges verts par rapport aux pièges blancs (Blackmer et *al.*, 2008). Notre résultat, comme ceux des auteurs précédents, semble mettre en évidence un certain attrait des punaises par la couleur verte. De plus, on a souvent constaté que la combinaison de la couleur et de l'odeur a des effets additifs ou même synergiques dans la médiation des réponses des insectes (Arnold et *al.*, 2015 ; Giurfa et *al.*, 1995 ; Raguso & Willis 2005) ; les pièges contenant les deux types de stimuli fonctionneraient mieux que les pièges qui n'ont qu'un attractif visuel ou olfactif.

La préférence de la couleur verte serait aussi justifiée par la couleur du matériel végétal en général, la couleur de la cabosse de cacao en l'occurrence. Certaines caractéristiques fonctionnelles des pièges peuvent permettre d'avoir des conceptions différentes et adaptées pour le contrôle ou la surveillance des insectes. Mazzoni et *al.* (2011) suggèrent d'ailleurs qu'une approche de contrôle complémentaire, incluant la reconnaissance visuelle et permettant l'identification des indices des plantes hôtes, pourrait être utilisée pour surveiller les insectes.

### **III.2.7. Evaluation des populations et des dégâts de *Sahlbergella singularis***

L'évaluation du nombre de mirides dans les zones d'étude a montré des profils correspondant ou non aux différents facteurs climatiques mesurés.

Une pluviométrie élevée aux mois d'octobre 2014 et 2015 puis d'août 2016 à Ayoa, et de juillet 2015 à Konye expliquerait l'abondance des cabosses, aliment de prédilection des mirides et indirectement les abondances élevées des mirides. Les mirides affectionneraient les parcelles avec une abondance des ressources alimentaires. Nos résultats, dans les deux localités, ont montré une distribution locale des mirides très faiblement corrélée aux paramètres environnementaux. Il s'avère important de signaler que, de manière indirecte, la variation saisonnière du climat peut fortement modifier la dynamique des populations de mirides et altérer la physiologie des cacaoyers hôtes, les rendant plus ou moins désagréables aux insectes nuisibles (Awudzi et *al.*, 2016). Selon Idowu (1989), il est toujours difficile d'identifier l'effet réel et direct des facteurs environnementaux sur les activités et l'abondance des mirides. Cette difficulté résulte des nombreuses interactions qui existent souvent entre les facteurs environnementaux et certaines fonctions d'une plante hôte, telles que la production et la disponibilité des cabosses, support alimentaire et reproductif de *S. singularis*. Les précipitations pourraient également jouer un rôle important dans la facilitation de la disponibilité de cabosses pour l'alimentation mirides (Mahob et *al.*, 2011). Toutefois,

Anikwe et *al.* (2010) rapportent que, les précipitations élevées peuvent aussi causer une chute temporaire des populations de mirides ; cela a été au mois d'octobre 2015 à Konye.

Les pics des populations de mirides en mars 2016 à Ayos et en février 2016 à Konye se superposent à ceux de la température ; de faibles abondances de mirides ont été enregistrées lors des faibles températures en décembre 2015 et en janvier 2016 à Ayos et, en décembre 2015 à Konye. Cette distribution spécifique des punaises est en accord avec celle proposée par Anikwe et *al.* (2010), qui ont rapporté que les populations mirides déclinent dans les périodes de faible humidité et lorsque les températures diminuent. Par ailleurs, la corrélation négative trouvée entre le nombre moyen de mirides à Konye et la température ambiante est en accord avec les résultats de Awudzi et *al.* (2016), qui argumentent qu'une faible humidité pourrait réduire la survie des mirides en réduisant la quantité d'eau dans les sites d'alimentation et la disponibilité de sites d'alimentation et de reproduction adaptés. Cela a été le cas au mois de février 2015 à Ayos et à Konye.

Les pics des populations de mirides observés en octobre 2015 puis mars 2016 à Ayos et en février puis mai 2016 à Konye n'ont eu aucun effet sur la prévalence et la sévérité des dommages de ces organismes sur les cabosses. Ceci relevait du fait que pendant ces périodes, les cabosses, aliment privilégié de *S. singularis*, étaient presque absentes des cacaoyers, en raison certainement des conditions climatiques. Les mirides présents pendant ces périodes se nourrissaient certainement des branches et branchettes pour survivre.

Concernant l'impact du piégeage sur les dégâts des mirides, l'augmentation de la taille des populations des mirides dans les pièges expliquerait, mais très faiblement, la diminution de la prévalence et de la sévérité de leurs dommages sur les cabosses. Une réflexion menée sur la dynamique des populations des mirides par le taux de captures par piège indique que le piégeage à phéromones est un outil de surveillance du taux d'infestation de ces insectes en cacaoculture et de la sévérité de leurs dégâts (Sarfo, 2013). Les pièges de couleur verte pourraient, du fait de leur attractivité plus élevée comparée aux autres couleurs de pièges, être utilisés comme un outil de diagnostic précoce du niveau d'infestation des cacaoyères par les mirides. Ils peuvent servir à détecter l'augmentation des insectes adultes dans les cultures pérennes (Childers & Brecht, 1996) et à initier des mesures phytosanitaires afin de prévenir les dégâts importants et de réduire l'utilisation des insecticides chimiques (Samways, 1986). L'effectif important de mirides capturés au terme de ce travail s'expliquerait par le fait que les phéromones ont attiré les mirides en dehors de nos parcelles expérimentales.

**CONCLUSION, RECOMMANDATIONS ET  
PERSPECTIVES**

## CONCLUSION

Au cours du présent travail, qui entre dans le cadre de la lutte biologique contre le miride du cacaoyer, *Sahlbergella singularis*, nous avons évalué l'activité insecticide des champignons entomopathogènes, *B. bassiana* et *M. anisopliae*, contre les larves de ce miride et l'intégration des couleurs dans les pièges à phéromones pour optimiser leur utilisation.

Dans la première partie de cette étude orientée sur le potentiel entomopathogène de *B. bassiana* et de *M. anisopliae*, les deux objectifs de recherche étaient d'une part l'évaluation du pouvoir insecticide de six isolats fongiques de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae* et, d'autre part, la mise au point et la sélection des formulations de biopesticides.

Cette recherche a montré que :

- les isolats fongiques testés sont pathogènes vis-à-vis de *S. singularis*. Ils causent des taux de mortalité importants au sein de la population de mirides. Cela est le cas avec la méthode de contamination par immersion des traitements fongiques BIITAC10.3.3 à  $1 \times 10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup>, MIITAC11.3.4 à  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> et MIITAC6.2.2 à  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> qui induisent 100% de mortalité. Les isolats MIITAC11.3.4 et BIITAC10.3.3 ont l'un et l'autre rendu des temps létaux 50 (TL50) de 4,1 et 4,2 jours, alors que l'isolat BIITAC10.3.3 a montré une concentration létale 50 (CL50) de  $8,97 \times 10^5$  conidies.mL<sup>-1</sup>. Avec la méthode par ingestion, les traitements fongiques BIITAC10.3.3 à  $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> et MIITAC6.2.2 à  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> ont provoqué 94,3% de mortalité des mirides. Les meilleurs CL50 et TL50 ont été notés avec les isolats BIITAC10.3.3 et MIITAC6.2.2 ;
- les taux de mirides morts et présentant une germination des spores sur la cuticule ont été plus importants avec les traitements MIITAC11.3.4 à  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup>, MIITAC6.2.2 à  $1 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup>, BIITAC10.3.3 à  $1 \times 10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup> et BIITAC6.2.2 à  $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> avec la méthode de contamination par immersion. Pour ce qui est de la méthode par ingestion, les traitements BIITAC6.2.2 à  $3,2 \times 10^8$  conidies.mL<sup>-1</sup> et BIITAC10.3.3 à  $1 \times 10^9$  conidies.mL<sup>-1</sup> ont été plus efficaces;
- les isolats BIITAC6.2.2 et MIITAC11.3.4 transmettent mieux l'infection d'un miride à un autre. Ainsi, le contact entre les mirides doit être pris en compte pour une bonne dissémination de l'agent pathogène et pour créer une épizootie fongique au sein d'une population de mirides;
- concernant la compatibilité fongique avec les adjuvants, certains additifs auraient un effet inhibiteur sur la croissance, la germination et la sporulation des champignons. Le glycérol

s'est révélé être un bon accélérateur des paramètres suscités des champignons cibles. Il en est de même pour l'huile de soja, l'huile de palme raffinée et l'huile de coton ;

- de toutes les formulations, l'émulsion inverse (EI) conserve mieux la viabilité des spores de *B. bassiana* pendant 18 semaines ;

- la température affecte la germination des spores. La température ambiante de 25°C est plus favorable à la conservation des formulations tandis que celle de 30°C est inadéquate ;

- les tests de pathogénicité des conidies formulées en laboratoire et sur le terrain ont indiqué une efficacité certaine. La toxicité des deux espèces fongiques est avérée puisque le taux de mortalité des mirides induit au laboratoire dépasse 75%. Pour *B. bassiana*, la mortalité des mirides traités avec la formulation à base de l'huile de soja est plus élevée que celle avec l'huile de palme raffinée toutefois ; pour *M. anisopliae*, la situation s'inverse. L'espèce *M. anisopliae* est relativement moins létale pour les mirides que *B. bassiana*. Cette faible létalité la rend moins apte à la lutte biologique contre ces insectes ;

- l'insecticide de *B. bassiana*, formulé à base d'huile de soja, réduit significativement les populations de mirides comparé au témoin. Au bout de deux mois post-application, l'activité insecticide de cette formulation persiste malgré les conditions abiotiques. Tout compte fait, *B. bassiana* est donc un bon candidat pour la lutte contre les mirides de cacao ;

- le type de formulation influence l'efficacité du champignon comme agent de bio-contrôle, sa facilité d'application et sa durée de conservation. Ces atouts sont attribuables aux additifs qui entrent dans la mise au point de la formulation fongique.

Dans la deuxième partie de cette thèse, l'intérêt a été porté sur l'optimisation de l'utilisation de pièges à phéromones pour lutter contre les mirides. Les objectifs de recherche poursuivis étaient :

- l'évaluation de l'attractivité et de la préférence des pièges colorés appâtés vis-à-vis de *S. singularis* ;

- la détermination de l'impact de ces pièges à phéromones sur la densité et les dégâts de *S. singularis* en milieu réel.

Il est apparu que :

- quelle que soit la localité d'étude, les mirides ont préféré les pièges dans l'ordre décroissant suivant pièges verts, pièges violets enfin pièges blancs. Cette préférence pour les pièges verts s'explique par le mimétisme de la couleur du matériel végétal et/ou les longueurs d'onde réfléchies par les différentes couleurs ;

- la dynamique des populations de *S. singularis* ne s'explique pas directement par les valeurs des facteurs abiotiques. Ce résultat laisse donc penser que c'est l'état physiologique du

cacaoyer qui serait le facteur prépondérant influençant la dynamique spatio-temporelle de ce pest dans les plantations. Ces facteurs abiotiques pourraient modifier cet état physiologique au point que la plante ne soit plus favorable au développement des mirides ;

- les niveaux élevés de prévalence et de sévérité des dégâts dans les parcelles témoins comparées aux parcelles traitées autorisent à penser que l'utilisation du piégeage réduit les dommages causés par les mirides sur les cabosses ;

- les variations temporelles des captures des mirides sont spécifiques à chaque localité.

## **RECOMMANDATIONS**

Les données obtenues au terme de ce travail sont fondamentales pour les futurs programmes de recherche visant à formuler *B. bassiana* et *M. anisopliae* comme biopesticides. Pour celà, nous recommandons :

- aux instituts de recherche nationaux et internationaux pour le développement de l'agriculture de :

-montrer plus d'intérêt au secteur de la lutte biologique à travers la mise au point des biopesticides ;

- intégrer diverses couleurs dans l'utilisation des pièges à phéromones dans le monitoring, le piégeage de masse des mirides et même comme outil d'auto-dissémination des champignons entomopathogènes.

- aux pouvoirs publics de :

- s'investir dans la vulgarisation de ces biopesticides et pièges à phéromones colorés;

- revoir le calendrier de traitement des cacaoyères en fonction des régions, en l'adaptant à la dynamique des populations de mirides.

## **PERSPECTIVES**

Cette étude nous a permis de proposer pour la lutte contre les mirides, l'utilisation des moyens respectueux de l'environnement et d'améliorer les recommandations pour cette lutte biologique. Toutefois, certains sujets méritent encore de retenir notre intérêt. Ainsi, nous prévoyons à plus ou moins brèves échéances :

- d'isoler les toxines des isolats fongiques retenus et d'étudier leurs mécanismes d'action au niveau cellulaire. Le but d'une telle recherche est de comprendre le mécanisme d'action des champignons entomopathogènes et de mettre au point des formulations encore plus efficaces;

- d'identifier de nouvelles souches de *Beauveria bassiana* et de *Metarhizium anisopliae* plus virulentes vis-à-vis de *S. singularis* et d'étudier leurs caractéristiques ;
- de poursuivre les recherches sur les méthodes de conservation à long terme des formulations. Dans ce cadre, il est essentiel de tester l'effet des adjuvants sur la germination des conidies et sur leur durée de vie ;
- de mettre au point un moyen de production en masse des champignons entomopathogènes au niveau local ;
- d'étudier l'effet des formulations de biopesticides sur les insectes non cibles parfois bénéfiques à la cacaoculture afin d'établir avec précision les recommandations pour leur utilisation dans les programmes de lutte ;
- de refaire d'autres essais sur les pièges à phéromones en intégrant d'autres couleurs telles que la couleur jaune qui rappelle celle des cabosses mûrs et en remplaçant les phéromones par les kairomones. Ces essais pourraient permettre de déterminer la couleur la plus attractive pour *S. singularis* et d'optimiser l'utilisation des kairomones.
- d'étudier les caractères biochimiques des cacaoyers, à chaque période de l'année, pour rechercher une éventuelle influence des saisons sur l'état physiologique de l'arbre ;



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abdulhai, M., EL-Bouhssini, M., Jamal, M., Trissi, A.N., Sayyadi, Z., Skinner, M. & Parker, B.L., 2010.** *Beauveria bassiana* characterization and efficacy vs. sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 13: 1052-1056.
- Abbott, W., 1925.** A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Adu-Acheampong, R., 1997.** Evaluation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed extracts for the management of some cocoa mirid species. Thesis of Master of Philosophy Entomology, Insect Science Programme, *University of Ghana*: 68p.
- Adu-Acheampong, R., Archer, S., Leather, S., 2012.** Resistance to dieback disease caused by *Fusarium* and *Lasiodiplodia* species in cacao (*Theobroma cacao* L.) genotypes. *Experimental Agriculture*, 48: 85-98.
- Ainsworth, G.C., 1956.** Agostino Bassi, 1773-1856, *Nature*, 177: 255-257.
- Aka, R.A, Kouassi, N.K., Agnéroh, T.A., Amancho, N.A. & Sangaré, A., 2009.** Distribution et incidence de la mosaïque du concombre (CMV) dans des bananeraies industrielles au Sud-Est de la Côte d'Ivoire. *Sciences & Nature*, 6: 171-183.
- Akrofi, A.Y., 2015.** Phytophthora megakaria: A review on its status as a pathogen on cacao in West Africa. *African Crop Science Journal*, 23 (1): 67 - 87
- Allou, K., Morin, J-P., Kouassi, P., N'klo, F.H. & Rochart, D., 2006.** *Oryctes monoceros*, trapping with synthetic pheromone and palm material in Ivory Coast. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 1743-1754.
- Alston, D.G., Rangel, D.E.N., Lacey, L.A., Golez, H.G., Kim, J.J. & Roberts, D.W., 2005.** Evaluation of novel fungal and nematode isolates for control of *Conotrachelus nenuphar* (Coleoptera: Curculionidae) larvae. *Biological Control*, 35: 163-171.
- Altre, J.A., Vandenberg, J.D. & Cantone, F.A., 1999.** Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 332-338.
- Alverson, W.S., Whitlock, B.A., Nyffeler, R., Bayer, C. & Baum, D.A., 1999.** Phylogeny of the core Malvales: Evidence from ndhF Sequence Data. *American Journal of Botany*, 86 (10): 1474-1486.
- Alves, R.T., Bateman, R.P., Prior, C. & Leather, S.R., 1998.** Effects of simulated solar radiation on conidial germination of *Metarhizium anisopliae* in different formulations. *Crop Protection*, 17: 675-679.

- Alves, S.B., Pereira, R.M., Stimac, J.L. & Vieira, S.A., 1996.** Delayed Germination of *Beauveria bassiana* Conidia after Prolonged Storage at Low, Above-freezing Temperatures. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 575-581.
- Ambang, Z., Akoa, A., Bekolo, N., Nantia, J., Nyobe, L. & Ongono, Y.S.B., 2007.** Tolérance de quelques cultivars de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) et de l'espèce sauvage (*Manihot glaziovii*) à la mosaïque virale africaine et à la cercosporiose du manioc. *Tropicultura*, 25 (3): 140-145.
- Anikwe, J.C., 2010.** The Seasonal Occurrence and Control of the Cocoa Stem Borer, *Eulophonotus myrmeleon* Fldr. (Lepidoptera: Cossidae) on Cocoa in Ibadan, Nigeria. *Libyan Agriculture Research Center Journal International*, 1 (3): 142-146.
- Anikwe, J.C. & Okelana, F.A., 2009b.** Evaluation of field damage and chemical control of outbreak of *Sahlbergella singularis* Haglund in a cocoa plantation in Ibadan, Nigeria. *World Journal of Agricultural Sciences*, 5 (2): 190-194.
- Anikwe, J.C., Okelana, F.A. & Omoloye, A.A., 2010.** The population dynamics of the brown cocoa mirid, *Sahlbergella singularis* haglund in Ibadan, Nigeria. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development*, 10: 2772-2783.
- Anikwe, J.C., Omoloye, A.A., Aikpokpodion, P.O., Okelana, F.A. & Eskes, A.B., 2009a.** Evaluation of resistance in selected cocoa genotypes to the brown cocoa mirid, *Sahlbergella singularis* Haglund in Nigeria. *Crop Protection* 28: 350-355.
- Anonyme, 2002.** *Mémento de l'Agronome*. 5ème édition. CIRAD, GRET, Ministère français des affaires étrangères, Paris: 1051-1063.
- Anonyme, 2003.** *A la découverte du cacao: un guide pour la formation des facilitateurs*. Janny, G.M., Ritchie B. J. & Flood, J. (Eds). CABI Bioscience, Bakehame Lane : 114p.
- Anonyme, 2007.** Phytosanitairement vôtre. *Journal d'Information de la Direction de l'Agriculture et de la Forêt- Service de la Protection des Végétaux*. Ed Guyane, N° 29: 4p.
- Anonyme, 2013.** Commission nationale d'homologation des produits phytosanitaires et de certification des appareils de traitement : Liste des pesticides homologués au Cameroun du 31 juillet 2013. 40p.
- Anonyme, 2014.** Plan de relance et de développement des filières cacao et café du Cameroun- Horizon 2020, 106p.
- Anonyme, 2015.** Liste des pesticides prohibés et liste des pesticides sous surveillance. Vol 1.0. Département Normes et certification De Ruyterkade 6 bg 1013 AA Amsterdam, Pays-Bas : 19p.

- Anonyme, 2016.** Le Cameroun en bref. [www.planetere.org/bulletin/2010/pdf-doc/Regions-du-Cameroun](http://www.planetere.org/bulletin/2010/pdf-doc/Regions-du-Cameroun), 29p, (consulté le 8 juillet 2018).
- Arnold, S.E.J., Stevenson, P.C. & Belmain, S.R., 2015.** Responses to colour and host odour cues in three cereal pest species, in the context of ecology and control. *Bulletin of Entomological Research* 105: 417-425. doi:10.1017/s0007485315000346.
- Ashfaq, M., Khan Rashid, A., Khan Ahsan, M., Rasheed, F. & Hafeez, S., 2005.** Insect orientation to various colour lights in the agricultural biomes of Faisalabad. *Pakistan Entomology*, 27: 49-52.
- Awang, A. & Lamin, K., 2014.** Foreur des cabosses (« Cocoa Pod Borer », CPB). In : *Guide technique pour les transferts sécurisés de matériel génétique de cacaoyer*. Ed M.J., Daymond, A.J. & Hadley, P. (Eds), Bioversity International, Montpellier, France: 66-70.
- Awudzi, G.K., Cudjoe, A.R., Hadley, P., Hatcher, P.E. & Daymond, A.J., 2016.** Optimizing mirid control on cocoa farms through complementary monitoring systems. *Journal of Applied Entomology*, 141: 247-255.
- Ayalew, G., 2016.** Efficacy of BotaniGard (*Beauveria bassiana*) Against Whiteflies on Poinsettia and Dahlia. *Agriculture, Forestry and Fisheries*, 5: 181-185.
- Azhar, I., 1986.** A threat of cocoa pod borer (*Conopomorpha cramerella*) infestation to the Malaysian cocoa industry. *Teknologi Koko-Kelapa*, 2 : 53-60.
- Babin, R., 2009.** Contribution à l'amélioration de la lutte contre le miride du cacaoyer *Sahlbergella singularis* Hagl. (Hemiptera : Miridae). Influence des facteurs agro-écologiques sur la dynamique des populations du ravageur. *Thèse de Doctorat, Département de Biologie Ecologie Environnement, Université de Montpellier III, Montpellier, France*: 201p.
- Babin, R., 2018.** Pest Management in Organic Cacao. In: *Handbook of Pest Management in Organic Farming*. Vacante, V. and Kreiter, S. (Eds), CAB International, Nairobi, Kenya, 20: 502-518.
- Babin, R., Bisseleua, D.H.B., Dibog, L., & Lumaret, J.P., 2008.** Rearing method and life-table data for the cocoa mirid bug *Sahlbergella singularis* Haglund (Hemiptera: miridae). *Journal of Applied Entomology*, 132: 366-374.
- Babin, R., Dibog, L. & Bisseleua, D.B.H., 2006.** Description et évaluation d'une nouvelle méthode d'élevage, et éléments de biologie de *Sahlbergella singularis* Hagl. (Hemiptera: Miridae), principal ravageur du cacaoyer au Cameroun. *Actes de la 15ème*

*Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère, San Jose, Costa Rica* : 1297-1303.

- Babin, R., Ten Hoopen, G.M., Cilas, C., Enjalric, F., Yede, Gendre, P. & Lumaret, J-P., 2010.** Impact of shade on the spatial distribution of *Sahlbergella singularis* in traditional cocoa agroforests. *Agricultural and Forest Entomology*, 12: 69-79.
- Badegana, A.M., Amang, J. & Mpe, J.M., 2004.** Préférence alimentaires de *Sahlbergella singularis* vis-à-vis de quelques clones de cacaoyers. *Revue Protection des Végétaux*, 19 (1) : 45-50.
- Bagal, M., Belletti, G. & Marescotti, A., 2013.** *Etude sur le potentiel de commercialisation du cacao du Cameroun en "Indication géographique"*. REDD (Eds), IRAM SA Avenue Charles – Dickens 6, CH – 1006, SUISSE : 9p.
- Bagny Beilhe, L., Piou, C., Tadu, Z., & Babin, R., 2018.** Identifying Ant-Mirid Spatial Interactions to Improve Biological Control in Cacao-Based Agroforestry System. *Environmental Entomology*, 47(3), 551–558. doi:10.1093/ee/nvy018.
- Bateman, R., 2008.** Pesticides Use in Cocoa: A Guide for Training, Administrative and Research Staff. *Report*, 1<sup>st</sup> ed., ICCO/IPARC: 57p.
- Bateman, R.P., Carey, M., Moore, D. & Prior, C., 1993.** The enhanced infectivity of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations to desert locusts at low humidities. *Annual of Applied Biology*, 122: 145-152.
- Bateman, R.P., Holmes, K.A., Krauss U. & Padi, B., 2005.** Future tactics and tools for pest management. In *Cocoa Futures*. Flood, J., Murphy, R. (Eds), *CABI Commodities Press*, Cali, Colombia: 77-93.
- Batta, Y.A., 2004.** Control of rice weevil (*Sitophilus oryzae* L., Coleoptera: Curculionidae) with various formulations of *Metarhizium anisopliae*. *Crop Protection*, 23: 103-108.
- Batta, Y.A., 2007.** Biocontrol of almond bark beetle (*Scolytus amygdali* Geurin-Meneville, Coleoptera: Scolytidae) using *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1406-1414.
- Batta, Y.A., Murdoch, G. & Mansfield, S., 2010.** Investigations into the formulation and efficacy of entomopathogenic fungi against larvae of yellow mealworm (*Tenebrio molitor* L., Coleoptera: Tenebrionidae). *General & Applied Entomology*, 39: 6-8.
- Batta, Y.A., Rahman, M., Powis, K., Baker, G. & Schmidt, O., 2011.** Formulation and application of the entomopathogenic fungus: *Zoophthora radicans* (brefeld) Batko (Zygomycetes: Entomophthorales). *Journal of Applied Microbiology*, 110: 831-839.

