

# Sensibilité des larves de moustiques à différentes espèces d'Hyphomycètes entomopathogènes (1)

Guy RIBA (2), Aliou KEITA (3),  
Jean-Jacques VINCENT (4)

---

## Résumé

Plusieurs souches d'Hyphomycètes entomopathogènes appartenant à diverses espèces ont été appliquées contre trois espèces de moustiques. Parmi elles quelques souches de *Metarhizium anisopliae* et *Penicillium citrinum* se sont révélées très agressives à l'égard des larves de *Culex pipiens*, *Aedes aegypti* et *Anopheles stephensi*. Elles manifestent leur effet insecticide soit par l'intermédiaire de toxines soit en colonisant l'hémocoèle.

Les perspectives de lutte contre les moustiques à l'aide de ces germes sont évoquées.

**Mots-clés :** Hyphomycètes entomopathogènes — Agressivité — Toxémie — *Culex pipiens* — *Aedes aegypti* — *Anopheles stephensi*.

---

## Summary

SUSCEPTIBILITY OF MOSQUITO LARVAE TO DIFFERENT SPECIES OF ENTOMOPATHOGENOUS HYPHOMYCETES. *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces fumoso-roseus*, *Beauveria tenella*, *Hirsutella thompsoni*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium lecanii* are not pathogenic to mosquito larvae. But *Penicillium citrinum* and *Metarhizium anisopliae* are aggressive against *Culex pipiens*, *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti* larvae. For 4th instar larvae LT 50 is about 1.7 day at  $10^6$  sp/ml. At  $10^7$  sp/ml larvae are killed by toxic effect after accumulation of conidia in the gut. Anyway field applications of these fungi are necessary to determine their real potentiality as microbial control agents of mosquitoes.

**Key words :** Entomopathogenic Hyphomycetes — Aggressiveness — Toxins — *Culex pipiens* — *Aedes aegypti* — *Anopheles stephensi*.

## Introduction

L'apparition de races de moustiques résistantes aux insecticides chimiques et l'augmentation croissante du prix de revient de ces produits ont encouragé les recherches de lutte biologique contre ces

Diptères. La découverte de la souche « israelensis » de *Bacillus thuringiensis* a accéléré cet engouement tout en facilitant la lutte contre les moustiques.

Par analogie avec leur mode d'action dans les populations d'insectes ravageurs de culture, on peut penser que les Hyphomycètes entomopathogènes

---

(1) Ce travail effectué à la Station de Lutte biologique I.N.R.A. de La Minière, 78280 Guyancourt, a été financé par l'Organisation Mondiale de la Santé dans le cadre du programme spécial d'étude des maladies tropicales n° 800262.

(2) Chargé de recherches.

(3) Docteur de 3<sup>e</sup> cycle.

(4) Maître de recherches O.R.S.T.O.M.

peuvent juguler les populations de moustiques selon deux processus : soit par effet choc à la suite d'une introduction massive du germe dans l'écosystème, soit par induction d'une épizootie plus ou moins régulière dans l'espace et dans le temps comme cela a été observé dans divers agrosystèmes (Ferron, 1981).

La recherche de souches de champignons entomopathogènes reste une priorité bien que de nombreux travaux aient été réalisés (Daoust et Roberts, 1982 ; Roberts, 1970 ; Sweeney et Panter, 1977 ; Federici, 1981). A cette fin nous avons étudié l'agressivité de nombreuses espèces et souches d'Hyphomycètes entomopathogènes à l'égard des larves de trois Culicidés : *Aedes aegypti* (Linné), *Anopheles stephensi* Liston, et *Culex pipiens pipiens* Linné.

## Matériel et méthodes

### LES SOUCHES D'HYPHOMYCÈTES

Les souches éprouvées sont extraites de la mycothèque de la Station de Recherches de Lutte biologique INRA, de La Minière. Elles sont caractérisées d'une part par la date et le lieu d'isolement, d'autre part par le nom de l'insecte-hôte d'origine.

Les souches sont cultivées sur milieu complet gélosé qui contient 10 g glucose ; 0,36 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 1,42 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ; 1 g KCl ; 0,6 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ; 0,7 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  ; 5 g extrait de levure ; 20 g agar dans 1 000 ml d'eau distillée. Les conidies sont récoltées après 15 jours de culture à 25°C.