- Blackmer, J.L., Byers, J.A. & Rodriguez-Saona, C., 2008.** Evaluation of color traps for monitoring *lygus* spp.: design, placement height, time of day, and non-target effects. *Crop Protection*, 27: 171-181.
- Boddum, T., Skals, N., Wirén, M., Baur, R., Rauscher, S. & Hillbur, Y., 2009.** Optimization of the pheromone blend of the swede midge, *contarinia nasturtii*, for monitoring. *Pest Management Sciences*, 65: 851-856.
- Beilharz, V.C., Parberry, D.G. & Swart, H.J., 1982.** Dodine: A selective agent for certain soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 79: 507-511.
- Bélanger, A. & Musabyimana, T., 2008.** *Le Neem contre les insectes et les maladies*. Bélanger, A. & Musabyimana T. (Eds), Association pour la Promotion des Produits Naturels Peu Préoccupants, 19 Montbreger 23000 St LAURENT: 13p.
- Benserradj, O., 2014.** Evaluation de *M. anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques. *Thèse de Doctorat 3ème cycle, Faculté des Sciences, Université de Constantin 1, République Algérienne Démocratique et Populaire* : 179p.
- Bisseleua, D.H.B., Yede, and Vidal, S., 2011.** Dispersion Models and Sampling of Cacao Mirid Bug *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae) on *Theobroma Cacao* in Southern Cameroon. *Environnemental Entomology*, 40 : 11-119
- Borman, A.M., Szekely, A., Campbell, C.K. & Johnson, E.M., 2006.** Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*, 161: 361-368.
- Boruah, S., Dutta, P., Puzari, K. C. & Hazarika, G. N., 2015.** Liquid bioformulation of *Metarhizium anisopliae* is effective for the management of cowpea mosaic disease. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 6: 179-185.
- Boucias, D.G., Pendland, J.C. & Latge, J.P., 1991.** Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycosis in arthropod host. In: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*, Cole G.T. & Hoch H.C. (Eds), Springer Sciences + Business Media, New York : 101-128.
- Braudeau, J., 1969.** *Le cacaoyer*. Braudeau, J. (Eds), G-P. Maisonneuve et Larousse, Paris, France : 304p.
- Briand, F., 2009.** Les phéromones sexuelles: utilisées comme moyen de lutte, évaluation de leur efficacité et mesure de leur impact physiologique sur les vers de la grappe. *Thèse de Doctorat, Institut de Biologie, Université de Neuchâtel* : 184pp.
- Brun, L. A., Sounigo, O., Coulibaly, N. & Cilas, C., 1997.** Method of analysis for studingcocoa (*Theobroma cacao* L.) susceptibility to mirids. *Euphytica*, 94: 349-359.

- Burgues, D.H., 1998.** Formulation of mycoinsecticides. In: *Formulation of microbial biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments*. Burgues, H.D. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 131-185.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. & Shostak, A.W., 1997.** Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *Journal of Parasitology*, 23: 576-583.
- Butt, T.M. & Copping, L.G., 2000.** Fungal biological control agents. *Pesticide Outlook* 11: 186-191.
- Butt T.M., Jackson M.C. & Magan N. 2001.** *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*. Butt, T.M., Jackson, C.W. & Magan, N. (Eds.), CABI Publisher: 390p.
- Cagan, L. & Sversel, M., 2001.** The influence of ultraviolet light on pathogenicity of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin to the European corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Central European Agriculture*, 2: 228-234.
- Camargo, M.G., Golo, P.S., Angelo, I.C., Perinotto, W.M.S., Sá, F.A., Quinelato, S. & Bittencourt, V.R.E.P., 2012.** Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, 188: 140-147.
- Caplong, P., Paulin, D. Alauzet, C. & Decazy, B., 1993.** Le foreur du tronc du cacaoyer, *Eulophonotus myrmeleon* Felder (Lépidoptère Cossidae), un ravageur potentiellement dangereux en cacaoculture In : *Actes de la 11<sup>ème</sup> Conférence internationale sur la recherche cacaoyère, Lagos, Cocoa Producers' Alliance*: 215-221.
- Cardé, R.T. & Minsk, A.K., 1995.** Control of moth pests by mating disruption: Successes and Constraints. *Annual Review of Entomology*, 40: 559-585
- Castrillo, L.A., Roberts, D.W. & Vandenberg, J.D., 2005.** The fungal past, present, and future: Germination, ramification, and reproduction. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89: 46-56.
- Charnley, A.K., 2003.** Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research*, 40: 241-321.
- Charnley, A.K. & St Leger., 1991.** The role of cuticle degrading enzymes in fungal pathogenesis of insects. In: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*. Cole, G.T. & Hoch, H.C. (Eds), Plenum Publishing Co., New York: 267-286.

- Cheraghi, A., Habibpour, B., Mossadegh, M.S. & Sharififard, M., 2012.** Horizontal Transmission of the Entomopathogen Fungus *Metarhizium anisopliae* in *Microcerotermes diversus* Groups. *Insect*, 3: 709-718.
- Cherry, A.J., Abalob, P. & Hella, K., 2005.** A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Product Research*, 41: 295-309.
- Cherry, A.J., Jenkins, N.E., Hevief, G., Bateman, R. & Lomer, C.J., 1999.** Operational and Economic Analysis of a West African pilot-scale production plant for aerial conidia of *Metarhizium* spp. for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*, 9: 35-51.
- Childers, C.C. & Brecht, J.K., 1996.** Colored sticky traps for monitoring *Frankliniella bispinosa* Morgan) (Thysanoptera: Thripidae) during flowering cycle in citrus. *Journal of Economic Entomology*, 89: 1240-1249.
- Cilas, C., 1991.** Estimation of some genetic parameters in different cocoa cross schemes. *Café Cacao Thé*, 35 (1): 3-14.
- Cilas, C. & Despréaux, D., 2004.** *Improvement of cocoa tree resistance to Phytophthora diseases*. Cilas, C. & Despréaux, D. (Eds). Repères CIRAD, Montpellier, Cedex, France: 171p.
- Clark, T.B., Kellen, W.R., Fukuda, R. & Lindegren, J.E., 1968.** Field and laboratory studies on the pathogenicity of the fungus *Beauveria bassiana* to three genera of mosquito. *Journal of Invertebrate Pathology*, 11: 1-8.
- Clarkson, J.M. & Charnley, A.K., 1996.** New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4: 197-203.
- Clerk, C.G. & Madelin, M.F., 1965.** The longevity of conidia of three insect-parasitizing hyphomycetes. *Transactions of the British Mycological Society*, 48, 193–209.
- Collingwood, C.A., 1977.** African mirids. In: *Les Mirides du Cacaoyer*. Lavabre E.M. (Eds), G-P. Maisonneuve et Larose, Paris : 71-83.
- Cork, A.A., 2004.** *A pheromone Manual*. Cork, A.A. (Eds), Natural Resources Institute, Chatham Maritime ME44TB, UK: 73p.
- Cork, A.A., Alam, S.N., Das, A., Das, C.S., Ghosh, G.C., Phythian, S., Farman, D.I., Hall D.R., Maslen, N.R., Vedham, K., Rouf, F.M.A. & Srinivasan, K., 2001.** Female



- sex pheromone of Brinjal fruit and shoot borer, *Leucinodes orbonalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Blend optimization. *Journal of Chemical Ecology*, 27: 1867- 1877.
- Crespo, R., Pedrini, N., Jua´rez, M.P., Dal Bello, G.M., 2006.** Volatile organic compounds released by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiological Research*, 163: 148-151.
- Cross, J.V., Hall, D.R., 2009.** Exploitation of the sex pheromone of apple leaf midge *dasineura mali* kieffer (Diptera: Cecidomyiidae) for pest monitoring: part 1. Development of lure and trap. *Crop Protection*, 28: 139-144.
- Cuatrecasas, J., 1964.** Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. *Bulletin of the United State National Museum, Smithsonian Institution (Washington)*, 35: 379-614.
- Danho, M., Bini, K.N.K., Adja, N.A., Gnago, A.J. & Akamou, F., 2014.** Efficacité des néonicotinoïdes et des pyréthrinoïdes utilisés contre le foreur des tiges du cacaoyer (*Eulophonotus myrmeleon* Felder (Lepidoptera, Cossidae). Implications dans la stratégie de protection de la cacaoculture en Côte d'Ivoire. *International Journal of Biological and chemical Sciences*, 8 (2): 459-467.
- Daoust, R.A., Ward, M.G. & Roberts, D.W., 1983.** Effect of formulation on the viability of *Metarhizium anisopliae* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 41: 151-160
- De Kouassi, M., 2001.** Les possibilités de lutte microbiologique : Emphase sur le champignon entomopathogène *B. bassiana*.  
<https://journals.openedition.org/vertigo/4091>, doi.org/[10.4000/vertigo.4091](https://doi.org/10.4000/vertigo.4091), (page consultée le 6 décembre 2018)
- Debach, P., 1964.** The scope of biological control. In *Biological Control of Insects Pests and Weeds*. Debach, P. (Eds), Chapman and Hall Ltd. London: 3-20.
- Deberdt, P., Mfegue, C.V., Tondje, P.R., Bon, M.C., Ducamp, C.H., Begoude, B.A.D., Ndoumbè-Nkeng, M., Hebbar, P.K. & Cilas, C., 2008.** Impact of environmental factors, chemical fungicide and biological control on cacao pod production dynamics and black pod disease (*Phytophthora megakarya*) in Cameroon. *Biological Control*, 44: 149-159.
- Decazy, B., 1976.** Preliminary note on the ecology of the cocoa psyllid: *Tyora tessmani* (Aul.) (Homoptera-Psyllidae). In: *5th conference of the entomologists of the cocoa of the West Africa, December 13th-18th 1976. Ed.ONAREST, Yaoundé, Cameroon* : 83-94.

- Delvare, G. & Aberlenc, H.P., 1989.** *Les insectes d'Afrique et d'Amérique tropicale : clés pour la reconnaissance des familles.* Delvare, G. & Aberlenc, H.P. (Eds), Laballery - 58500 Clamecy, PRIFAS, CIRAD-GERDAT, Montpellier Cedex, France: 302p.
- Demirci, F., Mustu, M., Kaydan, M.B. & Ülgentürk, S., 2011.** Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen; *Isaria farinosa*, on citrus mealybug, *Planococcus citri*. *Journal of Pest Sciences* 84: 337-342
- Devi, V.P.S. & Hari, P.P., 2009.** Identification of a virulent isolate of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, its mass multiplication and formulation for development into a mycoinsecticide for management of *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Journal of Biological Control*, 23: 137-44.
- Devi, K.U., Sridevi, V., Mohan, C.M. & Padmavathi, J., 2005.** Effect of high temperature and water stress on in vitro germination and growth in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin. *Journal of invertebrate Pathology*, 88: 181-189.
- Dibog, L., Babin, R., Amang A Mbang, J., Decazy, B., Nyassé, S., Cilas C. & Eskes, A.B., 2008.** Effect of genotype of cocoa (*Theobroma cacao*) on attractiveness to the mirid *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae) in the laboratory. *Pest Management Science*, 64: 977-980.
- Dimbi, S., Maniania, N.K. & Ekes, S., 2013.** Horizontal Transmission of *Metarhizium anisopliae* in Fruit Flies and Effect of Fungal Infection on Egg Laying and Fertility. *Insect*, 4: 206-216.
- Donahue, W.A.J.R., Showler, A.T., Donahue, M.W., Vinson, B.E., Hui L. & Osbrink, W.L.A., 2015.** Knockdown and Lethal Effects of Eight Commercial Nonconventional and Two Pyrethroid Insecticides against Moderately Permethrin-resistant Adult Bed Bugs, *Cimex lectularius* (L.) (Hemiptera: Cimicidae). *Biopesticides International*, 11: 108-117.
- Dongo, L.N., & Orisajo, S.B., 2007.** Status of cocoa swollen shoot virus disease in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 6 (17): 2054-2061.
- Downham ,M.C.A., Tamo, M., Hall, D.R., Datinon, B., Adetonah, S. & Farman, D.I., 2004.** Developing pheromone traps and lures for *Maruca vitrata* in Benin, West Africa. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 110: 151-158.
- Dzahini-Obiatey, H. & Adu Ampomah, Y., 2014.** Cacao swollen shoot virus (CSSV): genus Badnavirus. In: *Technical Guidelines for the Safe Movement of Cacao*

- Germplasm*. End, M.J., Daymond, A.J. and Hadley, P. (Eds), Bioversity International, Montpellier, France: 21-25.
- Eberle, K.E., Wennmann, J.T., Kleespies, R.G. & Jehle, J.A., 2012.** Basic techniques in insect virology. In: *Manual of Techniques in Invertebrates Pathology*. Second Ed Lacey, L.A., *Academic Press*: 15-74.
- Edde, P.A., Phillips, T.W. & Toews, M., 2005.** Responses of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae) to its aggregation pheromones as influenced by trap design, trap height and habitat. *Environmental Entomology*, 34: 1549-1557.
- Edoh Adabe, K. & Ngo-Samnick, E.L., 2014.** *Production et transformation du cacao*. Ingénieurs Sans Frontières Cameroun & Centre technique de coopération agricole et rurale (Eds), 6700 AJ Wageningen, Pays-Bas, 44p.
- Efombagn, M.I.B., Bieysse, D., Nyassé, S. & Eskes, A.B., 2011.** Selection for resistance to Phytophthora pod rot of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in Cameroon: Repeatability and reliability of screening tests and field observations. *Crop protection*, 30(2): 105-110.
- Efombagn, M.I.B., Sounigo, O., Nyassé, S., Manzanares-Dauleux, M. & Eskes, A.B., 2009.** Phenotypic variation of cacao (*Theobroma cacao* L.) on farms and in the gene bank in Cameroon. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1 (6): 258-264.
- Efron, Y., Marfu, J., Faure, M. & Epaina, P., 2002.** Screening of segregating cocoa genotypes for resistance to vascular-streak dieback under natural conditions in Papua New Guinea. *Australasian Plant Pathology*, 31(4): 315-9.
- Eilenberg, J., Hajek, A. & Lomer, C., 2001.** Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*, 46: 387-400.
- Ekesi, S., Maniania, N.K. & Ampong-Nyarko, K., 1999.** Effect of temperature on germination, radial growth and virulence of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on *Megalurothrips sjostedti*. *Biocontrol Science & Technology*, 9: 177-185.
- Entwistle, P.F., 1972.** *Pests of Cocoa*. Longman Group Limited (Eds), London: 779p.
- Eskes, B.A. & Lanaud, C., 1997.** Le cacaoyer. In : *L'amélioration des plantes tropicales*. Charie, A., Jacquenot, M., Manon, S. & Nicolas, P. (Eds), Publication CIRAD/ORSTOM, Paris: 141-170.
- FAO, 2004.** Evaluation des données d'essais de terrain sur l'efficacité et la sélectivité des insecticides sur les criquets et sautereaux : *Rapport de la FAO du groupe consultatif sur les pesticides, neuvième réunion, Rome* : 35p.

- Fargues, J. & Luz, C., 1998.** Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on sporulation of *Beauveria bassiana* on cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Biocontrol Science & Technology*, 8: 323–334
- Faria, M., Hajek, A.E. & Wraight, S.P., 2009.** Imbibitional damage in conidia of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, *Metarhizium acridum*, and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 51: 346-354.
- Feng, M.G., Chen, B. & Ying, S.H., 2004.** Trials of *Beauveria bassiana*, *Paecilomyces fumosoroseus* and imidacloprid for management of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) on greenhouse grown lettuce. *Biocontrol Science & Technology*, 14: 531–544.
- Flood, J., 2014.** Vascular streak die-back. In: *Technical Guidelines for the Safe Movement of Cacao Germplasm*. Ed. M.J., Daymond, A. J. & Hadley, P. (Eds), Bioversity International, Montpellier, France: 35-36.
- Flood, J. & Murphy, R., 2004.** Cocoa Futures: A source book of some important issues facing the cocoa industry. *Cabi-federacafe, USDA, Chinchina, Colombia*: 163p.
- Flores-Villegas, L.A., Cabrera-Bravo, M., Toriello, C., Bucio-Torres, M.I., Salazar-Schettino, P. & Córdoba-Aguilar, A., 2016.** Survival and immune response of the Chagas vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) against two entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*. *Parasite Vectors*, 9 (176): 1-11.
- Forlani, L., Pedrini, N. & Juárez, M.P., 2011.** Contribution of the horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* to the overall performance of a fungal powder formulation against *Triatoma infestans*. *Research and Reports in Tropical Medicine*, 2: 135-140.
- Furlong, M.J. & Pell, J.K., 1997.** The influence of environmental factors on the persistence of *Zoophthora radicans* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69: 223-233.
- Gatarayih, M.C., Laing, M.D. & Miller, R.M., 2010.** Effects of adjuvant and conidial concentration on the efficacy of *Beauveria bassiana* for the control of the two spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Experimental & Applied Acarology*, 50: 217-229.
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W.W., Emmerson, M., Morales, M.B., Ceryngier, P., Liirah, J., Tschardtke, T., Winqvist, C., Eggers, S. Bommarco, R., Pärt, T., Bretagnolle, V., Plantegenest, M., Clement, L.W., Dennis, C., Palmer, C., Onate, J.J., Guerrero, I., Hawro, V., Aavik, T., Thies, C., Flohre, A., Hänke, S., Fischer, C., Goedhart, P.W. & Inchausti, P., 2010.** Persistent negative effects of

- pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology*, 11: 97-105.
- Giurfa, M., Nunez, J., Chittka, L. & Menzel, R., 1995.** Colour preferences of flower-naive honeybees. *Journal of Comparative Physiology*, 177: 247-259.
- Goettel, M.S. & Inglis, G.D., 1997.** Fungi : Hyphomycetes. In: *Manual of technique in insect pathology*. Lacey, L.A. (Eds), Academic press, London: 213-249.
- Goettel, M.S., Inglis, G.D. & Wraight, S.P., 2000.** Fungi. In: *Field manual technique in invertebrate pathology*. Lacey, L.A. & Kaya, H.K. (Eds), Kluwer Academic Publisher, Netherlands: 255-282.
- Guest, D. & Keane, P., 2007.** Vascular-streak dieback: a new encounter disease of cacao in Papua New Guinea and Southeast Asia caused by the obligate Basidiomycete *Oncobasidium theobromae*. *Phytopathology*, 97 (12): 1654-1657.
- Goettel M.S., St Leger R.J., Rizzo N.W., Staples R.C & Roberts D.W., 1989.** Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. *J. General. Microbiol.* **135** :2233-2239.
- Hajek, A.E., Papierok, B. & Eilenberg, J., 2012.** Methods for study of the Entomophthorales. In: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Lacey, L.A. (Eds), Academic press, London: 285-316.
- Hall, R.A. & Burges, H.D., 1979.** Control of aphids in glasshouses with the fungus *Verticillium lecanii*. *Annual of Applied Biology*, 93: 235-246.
- Hassan, Al-A. & Mohammed, Al-D., 2004.** Trapping Efficiency of Various Traps for Insects in Cucumber Crop under Greenhouse Conditions in Riyadh, Saudi Arabia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7 (7): 1213-1216.
- Hendrawan, S. & Ibrahim, Y., 2006.** Effects of dust formulations of three entomopathogenic fungal isolates against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice grain. *Journal Biosains*, 17: 1-7.
- Heuskin, S., 2011.** Contribution to the study of semiochemical slow-release formulations as biological control devices. *Thesis, degree of Doctor of Philosophy, Gembloux, Belgium, University of Liege – Gembloux Agro-Bio Tech*: 224p.
- Hinsley, S.R., 2008.** Malvaceae Info. <http://www.malvaceae.info/index.html>. (Consulté le 20 Novembre 2018).

- Hong, T.D., Edginton, S., Ellis, H.R., de Muro, M.A. & Moore, D., 2005.** Saturated salt solutions for humidity control, and the survival of dry powder and oil formulations of *Beauveria bassiana* conidia. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89:136–143.
- Hussein, K.A., Abdel-Rahman, M.A.A., Abdel-Mallek, A.Y., El-Maraghy, S.S. & Joo, J.H., 2010.** Climatic factors interference with the occurrence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in cultivated soil. *African Journal of Biotechnology*, 9: 7674-7682.
- Hsia, I.C.C., Islam, M.T., Ibrahim, Y., Yee How, T. & Omar, D., 2014.** Evaluation of Conidial Viability of Entomopathogenic Fungi as Influenced by Temperature and Additive. *International Journal of Agriculture & Biology*, 16: 146–152.
- ICCO, 2017.** Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics. Volume XLIII No. 1, Cocoa Year 2016/17: 101p.
- ICCO, 2019.** <https://www.icco.org/.../398-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics-november-2018.htm>. (Consulté le 1er Février 2019).
- Idowu, O.L, 1989.** Control of economic insect pests of cacao. In: *Progress in Tree Crop Research*. 2nd ed, CRIN, Ibadan, Nigeria, 2: 89-102.
- Igboekwe, A.D., 1983.** Studies on the damage to young cocoa seedlings by the cocoa psyllid *tyora tessmanni* (Aulmann) (Homoptera: Psyllidae). *Café-Cacao-Thé*, 27: 67-70.
- Inglis, D.G., Enkerli, J. & Goettel, M.S., 2012.** Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. Lacey, L.A. (Eds), Academic press, London: 189-253.
- Inglis, G.D., Goettel, M., Butt, M. & Strasser, H., 2001.** Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: *Fungi as Biocontrol Agents Progress, Problems and Potential*. Butt, J.M. (Eds). CABI Publishing, Oxfordshire, UK: 23-69.
- Inglis, G.D, Goettel, M. & Jonson, D.L., 1993.** Persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, on phyllophanes of crested wheatgrass and alfalfa. *Biological Control*, 3: 258-270.
- Inglis, G.D, Goettel, M. & Jonson, D.L., 1995.** Influence of ultraviolet light protectants on persistence of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Journal of Biological Control*, 5: 581-590.
- IRAD, 2008.** *Deuxième rapport sur l'état des ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture au Cameroun*. Yaoundé, Cameroun: 93p.
- Jackson, D.M. & Bohac, J.R., 2006.** Evaluation of Pheromone Traps for Monitoring Sweetpotato Weevils. *Journal of Agriculture and Urban Entomology*, 23: 141-158.

- Jansson, R.K., Mason, L.J., Heath, R.R., Sorensen, K.A., Hammond, A.M. & Robinson, J.V., 1992.** Pheromone-Trap Monitoring System for Sweetpotato Weevil (Coleoptera: Apionidae) in the Southern United States: Effects of Trap Type and Pheromone Dose. *Journal of Economic Entomology*, 85: 416-423.
- Jenkins, N.E., Hevief, G., langewald, J., Cherry, A.J. & Lomer, C.J., 1998.** Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycoinsecticides. *Biocontrol*, 19: 21-31.
- JITAP, 2006:** *Rapport sur l'impact des accords de l'OMC sur l'economie du Cameroun, négociation et mise en œuvre* : 69p.
- Kadje, A. & Tondje, P.R., 1988.** *Practical guide of the nursery and setting in Field of Young Plants of Cocoa in Cameroon*. CEPER, (Eds), Yaoundé, Cameroon: 61p.
- Kakizaki, M., 2004.** The sex pheromone for mating disruption of the rice leaf bug, *Trigonotylus caelestialium* (Heteroptera: Miridae). *Applied Entomology and Zoology*, 39 (2): 221-228.
- Keane, P.J., 2010.** Lessons from the tropics - plant diversity, unusual and changeable plant pathology, horizontal resistance and the plight of farmers. *Australasian Plant Pathology*, 39 (2) : 192-201.
- Kébé, B.I., 2013.** La maladie du Swollen Shoot du cacaoyer. *Atelier International d'Echanges sur la Maladie du Swollen Shoot*, du 26 au 28 Novembre 2013. [WWW.conseilcafecacao.ci/docs/swollen\\_shoot/Expos\\_KEBE](http://WWW.conseilcafecacao.ci/docs/swollen_shoot/Expos_KEBE): 36p.
- Khashaveh, A., Safaralizadeh, M.H. & Ghosta, Y., 2011.** Pathogenicity of Iranian isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschinkoff) (Ascomycota: Hypocreales) against *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) *Biharean Biologist* 5: 51-55.
- Kollmann, A., Brault, A., Touton, I., Dubroca, J., Chaplain, V. & Mouglin, C., 2003.** Impact of nonylphenol surfactants on fungi following the application of sewage sludge on agricultural soils. *Journal of Environmental Quality*, 32: 1269-1276.
- Kouakou, K., Kébé, B.I., Kouassi, N., Anno, A.P., Aké, S. & Muller, E., 2011.** Impact de la maladie virale du swollen shoot du cacaoyer sur la production de cacao en milieu paysan à Bazré (Côte d'Ivoire). *Journal of Applied Biosciences*, 43: 2947-2957.
- Kouamé, N.N., N'Guessan, K.F., N'Guessan, H.A., N'Guessan, P.W. & Tano, Y., 2014.** Variations saisonnières des populations de mirides du cacaoyer dans la région de l'Indénie-Djuablin en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 83:7595-7605.