### LES SOUCHES DE MOUSTIQUES

Toutes les souches de moustiques ont été aimablement fournies par le Service d'entomologie médicale de l'O.R.S.T.O.M. à Bondy (1). La souche de *Culex pipiens pipiens* est élevée depuis de nombreuses générations en laboratoire. La souche *Aedes aegypti* utilisée est originaire de Bora-Bora, tandis que la souche d'*Anopheles stephensi* vient de la London School of Hygiene and Tropical Medicine.

Les moustiques sont élevés en ambiance contrôlée à 25°C et 80 % d'humidité relative. Ils sont nourris quotidiennement avec un broyat de croquettes « Canina »<sup>®</sup>.

## LES TESTS BIOLOGIQUES

Dans la mesure où nous ne connaissons pas les voies de pénétration préférentielles de toutes les espèces éprouvées sur larves de moustiques, le titrage biologique des champignons a été effectué par immersion des insectes dans des suspensions conidiennes de concentration connue.

Les expérimentations sont conduites selon un protocole de type bloc complet à quatre répétitions. Pour chaque variante quatre lots de dix larves de stade II ou IV sont contaminées. Elles sont placées dans des godets de 15 cm<sup>2</sup> de section contenant 100 ml de suspension.

La mortalité est contrôlée quotidiennement à compter du premier jour. Les cadavres sont observés au microscope optique ( $\times 100$ ) en vue de la détection d'éventuelles multiplications intrahémocoeliennes du germe. Nous considérons qu'il y a mortalité par mycose lorsque le champignon a colonisé tout ou partie de l'hémocoèle. L'essai dure cinq jours. Le temps léthal 50 (TL 50) ou la dose létale 50 (DL 50) sont calculés par régression ou en arc sin  $\sqrt{\% \text{ mortalité}}$  après transformation des données.

## Résultats

### 1. ÉTUDE DE L'AGRESSIVITÉ DE PLUSIEURS ESPÈCES À L'ÉGARD DE LARVES D'*Aedes aegypti*

Les essais comparatifs sont effectués avec des suspensions titrant 10<sup>7</sup> conidies/ml. Le tableau I met en évidence de grandes différences en fonction des espèces ou des souches d'Hyphomycètes :

— ainsi certaines espèces ne semblent pas pathogènes pour les moustiques telles : *Nomuraea rileyi*, *Paecilomyces fumoso-roseus*, *Beauveria tenella*, *Hirsutella thompsoni*, *Paecilomyces lilacinus*, *Verticillium lecanii* ;

— d'autres souches telles celle de *Penicillium citrinum* tuent les larves de moustiques sans se multiplier dans l'hôte, probablement grâce à un processus toxémique ;

— au sein de l'espèce *Metarhizium anisopliae* l'échantillonnage analysé est suffisamment vaste pour considérer que la variété « major » de cette espèce n'est pas pathogène pour les moustiques (12 souches ont été éprouvées) ;

(1) Nous remercions le Dr. Coz pour son accueil, ses conseils et son amabilité.

Agressivité de différentes espèces d'Hyphomycètes à l'égard des larves de stade II d'*Aedes aegypti*

Souche M. anisopliae	Pays d'origine	Insecte-hôte d'origine	TL 50 en j.	Pourcentage de mortalité		Souche M. anisopliae	Pays d'origine	Insecte-hôte d'origine	TL 50 en j.	Pourcentage de mortalité	
				Total	mycose					Total	Mycose
2 M	Afrique	Oryctes rhinoceros		0	0	164	Brésil	Mahanarva posticata	3,8	68	61,7
5 M	-	Strataegus aloeus		0	0	165	-	- -	4,7	54	48,6
9	-	Schistocerca gregaria		0	0	167	-	- -	2,8	83	76,9
14	France	Phyllopertha horticola		0	0	169	-	- -	2,7	86	71,1
15	Afrique	Oryctes rhinoceros		0	0	171	-	Cerpopide	2,3	94	73,9
21 M	N. Zélande	Costilytra zealandica		0	0	Metarhizium flavoviridae	France	Curculionide		0	0
22	-	Heteronychus sancta Helena	4,0	40,6	33,4	Nomurea rileyi					
23	-	Oxycanus sp.		0	0	5	U.S.A.	Anticarsia gemmatilis		0	0
25 M	La Minière	Oryctes monoceros		0	0	7	Japon	Bombyx mori		0	0
29 M	-	Oryctes rhinoceros		0	0	8	-	Spilosoma sp.		0	0
32 I	-	Cetonia aurata		0	0	Paecilomyces fumoso-roseus					
34 M	-	- -		0	0						
37	-	Platysma vulgare	4,2	50	42,1	4	France	Mamestra brassicae		0	0
40	France	Melolontha melolontha	3,6	60	48,4	35	-	- -		0	0
42	Guadeloupe	Phyllophaga pratrucloides	4,1	57,3	53,9	39	-	Scotia segetum		0	0
44 M	La Minière	Leptinotarsa decemlineata		0	0	Beauveria tenella 47	-	Melolontha melolontha		0	0
51 M	La Minière	Oryctes rhinoceros		0	0	Beauveria bassiana 147	-	Ostrinia nubilalis		13	3,3
66 M	Poitiers	Oryctes nasicornis		0	0	Penicillium citrinum	Inde	?	1,0	100	0
69 M	Polynésie	Oryctes sp.		0	0	Hirsutella thompsoni					
73 M	Indes	Oryctes rhinoceros		0	0	A	Cuba	Acarien		0	0
78	Madagascar	Hoplochelus ryzotrogoïdes		93,4	32,2	C	CBS 311-77			0	0
84	Guadeloupe	Cosmopolites sordidus	2,4	79,6	63,7	D	CBS 450-78			0	0
85	-	Metamasius sp.	2,1	75,3	59,8	E	CBS 555-77			0	0
91	France	Taupin		33	26,81	Paecilomyces lilacinus	Pérou	Meloïdogyne incognita		0	0
95 M	-	Oryctes nasicornis		0		Verticillium lecanii					
116	Brésil	Mahanarva posticata	3,1	74,1	73,02	B	Hollande	Trialeurodes vaporariorum		0	0
127	Brésil E9 CS	- -	1,2	93,4	46,7	F	France	Cochenille		0	0
139	France	Ostrinia nubilalis	1,1	98	27,7	G	France	Chilo suppressalis		0	0
144	Brésil	Mahanarva posticata		3,6	16,3	V	France	Aleurode		0	0
148	-	- -		43	36,2						
149	-	- -		34	27,1						
150	-	- -	2,6	88	78,4						
151	-	Zulia enteriana	1,9	95	72,6						
152	-	- -	3,4								
153	-	- -	2,9	86	73,4						
158	-	- -	3,3	71	64						
160	U.S.A.	Elateride	4,0	62	56,1						

Les souches accompagnées des lettres M ou I correspondent aux variétés major ou intermédiaires. Les larves ont été traitées par des suspensions conidiennes titrant 10<sup>7</sup> sp/ml

— l'ensemble des souches « minor » de cette espèce apparaît plus ou moins agressif à l'égard des larves d'*Aedes aegypti*. Nous n'avons pas noté de relation entre l'agressivité à l'égard des moustiques, le lieu géographique d'isolement ou l'insecte-hôte d'origine.

## 2. ÉTUDE COMPARÉE DE L'AGRESSIVITÉ DE PLUSIEURS SOUCHES DE *M. anisopliae* À L'ÉGARD DE LARVES D'*Aedes aegypti*

L'effet dose déterminé sur la mortalité par mycose est analysé sur sept souches de *M. anisopliae*. Il fait apparaître une plus grande agressivité des souches Ma 139, 78 et 127 (tabl. II).

Par ailleurs la figure 1 montre que le TL 50 est très fortement influencé par la dose du pathogène. Ainsi lorsque les larves sont mises en présence d'une suspension titrant  $10^7$  sp/ml, la moitié d'entre elles meurent en moins de 0,8 jour tandis que le TL 50 est de 1,7 jour à  $10^5$  sp/ml.