- Kouamé, N.N., N'Guessan, K.F., N'Guessan, H.A., N'Guessan, P.W. & Tano, Y., 2015.** Variations saisonnières des populations de mirides du cacaoyer dans la région du Haut-Sassandra en Côte d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 25 (1): 3787-3798.
- Kouassi, A.M., 2005.** Comparaison de l'efficacité de cinq insecticides dans la lutte contre le foreur du tronc du cacaoyer *Eulophonotus myrmeleon* (Lepidoptera : Cossidae). *Mémoire de Diplôme d'Agronomie Approfondie (DAA), Défense des Cultures, Université Félix Houphouët Boigny de Cocody, Côte-d'Ivoire* : 50p.
- Krauss, U., Hidalgo, E., Bateman, R., Adonijah, V., Arroyo, C., García, J., Crozier, J., Brown, N.A., Ten Hoopen, G.M. & Holmes, K.A., 2010.** Improving the formulation and timing of application of endophytic biocontrol and chemical agents against frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) in cocoa (*Theobroma cacao*). *Biological control*, 54: 230-240.
- Kreutz, J., Zimmermann, G. & Vaupel, O., 2004.** Horizontal Transmission of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* among the Spruce Bark Beetle, *Ips typographus* (Col., Scolytidae) in the Laboratory and under Field Conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 14: 837-848.
- Kumar, R., 1984.** *Insect pest control*. Edward Arnold, (Eds) LTD, London: 83-96.
- Lachenaud, Ph., Paulin, D., Ducamp, M. & Thevenin, J.M., 2007.** Twenty years of agronomic evaluation of wild cocoa trees (*Theobroma cacao* L.) from French Guiana. *Scientia Horticulturae*, 113 (4): 313-321.
- Larone, D.H., 2002.** *Medically Important Fungi – A Guide to Identification*. Larone, D.H. (Eds), Fourth ed. ASM Press, Washington, D.C.: 274p.
- Lass, R.A., 1985.** *Phytophthora* pod rot (often called "black pod"). In : *Cocoa*. Wood, G.A.R., Lass, R.A. (Eds), Longman, Londres, Royaume-Uni: 267-282.
- Lavabre, E.M., 1970.** *Insectes nuisibles des cultures tropicales*. Lavabre E.M. (Eds), G-P. Maisonneuve et Larose, Paris: 87-141.
- Lavabre, EM, 1977a.** Importance économique des mirides dans la cacaoculture mondiale. In : *Les mirides du cacaoyer*. Lavabre E.M. (Eds), G-P. Maisonneuve et Larose, Paris: 139-153.
- Lavabre, E.M., 1977b.** *Les mirides du cacaoyer*. Lavabre E.M. (Eds), G-P. Maisonneuve et Larose, Paris : 366p.
- Lazzarini, G.M., Rocha, L.F. & Luz, C., 2006.** Impact of moisture on in vitro germination of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* and their activity on *Triatoma infestans*. *Mycological Research*, 110: 485-492.



- Leland, J.E. & Behle, R.W., 2005.** Coating *Beauveria bassiana* with lignin for protection from solar radiation and effects on pathogenicity to *Lygus lineolaris*. *Biocontrol Science & Technology*, 15: 309-320.
- Liu, H., Skinner, M., Parker, B.L. & Brownbridge, M., 2002.** Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteronomycotina: Hyphomycetes), and other Entomopathogenic Fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: miridae). *Journal of Economic Entomology*, 95 (4): 675-681.
- Lodos, 1967.** Studies on *Bathycoelia thalassina* (H.-S.) Hemiptera Pentatomidae, the cause of premature ripening of cocoa pods in Ghana. *Bulletin of Entomological Research*, 57: 289-299.
- Lopes, R.B., Michereff-Filho, M., Tigano, M.S., Neves, P.M.O.J., López, E.L., Fancelle, M. & Silva, J.P.D., 2011.** Virulence and horizontal transmission of selected Brazilian strains of *Beauveria bassiana* against *Cosmopolites sordidus* under laboratory conditions. *Bulletin of Insectology*, 64: 201-208.
- Lotfi Mola, F. & Afkari, R., 2012.** Effects of different vegetable oils formulations on temperature tolerance and storage duration of *Beauveria bassiana* conidia. *African Journal of Microbiology Research*, 6 (22): 4707-4711.
- Luz, C. & Batagin, I., 2005.** Potential of oil-based formulations of *Beauveria bassiana* to control *Triatoma infestans*. *Mycopathology*, 160: 51-62.
- Luz, C. & Fargues, J., 1997.** Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *Beauveria bassiana*, pathogenic to *Rhodnius prolixus*. *Mycopathologia*, 138: 117-125.
- Luz, C. & Fargues, J., 1998.** Factors affecting conidial production of *Beauveria bassiana* from fungus killed cadavers of *Rhodnius prolixus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 72: 56-63.
- Mahdneshin, Z., Safaralizadah, H.M. & Ghosta, Y., 2009.** Study on the efficacy of Iranian isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin against *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Biological Sciences*, 9: 170-174.
- Mahob, R.J., 2013.** Pesticides de la filière cacao et essais de lutte intégrée contre *Sahlbergella singularis* haglund 1895 (Hemiptera : Miridae); principal bio-agresseur du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) au Cameroun. *Thèse de doctorat PhD, Université de Yaoundé1, Cameroun* : 178p.

- Mahob, R.J., Babin, R., Ten Hoopen, G.M., Dibog, L., Yédé, Hall, D.R. & Bilong Bilong, C.F., 2011.** Field evaluation of synthetic sex pheromone traps for the cocoa mirid *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae). *Pest Management Sciences*, 67: 672-676.
- Mahob, R.J., Baleba, L., Yede, Dibog, L., Cilas, C., Bilong Bilong, C.F. & Babin, R., 2015.** Spatial distribution of *Sahlbergella Singularis* HAGL. (Hemiptera: Miridae) populations and their damage in unshaded young cacao-based agroforestry systems. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 5: 121-131.
- Mahob, R.J., Ndoumbè-Nkeng, M., Ten Hoopen, G.M., Dibog, L., Nyassé, S., Rutherford, M., Mbenoun, M., Babin, R., Amang A Mbang, J., Yede & Bilong Bilong, C.F., 2014.** Pesticides use in cocoa sector in Cameroon: characterization of supply source, nature of actives ingredients, fashion and reasons for their utilization. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8: 1976-1989.
- Mahot, H.C., 2006.** Evaluation *in vitro* du pouvoir pathogène de *Beauveria bassiana* Vuillemin, 1912 (Moniliaceae) vis-à-vis de *Sahlbergella singularis* Haglund, 1895 (Hemiptère: Miridae), ravageur du cacaoyer. *Mémoire de DEA, Université de Yaoundé I, Cameroun* : 44p.
- Mahot, H., Babin, R., Dibog, L., Tondje, P.R., Bilong, C., 2006.** Biocontrol of cocoa mirid *Sahlbergella singularis* Hagl. (Hemiptera: Miridae) with *Beauveria bassiana* Vuillemin. First results of activities carried out at IRAD, Cameroon. *INCOPEP 5<sup>th</sup> International seminar on cocoa pests and diseases, San Jose, Costa Rica*: 14.
- Maniania, N.K., Bugeme, D.M., Wekesa, V.W., Delalibera, Jr. I. & Knapp, M., 2008.** Role of entomopathogenic fungi in the control of *Tetranychus evansi* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae), pests of horticultural crops. *Experimental & Applied Acarology*, 46: 259-274.
- Mazzoni, V., Trona, F., Ioriatti, C., Lucchi, A., Eriksson, A., Anfora, G., 2011.** Attractiveness of different colours to *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae) adults. *Integrated Protection & Production in Viticulture*, 67: 281-284.
- Mbondji, P.M., 1984.** Main insects pests of cocoa and coffee trees of Cameroon. *Biometric and pest management*. CEPER, (Eds), Yaoundé, Cameroon: 94p.
- Mbondji, P.M., 2010.** *Le cacaoyer au Cameroun*. Presses de l'Université Catholique d'Afrique Centrale : 254 p.
- Mboussi, S.B., Ambang, Z., Kakam, S. & Beilhe, L.B., 2018.** Control of cocoa mirids using aqueous extracts of *Thevetia peruviana* and *Azadirachta indica*. *Cogent Food & Agriculture*, 1430470 1-13. <https://doi.org/10.1080/23311932.2018.1430470>.

- McClatchie, G.V., Moore, D., Bateman, R.P. & Prior, C., 1994.** Effects of temperature on the viability of the conidia of *Metarhizium flavoviride* in oil formulations. *Mycological Research*, 98: 749-756.
- McCoy, C., 1990.** Entomogenous fungi as microbial pesticides. In: *New direction in biological control*. Baker RR, Dunn P.E., Liss (Eds), New York, USA, 139-159.
- McCoy, C., Quintela, E.D. & De-Fria, M., 2003.** Environmental persistence of entomopathogenic fungi. In: *Factors affecting the survival of entomopathogens*. Baur ME, & Fuxa, J.R. (Eds), Southern Cooperative Series Bulletin 400, Louisiana, State University Agricultural Center.
- Membang, G., 2013.** Pathogenicité des champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus*. *Mémoire de Master, Département de Biologie et Physiologie Végétale, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, Cameroun* : 63 p.
- Miller, J.R., Gut, L.J., De Lame, F.M. & Stelinski, L.L., 2006.** Differentiation of competitive vs. non-competitive mechanism mediating disruption of moth sexual communication by point sources of sex pheromone (Part 1): Theory. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 2089-2114.
- Mishra, S., Kumar, P. & Malik, A., 2013.** Evaluation of *Beauveria Bassiana* Spore Compatibility with Surfactants. *International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 7 (1): 7-11.
- Mohammadbeigi, A., 2012.** Efficacy of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae) and *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae). *Thesis, degree of Doctor of Philosophy, Newcastle University*: 104p.
- Mohammadbeigi, A. & Port, G., 2013.** Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae) via contact and ingestion. *International Journal of Agriculture & Crop Sciences*, 5 (2): 138-146.
- Moore, D., Bateman, R.P., Carey, M. & Prior, C., 1995.** Long-term Storage of *Metarhizium flavoviride* Conidia in Oil Formulations for the Control of Locusts and Grasshoppers. *Biocontrol Science & Technology*, 5: 193-200.
- Moore, D. & Prior, C., 1993.** The potential of mycoinsecticides. *Biocontrol News Information*, 14: 31-40.

- Mora, M.A.E., Castilho, A.M.C. & Fraga, M.E., 2017.** Classification and infection mechanism of entomopathogenic fungi. *Agricultural Microbiology / Review Article*, 84: 1-10.
- Morand, C., 2013.** Les polyphénols du thé et du cacao ont-ils des effets santé ? *Phytothérapie*, 11: 92-99. DOI 10.1007/s10298-013-0770-1.
- Mossu, G., 1990.** *Le cacaoyer*. Eds G-P Maisonneuve et Larose, Paris: 9-15 & 140-145.
- Mouatcho, J.C., 2010.** The use of entomopathogenic fungi against *Anopheles funestus* Giles (Diptera: Culicidae). *Thesis, degree of Doctor of Philosophy, University of the Witwatersrand, Johannesburg* : 162p.
- Mumford, J.D., 1986.** Control of the cocoa pod borer (*Acrocercops cramerella*): a critical review. In: *Cocoa and coconuts: progress and outlook*. Pushparajah, E. & Chew, P.S. (Eds.), Incorporated Society of Planters, Kuala Lumpur, Malaysia: 277-286.
- Musabyimana, T., Saxena, R.C., Kairu, E.W., Ogot, C.P.K.O. & Khan, Z.R., 2001.** Effects of Neem Seed Derivatives on Behavioral and Physiological Responses of the *Cosmopolites sordidus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economical Entomology*, 92 (2): 449-454.
- Ndombè-Nkeng, M., Cilas C., Nyemb, E., Nyassé, S., Bieysse, D., Flori, A. & Sache, I., 2004.** Impact of removing diseased pods on cocoa black pod caused by *Phytophthora megakarya* and on cocoa production in Cameroon. *Crop Protection*, 23: 415-424.
- Ndombè-Nkeng, M. & Sache, I., 2003.** Lutte contre la pourriture brune des cabosses du cacaoyer au Cameroun. N° 562 de Phytoma : La Défense des Végétaux (Eds) Carrousel: 10-12.
- Ngakou, A., Tamo M., Parh, I.A., Nwaga, D., Ntonifor, N.N., Korie, S. & Nebane, C.L.N., 2008.** Management of cowpea flower thrips, *Megalurothrips sjostedti* (Thysanoptera, Thripidae), in Cameroon. *Crop Protection* 27: 481-488
- N'guessan, K.F., 2013.** Acquis des projets antérieurs de lutte contre le Swollen shoot en Côte d'Ivoire. *Atelier International d'Echanges sur la Maladie du Swollen Shoot* du 26 au 28 Novembre 2013. [www.conseilcafecacao.ci/docs/swollen\\_shoot/Expos\\_N'GUESSAN](http://www.conseilcafecacao.ci/docs/swollen_shoot/Expos_N'GUESSAN): 46p.
- N'Guessan K.F. & Coulibaly N., 2000.** Dynamique des populations de mirides et de quelques autres prédateurs du cacaoyer dans la région Ouest de la Côte d'Ivoire. *Actes de la 13ème Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère, Kota Kinabalu, Malaisie*: 425-429.

- N'Guessan, K.F., Kébé, I.B. & Adiko, A., 2010a.** Seasonal variations of the population of *Eulophonotus myrmeleon* Felder (Lepidoptera: Cossidae) in the Sud-Bandama region of Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 35: 2251-2259.
- N'Guessan, K.F., Lachenaud, Ph. & Eskes, 2010b.** Antixenosis as a mechanism of cocoa resistance to cocoa mirid, *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Applied Biosciences*, 36: 2332-2339.
- N'Guessan, K.F., N'Goran, J.A.K. & Eskes, A.B. 2008.** Resistance of cocoa (*Theobroma cacao* L.) to *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae): investigation of antixenosis, antibiosis and tolerance. *International Journal of Tropical Insect Science*, 28(4): 201-210.
- N'Guessan, A.H., N'Guessan, K.F., Kouassi, K.P., Kouamé, N.N. & N'Guessan, P.W., 2014.** Dynamique des populations du foreur des tiges du cacaoyer, *Eulophonotus myrmeleon* Felder (Lépidoptère : Cossidae) dans la région du Haut-Sassandra en Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, 83 : 7606- 7614.
- Nguyen-Ban, J., 1977.** La lutte chimique contre les mirides du cacaoyer. In : *Les mirides du cacaoyer*. Lavabre E.M. (Eds), G-P. Maisonneuve et Larose, Paris : 257-278.
- Nwaga, D., 1988.** Interet du polymorphisme proteique et enzymatique pour la caracterisation des pythiacees (*Phytophthora* et *Phythium*) et de leur interaction avec le tabac et le haricot. *Thèse en Science de la vie et de l'environnement et Ecole Nationale SupAgro de Rennes, Cameroun* : 142p.
- Nwaga, D., Jansa, J., Abossolo Angue, M. & Frossard, E., 2010.** The Potential of Soil Beneficial Micro-Organisms for Slash-and-Burn Agriculture in the Humid Forest Zone of Sub-Saharan Africa. In : *Soil Biology and Agriculture in the Tropic*. Dion P. (Eds), Springer Heidelberg Dordrecht London New York: 81-107.
- Nyassé, S., Grivet, L., Risterucci, A.M., Blaha, G., Berry, D., Lanaud, C. & Despréaux, D., 1999.** Diversity of *Phytophthora megakarya* in Central and West Africa revealed by isozyme and RAPD markers. *Mycological Research*, 103: 1225-1234.
- Ojelade, K.T.M., Anikwe, J.C. & Idowu, O.L., 2005.** Comparative Evaluation of miricidal efficacy of some insecticides for the control of the brown cocoa mirid *Sahlbergella singularis* in Nigeria. *Journal of Applied Tropical Agriculture*, 10: 46-53.
- Okelana, F.A., 1989.** Observations on insect pests'infestation in rehabilitated plots. *CRIN Annual Report*, Ibadan, Nigeria: 27-28.
- Oliveira, D.G.P., Pauli, G. Mascarin, G. M. & Delalibera, I., 2015.** A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana*

and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. *Journal of Microbiological Methods*, 119 : 44-52.

- Olivry, J.C., 1986.** *Monographies hydrologiques: Fleuves et Rivières du Cameroun.* MESRES-ORSTOM, Collection “Monographies Hydrologiques” ORSTOM N°9 : 733p.
- ONCC, 2007.** Mesures prises par les gouvernements pour parvenir à une économie cacaoyère plus durable : cas du Cameroun. *Rapport de la commission consultative sur l'économie cacaoyère mondiale*, Accra, Ghana: 8p.
- ONCC, 2018.** Bilan de la campagne cacaoyère 2017-2018.  
<http://www.oncc.cm/index.php/fr/2016-05-11-22-15-56/campagne-cacaoyere-2017-2018-bilan>. (Consulté le 1<sup>er</sup> Février 2019).
- Otgonjargal, K.h., Purevjargal, G., Enkhbold, N. & Battur, B., 2015.** Optimum and Tolerance pH Range, Optimal Temperature of the Local Strain *Beauveria bassiana-G07*. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, 4: 578-580.
- Owusu-Manu, 1976.** Estimation of cocoa pod losses caused by *Bathycoelia thalassina* (Hemiptera: Pentatomidae). *Ghana journal of Agricultural Science*, 9: 81-83.
- Padi, B. & Adu-Acheampong, R., 2000.** Preliminary measure for the control of the cocoa stem borer *Eulophonotus myrmeleon* Felder (Lepidoptera : Cossidae). In: *Proceedings of the 13th International Cocoa Research Conference, Vol. 1, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia*: 649-657.
- Padi, B., Hall, D., Farman, D., Downham, M., Lowor, S. & Sarfo, J.E., 2000.** Evidence of sex attractants in the cocoa mirids *Distantiella theobroma* (Dist.) and *Sahlbergella singularis* Hagl. (Heteroptera: Miridae) in field-trapping experiments. In: *Proceedings of the 13th International Cocoa Research Conference, Vol. 1, Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia*: 395-400.
- Padi, B., Oduor, G. & Hall, D.R., 2002.** Development of mycoinsecticides and pheromones for cocoa mirids in Ghana. *Final Technical Report, 1<sup>st</sup> October, 1998- 31<sup>st</sup> March 2002*: 45p.
- Padi, B., Owusu, G.K. & Kumah, N.K., 1996.** A record of *Desplatsia dewevrei* (De Wild & Th. Dur.) (Tiliales: Tiliaceae) as an alternative and potential breeding host plant for the cocoa mirid *Sahlbergella singularis* Hagl. *Actes de la 12ème Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère, San Salvador, Brésil*: 31-37.

- Padi, B. & Sarfo, J.E., 2002.** Capsid Thrust: Integrated pest management in the Ghana Cocoa Industry. *Annual Report of Cocoa Research Institute of Ghana, 1999/2000*: 70-74.
- Padin, S., Beelo, D.G. & Fabrizio, M., 2002.** Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and bean treated with *Beauveria bassiana*. *Journal of Stored Products Research*, 38: 66-74.
- Parker, B.L., Skinner, M., Costa, S.D., Gouli, S., Reid, W. & Bouhssini, M., 2003.** Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae): collection and characterization for development. *Biological Control*, 27: 260-272.
- Phillips-Mora, W, Castillo, J, Arciniegas, A, Mata, A, Sánchez, A, Leandro, M, Astorga, C, Motamayor, J, Guyton, B, Seguíne, E. & Schnell, R., 2010.** Overcoming the main limiting factors of cacao production in Central America through the use of improved clones developed at CATIE. In: *Proceedings of the 16th International Cocoa Research Conference, Bali, Indonesia*: 93-99.
- Phillips-Mora, W. & Wilkinson, M.J., 2007.** Frosty pod of cacao: A disease with a limited geographic range but unlimited potential for damage. *Phytopathology*, 97 : 1644-1647.
- Piart, J., 1977.** Plantes hôtes et préférences alimentaires chez les Mirides du cacaoyer. In : *Les mirides du cacaoyer*. Lavabre, E.M. (Eds), G-P. Maisonneuve et Larose, Paris: 213-221.
- Pipitone, L., 2018.** Cocoa Boom & Bust: A Review of Cocoa Market Developments. In: *10th Multi-year expert meeting on commodities and development*: 16p.
- Pohe, J., Koula, J., Rabe, G.R. & Dezali, L.R., 2013.** Agressivité de la pourriture brune des cabosses de cacaoyer dans le sud-est de la Côte d'Ivoire. *Journal of Animal & Plant sciences*, 20: 3126-3136.
- Poprawski, T.J. & Wraight, S.P., 2000.** Application and evaluation of entomopathogens in vegetable row crops: potato. In: *Field manual of techniques in invertebrate pathology*. Lacey, L.A, & Kaya, H.K. (Eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Pays-Bas: 371-388.
- Prior, C.P. & Jollands, G., 1988.** Infectivity of oil and water formulations of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to the cocoa weevil pest *Pantorhytes plutus* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 52: 66-72.
- Pu, X.Y., Feng, M.G. & Shi, C.H., 2005.** Impact of three application methods on the field efficacy of a *Beauveria bassiana*-based mycoinsecticide against the false-eye

- leafhopper, *Empoasca vitis* (Homoptera: Cicadellidae) in tea canopy. *Crop Protection*, 24: 167-175.
- Püntener, W., 1981.** *Manual for Field Trials in Plant Protection*. 2<sup>nd</sup> ed. Agricultural Division, Ciba-Geigy, Limited, 205p.
- Qazzaz, F.O., Al-Masri, M.I. & Barakat, R.M., 2015.** Effectiveness of *Beauveria bassiana* Native Isolates in the Biological Control of the Mediterranean Fruit Fly (*Ceratitis capitata*). *Advances in Entomology*, 3: 44-55.
- Quesada-Moraga, E., Martin-Carballo, I., Garrido-Jurado, I. & Santiago-Álvarez, C., 2008.** Horizontal transmission of *Metarhizium anisopliae* among laboratory populations of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae). *Biological Control*, 47: 115-124.
- Raguso, R.A. & Willis, M.A., 2005.** Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by wild hawkmoths, *Manduca sexta*. *Animal Behaviour*, 69: 407-418.
- Ranamukhaarachchi, S.L. & Wickramarachchi, K.S., 2007.** Color Preference and Sticky Traps for Field Management of Thrips *Ceratothripoides claratris* (Shumsher) (Thysanoptera: Thripidae) in Tomato in Central Thailand. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9: 392-397.
- Rodrigues, I.M.W., Filho, A.B. Giordano, I.B., Denadae, B.E., Fernandes, J.B. & Forim, M.R., 2017.** Compatibility of polymers to fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* and their formulated products stability. *Acta Scientiarum Agronomy*, 39: 457-464.
- Roy, H.E., Steinkraus, D.C., Eilenberg, J., Hajek, A.E. & Pell, J.K., 2006.** Bizarre interactions and endgames: Entomopathogenic fungi and their arthropod hosts. *Annual Review of Entomology*, 51: 331- 357.
- Ruseani, N.S., 2015.** Interaction of Vascular Streak Dieback Disease of Cocoa with Soil Nutrient Status in Indonesia. *Thesis of Master of Philosophy, Agriculture and Food Sciences, University of Queensland, Australia*: 139p.
- Sabbahi, R., 2008.** Utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* dans une stratégie de gestion phytosanitaire des principaux insectes ravageurs en fraiseraies. *Thèse de Doctorat, Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Canada*: 181p.
- Samways, M.J., 1986.** Spatial distribution of *Scirtothrips aurantii* Fuare (Thysanoptera: Thripidae) and threshold level for one percent. damage on citrus fruit based on trapping with fluorescent yellow sticky traps. *Bulletin of Entomological Research*, 76: 649-659.



- San Aw, K.M. & Mun Hue, S., 2017.** Mode of Infection of *Metarhizium* spp. Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. *Journal of Fungi*, 3: 1-20.
- Sanders, C.J., 1997.** Disruption of male Spruce Budworm orientation to female moths by pheromone and pheromone analogs in a wind-tunnel. *Physiological Entomology*, 20: 71-80
- Santos, R.C., Pires, J.L. & Correa, R.X., 2012.** Morphological characterization of leaf, flower, fruit and seed traits among Brazilian *Theobroma* L. species. *Genetic Resources Crop Evolution*, 59: 327-345.
- Sarfo, J.E., 2013.** Behavioural response of cocoa mirids, *Sahlbergella singularis* Hagl and *Distantiella theobroma* Dist. (Heteroptera: Miridae) to sex pheromones. *Thesis, degree of Doctor of Philosophy, University of Greenwich*: 283p.
- Sarfo, J.E., Padi, B., Hall, D.H., Downham, M.C. & Ackonor, J.B., 2007.** Effects of cocoa mirid pheromone trap positioning and density on trap catches. In: *Proceedings of 15th International Cocoa Research Conference*, San Jose, Costa Rica: 1635-1644.
- Saripah, B. & Azhar, I., 2007.** Implementation of cocoa pod slewing in controlling cocoa pod borer infestation. In: *proceeding 2007 conference on plant plantation commodities, Kuala Lumpur, Malaysia*: 221-227.
- Shah, P.A. & Pell, J.K., 2003.** Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 61: 413-423.
- Silva, C.R.S., Venturieri, G.A. & Figureueira, A., 2004.** Description of Amazonian *Theobroma* L. collections, species identification, and characterization of interspecific hybrids. *Acta Botanica Brasilica*, 18 (2): 333-341.
- Smith, R.F., Pierce, H.D. & Borden, J.H., 1991.** Sex pheromone of the mullein bug, *Campylomma verbasci* (Meyer). *Journal of Chemical Ecology*, 17: 1437-1447.
- Sonwa, D.J., Coulibaly, O., Akinwumi Adesina, A., Weise, S.F. & Tchatat, M., 2002.** Integrated pest management in cocoa agroforests in southern Cameroon: Constraints and overview. *Integrated Pest Management Reviews*, 7: 191-199.
- Sonwa, D.J., Coulibaly, O., Weise, S.F., Akinwumi Adesina, A. & Janssens, M.J.J., 2008.** Management of cocoa: Constraints during acquisition and application of pesticides in the humid forest zones of southern Cameroon. *Crop Protection*, 27: 1159-1164.
- Sonwa, D.J., Weise, S., Adesina, A., Nkongmeneck, A.B., Tchatat, M. & Ndoye, O., 2005.** Production constraints on cocoa agroforestry systems in West and Central Africa:

- The need for integrated pest management and multi-institutional approaches. *The Forestry Chronicle*, 81: 345-349.
- Sounigo, O., Coulibaly, N., Brun, L., N’Goran, J., Cilas, C. & Eskes, A.B., 2003.** Evaluation of resistance of *Theobroma cacao* L. to mirids in Côte d’Ivoire: results of comparative progeny trials. *Crop Protection*, 22 : 615-621.
- Soupi Nkeutcha, M.S., 2013.** Implication des arabinogalactanes protéines dans le développement des embryons chez *Theobroma cacao* L. *Thèse de Doctorat, Université de Yaoundé I, Cameroun* : 166P.
- Suckling, D.M., Walker, J.T.S., Shaw, P.W., Manning, L., Lo, P., Wallis, R., Bell, V., Sandanayaka, V.R.M., Hall, D.R., Cross, J.V. & El-Sayeed, A.M., 2007.** Trapping *Dasinuera mali* (Diptera: Cecidomyiidae) in apples. *Journal of Economic Entomology*, 100: 745-751.
- Sugiyama, M., Shimoji, Y. & Kohama, T., 1996.** Effectiveness of a newly designed sex pheromone trap for the sweetpotato weevil, *Cylas formicarius* (Fabricius) (Coleoptera: Brentidae). *Applied Entomology & Zoology*, 31: 547-550.
- Stathers, T.E., Moore, D. & Prior, C., 1993.** The effect of different temperatures on the viability of *Metarhizium flavoviride* conidia stored in vegetable and mineral oils. *Journal of Invertebrate Pathology*, 62: 111-115.
- Sriram, S. & Savitha, M.J., 2011.** Enumeration of colony forming units of *Trichoderma* in formulations-precautions to be taken to avoid errors during serial dilution. *Journal of Biological Control*, 25: 64-67.
- Steinhaus, E.A., 1963.** *Insect Pathology an Advanced Treatise*. Steinhaus, E.A. (Eds) Academic Press, London: 689p.
- Svedese, V.M., Lima, E.A.L.A. & Porto, A.L.F., 2013.** Horizontal Transmission and Effect of the Temperature in Pathogenicity of *Beauveria bassiana* Against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 56: 413-419.
- Swanson, J.D., Carlson, J.E. & Gultinan, M.J., 2008.** Comparative flower development in *Theobroma cacao* based on temporal morphological indicators. *International Journal of Plant Sciences*, 169: 1187-1199.
- Tanada, Y. & Kaya, H.K., 1993.** *Insect Pathology*. Vega, F.E. & Kaya, H.K. (Eds), Academic Press, New York 101-128.

- Tanuja, K., Hemalatha, K., Karuna, R. & Sashidhar, Rao, B., 2010.** Effect of various surfactants (cationic, anionic and non-ionic) on the growth of *Aspergillus parasiticus* (NRRL 2999) in relation to aflatoxin production. *Mycotoxin Research*, 26: 155-170.
- Tchoumakov, A.E. & Zaharova, I.I., 1990.** Influence and statistics of the development of the diseases In: Damage caused by the diseases with the agricultural cultures. Tchoumakov, A.E. & Zaharova, I.I. (Eds), Agropromes, Moscow.
- Thongjua, T., Thongjua, J., Sriwareen, J. & Khumpairun, J., 2015.** Attraction Effect of Thrips (Thysanoptera : Thripidae) to Sticky Trap Color on Orchid Greenhouse Condition. *Journal Agricultural Technology*, 11: 2451-2455.
- Tijani, A.A., 2006.** Pesticides use practices and safety issues: the case of cocoa farmers in Ondo State, Nigeria. *Journal of Human Ecology*, 19: 183-190.
- Toledo, J., Campos, S.E., Flores, S, Liedo, P, Barrera, J, Villasenor, A. & Montoya, P., 2007.** Horizontal Transmission of *Beauveria bassiana* in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Under Laboratory and Field Cage Conditions. *Journal of Economic Entomology*, 100 : 291-297.
- Tondje, P.R., Roberts, D.P., Bon, M.C., Widmer, T., Samuels, G.J., Ismaiel, A., Begoude, A.D., Tchana, T., Nyemb-Tshomb, E., Ndoumbe-Nkeng, M., Batoman, R., Fontem, D. & Hebbar, K.P., 2007.** Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of back pod disease of cocoa in Cameroon. *Biological Control*, 43: 202-212.
- Tong-Kwee, L., Muhamad, R., Gait Fee, C. & Chew Lan, C., 1989.** Studies on *Beauveria bassiana* isolated from the cocoa mirid, *Helopeltis theobromae*. *Crop Protection*, 8: 358-362.
- Ugine, T.A., Wraight, S.P., Brownbridge, M. & Sanderson, J.P., 2005.** Development of a novel bioassay for estimation of median lethal concentrations (LC50) and doses (LD50) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, against western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 89 : 210-218.
- Ummidi, R.V.S. & Vadlamani, P., 2014.** Preparation and use of oil formulations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Spodoptera litura* larvae. *African Journal of Microbiology Research*, 8 (15): 1638-1644.
- Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F. & Rehner, S.A., 2008.** Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*, 46 : 72–82.

- Ventura, M.U. & Panizzi, A.R., 2004.** Responses of *Neomegalotomus parvus* (Hemiptera: Alydidae) to Color and Male-Lured Traps. *Brazilian Archives of Biology Technology*, 47 : 531-535.
- Vidal, C., Fargues, J. & Lacey, L.A., 1997.** Intraspecific variability of *Paecilomyces fumosoroseus*: Effect of temperature on vegetative growth. *Journal of Invertebrate Pathology*, 70 : 18-26.
- Visalakshy, P.N.G., Krishnamoorthy, A. & Kumar, A.M., 2006.** Compatibility of plant oils and additives with *Paecilomyces farinosus*, a potential entomopathogenic fungus. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 4 : 333-335.
- Wang, J. & Zheng, C., 2012.** Characterization of a newly discovered *Beauveria bassiana* isolate to *Frankliniella occidentalis* Perganda, a non-native invasive species in China. *Microbiological Research* 167 : 116-120.
- Weill, A. & Duval, J., 2009.** Produits phytosanitaires, lutte biologique et pulvérisation. In : *Guide de gestion globale de la ferme maraîchère biologique et diversifiée*. Weill, A. & Duval, J. (Eds), Equiterre Masson, Montréal, Québec, Canada : 313-326.
- Wenzel, R.I.M., Forim, M.R., Da Silva, M.F.G.F., Fernandes, J.B. & Batista Filho, A., 2016.** Effect of Ultraviolet Radiation on Fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, Pure and Encapsulated, and Bio-Insecticide Action on *Diatraea saccharalis*. *Advances in Entomology*, 4 : 151-162.
- Wheeler, A.G., 2001.** *Biology of Plant Bugs (Hemiptera: Miridae): Pests, Predators, Opportunists*. Comstock Publishing Associates, (Eds), Cornell University Press, New York: 507p.
- Whitlock, B.A., Bayer, C. & Baum, D., 2001.** Phylogenetic relationships and floral evolution of the Bettnerioideae ("Sterculiaceae" or Malvaceae S.1) based on sequences of the chloroplast gene *ndhF*. *Systematic Botany*, 26 : 420-437.
- Williams, G., 1953.** Field observations on the cacao mirids, *Sahlbergella singularis* Hagl. and *Distantiella theobroma* (Dist.), in the Gold Coast. Part II. Geographical and habitat distribution. *Bulletin of Entomological Research*, 44 : 427-437.
- Woertz, J.R. & Kinney, K.A., 2004.** Influence of sodium dodecyl sulfate and Tween 20 on fungal growth and toluene degradation in a vapor-phase bioreactor. *Journal Environmental Engineering*, 130 : 292-299.
- Wraight, S.P., Carruthers, R.I., Jaronski, S.T., Bradley, C.A., Garza, C.J. & Galaini-Wraight, S., 2000.** Evaluation of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and

- Paecilomyces fumosoroseus* for microbial control of the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control*, 17 : 203-217.
- Wright, J.E. & Chandler, L.D., 1992.** Developpement of a bioreactional mycoinsecticide: *Beauveria bassiana* and conidial formulation and its application against boll weevil populations (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Economic Entomology*, 85 : 1130-1135.
- Yang, M., Zhang, J.T., Zong, S.X & Luo, Y.Q., 2012.** Synthesis and field evaluation of sex attractants of *Holcocerus vicarius* (Lepidoptera: Cossidae). *Scientia Silvae Sinicae*, 48: 61-66.
- Yédé, 2016.** Diversité des peuplements des hémiptères dans les cacaoyères de la région du Centre Cameroun : impact économique et essai de lutte biologique. *Thèse de Doctorat Ph.D, Université de Yaoundé I, Yaoundé, Cameroun* : 175p.
- Yédé, Babin, R., Djieto-Lordon, C., Cilas, C., Dibog, L., Mahob, R. & Bilong Bilong, C.F., 2012.** True Bug (Heteroptera) Impact on Cocoa Fruit Mortality and Productivity. *Journal of Economic Entomology*, 105: 1285-1292.
- Youdeowei, A., 1973.** The life cycles of the cocoa Mirids *Sahlbergella singularis* Hagl. And *Distantiella theobroma* Dist. in Nigeria. *Journal of Natural History*, 7: 217-223.
- Zar, H.J., 1996.** *Biostatistical Analysis*. 3<sup>rd</sup> ed, Prentice Hall, NJ USA: 662p.
- Zhang, A., Kuang, L.F., Maisin, N., Karumuru, B., Hall, D.R, Virdiana, I., Lambert, S., Purung, H.B., Wang, S. & Hebbar, P., 2008.** Activity evaluation of cocoa pod borer sex pheromone in cacao fields. *Environmental Entomology*, 37 (3): 719-724.
- Zhang, C.F., Meng, X.Z., Han, Y. & Sheng, C.F., 2002.** Chinese tortix *Cydia trasi* (Lepidoptera: Olethreutidae); suppression on street-planting trees by mass trapping with sex pheromone traps. *Environmental Entomology*, 31: 602-607.
- Ziani, J., 2008.** Application de *Beauveria bassiana* contre la punaise terne *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hémiptères: Miridés) dans les vignobles. *Mémoire de Maîtrise Département de Biologie, Université du Québec, Canada* : 88 p.



**ANNEXES**

**Annexe 1 : Essai du test de pathogénicité**



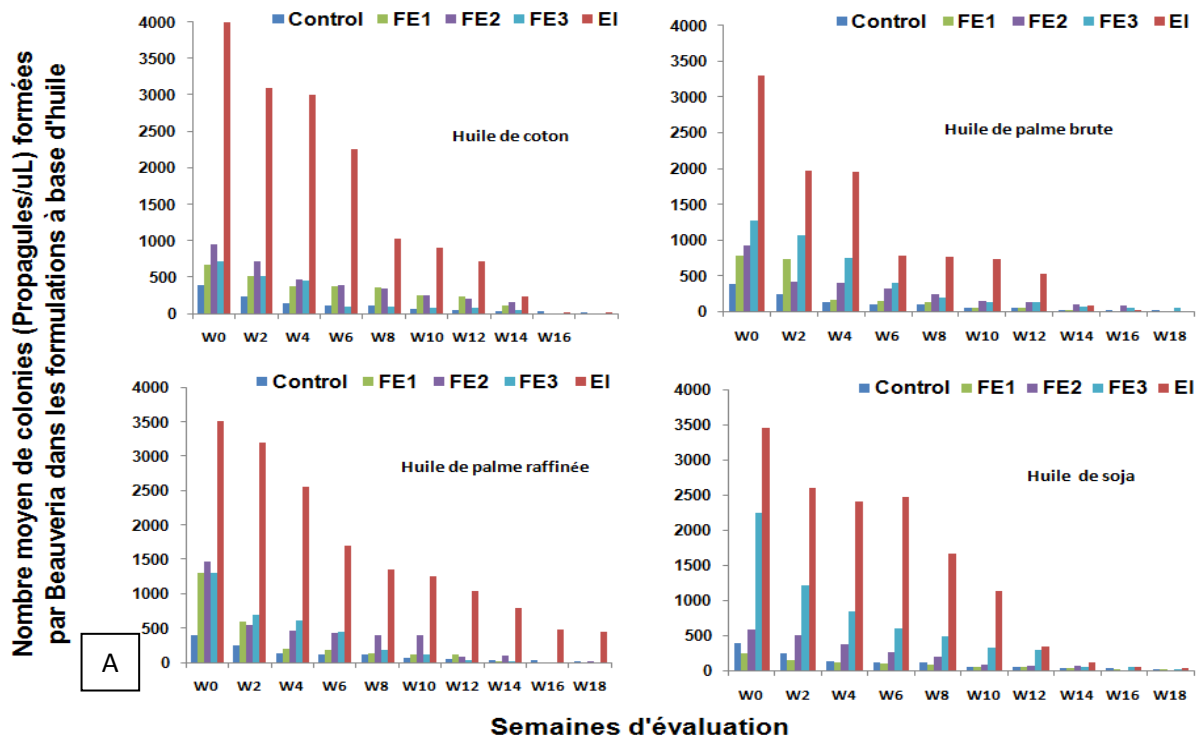
**Annexe 2 : Préparation des formulations sous la hotte à flux laminaire**



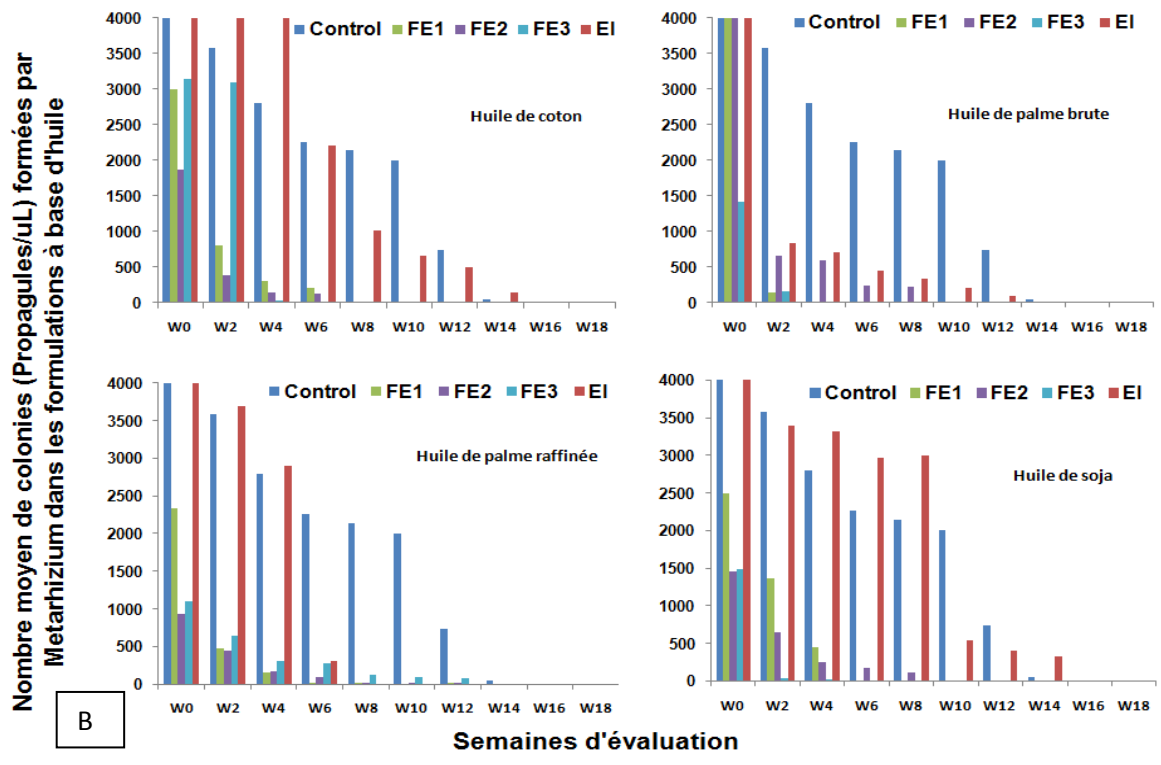
**Annexe 3 : Procédure de filtration des milieux contenant les spores et le mycélium fongique**



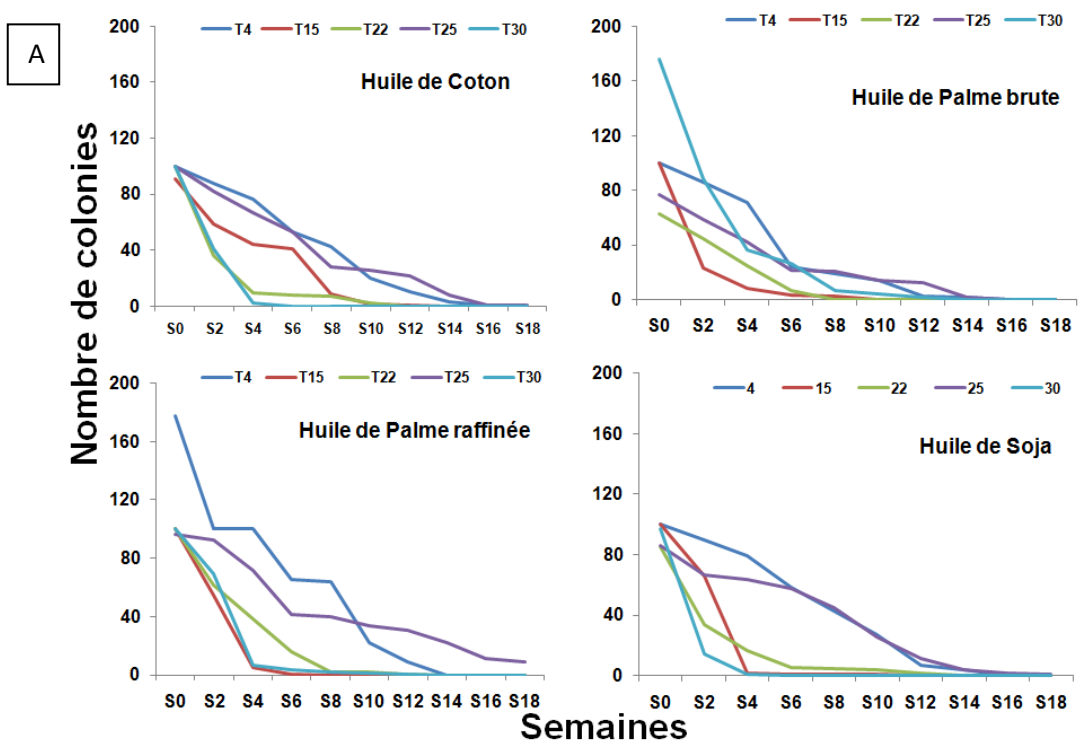
**Annexe 4 :** Effet des différentes formulations sur la viabilité des conidies de *B. bassiana* (A) et de *M. anisopliae* (B) toutes les deux semaines et pendant 18 semaines.

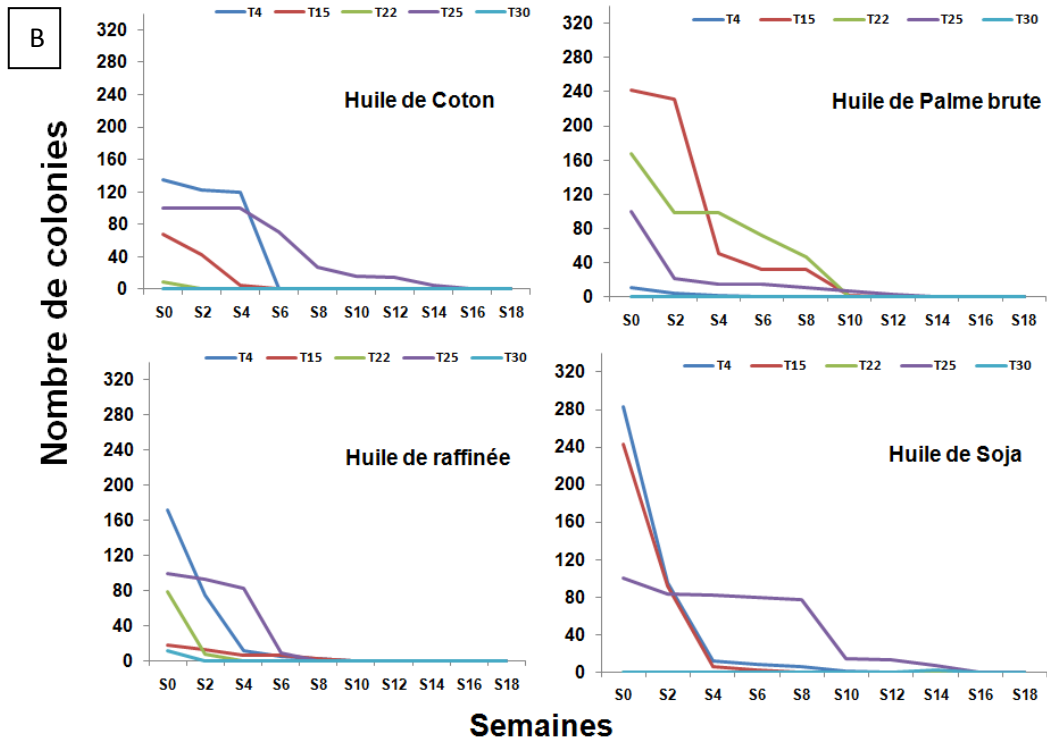




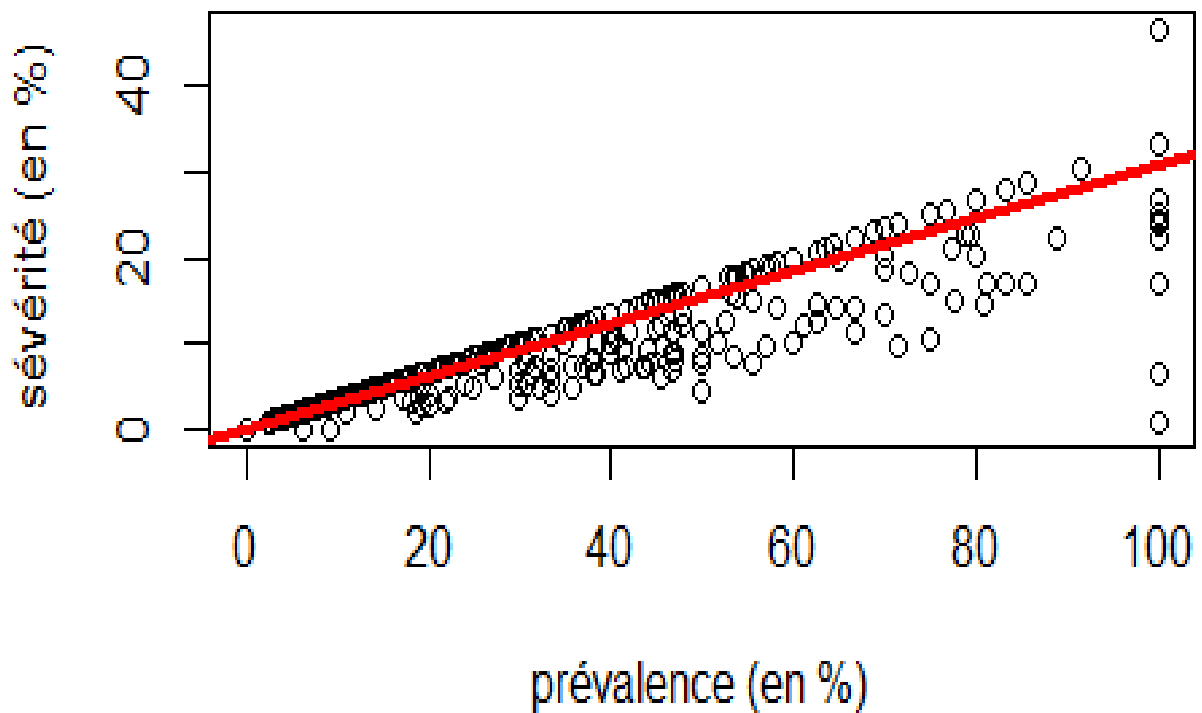


**Annexe 5 :** Effet de la température sur la viabilité des conidies de *B. bassiana* (A) et de *M. anisopliae* (B) formulées dans des émulsions inverses puis évaluée toutes les deux semaines et pendant 18 semaines.





**Annexe 6 :** Interaction entre la prévalence et de l'indice de sévérité des dommages de *S. singularis* dans tous les champs (Mai 2015- Septembre 2016).





**Annexe 7 :** Liste des publications tirées de la thèse

**H.C. Mahot**, G. Membang; R. Hanna, B.A.D. Begoude, L. Bagny Beilhe & B.C.F. Bilong, 2019. Laboratory assessment of virulence of Cameroonian isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against mirid bugs *Sahlbergella singularis* Haglund (Hemiptera: Miridae). *African Entomology*, 27(1): 86–96. DOI: <https://doi.org/10.4001/003.027.0086>.

**Hermine C. Mahot**, Joseph R. Mahob, David R. Hall, Sarah E.J. Arnold, Apollin K. Fotso, Gertrude Membang, Nathalie Ewane, Adolph Kemga, Komi K.M. Fiaboe, Charles F.B. Bilong, Rachid Hanna, 2020. Visual cues from different trap colours affect catches of *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae) in sex pheromone traps in Cameroon cocoa plantations. *Crop Protection* 127 (2020). DOI : <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104959>.