Enfin il faut noter que toutes les larves ont ingéré le pathogène qui s'accumule dans le tube digestif au niveau du mésentéron. Au cours des 24 premières heures qui suivent le traitement aucune des larves mortes observées au microscope optique ( $\times 40$ ) ne contient d'éléments fongiques dans l'hémocoèle.

TABLEAU II

Étude comparée en fonction de la dose de l'agressivité des souches de *M. anisopliae* à l'égard des larves de stade II d'*Aedes aegypti* (seule la mortalité par mycose est considérée ; les chiffres accompagnés de la même lettre ne sont pas significativement différents au seuil de 5 %)

Souche	DOSE					
	$10^5$		$10^6$		$10^7$	
	J3	J5	J3	J5	J3	J5
Ma 42	6,2a	14,7a	30,6a	47,9a	36,6a	53,9a
- 127	9,3b	41,2c	38,3a	63,0b	60,0c	46,7c
- 85	8,6b	37,3c	41,0b	52,7a	50,8b	59,8a
- 84	9,2b	31,2c	42,7b	56,8a	54,6b	63,7b
- 116	9,7b	26,4b	46,7b	52,2a	63,5c	73,0b
- 78	13,6c	57,2d	53,4c	69,1c	21,3c	32,2c
- 139	15,4c	61,3d	70,0d	82,1d	25,4c	27,7c

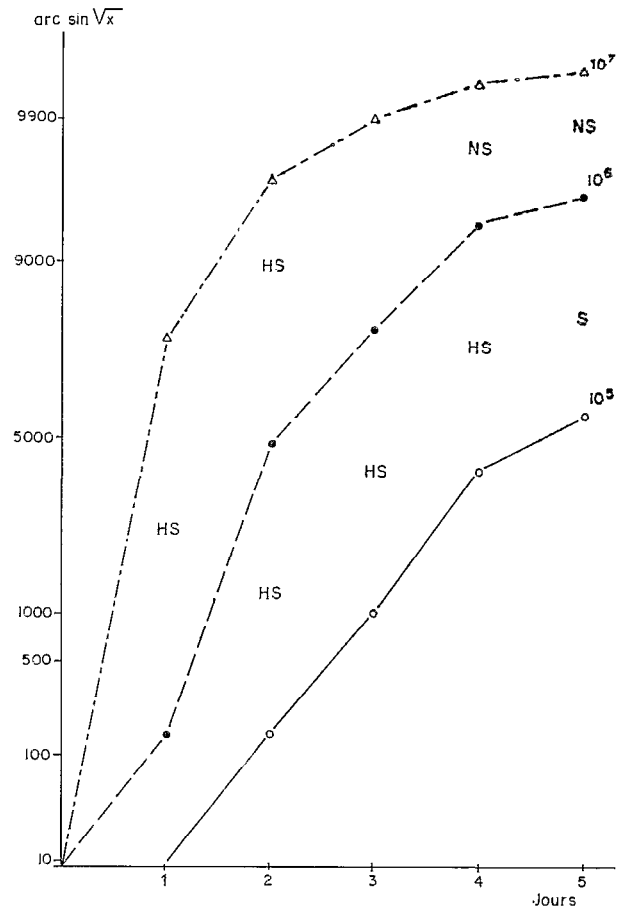


FIG. 1. — Effet de la dose de spores de la souche 139 de *Metarhizium anisopliae* sur la mortalité totale des larves de stade II d'*Aedes aegypti* (HS = hautement significatif ; S = significatif ; NS = non significatif)

## 3. SENSIBILITÉ COMPARÉE DES TROIS ESPÈCES DE CULICIDES À *anisopliae*

Afin d'être plus discriminant ce test a été réalisé avec des suspensions titrant  $10^5$  sp/ml. *A. aegypti* est l'espèce la plus résistante, alors que les larves de stade II de *C. pipiens* sont particulièrement sensibles aux mycoses (fig. 2). Plus de 70 % des larves de *C. pipiens* meurent au cours du premier jour avant que le champignon n'ait pu germer ; par contre dans les mêmes conditions aucune larve des deux autres espèces ne meurt.