# Laboratory assessment of virulence of Cameroonian isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against mirid bugs *Sahlbergella singularis* Haglund (Hemiptera: Miridae)

H.C. Mahot<sup>1,2,4\*</sup> <sup>§</sup>, G. Membang<sup>1</sup>, R. Hanna<sup>1</sup> , B.A.D. Begoude<sup>2</sup>,  
L. Bagny Beilhe<sup>3</sup> & B.C.F. Bilong<sup>4</sup>

<sup>1</sup>International Institute of Tropical Agriculture (IITA), BP 2008, Yaoundé-Messa, Cameroon

<sup>2</sup>Laboratory of Regional Biological Control and Applied Microbiology, Institute of Agricultural Research for Development (IRAD), P.O. Box 2067, Yaoundé, Cameroon

<sup>3</sup>CIRAD, UPR Bioagresseurs, Montpellier, France

<sup>4</sup>Laboratory of Parasitology and Ecology, Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. Box 812, Yaoundé, Cameroon

The brown cocoa mirid, *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae), causes cocoa yield loss of about 30 % to 70 % in Cameroon. The pathogenicity of six indigenous isolates of *Beauveria bassiana* (BIITAC) and *Metarhizium anisopliae* (MIITAC) to the fourth and fifth nymphal stages of *S. singularis* was evaluated under laboratory conditions. Two methods of inoculation were tested at various conidial concentrations: (1) immersing the pod in 200 ml of the suspension for 3 min (ingestion method) and (2) immersing each insect in 1 ml of the suspension for 5 s (immersion method). Tween<sup>®</sup> 80 at 0.1 % (v/v) was used as a control. After 14 days from initial exposure to conidia, corrected mortality ranged from 35 to 100 % for immersion and from 16 to 94.3 % for ingestion. Mortalities due to fungi isolates were significantly different from that of their control ( $P < 0.05$ ). The effect of immersion was more significant than that of ingestion, and mortalities increased with increasing spore concentration. Mycelial outgrowth and sporulation after seven days on some of the dead insects, kept on humidified filter paper in dark conditions, demonstrated that death was due to fungal infection (mycosis). Based on pathogenicity results, LC<sub>50</sub>, LT<sub>50</sub> and LT<sub>90</sub> fungal outgrowth, *B. bassiana* isolates BIITAC10.3.3, BIITAC6.2.2, MIITAC6.2.2 and the *M. anisopliae* isolate MIITAC11.3.4 could be selected for their virulence, and advanced to field trials for the development of microbial control.

**Key words:** pathogenicity, entomopathogens, biocontrol, fungi.

## INTRODUCTION

Mirid bugs, *Sahlbergella singularis* Haglund and *Distantiella theobroma* Distant (Hemiptera: Miridae), are the most damaging pest species of cocoa (*Theobroma cacao* L.) in West Africa (Lavabre 1977). In Cameroon, *S. singularis* is by far the most common species on cocoa (Babin 2009). Mirid bugs feed on pods and shoots. They induce cherelle wilt, contributing to young fruits' mortality and cause the drying up of leaves, branch tips, and the quick destruction of the cocoa canopy, which further results in a quick decline of farms when control measures are inadequate (Lavabre 1977; Anikwe 2010; Yédé *et al.* 2012; Mahob 2013). This pest can induce 30 % yield loss in cocoa in the first year and up to 80 % loss in two consecutive seasons if the farm is left unprotected (Anikwe 2010).

Chemical insecticides of the families organochlorines, organophosphates, pyrethroids, nicoti-

noids and carbamates are most commonly used to control the mirid bugs in Cameroon (Mahob *et al.* 2014). However, serious problems such as resistance, pest resurgence and elimination of economically beneficial insects, toxicity to humans and wildlife are often encountered (Padin *et al.* 2002; Hendrawan & Ibrahim 2006; Mahdneshtin *et al.* 2009). Concerns over environmental issues related to the use of synthetic chemical pesticides have led to changes in strategy, and development of Integrated Pest Management (IPM) programmes, where biological control strategies are recommended. Indeed, the use of fungal biocontrol agents can potentially reduce the use of chemical insecticides and furthermore their residual effects. Entomopathogenic fungi are excellent candidates for biological control and are considered as promising alternatives, in attempts



\*Author for correspondence. E-mail: mahotclaudine@yahoo.fr

Received 5 June 2018. Accepted 12 December 2018

ISSN 1021-3589 [Print]; 2224-8854 [Online]  
DOI: <https://doi.org/10.4001/003.027.0086>

*African Entomology* 27(1): 86–96 (2019)  
©Entomological Society of Southern Africa

to improve the sustainability of crop protection.

Among the hundreds of entomopathogenic species of fungi reported from insects, *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin (Deuteromycota: Hypocreales) and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin (Deuteromycota: Hypocreales), are the most frequently used. *Beauveria bassiana* is one of the most effective entomopathogenic fungi, due to its cosmopolitan distribution (Bidochka *et al.* 1998), its ability to infect any life stage of its hosts, its wider host range than the other Deuteromycetes, its ability to infect almost all orders of insects and certain plant tissues (Roberts & Hajek 1992; Bing & Lewis 1992). It can be easily isolated from insect cadavers or from soils using simple media, as well as by baiting soils with insects (Meyling 2007). As opposed to *B. bassiana*, *M. anisopliae* is mainly found in sun-exposed habitats or agricultural soils (Bidochka *et al.* 1998).

These two entomopathogenic fungi have drawn attention as potential biocontrol agents for many important pests such as Thysanoptera, *e.g.* *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Ugine *et al.* 2005; Wang & Zheng 2012), Coleoptera, *e.g.* *Anthonomus signatus* (Say), *Otiorhynchus ovatus* (Linnaeus) (Sabbahi 2008), Orthoptera, *e.g.* *Uvarovisia zebra* (Uvarov) (Mohammadbeigi & Port 2013). Furthermore, their insecticidal potentials have been tested on some Hemiptera such as *Eurygaster integriceps* (Puton) (Abdulhai *et al.* 2010) and tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Liu *et al.* 2002; Liu *et al.* 2003; Sabbahi 2008). Preliminary test of the effect of *Beauveria* isolates against *S. singularis* have been done (Mahot 2006). However, the beneficial effects of these two entomopathogenic fungi have never been documented against mirid pests of cocoa, one of the major export crops in Cameroon. Thus, considering the disadvantages of chemical control, there is an increasing need for alternative insect management strategies in agricultural systems.

This study aimed to evaluate the pathogenicity and virulence potential of some indigenous isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* on the mirid, *S. singularis*, using direct and indirect methods of application in the laboratory.

## MATERIAL AND METHODS

### *Insect rearing*

Mirid bug nymphs were collected at Ngat (3°46'N 11°49'E, 705 m elevation) in the Centre Region of Cameroon and reared following Babin

*et al.*'s (2008) approach. They were placed in plastic containers (25 × 25 × 1.13 cm) in a room with the following controlled average characteristics (T = 25 °C, RH = 64.85 ± 9.73 %, photoperiod: 12L:12D). Ventilation of those plastic containers was provided through four rectangular holes (7 × 12 cm), one on each side and covered with muslin. Pods were replaced every 7–10 days, depending on the extent of feeding damage. The bottom of each container was lined with absorbent paper, to prevent water condensation. Nymph development was monitored daily. Newly emerged female mirids were collected and kept separately until sexual maturity (5–6 days) in ventilated plastic boxes (7 × 10 × 2 cm) containing three sections of young cocoa shoots. These cocoa shoots were changed every 2 days. Subsequently, a 1–2-day-old adult male was introduced into each box for mating. After 24 h, all adults were transferred to muslin cages and attached to cocoa pods in the field. After a minimum of 16 days, which represents the expected hatching time, muslin cages were checked daily to detect newly emerged nymphs. When one or more nymphs had been detected, the pods were cut from the tree and taken to the rearing room where they were kept on absorbent paper in plastic containers with holes for ventilation.

### *Fungal isolates*

*Beauveria bassiana* and *M. anisopliae* were obtained from the Pathology Laboratory (IITA/ Cameroon). Isolates were named BIITAC 10.3.3, BIITAC 6.2.2, and BIITAC 8.1.5 for *B. bassiana* and MIITAC 11.3.4, MIITAC 6.2.2 and MIITAC 6.4.2 for *M. anisopliae*. BIITAC means *Beauveria* from IITA Cameroon and MIITAC means *Metarhizium* from the same institution. In previous work (Membang 2013) at the Pathology Laboratory aimed to isolate some potential entomopathogenic fungi, the above-mentioned species were isolated from soil using the insect bait method (Meyling 2007). Soil sampled from banana farms in the Centre Region of Cameroon had been used. Larvae of banana weevils, *Cosmopolites sordidus* (Germar) (Coleoptera: Curculionidae) were placed on 250 g of humidified soil and covered with black paper. After their death, fungal conidia appearing on cadavers were cultured and purified on Petri dishes containing potato dextrose agar (PDA) medium. The six indigenous isolates used to investigate their pathogenicity against *S. singularis* were screened

through laboratory pathogenicity on *C. sordidus* adult and larvae.

### Bioassays

For bioassays, multiple concentrations of conidial suspensions of the different isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* were prepared using a haemocytometer. Suspensions were prepared at  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $3.2 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  conidia/ml by scraping conidia from 21-day-old cultures and added in 0.1 % Tween 80 (Liu *et al.* 2003; Cherry *et al.* 2004; Mohammadbeigi *et al.* 2013). Water with 0.1 % Tween 80 was used as a control. Before using these suspensions, the viability of the conidia was evaluated. For each isolate, a sample of 50  $\mu$ l was spread onto the surface of a Petri dish containing PDA with three replicates for each fungal isolate. Plates were incubated at 25 °C for 24 h. For each plate, four microscopic fields were delimited. In each of them, 100 conidia were counted under an optical microscope to reach the number of 400 viable conidia. Viable conidia were those that germinated with the germ tube at least longer than its diameter (Hywell-Jones & Gillespie 1990). The conidial germination percentage for each plate was calculated according to Nussenbaum (2013). Only the suspension in which conidia germination rate was above 90 % was used in further experiments. The insecticidal potential was evaluated directly, by immersing fourth and fifth instar nymphs of *S. singularis* in the conidial suspension, and indirectly by immersing a small cocoa pod used to feed nymphs.

### Direct method

The experiments were arranged as a completely randomised design with treatments organised in four conidial concentrations,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $3.2 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  conidia/ml and untreated control treatment of only water with 0.1 % Tween 80 for each isolate. Each treatment involved 35 fourth instar nymphs of the mirid divided in five replicates. The experiments were performed under laboratory conditions at 25 °C. Every single mirid was immersed in 1 ml of conidia suspension for 5 s. Seven insects treated by fungal suspension for each concentration and each isolate were transferred on filter paper in ventilated plastic containers (19 × 12 × 4 cm). The container was supplied with a small cocoa pod for insect feeding and placed in the screen house. The number of dead insects was recorded daily for 14 days and the feeding cocoa pod was renewed on the seventh day.

### Indirect method or ingestion

Each cocoa pod serving as food for the mirids was immersed in 200 ml of conidia suspension for 3 min. In the control, pods were immersed in the same quantity of water having 0.1 % Tween 80 solution. After air drying, the treated pods were equally distributed in ventilated plastic containers, described above. Seven fourth instar larvae were released in each container, which represented one replication of each isolate and each concentration. The daily mortality was recorded as described above. Five replications were used for each isolate and each concentration.

### Fungal sporulation on dead insects

Dead nymphs were immersed in 70 % ethanol for 15 s to sterilise their surface and rinsed in sterile distilled water for 10 s. Afterwards they were immersed in 1 % sodium hypochlorite for 1 min, then rinsed three times for 10 s with sterile distilled water. Insects were dried on sterile filter paper and under sterile conditions. They were placed in a humid Petri dish lined with moistened cotton wool and filter paper and incubated in the dark screen house for 7 days to allow mycelial outgrowth over the cadavers. *Beauveria bassiana* and *M. anisopliae* sporulation were respectively recognised by the white and green powdery muscardine on dead insects and this indicates that the insects died from a fungal infection.

### Statistical analysis

Cumulative mortalities were corrected using Abbott's formula (Abbott 1925) and normality tested with Shapiro-Wilk test. Percentages were (arcsine square-root)  $x^2$  transformed (Zar 1996) before analysis of variance (ANOVA). Paired mean comparisons among fungal isolate, concentrations and fungal species were made using Tukey HSD test. The time to 50 % and 90 % mortality (LT<sub>50</sub> and LT<sub>90</sub>) at the more efficient concentration and concentration for 50 % mortality (LC<sub>50</sub>) on the 14th day post-treatment were determined using the probit analysis program. The software JMP 8.0.2 and SPSS 20.0 were used for all analyses.

## RESULTS

### Direct method

Isolates were all pathogenic to *S. singularis* at all concentrations, but had different levels of virulence. Average percentage of corrected mortalities at day 14 post-treatment ranged from 40–100 % with *B. bassiana* isolates and from 35–100 % with

*M. anisopliae* (Fig. 1). In the direct method (immersion method), mortalities were significantly affected by isolates ( $F_{5,15} = 3.3$ ;  $P = 0.0085$ ) and by concentrations ( $F_{3,15} = 3.9$ ;  $P = 0.0106$ ), then by the interaction isolates versus concentrations ( $F_{15,15} = 6.4$ ;  $P < 0.0001$ ). The effect of concentration, isolate and the two factors combined was significant at the level of 5 %. Isolate MIITAC11.3.4, at concentrations of  $3.2 \times 10^8$  and  $1 \times 10^8$  conidia/ml, had the same response with BIITAC10.3.3 at  $1 \times 10^9$  and MIITAC6.2.2 at  $1 \times 10^8$  conidia/ml. Results also showed that treatment with isolates MIITAC6.4.2 at  $1 \times 10^9$  and  $1 \times 10^8$  conidia/ml, BIITAC8.1.5 at  $3.2 \times 10^8$  then BIITAC6.2.2 at  $3.2 \times 10^8$  conidia/ml had the same effect (Fig. 1) on mirid mortality. Whatever the isolate, concentration response was significantly different with mortality rate except between  $3.2 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  conidia/ml responses. However, there was a significant positive correlation between the corrected mortality and the fungal concentration (Pearson coefficient

$r^2 = 0.57$ ,  $\chi^2 = 3.2448$ , d.f. = 22,  $P = 0.004$ ,  $Y = 2.403e - 08X + 7.299e + 01$ ). The mortality rate increased with increasing concentration. According to the only pathogenicity test through direct immersion method, all the six isolates could be retained, concentrations of  $1 \times 10^8$ ,  $3.2 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  conidia/ml were more effective than  $1 \times 10^7$  conidia/ml on *S. singularis*.

The median lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) values were estimated for isolates of each fungus applied to the fourth and fifth instar larvae of *S. singularis*. Results indicated significant relationships ( $P < 0.05$ ) between log dose and probit mortality. Based on the LC<sub>50</sub>, the isolate BIITAC10.3.3 of *B. bassiana* with a value of  $8.97 \times 10^5$  conidia/ml, the isolate MIITAC6.4.2 ( $3.69 \times 10^6$  conidia/ml) and to a lesser extend MIITAC11.3.4 ( $7.16 \times 10^6$  conidia/ml) of *M. anisopliae* had good insecticidal potentials compared with the others. The fungal suspension of BIITAC8.1.5 and MIITAC6.2.2 isolates had the least efficient LC<sub>50</sub> (Table 1). The maximum daily

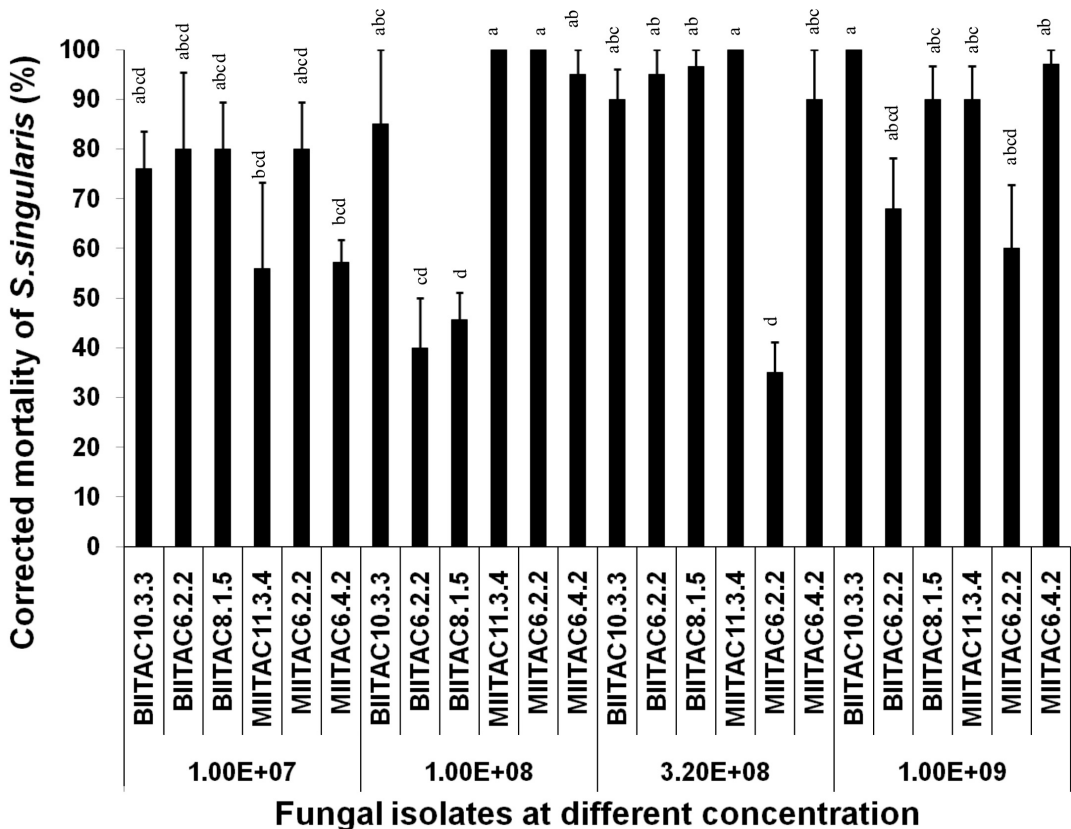


Fig. 1. Mean percentages of corrected mortalities of *Sahlbergella singularis* exposed by immersion to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates at  $1 \times 10^7$ ;  $1 \times 10^8$ ;  $3.2 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  conidia/ml at day 14.



mortality caused by fungi was observed at day 4 for isolates BIITAC10.3.3, MIITAC11.3.4 and MIITAC6.2.2 at a concentration of  $1 \times 10^9$  conidia/ml (not shown in table). The  $LT_{50}$  and  $LT_{90}$  values at the most significant concentration  $3.2 \times 10^8$  conidia/ml for *B. bassiana* and *M. anisopliae* isolates were therefore calculated (Table 2). Among *B. bassiana* isolates, BIITAC10.3.3 gave  $LT_{50}$  and  $LT_{90}$  values of 4.2 and 8.7, respectively, while among the *M. anisopliae* isolates, MIITAC11.3.4 had the best  $LT_{50}$  and  $LT_{90}$  (Table 2). Based on these factors, BIITAC10.3.3 and MIITAC11.3.4 were acknowledged as the most virulent isolates.

**Ingestion of fungi**

Similar to the immersion method, all fungal isolates have also displayed a pathogenic potential by ingestion (Fig. 2). Average percentages of the corrected mortalities ranged from 6.7 to 94.3 % and from 16 to 94.3 % at day 14 respectively with *B. bassiana* and *M. anisopliae* isolates. The effects of concentrations ( $F_{3,15} = 10.0$ ;  $P < 0.0001$ ) and the effect of the interaction between isolates *versus* concentrations ( $F_{15,15} = 3.5$ ;  $P < 0.0001$ ) were significant on mortality response 14 days after

exposure to contaminated residues. The highest mortality (94.3 %) caused by *B. bassiana* was obtained with BIITAC10.3.3 suspension at  $3.2 \times 10^8$  conidia/ml, while the one due to *Metarhizium* was obtained with MIITAC6.2.2 at  $1 \times 10^8$  conidia/ml (Fig. 2). Treatment BIITAC10.3.3 at  $3.2 \times 10^8$ , MIITAC6.2.2 at  $1 \times 10^8$ , BIITAC8.1.5 at  $3.2 \times 10^8$  and MIITAC6.4.2 at  $3.2 \times 10^8$  conidia/ml were more effective. The efficacy of those treatments is on a par with BIITAC6.2.2 at  $3.2 \times 10^8$ . Whatever the isolate, response of concentration  $3.2 \times 10^8$  conidia/ml was significantly different from the others ( $P < 0.0001$ ), then no significant difference has been found between concentrations  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  conidia/ml. There was a significant and positive correlation between corrected mortality and concentration ( $r^2 = 0.55$ ,  $\chi^2 = 3.1177$ , d.f. = 22,  $P = 0.005$ ,  $Y = 3.697e - 08X + 5.251e + 01$ ). In general, mortality rate increased with increasing conidial concentration. Based on the results of this bioassay, BIITAC10.3.3, BIITAC8.1.5, BIITAC6.2.2, MIITAC6.4.2 and MIITAC6.2.2 could be retained as promising isolates and a concentration of  $3.2 \times 10^8$  conidia/ml should be chosen for next step (Fig. 2).

**Table 1.** Concentration–mortality response of *Sahlbergella singularis* nymphs exposed to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates by contact to and assessed after 14 days of observation.

Fungal isolates		LC <sub>50</sub> (conidia/ml)	Probit parameter ± S.E.		χ <sup>2</sup> -value
			Intercept	Slope	
<i>Beauveria</i>	BIITAC6.2.2	$4.32 \times 10^6$	-3.54 ± 0.78	0.535 ± 0.98	24.92
	BIITAC8.1.5	$1.15 \times 10^7$	-5.15 ± 0.78	0.729 ± 0.98	2.00
	BIITAC10.3.3	$8.97 \times 10^5$	-3.49 ± 0.92	0.586 ± 0.12	7.185
<i>Metarhizium</i>	MIITAC11.3.4	$7.16 \times 10^6$	-6.998 ± 0.96	1.021 ± 0.12	8.178
	MIITAC6.2.2	$2.18 \times 10^7$	-8.678 ± 0.91	1.182 ± 0.12	5.895
	MIITAC6.4.2	$3.69 \times 10^6$	-2.756 ± 0.74	0.420 ± 0.09	18.518

**Table 2.** Virulence of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates by contact to *Sahlbergella singularis* after 14 days post-treatment at  $3.2 \times 10^8$  conidia/ml.

Fungal isolate	LT <sub>50</sub>	95 % confidence interval		LT <sub>90</sub>	95 % confidence interval	
		Lower	Upper		Lower	Upper
BIITAC6.2.2	5.1	4.4	5.8	13.2	11.2	16.6
BIITAC8.1.5	4.4	3.2	5.5	11.0	8.6	16.7
BIITAC10.3.3	4.2	3.0	5.2	8.7	6.9	12.6
MIITAC11.3.4	4.1	3.7	4.5	7.5	6.8	8.5
MIITAC6.2.2	4.7	4.1	5.2	12.6	11.0	15.1
MIITAC6.4.2	5.5	4.2	6.7	15.1	11.5	25.1



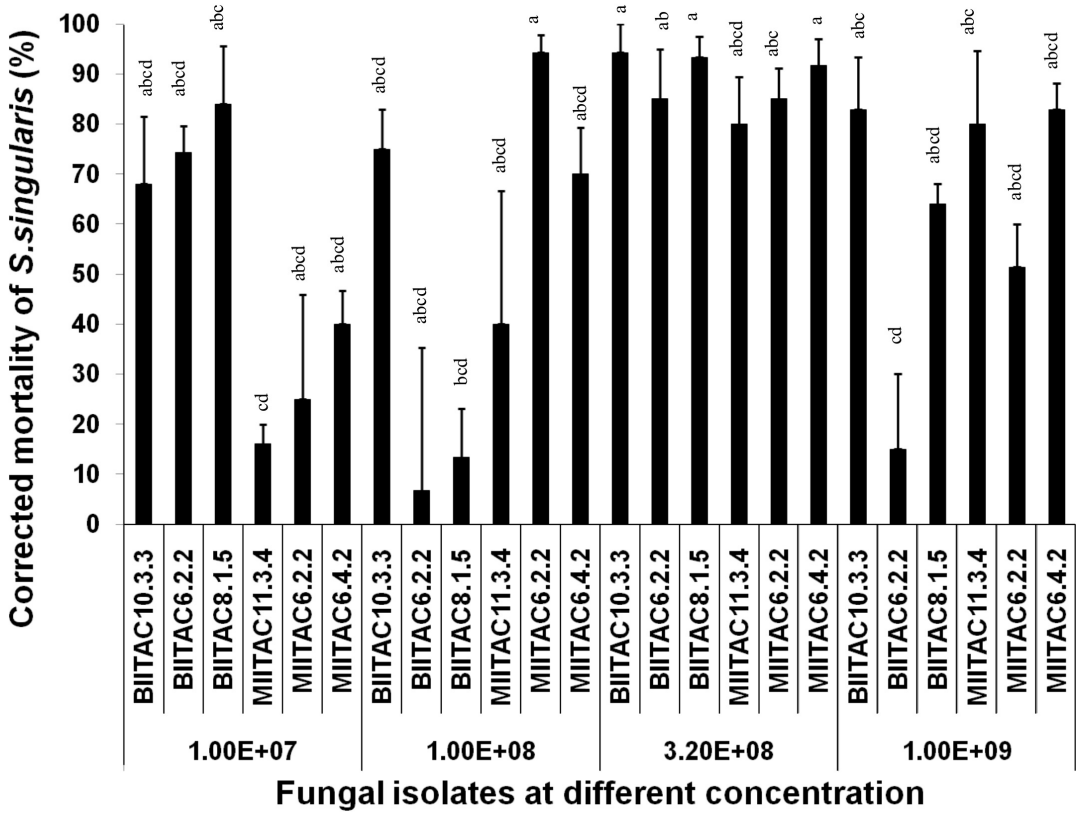


Fig. 2. Mean percentages of corrected mortalities of *Sahlbergella singularis* exposed by ingestion to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* at  $1 \times 10^7$ ;  $1 \times 10^8$ ;  $3.2 \times 10^8$  and  $1 \times 10^9$  conidia/ml at day 14.

The concentration–mortality response was also evaluated for each isolate during the contamination by ingestion. Results indicated a significant relationship ( $P < 0.05$ ) between log dose and probit mortality (Table 3). Among all *B. bassiana* isolates, BIITAC10.3.3 gave the smallest  $LC_{50}$  value ( $6.45 \times 10^5$  conidia/ml), thus it had the best insecticidal potential compared with BIITAC6.2.2 and BIITAC8.1.5. When taking into account the  $LC_{50}$  of *Metarhizium*, the best insecticidal potential could be attributed to the isolate MIITAC6.4.2 which recorded a  $LC_{50}$  value of  $2.09 \times 10^7$  conidia/ml. Nevertheless MIITAC11.3.4 and MIITAC6.2.2 could also be considered as efficient entomopathogens as their  $LC_{50}$  values were so close to that of MIITAC6.4.2.

The regression analysis evaluated time–mortality response within the ingestion method of contamination. Between *B. bassiana* isolates, BIITAC6.2.2 had the smaller  $LT_{50}$  while BIITAC8.1.5 and BIITAC10.3.3, had the smaller  $LT_{90}$

(Table 4). The isolate MIITAC6.2.2 presented an interesting  $LT_{50}$  (4.0 days) and  $LT_{90}$  (10.8 days), respectively. The three isolates of *B. bassiana* and MIITAC6.2.2 could also be chosen according to their virulence on insect.

### Fungal sporulation on dead insects

Insects that did not produce mycelia were recorded as other mortality, but cumulative mortality (mortality caused by fungal infection plus other mortality) until day 14 of the experiment was used in the analysis.

Results showed that both fungi can infect *S. singularis* (Fig. 3A, B) either by contact or by ingestion causing subsequent death of insects.

In general for *B. bassiana*, the immersion method could cause up to 100 % mortality with BIITAC10.3.3 at  $1 \times 10^9$  conidia/ml, while for *M. anisopliae* mortalities reached 100 % with MIITAC11.3.4 at  $3.2 \times 10^8$  and  $1 \times 10^8$  conidia/ml, then followed by MIITAC6.2.2 at  $1 \times 10^8$  (Fig. 1). The effect

**Table 3.** Concentration–mortality response of *Sahlbergella singularis* nymphs exposed to *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates by ingestion.

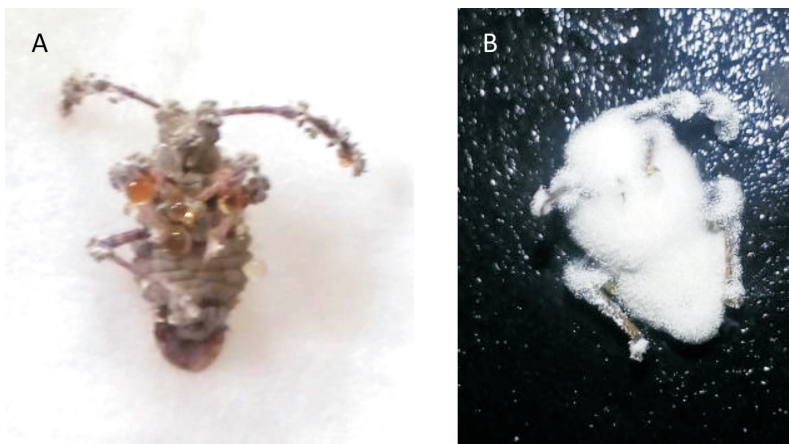
Fungi isolate		LC <sub>50</sub> (conidia/ml)	Probit parameter ± S.E.		χ <sup>2</sup> -value
			Intercept	Slope	
<i>Beauveria</i>	BIITAC6.2.2	1.46 × 10 <sup>8</sup>	−8.490 ± 0.841	1.040 ± 0.103	33.876
	BIITAC8.1.5	5.71 × 10 <sup>7</sup>	−7.912 ± 0.814	1.020 ± 0.100	9.989
	BIITAC10.3.3	6.45 × 10 <sup>5</sup>	−2.266 ± 0.786	0.390 ± 0.098	3.427
<i>Metarhizium</i>	MIITAC11.3.4	9.47 × 10 <sup>7</sup>	−8.013 ± 0.818	1.005 ± 0.100	7.097
	MIITAC6.2.2	7.55 × 10 <sup>7</sup>	−10.49 ± 0.905	1.335 ± 0.112	47.471
	MIITAC6.4.2	2.09 × 10 <sup>7</sup>	−5.697 ± 0.772	0.778 ± 0.096	0.056

**Table 4.** LT<sub>50</sub> and LT<sub>90</sub> of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates applied by ingestion at 3.2 × 10<sup>8</sup> conidia/ml to *Sahlbergella singularis*.

Fungi isolate	LT <sub>50</sub>	95 % confidence interval		LT <sub>90</sub>	95 % confidence interval	
		Lower	Upper		Lower	Upper
BIITAC6.2.2	7.6	6.2	9.5	30.9	20.6	68.4
BIITAC8.1.5	9.6	9.2	10.0	19.0	17.4	21.3
BIITAC10.3.3	9.0	8.6	9.4	19.4	17.6	21.9
MIITAC11.3.4	11.3	9.4	15.7	24.7	17.2	63.1
MIITAC6.2.2	4.0	3.4	4.5	10.8	9.4	13.2
MIITAC6.4.2	7.8	7.4	8.2	18.0	16.4	20.2

obtained with the concentration of 3.2 × 10<sup>8</sup> conidia/ml was not significantly different from that of 1 × 10<sup>9</sup> conidia/ml whatever the isolate, except by the ingestion method. In almost all cases, the effect given by concentration value of 3.2 × 10<sup>8</sup> conidia/ml appeared to be the same as the 1 × 10<sup>9</sup> conidia/ml and in that sense, could be considered as more efficient. Results also showed

that treatment effect by immersion was significantly different from ingesting an infected pod ( $F_{1,15} = 22.2, P < 0.0001$ ). Mortality rates obtained when contaminating insect with fungal suspension through direct contact (immersion) at 3.2 × 10<sup>8</sup> conidia/ml were always slightly higher than those obtained by indirect contact method (ingestion).

**Fig. 3.** *Sahlbergella singularis* infected by *Metarhizium anisopliae* (A) and *Beauveria bassiana* (B).

## DISCUSSION

In nature, regulation of insect populations can be well achieved using key important factors, which are entomopathogenic fungi. With regard to cocoa, few studies have examined the harmful action of both *B. bassiana* and *M. anisopliae* against cocoa mirids (Tong-Kwee *et al.* 1989). Thus in this study, we have examined the entomopathogenic potential of several isolates of *B. bassiana* and by *M. anisopliae* against *S. singularis* nymphs.

The results of the present study demonstrated the ability of some isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* to induce mortality of *S. singularis* via immersion and ingestion although the effectiveness varied depending on the conidial concentration of the fungi. When the fungal suspension of *B. bassiana* was applied by immersion of *S. singularis* at  $1 \times 10^7$  conidia/ml, the induced mean mortalities ranged from 76.0–80.0 %. These results are different from those found by Abdulhai *et al.* (2010), who obtained mean mortalities from 86–100 % for *B. bassiana* isolates at  $1 \times 10^6$  conidia/ml by immersion on *Eurygaster integriceps*, another Hemipteran. This difference could be supported either by the genotype of the strain involved, or by the difference in Hemipteran species. On the other hand, our isolates of *M. anisopliae* caused mortalities ranging from 60–97.1 % by immersion at  $1 \times 10^9$  conidia/ml. This result could be compared to the ones of Khashaveh *et al.* (2011) who found 100 % of *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae) mortality 10 days after immersion in the *M. anisopliae* suspension at  $1 \times 10^9$  conidia/ml. In previous laboratory studies using some local *B. bassiana* strains against *S. singularis*, through the ingestion method at  $1 \times 10^7$  conidia/ml mortalities ranged from 35.7–100 % (Mahot 2006), which compares well with the results found in this study. This allows us to confirm that *B. bassiana* fungi could readily infect *S. singularis* and cause mortality through ingestion.

In addition, the highest mortality percentage generally occurred at highest concentration, and then decreased with a decline in inoculum concentration. Inoculum concentration is an important factor on the pathogenicity of entomopathogenic fungi (Demirci *et al.* 2011). In the Parker *et al.* (2003) study, *Isaria farinosa* (Holmskjold) Fries (Sordariomycetes: Hypocreales) was applied on pine litter and wheat plants at concentrations of

$1 \times 10^6$  conidia/ml,  $1 \times 10^7$  conidia/ml, and  $1 \times 10^8$  conidia/ml and the percentage mortality of *E. integriceps* increased with increasing inoculum concentration. The same trend was observed in this study with the exception of some isolates (BIITAC6.2.2 and MIITAC6.2.2 by direct contact, and BIITAC8.1.5, BIITAC6.2.2 and MIITAC6.2.2 at  $1 \times 10^9$  conidia/ml by ingestion), where the physiological stage of the insect could have been responsible for this deviation.

An important consideration in selecting a fungus strain is its virulence, which is the quantitative amount of death that a pathogen can incite in a group of insects (Inglis *et al.* 2001). Mortality caused by fungi, fungal sporulation on dead insects, the  $LC_{50}$ ,  $LT_{50}$  and  $LT_{90}$  can be used to measure the level of virulence, when selecting beneficial fungal isolates.

The efficacy of fungi varied with isolates causing mortality from 6.7–100 %. Different isolates of the same species do not have equal potential for control of the same insect pest (Altre *et al.* 1999). Differences in potential of a strain's toxicity depended on physiological and enzymatic properties of each isolate (Leland *et al.* 2005). The fungal pathogenesis is a complex process and is dependent upon the attributes of both the pathogen and the host. The efficacy of isolates can also be attributed to their ability to germinate, to grow and to proliferate; when giving that germination, growth and proliferation within and outside a host are some stages that express the action of several entomopathogenic fungi (Sabbahi 2008; Mohammadbeigi 2012). Therefore, the outgrowth of fungi usually confirms that the insect is killed by fungal mycosis; it shows the fungal effectiveness and helps in the isolate's screening. During growth and proliferation, the isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae* rapidly colonise all tissues and organs while producing immune suppressor toxins that may damage haemocytes and cause insect paralysis and death (Flores-Villegas *et al.* 2016). These effects are possibly due to the ability of fungi to produce a collagenous coat of hyphal bodies that mask the recognition of  $\beta$ -1,3-glucans, the most powerful immune stimulant, by the insect's immune system (Sabbahi 2008; Flores-Villegas *et al.* 2016). Nevertheless, this effect is not very reliable as a test of virulence, given that insects may die from fungal mycosis and then be non-colonised by it because of competition by other saprophytic microorganisms (Inglis *et al.* 2012).

The lowest LC<sub>50</sub> estimated by immersion method after 14 days of treatment in our study is  $8.97 \times 10^5$  conidia/ml and  $3.69 \times 10^6$  conidia/ml for the BITTAC10.3.3 and MITTAC6.4.2 isolates of *B. bassiana* and *M. anisopliae*, respectively. For the ingestion method, the lowest LC<sub>50</sub> were estimated at  $6.45 \times 10^5$  conidia/ml then at  $2.09 \times 10^7$  conidia/ml, for these same isolates, respectively. These results stand in agreement with that of Liu *et al.* (2002) and Ziani (2008) who found that concentrations of  $0.8 \times 10^5$  to  $5.0 \times 10^5$  conidia/ml and  $8.0 \times 10^5$  and  $1.7 \times 10^4$  conidia/ml of some *B. bassiana* and *M. anisopliae* isolates were needed to cause 50 % mortality of *Lygus lineolaris* (Miridae). However, in their studies, between 8 and 6 days was necessary to reach this level, respectively, and less than ours, which was 14 days. This difference between our results may be related to the origins of fungal isolates, the type of insect hosts although both were Hemipteran. These same isolates of *B. bassiana* INRS-IP and INRS-CFL respectively killed 50 % of the nymphs in 4.77 and 5.03 days at  $1 \times 10^6$  conidia/ml (Ziani 2008) while for our *Beauveria* isolates LT<sub>50</sub> ranged from 4.1 to 5.1 days at concentration  $3.2 \times 10^6$  conidia/ml by the immersion method. At the same conidial concentration used by the above-mentioned author, our LT<sub>50</sub> could be lower or higher than that obtained. The expected difference between these LT<sub>50</sub> values and ours could likely be attributed to the difference between the cuticle structures of insects. Cuticle types in various insects differ in their protein composition and level of sclerotisation (Charnley 2003). *S. singularis* cuticle could be less or more sclerotised than that of *L. lineolaris* and there is a need for this comparative study. The cuticle appears to influence all stages of the infection process: adhesion, germination and aspersorium differentiation (Butt *et al.* 2001). Liu *et al.*

(2002) also demonstrated the susceptibility of *L. lineolaris* nymphs to some fungal isolates. At  $2 \times 10^7$  conidia/ml the values of LT<sub>50</sub> were 2.5, 2.7, 3.4 and 4 days for *B. bassiana* isolates (ARSEF5665, ARSEF1394, ARSEF3769 and ARSEF0353, respectively) and 2.9 days for *M. anisopliae* isolate (ARSEF3540).

In conclusion, the importance of this study resides in the identification of virulent strains prior to field or large-scale use. This laboratory study provides preliminary evidence for the insecticidal potential and virulence of six indigenous *B. bassiana* and *M. anisopliae* isolates against *S. singularis* nymphs. Cameroonian entomopathogenic fungi are virulent by contact or by ingestion so the two methods are practical. When applying fungal biopesticide in the field, the target pest can be affected through direct contact on cuticle or by ingesting the infectious agent. Our results may help to improve the use of a biological control approach to control cocoa mirid in cocoa plantations and to contribute to IPM programmes. Cameroonian *B. bassiana* and *M. anisopliae* isolates are good candidates for further development as biological control agents for *S. singularis*.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank IITA and SNV and GIZ for giving us the opportunity to lead this work. This research has been facilitated by financial assistance of the Cocoa-Eco and ProCISA projects. We also acknowledge technical support and assistance from the staff of the Entomology and Pathology laboratories of IITA-Cameroon.

## \*ORCID iDs

H.C. Mahot:  [orcid.org/0000-0003-1005-1111](https://orcid.org/0000-0003-1005-1111)

R. Hanna:  [orcid.org/0000-0002-5715-0144](https://orcid.org/0000-0002-5715-0144)

## REFERENCES

- ABDULHAI, M., EL-BOUHSSINI, M., JAMAL, M., TRISSI, A.N., SAYYADI, Z., SKINNER, M. & PARKER, B.L. 2010. *Beauveria bassiana* characterization and efficacy vs. sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae). *Pakistan Journal of Biological Sciences* 13: 1052–1056.
- ABBOTT, W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265–267.
- ALTRE, J.A., VANDENBERG, J.D. & CANTONE, F.A. 1999. Pathogenicity of *Paecilomyces fumosoroseus* isolates to diamondback moth *Plutella xylostella*: correlation with spore size, germination speed and attachment to cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology* 73: 332–338.
- ANIKWE, J.C. 2010. Feeding preference and morphometrics of *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae) on cocoa pods at different stages of physiological development. *Academic Journal of Entomology* 3: 29–44.
- BABIN, R. 2009. Contribution à l'amélioration de la lutte contre le miride du cacaoyer *Sahlbergella singularis* Hagl. (Hemiptera: Miridae). Influence des facteurs agro-écologiques sur la dynamique des populations du ravageur. Thèse de doctorat, Département de Biologie Ecologie Environnement, Université de Montpellier III, Montpellier, France.



- BABIN, R., BISSELEUA, D.H.B., DIBOG, L. & LUMARET, J.P. 2008. Rearing method and life-table data for the cocoa mirid bug *Sahlbergella singularis* Haglund (Hemiptera: Miridae). *Journal of Applied Entomology* **132**: 366–374.
- BIDOCHKA, M.J., KASPERSKI, J.E. & WILD, G.A.M. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Canadian Journal of Botany* **76**: 1198–1204.
- BING, L.A. & LEWIS, L.C. 1992. Endophytic *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in corn: the influence of the plant stage and *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Biocontrol Science and Technology* **2**: 39–47.
- BUTT, T.M., JACKSON, C.W. & MAGAN, N. 2001. Introduction-fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: Butt, T.M. & Jackson, C.W. (Eds) *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. 1–8. CABI Publishing, Wallingford, U.K.
- CHARNLEY, A.K. 2003. Fungal pathogens of insects: cuticle degrading enzymes and toxins. *Advances in Botanical Research* **40**: 241–321.
- CHERRY, A.J., ABALOB, P. & HELLA, K. 2004. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research* **41**: 295–309.
- DEMIRCI, F., MUSTU, M., KAYDAN, M.B. & ÜLGENTÜRK, S. 2011. Laboratory evaluation of the effectiveness of the entomopathogen; *Isaria farinosa*, on citrus mealybug, *Planococcus citri*. *Journal of Pest Sciences* **84**: 337–342.
- DRAGANOVA, S., TAKOV, D., PILARSKA, D., DOYCHEV, D., MIRCHEV, P. & GEORGIEV, G. 2013. Fungal pathogens on some Lepidopteran forest pests in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica* **65**: 179–186.
- FLORES-VILLEGAS, L.A., CABRERA-BRAVO, M., TORIELLO, C., BUCIO-TORRES, M.I., SALAZAR-SCHETTINO, P. & CÓRDOBA-AGUILAR, A. 2016. Survival and immune response of the Chagas vector *Meccus pallidipennis* (Hemiptera: Reduviidae) against two entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Isaria fumosorosea*. *Parasites & Vectors* **9**: 1–11.
- HENDRAWAN, S. & IBRAHIM, Y. 2006. Effects of dust formulations of three entomopathogenic fungal isolates against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) in rice grain. *Journal Biosains* **17**: 1–7.
- HYWELL-JONES, N.L. & GILLESPIE, A.T. 1990. Effect of temperature on spore germination in *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Mycological Research* **94**: 389–392.
- INGLIS, D.G., GOETTEL, M.S., BUTT, T.M. & STRASSER, H. 2001. Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. In: Butt, T.M., Jackson, C.W. & Magan, N. (Eds) *Fungi as Biocontrol Agents*. 23–69. CABI Publishing, Wallingford, U.K.
- INGLIS, D.G., ENKERLI, J. & GOETTEL, M.S. 2012. Laboratory techniques used for entomopathogenic fungi: Hypocreales. In: Lacey, L.A. (Ed.) *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. 189–253. Academic Press, London, U.K.
- KHASHAVEH, A., SAFARALIZADEH, M.H. & GHOSTA, Y. 2010. Pathogenicity of Iranian isolates of *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) (Ascomycota: Hypocreales) against *Trogoderma granarium* Everts (Coleoptera: Dermestidae). *Biharaan Biologist* **5**: 51–55.
- LAVABRE, E.M. 1977. *Les Mirides du Cacaoyer*. Maisonneuve et Larose, Paris, France.
- LELAND, E.J., MCGUIRE, M.R., GRACE, G.A., JARONSKI, S.T., ULLOA, M., PARK, Y.H. & PLATTNER, R.D. 2005. Strain selection of fungal entomopathogen, *Beauveria bassiana*, for control of plant bugs (*Lygus* sp.) (Heteroptera: Miridae). *Biological Control* **35**: 104–114.
- LIU, H., SKINNER, M., PARKER, B.L. & BROWN-BRIDGE, M. 2002. Pathogenicity of *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Deuteronomycotina: Hyphomycetes), and other entomopathogenic fungi against *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Economic Entomology* **95**: 675–681.
- LIU, H., SKINNER, M. & PARKER, B.L. 2003. Bioassay method for assessing the virulence of *Beauveria bassiana*, against tarnished plant bug, *Lygus lineolaris* (Hemiptera: Miridae). *Journal of Applied Entomology* **127**: 299–304.
- MAHDNESHIN, Z., SAFARALIZADAH, H.M. & GHOSTA, Y. 2009. Study on the efficacy of Iranian isolates of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin against *Rhyzopertha dominica* F. (Coleoptera: Bostrichidae). *Journal of Biological Sciences* **9**: 170–174.
- MAHOB, R.J., NDOUMBÈ-NKENG, M., TEN HOOPEN, G.M., DIBOG, L., NYASSÉ, S., RUTHERFORD, M., MBENOUN, M., BABIN, R., AMANG A MBANG, J., YEDE & BILONG BILONG, C.F. 2014. Pesticides use in cocoa sector in Cameroon: characterization of supply source, nature of actives ingredients, fashion and reasons for their utilization. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* **8**: 1976–1989.
- MAHOB, R.J. 2013. Pesticides de la filière cacao et essais de lutte intégrée contre *Sahlbergella singularis* Haglund, 1895 (Hemiptera: Miridae); principal bio-agresseur du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) au Cameroun. Thèse de doctorat Ph.D. de l'Université de Yaoundé I, Faculté des Sciences, Département de Biologie et Physiologie Animales, Yaoundé, Cameroun.
- MAHOT, H.C. 2006. Evaluation in vitro du Pouvoir Pathogène de *Beauveria bassiana* Vis-à-Vis de *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae), Ravageur du Cacaoyer. DEA, Département de Biologie et Physiologie Animale, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, Cameroun.
- MEMBANG, G. 2013. Pathogénicité des champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* contre le charançon du bananier *Cosmopolites sordidus*. Thèse du Master, Département de Biologie et Physiologie Végétale, Faculté des Sciences, Université de Yaoundé I, Cameroun.
- MEYLING, N.V. 2007. *Methods for Isolation of Entomopathogenic Fungi from the Soil Environment*. Laboratory Manual, January 2007. Department of Ecology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.

- MOHAMMADBEIGI, A. & PORT, G. 2013. Efficacy of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against *Uvarovistia zebra* (Orthoptera: Tettigoniidae) via contact and ingestion. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 5: 138–146.
- NUSSENBAUM, A.L. 2013. Germination, radial growth and virulence to boll weevil of entomopathogenic fungi at different temperatures. *World Applied Sciences Journal* 25: 1134–1140.
- PARKER, B.L., SKINNER, M., COSTA, S.D., GOULI, S., REID, W. & BOUHSSINI, M. 2003. Entomopathogenic fungi of *Eurygaster integriceps* Puton (Hemiptera: Scutelleridae): collection and characterization for development. *Biological Control* 27: 260–272.
- PADIN, S., BEELO, D.G. & FABRIOZO, M. 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and bean treated with *Beauveria bassiana*. *Journal of Stored Products Research* 347: 1–6
- ROBERTS, D.W. & HAJEK, A.E. 1992. Entomopathogenic fungi as bioinsecticides In: Leathman, G.F. (Ed.). *Frontiers in Industrial Mycology*. 144–159. Chapman and Hall, New York, U.S.A.
- SABBAHI, R. 2008. Utilisation du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* dans une stratégie de gestion phytosanitaire des principaux insectes ravageurs en fraisesraies. Thèse de doctorat, Département de Biologie, Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Canada.
- TONG-KWEE, L., MUHAMAD, R., GAIT FEE, C. & CHIEW LAN, C. 1989. Studies on *Beauveria bassiana* isolated from the cocoa mirid, *Helopeltis theobroma*. *Crop Protection* 8: 358–362.
- UGINE, T.A., WRAIGHT, S.P., BROWNBIDGE, M. & SANDERSON, J.P. 2005. Development of a novel bioassay for estimation of median lethal concentrations (LC<sub>50</sub>) and doses (LD<sub>50</sub>) of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, against western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 89: 210–218.
- WANG, J. & ZHENG, C. 2012. Characterization of a newly discovered *Beauveria bassiana* isolate to *Frankliniella occidentalis* Perganda, a non-native invasive species in China. *Microbiological Research* 167: 116–120.
- ZAR, H.J. 1996. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, NJ, U.S.A.
- ZIANI, J. 2008. Application de *Beauveria bassiana* contre la punaise terne *Lygus lineolaris* (Palisot de Beauvois) (Hémiptères: Miridés) dans les vignobles. *Mémoire de Maîtrise Département de Biologie, Université du Québec, Canada*. 88 pp.

Copyright of African Entomology is the property of Entomological Society of Southern Africa and its content may not be copied or emailed to multiple sites or posted to a listserv without the copyright holder's express written permission. However, users may print, download, or email articles for individual use.



## Visual cues from different trap colours affect catches of *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae) in sex pheromone traps in Cameroon cocoa plantations

Hermine C. Mahot<sup>a,b,c,\*</sup>, Joseph R. Mahob<sup>c</sup>, David R. Hall<sup>d</sup>, Sarah E.J. Arnold<sup>d</sup>, Apollin K. Fotso<sup>a</sup>, Gertrude Membang<sup>a</sup>, Nathalie Ewane<sup>a</sup>, Adolph Kemga<sup>a</sup>, Komi K.M. Fiaboe<sup>a</sup>, Charles F.B. Bilong<sup>c</sup>, Rachid Hanna<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup> International Institute of Tropical Agriculture (IITA), BP 2008, Yaoundé-Messa, Cameroon

<sup>b</sup> Institute of Agricultural Research for Development (IRAD), P.O. 2067, Yaoundé, Cameroon

<sup>c</sup> Faculty of Science, University of Yaoundé I, P.O. 812, Yaoundé, Cameroon

<sup>d</sup> Natural Resources Institute, University of Greenwich, Kent, UK

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Theobroma cocoa*  
Cocoa mirids  
Green trap color  
Insect monitoring  
Spectral analysis

### ABSTRACT

Cocoa mirids, *Sahlbergella singularis* and *Distantiella theobroma*, are the most economically important insect pests of cocoa in West and Central Africa, where they can cause up to 40% losses in cocoa yields. *Sahlbergella singularis* is the most common species in Cameroon and was therefore targeted in this study. During a two-year trial in 15 cocoa plantations in Ayos and Konye, in the Centre and Southwest regions of Cameroon respectively, the most effective colour – white, purple or green – of sex pheromone traps was examined for integration into mirid management programmes. Similar temporal patterns in *S. sahlbergella* male trap catches were observed with all three colours, but the green trap caught more *S. singularis* (Ayos:  $0.968 \pm 0.091$  [SEM]; Konye:  $0.640 \pm 0.076$ /trap/month) compared with purple traps (Ayos:  $0.674 \pm 0.068$ ; Konye:  $0.441 \pm 0.058$ ), and white traps (Ayos:  $0.467 \pm 0.049$ , Konye:  $0.253 \pm 0.041$ ). Trap reflectance showed wavelength peaks typical for purple in both short (approximately 380–480 nm) and long wavelengths (>650 nm), and ~530 nm for green. Reflectance peaks exceeded 100% of the incident light in the 400–450 nm range from the white, suggesting the presence of optical brighteners. Trap catches support the hypothesis that *S. singularis* ocelli are more responsive to light of shorter wavelengths. Despite the low attractiveness of the sex pheromone to *S. singularis*, a optimisation of the colour of the trap can improve *S. sahlbergella* monitoring, mass trapping, and other control measures which could ultimately lead to reductions of insecticide use and to conservation of beneficial arthropods, particularly cocoa flower pollinators that are critical for improving cacao tree productivity.