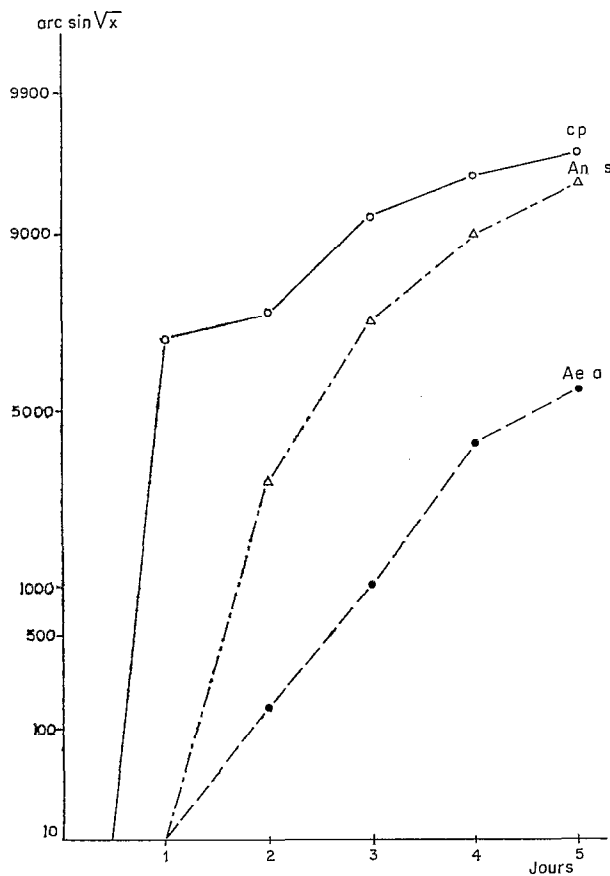


FIG. 2. — Sensibilité comparée des larves de stade II de *Culex pipiens* (Cp), *Anopheles stephensi* (An s) et *Aedes aegypti* (Ae a) à une suspension de conidies de la souche 139 de *Metarhizium anisopliae* à la dose de  $10^6$  sp/ml. Les résultats sont exprimés en fonction de la mortalité larvaire totale

## Discussion

### 1. AGRESSIVITÉ À L'ÉGARD DES MOUSTIQUES ET SPÉCIFICITÉ DES HYPHOMYCÈTES ENTOMOPATHOGÈNES

Parmi les souches d'Hyphomycètes éprouvées aucune n'est inféodée aux moustiques. Néanmoins, certaines d'entre elles, telles *Penicillium citrinum* et *Metarhizium anisopliae* semblent très agressives à l'égard de ces insectes.

Les souches « minor » qui ont été éprouvées sont issues d'insectes et de régions très variées. Cependant toutes se sont révélées plus ou moins

agressives à l'égard des moustiques. Les larves de moustiques présentent une très faible résistance à cette variété d'Hyphomycète. De ce fait la relation entre les moustiques et la variété « minor » de *M. anisopliae* paraît peu spécifique.

### 2. MODE D'ACTION DES HYPHOMYCÈTES ENTOMOPATHOGÈNES CONTRE LES LARVES DE MOUSTIQUES

Roberts (1967) a montré que *M. anisopliae* attaque les larves de moustiques préférentiellement par le siphon respiratoire. C'est pourquoi ce germe tue davantage de moustiques lorsqu'il est appliqué à la surface de l'eau. Mais, en fait, si les larves sont mises dans des suspensions conidiennes de fortes concentrations ( $10^7$  sp/ml) le champignon peut tuer celles-ci avant toute colonisation fongique intrahémocoelienne.

On peut penser que des processus toxémiques sont en cause puisque Crisan (1971) a montré que certaines propagules étaient accumulées dans le tube digestif puis partiellement lysées, tandis que Roberts (1967, 1970) a souligné la sensibilité des larves de moustiques aux toxines de *M. anisopliae*.

### 3. PERSPECTIVES DE LUTTE CONTRE LES MOUSTIQUES À L'AIDE DE CHAMPIGNONS ENTOMOPATHOGÈNES

Il est important de noter que les larves de moustiques sont très sensibles aux mycoses. Les DL 100 et TL 50 sont très inférieurs à ceux qui sont généralement observés chez des insectes ravageurs de culture (Fargues et Rodriguez-Rueda, 1980 ; Riba *et al.*, 1983).