### 1. Introduction

Cocoa (*Theobroma cocoa* L.) is one of the most important cash-crops in West and Central Africa with the Ivory Coast, Ghana, Cameroon and Nigeria being the largest producers in descending order (Wessel and Quist-Wessel, 2015). Damage by insect pests and diseases, such as cocoa mirids, cocoa pod disease, and increasingly cocoa swollen shoot virus disease, continue to be among the most important factors limiting yield (Wessel and Quist-Wessel, 2015). Pesticide treatments, while largely

effective in limiting insect pest and disease damage, are thought to cause considerable negative collateral effects on ecosystem services of beneficial insects, especially cocoa flower pollinators, which are essential for cocoa pollination and pod yield (Toledo-Hernandes et al., 2017).

Cocoa mirids, *Sahlbergella singularis* Hagl. and *Distantiella theobroma* (Dist.) (Hemiptera: Miridae), are the most important insect pests of cocoa in the cocoa belt of West Africa (Yede et al., 2012; Sarfo, 2013; Mahob et al., 2014; Bagny Beilhe et al., 2018a, Bagny Beilhe et al., 2018b). These mirids cause damage by injecting saliva into feeding sites

\* Corresponding author. International Institute of Tropical Agriculture (IITA), BP 2008, Yaoundé-Messa, Cameroon.

E-mail address: [mahotclaudine@yahoo.fr](mailto:mahotclaudine@yahoo.fr) (H.C. Mahot).

<sup>1</sup> Present address: Institute of the Environment and Sustainability, Congo Basin Institute, Box 11 951496, University of California, Los Angeles (UCLA), Los Angeles, CA 90095, USA.



which can lead to desiccation of young shoots and leaves and appearance of cankers on pods and branches (Mahob et al., 2019). Mirid feeding damage can also promote tissue infections by opportunistic pathogenic fungi such as *Fusarium* spp. and *Lasiodiplodia* spp. (Adu-Acheampong et al., 2012, 2014; Voula et al., 2018) that can lead to cocoa dieback (Anikwe and Otuonye, 2015). There is also mounting evidence that yield losses caused by mirid feeding are principally due to abortion of young fruits (Yede et al., 2012). Severe mirid damage can cause up to 40% loss in bean yield and the risk of tree death in the absence of appropriate control (Entwistle, 1972).

The biology, ecology and management of *S. singularis* and *D. distantiella* have been the subject of numerous studies (Entwistle, 1972; Kumar and Ansari, 1974; De Miré, 1977, 1985; Nwana and Youdewei, 1978; Decazy, 1979; Nwana et al., 1979; Babin et al., 2008, 2010; Mahob et al., 2011; Bagny Beilhe et al., 2018a). Conventional pesticides remain the most widely used option in the control of cocoa mirids (Mahob et al., 2014), which has led to widespread insecticide resistance, secondary pest outbreaks and negative effects on beneficial arthropods, especially cocoa flower pollinators (Sarmah et al., 2004; Tijani, 2006; Geiger et al., 2010; Kibria, 2016; Bagny Beilhe et al., 2018a; Humann-Guillemot et al., 2019). Risks linked to the use of chemical insecticides, including stringent legislation by cocoa-importing countries, have led to numerous efforts to develop alternative mirid control approaches, including host plant resistance (e.g. Sounigo et al., 2003), cultural control through shade management (e.g. Babin et al., 2010), biological control (e.g. Bagny Beilhe et al., 2018b), and semi-chemicals and biopesticides (Padi et al., 2002; Ayenor et al., 2007; Anikwe and Makanjuola, 2013; Mahob et al., 2011; Posada et al., 2010; Sarfo et al., 2018a, b).

Sex pheromones have been identified for a wide range of insect species (e.g., Witzgall et al., 2010; Miller and Gut, 2015; El-Sayed, 2017; Gregg et al., 2018) and used in a variety of ways, e.g., monitoring, pheromone confusion, mass trapping. Female sex pheromones were identified for *S. singularis* and *D. theobroma* by Padi et al. (2000, 2002) and attraction of male mirids to white and clear plastic sticky and water traps baited with the pheromone and their potential for monitoring mirid populations and mass trapping have been demonstrated in Ghana (Ayenor et al., 2007; Sarfo et al., 2018a, b) and in Cameroon (Mahob et al., 2011). None of the previous studies has determined, however, the effect of sex pheromone trap colour on catches of the two mirid species. There is also a need to determine the performance of the sex pheromone traps across a range of abiotic environments and pest pressures.

Trap colour is known to affect attraction of hemipteran and thysanopteran insects to unbaited traps (e.g. Thongjua et al., 2015; Hassan and Mohammed, 2004; Ranamukhaarachchi and Wickramarachchi, 2007; Blackmer et al., 2008; Mazzoni et al., 2011). However, the effect of colour on the attractiveness of traps baited with a chemical attractant has been less frequently investigated (e.g. Sampson et al., 2012; Arnold et al., 2015). In this study, we evaluated three colours of a sticky trap design to optimise mirid sex pheromone trapping in cocoa farms across a range of abiotic environments in Cameroon, with the ultimate aim of improving mirid monitoring and the potential application of pheromone traps in mass-trapping and auto-dissemination of entomopathogenic fungi that are under development for mirid microbial control (Lopes et al., 2014; Mahot et al., 2019).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study areas

The study was conducted over a period of 24 months (September 2014 through August 2016) in 15 cocoa plantations in the Centre (Ayos municipality) and Southwest (Konye municipality) regions of Cameroon, two of the areas with the highest cocoa production in Cameroon (Fig. 1) (Jagoret, 2011). In Ayos, the study was conducted in eight plantations in three villages, Ebeck (3), in Meto'o (3) and in Ekok

(2). In Konye, the study was conducted in seven plantations - Kokobuma (2), Baduma (2), Matondo (1) and Diongo (2) (Fig. 1). We used the agro-ecological zone classification developed by the Cameroon Institute of Agronomic Research for Development (IRAD). The Ayos municipality is in the humid forest agro-ecological zone characterised by dense tropical forest and equatorial climate with two rainy seasons (March–July and September–November) separated by two dry seasons (December–February and August). Total rainfall and average temperature and relative humidity are 1440 mm, 25 °C and 78% respectively (IRAD, 2008; Anonymous, 2015, 2016). The Konye municipality is in the lowland humid forest agroecology with equatorial climate characterised by a mono-modal rainfall pattern of abundant precipitation (2461 mm) and average temperature and relative humidity of 27 °C and 80% respectively (IRAD, 2008; Anonymous, 2015, 2106).

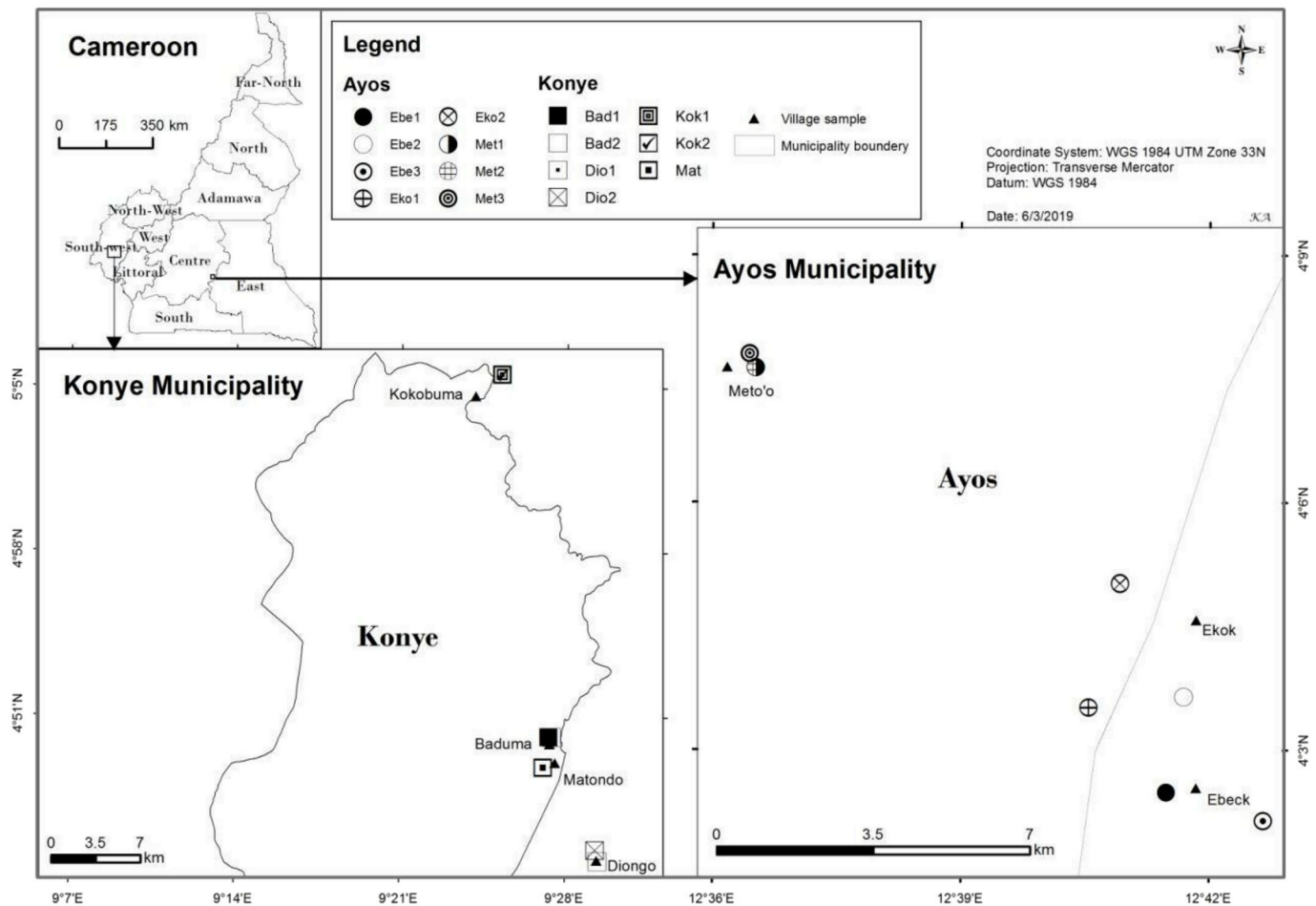
### 2.2. Experimental design

The study was carried out in 15, 20–40 year-old traditional cocoa plantations with relatively high occurrence of *S. singularis* and absence of insecticide treatments for at least two years before the initiation of experiments. One experimental plot (100 × 50 m) was delimited within each of the selected cocoa plantations. Each plot contained at least 600 cocoa trees with spacing that ranged between 2.5 × 2.5 m and 3 × 3 m. Six pheromone traps of each of the three colours (see below for description) were placed in each experimental plot. Traps were randomly assigned to trees within each plot with approximate spacing of 12.5 m between traps within a row and 15 m between rows. Traps were rerandomised in each experimental plot at two-month intervals because of the aggregated distribution of *S. singularis* (Babin et al., 2010). According to our trap deployment design, a trap is a sampling unit and a plantation is the experimental unit (or replication).

### 2.3. Trap design

The standard rectangular sticky trap (40 × 10 × 15 cm) was used due to its proven effectiveness in pheromone trapping of *S. singularis* (Mahob et al., 2011; Sarfo, 2013). The traps were fabricated locally with a 2-mm thick Plexiglas sheet in three colours, green and purple that resembles the colours of cocoa leaves and pods, and white to match traps used in studies by Mahob et al. (2011) and Sarfo et al. (2018a). The internal trap surface was lined on three sides (base and two vertical sides) with thin polyethylene sheet coated with a film of clear Tanglefoot® (Seabright Laboratories, Emeryville, CA, USA). Pheromone lures were prepared at the Natural Resources Institute and consisted of polyethylene vials (20 × 8 × 1.5 mm; Just Plastics, UK). The vials were impregnated with 1 mg of hexyl (R)-3-[(E)-2-butenyloxy]-butyrate + 0.5 mg hexyl (R)-3-hydroxy butyrate and an equal amount of butylated hydroxyl toluene as antioxidant (Padi et al., 2000, 2002; Mahob et al., 2011; Sarfo et al., 2018a). One lure was suspended with a wire from the inside centre roof of the trap. Traps were suspended in the canopy of cocoa trees at approximately 2 m above ground to facilitate trap servicing. Damaged or missing traps were replaced as needed. The experiments did not include unbaited control traps because the attractiveness of the pheromone lure to *S. singularis* has been demonstrated previously (Mahob et al., 2011; Sarfo, 2013).

Traps were monitored at 14-day intervals. Captured insects were removed and placed in tubes with 70% alcohol for later identification using the dichotomous keys of Entwistle (1972) and Lavabre (1977). The sex of trapped mirids was determined by the presence or absence of an ovipositor in females and males, respectively. The polyethylene sheet lining the inside of the traps and the pheromone lures were replaced every 2 months as loss of attractiveness usually occurs after eight weeks of pheromone placement in the field (Sarfo, 2013).



**Fig. 1.** Location of the 15 plantations used in the experiments during the two years of the experiments in Ayos and Konye Municipalities, respectively in Cameroon's Centre and Southwest regions. Each circle or square represents a plantation. Six traps of the three colours (green, purple and white) were deployed at each site.

#### 2.4. Spectral reflectance of trap materials

Spectral reflectance curves for the trap materials were measured according to Chittka and Kevan (2005) using an Avantes AvaSpec-2048 spectrophotometer and an AvaLight-DH-S-BAL Deuterium-Halogen light source (Avantes, Leatherhead, Surrey, UK), calibrated relative to a BaSO<sub>4</sub> white standard (Avantes WS-2). Measurements were taken with a fine probe (FCR7UV200-2-1.5 x 100) at 45° to the stimulus surface. The resulting reflectance values are the mean of three measurements on each of the front and reverse side of each green and purple samples, corresponding to the outside and inside of the trap. Only the front side of white traps was taken because the reverse side of the white trap is the same as the front side.

#### 2.5. Data analysis

*Sahlbergella singularis* catches for each trap colour within each plantation (six traps of each colour in each plantation) were averaged on a monthly basis after summing two consecutive, 14-day counts. Monthly catch counts were then compared separately for each location (Ayos or Konye) by univariate repeated measures analysis of variance on trap counts, with trap color and month as fixed factors and plantation (i.e. replication) as random factor.

A second analysis of variance was used to compare the effect of colour (sum of average monthly *S. sahlbergella* trap counts over 12 consecutive months of sampling) and location (Ayos and Konye) as fixed factors, with year as time factor and plantation (replicate) as random factor. Where needed, Tukey's HSD was used for post-hoc comparison of

means at  $\alpha = 0.05$ . Monthly trap counts were log-transformed before each analysis to correct for unequal variances inherent in count data. All statistical analyses were performed with JMP Pro 14.3. (SAS Institute, 2019).

### 3. Results

The number of *S. singularis* caught in traps depended on trap colour (Ayos:  $F_{2,14} = 94.8$ ,  $P < 0.001$ , Konye:  $F_{2,12} = 44.2$ ,  $P < 0.001$ ) and month of sampling (Ayos:  $F_{23,483} = 24.8$ ,  $P < 0.001$ ; Konye:  $F_{23,405} = 9.29$ ,  $P < 0.001$ ) in each of the two locations (Fig. 2). Green traps caught the highest number of *S. singularis* (Ayos:  $0.968 \pm 0.091$ ; Konye:  $0.640 \pm 0.076$ /trap/month), followed by purple (Ayos:  $0.674 \pm 0.068$ ; Konye:  $0.441 \pm 0.058$ ), and white traps (Ayos:  $0.467 \pm 0.049$ , Konye:  $0.253 \pm 0.041$ ). Mean catches in the three differently coloured traps were significantly different at each location (Tukey HSD,  $P < 0.05$ ).

Differences in trap colours at each location were not consistent across months as evident in sampling month and trap colour interactions before critical F value sphericity adjustment (Ayos:  $F_{46,483} = 1.61$ ,  $P = 0.009$ ; Konye:  $F_{46,405} = 1.46$ ,  $P = 0.030$ ). The highest trap catches occurred during the rainy season from May–October with another peak after harvest in February–March (Fig. 2). In Ayos, the variance components of the random factors - plantations, plantations x trap colour and plantation x trap colour x month explained 3.39, 0 (negative), and 7.93% of the variance with Wald P values of 0.075, 0.034, and  $< 0.001$  respectively. In Konye the random factors plantations, plantations x trap colour were not significant while plantation x trap colour x month

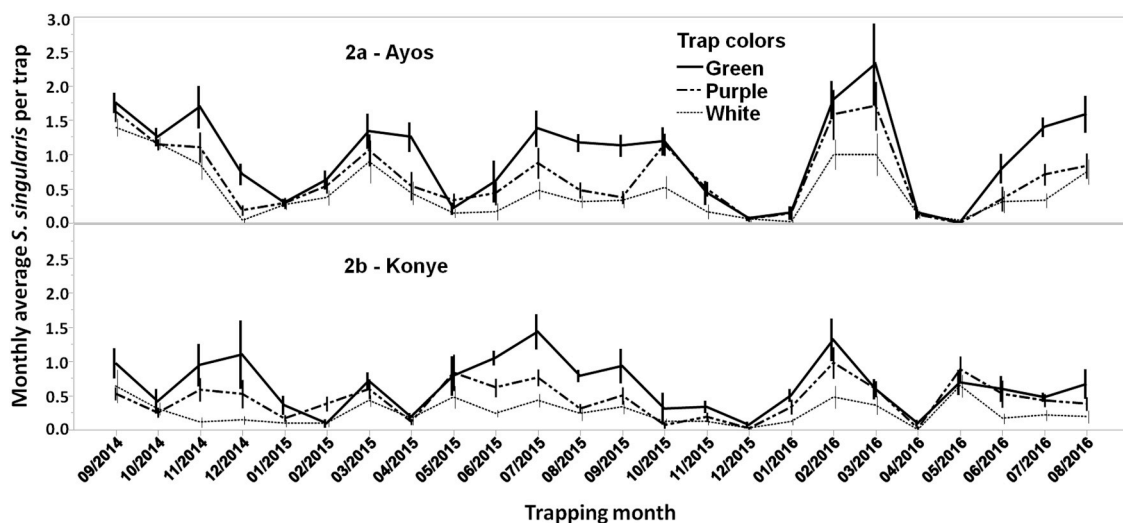


Fig. 2. Monthly counts (mean ± SEM) of the cocoa mirid, *Sahlbergella singularis*, in three colours of sex pheromone trap in Ayos (upper) and Konye Municipalities (lower).

explaining 6.48% of the variance and a Wald  $P < 0.001$ .

In the second analysis, where monthly counts were pooled for each year (12 consecutive months) of sampling, similar differences in male *S. singularis* counts were observed with trap colours independent of year for both locations (Tables 1 and 2). Counts of *S. singularis* in traps were higher overall in Ayos than in Konye and followed similar patterns in both years (Tables 1 and 2). Trap counts were higher in year 1 than in year 2 in both locations. The random factors plantation and plantation by trap color contributed insignificantly to total variation of the random factors in both locations (Wald  $P = 0.075-0.882$ ).

Spectral reflectance of trap materials from the front (external) and reverse (internal) side of each sample were similar, but overall reflectance was lower from the reverse surface, which corresponds to the inside surface the trap (Fig. 3). Front and reverse surfaces of white traps had similar reflectance values. The purple trap material had reflectance peaks in both short (approximately 380–480 nm) and long wavelengths (>650 nm). The reflectance curve for the green trap material was typical for a “plastic” green with a peak at approximately 530 nm, similar to that from green leaves. The white trap presumably contained fluorescent brightener(s) as the reflectance peaks exceeded 100% of the incident light in the 400–450 nm range (Fig. 3) (Goulson et al., 2000; Arnold et al., 2015).

#### 4. Discussion

The principal objectives of our study were to determine the effect of trap colour on attraction of male *S. singularis* to pheromone traps, and the level of consistency in the attractiveness across a large number of cocoa plantations in different environments (i.e. areas with different climates), all using a single trap design recommended by Mahob et al. (2011). Our results clearly support the hypothesis that appropriately

Table 1

Number of male *Sahlbergella singularis* (mean ± SE) in three colours of sex pheromone traps over two years (24 consecutive months) of trapping in Ayos and Konye municipalities of Cameroon.

Trap colour	Ayos		Konye	
	Year 1	Year 2	Year 1	Year 2
Green	12.3 ± 0.90a	11.1 ± 1.41a	8.50 ± 0.89a	6.57 ± 1.21a
Purple	8.63 ± 0.89b	7.54 ± 1.05b	5.48 ± 0.57b	4.93 ± 0.88b
White	6.50 ± 0.59c	4.67 ± 0.78c	3.21 ± 0.50c	2.76 ± 0.54c

\*Values followed by the same letter in a column are not significantly different (Tukey HSD,  $P > 0.05$ ).

Table 2

Analysis of variance of the effect of trap colour on counts of male *Sahlbergella singularis* in sex pheromone traps over a period of two years (24 consecutive months) in Ayos and Konye municipalities in Cameroon.

Sources of variation	Ndf <sup>a</sup>	Ddf <sup>a</sup>	F ratio	Prob > F
Ayos				
Trap colour (Green, Purple, White)	2	14	94.8	<0.001
Year (1 and 2)	1	21	7.12	0.014
Trap colour <sup>a</sup> Year	2	21	0.204	0.817
Konye				
Trap colour (Green, Purple, White)	2	12	46.3	<0.001
Year (1 and 2)	1	18	5.92	0.026
Trap colour <sup>a</sup> Year	2	18	1.41	0.269

<sup>a</sup> Ndf and Ddf are respectively numerator and denominator degrees of freedom.

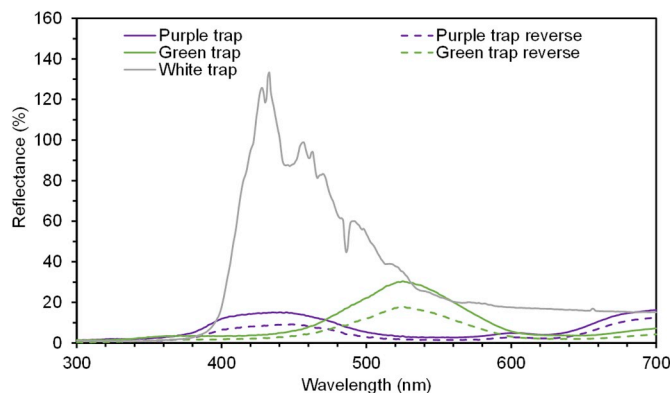


Fig. 3. Relative reflectance from two sides of purple, green and one side of white materials used in the construction of traps in the experiments. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

coloured traps can improve catches of *S. singularis*. Green (30.5% and 18.3% reflectance on front and reverse side respectively) was more attractive than purple (16.2% and 12.5% reflectance) followed by the standard white trap colour (reflectance: 133.4%). Green coloured traps resulted in nearly two-fold increase in catches of male *S. singularis* over those in the standard white trap. Of particular significance, the

difference among trap colours was independent of regions (despite agro-ecological differences), abundance of *S. singularis* or time-period, thus supporting the conclusion that using green traps is a reliable method of increasing catches of *S. singularis* in sex pheromone trap across a broad spectrum of the species densities and geographic locations.

When testing and optimising coloured traps, it is essential to work with quantified stimuli, i.e. colours that have been measured and reported in a way that is free from the bias of human visual perception. Extensive research has shown that colours that appear similar to the human eye can appear different to insects (Chittka et al., 1994). Complementary control approaches that include visual recognition and facilitate identification of host-plant cues might therefore improve insect monitoring tools (Mazzoni et al., 2011). Vision in Hemiptera is less well-characterised than in the Hymenoptera, Diptera or Lepidoptera. Vision studies in Hemiptera have been limited to aphids (Kirchner et al., 2005; Döring and Chittka, 2007), backswimmers *Notonecta* spp. (Bruckmoser, 1968; Bennett and Ruck, 1970), the stink bug *Nezara viridula* (L.) (Nobuyuki et al., 2014) and the psyllids *Ctenarytaina eucalypti* (Maskell), *C. bipartite* sp. n., *Anoconeossa bundoorensis* sp. n., and *Glycaspis brimblecombei* Moore (Farnier et al., 2014). All of these groups, as for most insects, have three (trichromatic) sensitivity peaks: in the UV (< 400 nm), blue (400–500 nm) and green (500–570 nm) (Fennell et al., 2019). Probably *S. sahlbergella* also has three photoreceptors like the majority of Hemiptera, and uses the green:blue opponency or green: (blue + UV) opponency to locate its host plant. So green or yellow traps are likely to be preferred during landing. Additional longer wavelength (>570 nm) sensitivity in tetrachromate Lepidoptera, Hymenoptera and Coleoptera may exist in *S. singularis* which would promote attraction by purple with high reflectance peak at ~700 nm (Fennell et al., 2019). Stimuli appearing blue, green and yellow to the human eye are likely to be highly prominent to Hemiptera species, but long-wavelength reflecting stimuli (i.e. red colours) are less readily detected. Ashfaq et al. (2005) reported that short wavelengths attract more insects than long wavelengths and insect ocelli are more responsive to light of shorter wavelength.

Reflectance measurement of the purple trap material showed two peaks; at the short and longer wavelength bands, but also an intermediate peak like that from green leaves. In comparison, reflectance from foliage tends to peak around 550 nm (Chittka et al., 1994). The white reflectance peaks exceeded 100%, most probably due to the presence of a fluorescent optical brightener (Goulson et al., 2000; Arnold et al., 2015). It is possible that mirids may be repelled by this fluorescence, leading to lower catches in white traps, although this was shown not to be the case for the maize weevil, *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Arnold et al., 2015). Moericke (1950, 1952) also demonstrated that aphids were not attracted to white colour and the landing response to other tested colours was highest against achromatic stimuli.

We deployed traps with medium-wavelength reflectance (green to humans) and traps with both short and long-wavelength reflectance peaks (purple to humans). The green traps would likely stimulate the long wavelength receptor of a trichromatic insect, whilst the purple traps would likely stimulate the short and medium wavelength receptors. Holopainen et al. (2001) reported that unbaited blue sticky traps were far more attractive to *Lygus rugulipennis* (Poppius) than yellow. The former had a reflectance peak at 450 nm like that of the green trap used in our study, while the latter showed peak reflectance >600 nm. Previous work on *Lygus* spp. showed poor responses to “red” and “orange” unbaited traps (Blackmer and Cañas, 2005), although both trap colours had reflectance around 500 nm in addition to the long wavelength reflectance. Conversely, green, yellow, purple, blue and clear traps caught larger numbers of insects (Blackmer and Cañas, 2005). These are traps that all have relatively good reflectance in medium wavelengths (around 500 nm) in addition to short- and long-wavelength reflectance, which correspond to the green trap, but not the purple trap used in our experiments. While the white trap had

reflectance around 500 nm, the optical brighteners reduce major reflectance to less than 450 nm. Consequently, based on results of Blackmer and Cañas, 2005, we would predict that green traps work most effectively, and indeed this was the case in our experiments.

Insect response to colour also appears to be species-specific (Blackmer et al., 2008). This specificity is supported by the evidence of numerous studies which have shown diverse preferences of colours (Ranamukhaarachchi and Wickramarachchi, 2007; Mazzoni et al., 2011; Thongjua et al., 2015). Green was preferred for the capture of the hemipteran bug, *Neomegalotomus parvus* (Westwood) (Ventura and Panizzi, 2004) and *C. eucalypti* (Farnier et al., 2014). During autumn 2004 and summer 2005, the preference order of *Lygus* spp. was green followed by purple then white (Blackmer et al., 2008). These results highlight the green colour attractiveness to hemipteran bugs and correspond well with our results on the attractiveness of green to *S. singularis*.

Combining colour and odour cues can have additive or even synergistic effects in mediating insect responses to a stimulus source (Giurfa et al., 1995; Raguso and Willis, 2005; Arnold et al., 2015). Traps containing both types of cues can have greater catches, compared with traps with only a visual or odour-based attractant. Conversely, presenting competing cues, e.g. odour from a different source to a visual stimulus, can provide information about the relative importance of visual versus odour cues in different species (Otálora-Luna et al., 2013; Pan et al., 2015; Arnold et al., 2016).

In our study, *S. singularis* catches in white sex pheromone traps were similar to those reported by Mahob et al. (2011) and Sarfo (2013). This relatively low catch was a reflection of the low abundance of *S. singularis* in Cameroon (Babin et al., 2008, 2010). Recent research by Sarfo et al. (2018a) showed that *S. singularis* sex pheromone trap catches can be improved substantially with trap placement in the middle of the cocoa canopy. Furthermore, Babin et al. (2010) showed that the highest densities of *S. singularis* occur in “pockets” where light incidence through the canopy is highest. Cocoa trees receiving light display microclimatic conditions suitable for development of mirid nymphs.

The higher trap catches reported by Sarfo et al. (2018a) from the middle of the cocoa tree canopy would substantially improve the potential for the sex pheromone and trap to be used in mass trapping (Gregg et al., 2018; Sarfo et al., 2018b), mating disruption (Lowor et al., 2009) or auto-dissemination of entomopathogenic fungi (Lopes et al., 2014; Tewaril et al., 2014). In the latter, male *S. singularis* are attracted to the trap where they are inoculated with spores of entomopathogens for wider dissemination to the target insect population in and around the cocoa plantations as part of the integrated control of mirid pests. Such improvement in the control of *S. singularis* with green traps could potentially lead to substantial reductions in the use of insecticides that have been implicated in the reduction in cocoa flower pollinators which have been shown to be essential for improving cocoa pod yield (Toledo-Hernandez et al., 2017).

Trap catches can also be used in time series analysis to model the effect of climate (i.e., temperature, rainfall and relative humidity) and plant phenology on the population dynamics of *S. singularis* and to compare these with a recent model from Djoukwe Tapi et al. (2018) to provide insights on the seasonality of this pest.

## Acknowledgements

The authors wish to thank the IITA Cameroon Entomopathology team, Cocoa Eco and ProCISA staff for their support during the execution of this study. Financial support was provided in part by the Dutch Development Organization (SNV) through the Cocoa Eco project, German Corporation for International Cooperation GmbH (GIZ) through the ProCISA project (Contract No 81193733), and CGIAR CRP Humid-tropics. The research was conducted while the senior author was on secondment to IITA from IRAD. The manuscript is part of PhD dissertation submitted by the senior author to the University of Yaoundé I.



## References

- Adu-Acheampong, R., Archer, S., Leather, S., 2012. Resistance to dieback disease caused by *Fusarium* and *Lasiodiplodia* species in cacao (*Theobroma cacao* L.) genotypes. *Exp. Agric.* 48, 85–98.
- Adu-Acheampong, R., Jiggins, J., van Huis, A., Cudjoe, A.R., Johnson, V., Sakyi-Dawson, O., Ofori-Frimpong, K., Osei-Fosu, P., Tei-Quartey, E., Jonfia-Essien, W., Owusu-Manu, M., Nana Karikari Addo, M.S., Afari-Mintah, C., Amuzu, M., Nyarko Eku-X, N., Quarshie, E.T.N., 2014. The cocoa mirid (Hemiptera: Miridae) problem: evidence to support new recommendations on the timing of insecticide application on cocoa in Ghana. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 34, 58–71.
- Anikwe, J.C., Makanjuola, W.A., 2013. Effectiveness of some ecological pest management practices against the brown cocoa mirid, *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae) in Nigeria. *Zoologist* 11, 1–6.
- Anikwe, C.J., Otuonye, A.H., 2015. Dieback of cocoa (*Theobroma cacao* L.) plant tissues caused by the brown cocoa mirid *Sahlbergella singularis* Haglund (Hemiptera: Miridae) and associated pathogenic fungi. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 35, 193–200. <https://doi.org/10.1017/S1742758415000120>.
- Anonymous, 2015. Plan National d'adaptation aux changements climatiques du Cameroun. Ministère de l'Environnement et de la Protection de la Nature et du Développement durable, p. 154.
- Anonymous, 2016. Le Cameroun en bref. [www.planetere.org/bulletin/2010/pdf-doc/Regions-du-Cameroun](http://www.planetere.org/bulletin/2010/pdf-doc/Regions-du-Cameroun).
- Arnold, S.E.J., Stevenson, P.C., Belmain, S.R., 2015. Responses to colour and host odour cues in three cereal pest species, in the context of ecology and control. *Bull. Entomol. Res.* 105, 417–425. <https://doi.org/10.1017/s0007485315000346>.
- Arnold, S.E.J., Stevenson, P.C., Belmain, S.R., 2016. Shades of yellow: interactive effects of visual and odour cues in a pest beetle. *PeerJ* 4, e2219. <https://doi.org/10.7717/peerj.2219>.
- Ashfaq, M., Khan Rashid, A., Khan Ahsan, M., Rasheed, F., Shahid, Hafeez, 2005. Insect orientation to various colour lights in the agricultural biomes of Faisalabad. *Pak. Entomol.* 27, 49–52.
- Ayenor, G.K., Van Huis, A., Obeng-Ofori, D., Padi, B., Röling, N.G., 2007. Facilitating the use of alternative capsid control methods towards sustainable production of organic cocoa in Ghana. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 27, 85–94.
- Babin, R., Bisseleua, D.H.B., Dibog, L., Lumaret, J.P., 2008. Rearing method and life-table data for the cocoa mirid bug *Sahlbergella singularis* Haglund (Hemiptera: Miridae). *J. Appl. Entomol.* 132, 366–374.
- Babin, R., ten Hoopen, G.M., Cilas, C., Enjalric, F., Yede Gendre, P., Lumaret, J.P., 2010. Impact of shade on the spatial distribution of *Sahlbergella singularis* in traditional cocoa agroforests. *Agric. For. Entomol.* 12, 69–79.
- Bagny Beilhe, L., Babin, R., ten Hoppen, M., 2018. Insect pests affecting cacao. In: Umahara, P. (Ed.), *Achieving Sustainable Cultivation of Cocoa*. Burleigh Dodds Science Publishing, Cambridge, UK, pp. 3003–3326.
- Blackmer, J.L., Cañas, L.A., 2005. Visual cues enhance the response of *Lygus hesperus* (Heteroptera: Miridae) to volatiles from host plants. *Environ. Entomol.* 34, 1524–1533. <https://doi.org/10.1603/0046-225x-34.6.1524>.
- Bagny Beilhe, L., Piou, C., Tadu, Z., Babin, R., 2018. Identifying ant-mirid spatial interactions to improve biological control in cacao-based agroforestry system. *Eviron. Entomol.* 47, 551–558. <https://doi.org/10.1093/ee/nvy018>.
- Bennett, R.R., Ruck, P., 1970. Spectral sensitivities of dark and light adapted *Notonecta* compound eyes. *J. Insect Physiol.* 16, 83–88.
- Blackmer, J.L., Byers, J.A., Rodriguez-Saona, C., 2008. Evaluation of color traps for monitoring *Lygus* spp.: design, placement height, time of day, and non-target effects. *Crop Protect.* 27, 171–181.
- Bruckmoser, P., 1968. Die spektrale empfindlichkeit einzelner sehzellen des rückenschwimmers *Notonecta glauca* L. (Heteroptera). *Z. für Vgl. Politikwiss. (ZfVP)* 59, 187–204.
- Chittka, L., Shmida, A., Troje, N., Menzel, R., 1994. Ultraviolet as a component of flower reflections, and the colour perception of Hymenoptera. *Vis. Res.* 34, 1489–1508.
- Chittka, L., Kevan, P.G., 2005. Flower colour as advertisement. In: Dafni, A., Kevan, P.G., Husband, B.C. (Eds.), *Practical Pollination Biology*. Enviroquest Ltd., Cambridge, ON, Canada, pp. 157–196.
- De Miré, B.P., 1977. La dynamique des populations de Mirides et ses implications. In: Lavabre, E.M. (Ed.), *Les Mirides du Cacaoyer*. G.-P. Maisonneuve et Larose, Paris, pp. 171–186.
- De Miré, B.P., 1985. Enquête sur la tolérance des mirides du cacaoyer aux insecticides au Cameroun, vol. 29. *Café Cocoa Thé*, pp. 183–196.
- Decazy, B., 1979. La lutte contre les mirides du cacaoyer au Cameroun: nouvelles données sur les insecticides thermonébulisables. *Café Cocoa Thé*. No23, 187–192.
- Djoukwe Tapi, M., Beigny Bilhe, L., Bouang, S., Dumont, Y., 2018. Models for Miridae, a cocoa insect pest. Application in control strategies. *Math. Methods Appl. Sci.* 41, 8673–8696.
- Döring, T.F., Chittka, L., 2007. Visual ecology of aphids—a critical review on the role of colours in host finding. *Arthropod-Plant Inte.* 1, 3–16. <https://doi.org/10.1007/s11829-006-9000-1>.
- El-Sayed, A., 2017. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. <http://www.pherobase.com>.
- Entwistle, P.F., 1972. In: *Pests of Cocoa*. Longman Group Ltd, London, UK, p. 779.
- Farnier, K., Dyer, A.G., Steinbaur, M.J., 2014. Related but not alike: not all Hemiptera are attracted to yellow. *Front. Ecol. Evol.* 2, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fevo.2014.00067>.
- Fennell, J.T., Fountain, M.T., Paul, N.D., 2019. Direct effects of protective cladding material on insect pests in crops. *Crop Protect.* 121, 147–156.
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W.W., Emmerson, M., Morales, M.B., Ceryngier, P., Liirah, J., Tschamtké, T., Winqvist, C., Eggers, S., Bommarco, R., Pärt, T., Bretagnolle, V., Plantegenest, M., Clement, L.W., Dennis, C., Palmer, C., Onate, J.J., Guerrero, I., Hawro, V., Aavik, T., Thies, C., Flohre, A., Hänke, S., Fischer, C., Goedhart, P.W., Inchausti, P., 2010. Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic Appl. Ecol.* 11, 97–105.
- Giurfa, M., Nunez, J., Chittka, L., Menzel, R., 1995. Colour preferences of flower-naive honeybees. *J. Comp. Physiol. A* 177, 247–259.
- Goulson, D., Martinez, A.-M., Hughes, W.O.H., Williams, T., 2000. Effects of optical brighteners used in biopesticide formulations on the behavior of pollinators. *Biol. Control* 19, 232–236.
- Gregg, P.C., Del Socorro, A.P., Landolt, P.J., 2018. Advances in attract-and-kill for agricultural pests: beyond pheromones. *Annu. Rev. Entomol.* 63, 453–470.
- Hassan, Al-A., Mohammed, Al-D., 2004. Trapping efficiency of various traps for insects in cucumber crop under greenhouse conditions in Riyadh, Saudi Arabia. *Pak. J. Biol. Sci.* 7, 1213–1216.
- Holopainen, J.K., Raiskio, S., Wulff, A., Tiilikka, K., 2001. Blue sticky traps are more efficient for the monitoring of *Lygus rugulipennis* (Heteroptera: Miridae) than yellow sticky traps. *Agric. Food Sci. Finl.* 10, 277–284.
- Humann-Guilleminot, B., Bnikowski, L.J., Jenni, L., Hilke, G., Glauser, G., Helfenstein, F., 2019. A nation wide survey of neonicotinoid insecticides in agricultural land with implications for agri environment scheme. *J. Appl. Ecol.* 00, 1–13.
- IRAD, 2008. Deuxième rapport sur l'état des ressources phylogénétiques pour l'alimentation et l'agriculture au Cameroun, p. 93.
- Jagoret, P., 2011. Analyse et évaluation de systèmes agroforestiers complexes sur le long terme Application aux systèmes de culture à base de cacaoyer au Centre Cameroun. Thèse de Doctorat, Université de Montpellier SupAgro, Département Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosciences et Environnement, p. 288. Montpellier, France.
- Kibria, G., 2016. Pesticides and its Impact on Environment, Biodiversity and Human Health-A Short Review, p. 5. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4487.4965/1>.
- Kirchner, S.M., Döring, T.F., Saucke, H., 2005. Evidence for trichromacy in the green peach aphid, *Myzus persicae* (Sulz.) (Hemiptera: aphididae). *J. Insect Physiol.* 51, 1255–1260. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.07.002>.
- Kumar, R., Ansari, A.K., 1974. Biology, immature stages and rearing of cocoa-capsids (Miridae: heteroptera). *J. Linn. Soc.* 54, 1–29.
- Lavabre, E.M., 1977. Variations saisonnières de populations. In: Lavabre, E.M. (Ed.), *Les Mirides du Cacaoyer*. G.-P. Maisonneuve et Larose, Paris, pp. 155–170.
- Lopes, R.B., Laumann, R.A., Moore, D., Oliveira, M.W.M., Faria, M., 2014. Coincidence of the fungus *Beauveria bassiana* and pheromone in attract and kill strategy of the banana weevil, *Cosmopolitus sordidus*. *Entomol. Exp. Appl.* 151, 75–85. <https://doi.org/10.1111/eea.12171>.
- Lowor, S.T., Gregg, P.C., Del Socorro, A.P., 2009. Potential for pheromone based attract-and-kill and mating disruption of the green mirid, *Creontiades dilutus* (stål) (Hemiptera: Miridae). *Int. J. Agric. Res.* 4, 153–162. <https://doi.org/10.3923/ijar.2009.153.162>.
- Mahob, R.J., Babin, R., Ten Hoopen, G.M., Dibog, L., Yede, Hall D.R., Bilong Bilong, C.F., 2011. Field evaluation of synthetic sex pheromone traps for the cocoa mirid *Sahlbergella singularis* (Hemiptera: Miridae). *Pest Manag. Sci.* 67, 672–676.
- Mahob, R.J., Ndoumbè-Nkeng, M., Ten Hoopen, G.M., Dibog, L., Nyassé, S., Rutherford, M., Mbenoun, M., Babin, R., Amang A Mbang, J., Yede, Bilong Bilong, C.F., 2014. Pesticides use in cocoa sector in Cameroon: characterization of supply source, nature of active ingredients, fashion and reasons for their utilization. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 8, 1976–1989.
- Mahob, R.J., Feudjo Thiemele, R., Diboh, L., Babin, R., Fotso Toguem, Y.G., Mahot, H., Baleba, L., Owaona Dongo, P.A., Bilong Bilong, C.F., 2019. Field evaluation of the impact of *Sahlbergella singularis* Haglund infestations on the productivity of different *Theobroma cacao* L. genotypes in Southern Cameroon. *J. Plant Dis. Prot.* <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00221-x>.
- Mahot, H.C., Membang, G., Hanna, R., Begoude, D.A.D., Bagny Beilhe, L., Bilong, B.C.F., 2019. Laboratory assessment of virulence of Cameroonian isolates of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against mirid bugs *Sahlbergella singularis* Haglund (Hemiptera: Miridae). *Afr. Entomol.* 27, 86–96.
- Mazzoni, V., Trona, F., Ioriatti, C., Lucchi, A., Eriksson, A., Anfora, G., 2011. Attractiveness of different colours to *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: cicadellidae) adults. *Integr. Protect. Prod. Viticult.* 67, 281–284.
- Moericke, V., 1950. Über das Farbsehen der Pfirsichblattlaus (*Myzodes persicae* Sulz.). *Z. Tierpsychol.* 7, 265–274. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1950.tb02199.x>.
- Moericke, V., 1952. Farben als Landeize für geflügelte Blattläuse (Aphidoidea). *Z. Naturforschorsch 7b*, 304–309.
- Miller, J.R., Gut, L.J., 2015. Mating disruption for the 21st century: matching technology with mechanism. *Environ. Entomol.* 44, 427–453. <https://doi.org/10.1093/ee/nvv052>.
- Nwana, I.E., Adesiyun, S.O., Youdeowei, A., 1979. Evaluation of some new pesticides for the control of cocoa mirids: laboratory assessments. In: Actes de la 7ème Conférence Internationale sur la Recherche Cacaoyère. Douala, Cameroun, pp. 453–455.
- Nwana, I.E., Youdeowei, A., 1978. The spatial distribution of three species of Hemiptera in a cocoa farm in Ibadan, Nigeria. *Niger. J. Entomol.* 3, 27–33.
- Nobuyuki, E., Wakakuwa, M., Arikawa, K., Hironaka, M., 2014. Spectral preference in a free flying condition of the southern green stink bug, *Nezara viridula* (heteroptera: pentatomidae) jpn. *J. Appl. Entomol.* 5, 28, 23–38.
- Otálora-Luna, F., Lapointe, S.L., Dickens, J.C., 2013. Olfactory cues are subordinate to visual stimuli in a neotropical generalist weevil. *PLoS One* 8, e53120. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053120>.
- Padi, B., Hall, D., Farman, D., Downham, M., Lowor, S., Sarfo, J.E., 2000. Evidence of sex attractants in the cocoa mirids *Distantiella theobroma* (Dist.) and *Sahlbergella singularis* Hagl. (Heteroptera: Miridae) in field-trapping experiments. In: *Proceedings*

- of the 13<sup>th</sup> International Cocoa Research Conference, vol. 1. Kota Kinabalu, Sabah, Malaysia, pp. 395–400.
- Padi, B., Oduor, G., Hall, D.R., 2002. Development of Mycopesticides and Pheromones for Cocoa Mirids in Ghana, R 7249 (ZA 0249). Final Technical Report. DFID Crop Protection Programme. [https://assets.publishing.service.gov.uk/media/57a08d38e5274a31e000170c/R7249\\_FTR.pdf](https://assets.publishing.service.gov.uk/media/57a08d38e5274a31e000170c/R7249_FTR.pdf).
- Pan, H., Xiu, C., Lu, Y., 2015. A combination of olfactory and visual cues enhance the behavioral responses of *Apolygus lucorum*. *J. Insect Behav.* 28, 525–534.
- Posada, F.J., Chaves, F.C., Gianfagna, T.J., Pava-Ripoll, M., Hebbar, P., 2010. Establishment of the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* as an endophyte in cocoa pods (*Theobroma cacao* L.). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.* 13, 71–78.
- Raguso, R.A., Willis, M.A., 2005. Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by wild hawkmoths, *Manduca sexta*. *Anim. Behav.* 69, 407–418. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.04.015>.
- Ranamukhaarachchi, S.L., Wickramarachchi, K.S., 2007. Color preference and sticky traps for field management of thrips *Ceratothripoides claratris* (Shumsher) (Thysanoptera: thripidae) in tomato in Central Thailand. *Int. J. Agric. Biol.* 9, 392–397.
- Sampson, C., Hamilton, J.G.C., Kirk, W.D.J., 2012. The effect of trap colour and aggregation pheromone on trap catch of *Frankliniella occidentalis* and associated predators in protected pepper in Spain. *IOBC-WPRS Bull.* 80, 313–318.
- Sarfo, J.E., 2013. Behavioural Response of Cocoa Mirids, *Sahlbergella Singularis* Hagl. And *Distantiella Theobroma* Dist. (Heteroptera: Miridae) to Sex Pheromones. Thesis, Degree of Doctor of Philosophy. University of Greenwich, p. 283.
- Sarfo, J.E., Campbell, C.A.M., Hall, D.R., 2018. Design and placement of synthetic sex pheromone traps for cacao mirids in Ghana. *Int. J. Trop. Insect Sci.* 38, 122–131.
- Sarfo, J.E., Campbell, C.A.M., Hall, D.R., 2018. Optimal pheromone trap density for mass trapping cacao mirids. *Entomol. Exp. Appl.* 166, 565–573.
- Sarmah, A.K., Müller, K., Ahmad, R., 2004. Fate and behaviour of pesticides in the agroecosystem—a review with a New Zealand perspective. *Austral. J. Soil Res.* 42, 125–154.
- SAS Institute, 2019. JMP® Pro 14.3. SAS Institute Inc., Cary, NC, pp. 1989–2019.
- Sounigo, O., Coulibaly, N., Brun, L., N’Goran, J., Cilas, C., Eskes, A.B., 2003. Evaluation of resistance of *Theobroma cacao* L. to mirids in Côte d’Ivoire: results of comparative progeny trials. *Crop Protect.* 22, 615–621.
- Tewaril, S., Leskey, T.C., Nielsen, A.L., Pineoro, J.C., Rodriguez-Saona, C.R., 2014. Use of pheromones in insect pest management, with special attention to weevil pheromones. In: Abrol, D.P. (Ed.), *Integrated Pest Management: Current Concepts and Ecological Perspectives*. Academic Press, ISBN 9780123985293, pp. 141–168. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12398529-3.00038-5>.
- Thongjua, T., Thongjua, J., Sriwareen, J., Khumpairun, J., 2015. Attraction effect of thrips (Thysanoptera: thripidae) to sticky trap color on orchid greenhouse condition. *J. Agr. Tech.* 11, 2451–2455.
- Tijani, A.A., 2006. Pesticides use practices and safety issues: the case of cocoa farmers in Ondo State, Nigeria. *J. Hum. Ecol.* 19, 183–190.
- Toledo-Hernandes, Wagner, T.C., Tschardtke, T., 2017. Neglected pollinators: can enhanced pollination services improve cocoa yields? A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 247, 137–148.
- Ventura, M.U., Panizzi, A.R., 2004. Responses of *Neomegalotomus parvus* (Hemiptera: alydidae) to color and male-lured traps. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 47, 531–535.
- Voula, V.A., Manga, E.F., Messi, A.L., Mahob, J.R., Begoude, B.A., 2018. Impact of mirids and fungal infestation on dieback of cocoa in Cameroon. *J. Entomol. Zool. Studies.* 6, 240–245.
- Wessel, M., Quist-Wessel, P.M.F., 2015. Cocoa production in West Africa, a review and analysis of recent developments. *NJAS - Wageningen J. Life Sci.* 74–75, 1–7.
- Witzgall, P., Kirsch, P., Cork, A., 2010. Sex pheromones and their impact on pest management. *J. Chem. Ecol.* 36, 80–100.
- Yede, Babin, R., Djieto-Lordon, C., Cilas, C., Dibog, L., Mahob, R., Bilong Bilong, C.F., 2012. True bug (heteroptera) impact on cocoa fruit mortality and productivity. *J. Econ. Entomol.* 105, 1285–1292.