Des souches très agressives ont été identifiées et leur double mode d'action a été mis en évidence en modifiant la concentration des suspensions sporales. Cependant les doses nécessaires à l'induction de mortalité par toxémie sont beaucoup trop élevées pour pouvoir être économiquement appliquées dans la lutte contre les moustiques, d'où la nécessité de mettre au point des formulations qui assurent le maintien des propagules à la surface de l'eau (Ramoska *et al.*, 1981 ; Daoust *et al.*, 1982, 1983).

Les connaissances préliminaires des relations étiologiques entre les champignons entomopathogènes et les moustiques sont suffisamment avancées pour être poursuivies par des essais dans les conditions naturelles afin d'obtenir une meilleure connaissance des composantes épidémiologiques de ce complexe parasitaire. Mais l'utilisation des champignons entomopathogènes dans la lutte contre les moustiques requiert une étude des conditions de

sporulation des cadavres mycosés, ce qui ne semble possible que lorsque ceux-ci flottent à la surface,

ainsi qu'une étude précise du maintien de potentiel infectieux du germe en milieu aquatique.

## BIBLIOGRAPHIE

- CRISAN (E. V.), 1971. — Mechanism responsible for release of toxin by *Metarhizium* spores in Mosquito larvae. *J. Invert. Path.*, 17 : 160-264.
- DAoust (R. A.) et ROBERTS (D. W.), 1982. — Virulence of natural and insect passages strains of *Metarhizium anisopliae* to Mosquito larvae. *J. Invert. Path.*, 40 : 107-117.
- DAoust (R. A.), WARD (M. G.) et ROBERTS (D. W.), 1982. — Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against Mosquito larvae. *J. Invert. Path.*, 40 : 228-236.
- DAoust (R. A.), WARD (M. G.) et ROBERTS (D. W.), 1983. — Effect of formulation on the variability of *Metarhizium anisopliae* conidia. *J. Invert. Path.*, 41 : 150-160.
- FARGUES (J.) et RODRIGUEZ-RUEDA (D.), 1980. — Sensibilité des larves de *Spodoptera littoralis* (Lep. : Noctuidae) aux Hyphomycètes entomopathogènes *Nomuraea rileyi* et *Paecilomyces fumoso-roseus*. *Entomophaga*, 5, 1 : 43-54.
- FEDERICI (S. A.), 1981. — Mosquito control by the fungi *Culicinomyces*, *Lagenidium* and *Coelomomyces* : 555-572, in *Microbial Control of Pests and Plant diseases, 1970-1980*. H. D. Burges Ed. Acad. Press.
- FERRON (P.), 1981. — Pest control by the fungi *Beauveria* and *Metarhizium* : 465-482, in *Microbial Control of Pests and Plant diseases, 1970-1980*. H. D. Burges Ed. Acad. Press.
- RAMOSKA (W. A.), WATTS (S.) et WATTS (H. A.), 1981. — Effects of sand formulated *Metarhizium anisopliae* spores on larvae of three mosquito species. *Mosq. News*, 41, 4 : 725-728.
- RIBA (G.), MARCANDIER (S.), RICHARD (G.) et LARGET (I), 1983. — Sensibilité de la pyrale du maïs (*Ostrinia nubilalis*) (Lep. Pyralidae) aux hyphomycètes entomopathogènes. *Entomophaga*, 28, 1 : 55-64.
- ROBERTS (D. W.), 1967. — Some effects of *Metarhizium anisopliae* and its toxins on mosquito larvae : 243-245, in *Insect Pathology and Microbial Control*. Holland Ed. Van der Laan.
- ROBERTS (D. W.), 1970. — *Coelomomyces*. *Entomophthora*, *Beauveria* and *Metarhizium* as parasites of mosquitoes. *Miscell. Pub. Ent. Soc. Amer.*, 7, 1 : 140-155.
- SWEENEY (A. W.) et PANTER (C.), 1977. — The pathogenicity of the fungus *Culicinomyces* to Mosquito larvae in a natural field habitat. *J. Med. Entomol.*, 15, 4 : 495-496.