MASTER
ECO-EPIDEMIOLOGIE
Parcours Gestion et Surveillance
des Emergences Parasitaires et Infectieuses
Année 2

Mémoire de Stage de Fin d'Etude

Caractérisation et étude du cycle d'un champignon entomopathogène de stomoxes à La Réunion

Présenté par

Justine GRILLET

Réalisé sous la direction de : M. COSTET Laurent (UMR PVBMT), GRIMAUD Yannick (GDS) et BALDET Thierry (UMR Astre)
Laboratoire/Organisme/Structure : CIRAD de La Réunion
Période du stage : du 01/02/2022 au 31/07/2022
Date de soutenance : 30/06/2022

Année universitaire 2021-2022

Remerciements

Je remercie Laurent, Yannick et Thierry pour leur encadrement et leurs conseils tout au long de ce stage de fin d'étude.

Merci à toutes les personnes du 3P qui m'ont aidé au sein du laboratoire et qui ont répondu avec gentillesse à toutes mes questions.

Je remercie Céline, Magali, Irénée, Mickaël et Leïla pour leur aide précieuse dans mes manipulations et pour leurs sourires au quotidien.

J'adresse un remerciement tout particulier à Julien, qui m'a formée, accompagnée, soutenue, aidée et fait rire au quotidien. Comme il aime à le dire : Julien, c'est le meilleur.

Merci aux kazistes et autres compagnons plus ou moins permanents de la colocation, pour toutes nos aventures.

Enfin, je remercie grandement les éleveurs avec qui nous travaillons et les financeurs qui permettent à ce projet d'exister.

.

Résumé

A La Réunion, les élevages bovins sont fortement touchés par des pullulations de stomoxes qui affectent très lourdement les exploitations au niveau sanitaire et économique. Dès 1981, il est décrit une mycose infectant les deux espèces de stomoxes, *Stomoxys niger niger* et *Stomoxys calcitrans* connues à La Réunion. Récemment, il a été démontré que ce champignon était responsable d'une véritable épizootie à l'échelle de l'île régulant potentiellement les populations de stomoxes. Cette étude poursuit la caractérisation de ce champignon entomopathogène du genre *Batkoa*. Les caractéristiques morphologiques du champignon permettant sa description taxonomique l'identifient comme *Batkoa apiculata*. Cependant les analyses moléculaires le positionnent proche d'une souche Brésilienne et phylogénétiquement éloignée de *B. apiculata*. Différents tests de pathogénicité ont été réalisés en vue de valider les postulats de Koch, après la mise en place d'un élevage de *S. niger niger*. Nous avons démontré la capacité du champignon à infecter des individus adultes via la projection de conidies par des stomoxes mycosés. Les tests de pathogénicité à l'aide de cultures sporulantes de champignon sur boite de Petri, n'ont pour l'instant pas permis de contaminer les stomoxes. Ces tests devront être répétés, l'utilisation de ce champignon pour des approches de lutte biologique par augmentation étant largement dépendante de la capacité à produire des propagules infectieuses en masse. Enfin, nous mettons en évidence la présence d'une espèce de stomoxe jamais décrite à La Réunion, *Stomoxys indicus*. Ces travaux seront poursuivis afin d'estimer le potentiel de ce champignon pour la lutte biologique contre toutes les espèces de stomoxes sur l'île de La Réunion ou ailleurs.

Mots clés : *Stomoxys spp.* – *Batkoa spp.*– Lutte biologique – Caractérisation morphologique – Pathogénicité – Culture fongique

Abstract

In Reunion Island, cattle farms are heavily affected by outbreaks of *Stomoxys*, which have a very serious impact on the health and economic situation of the farms. In 1981, a mycosis infecting the two species of *Stomoxys spp*. known in Reunion Island was described. Recently, it was demonstrated that this fungus was responsible for a real epizootic on the scale of the island, potentially regulating the stomox populations. This study continues the preliminary characterisation of this entomopathogenic fungus of the genus *Batkoa*. The morphological characteristics of the fungus allowing its taxonomic description lead to the species *Batkoa apiculata*. A molecular description was also carried out to clarify this identification. Various pathogenicity tests were also carried out in order to validate Koch's postulates, after the establishment of a *Stomoxys niger niger* farm. We demonstrated the ability of the fungus to infect adult individuals via the projection of conidia by infected stomoxes. We verified the two first postulates, necessary for mass production of fungi for biological control. Finally, we show the presence of a new stomox species never described on the island : *Stomoxys indicus*. This work will be continued in order to estimate the potential of this fungus for biological control of stomoxes in Reunion Island or elsewhere.

Key Words : *Stomoxys spp.* – *Batkoa* – Biologicol control – Morphologic characterisation – Pathogenicity – Fungi culture

Table des matières

Liste des figures .....

Liste des tableaux .....

Liste des abréviations .....

Introduction 1

Matériel et méthodes 7

A. Isolement et culture du champignon 7

B. Caractérisation morphologique du champignon 7

C. Mise en place et suivi de l'élevage 8

D. Tests de pathogénicité et vérification des postulats de Koch 9

E. Caractérisation moléculaire du champignon et des stomoxes 11

F. Analyse de survie 12

Résultats 12

A. Elevage 12

B. Isolement et culture du champignon 13

C. Caractérisation morphologique 13

D. Tests de pathogénicité 15

(i) Test de conidia shower à partir d'individus mycosés 15

(ii) Test de *conidia shower* à partir d'une culture de *Batkoa* 17

(iii) Test par contact direct d'adultes avec une culture du Batkoa 17

(iv) Test par contact direct de larves avec une culture de *Batkoa* 18

E. Caractérisation morphologique des Stomoxys sp. 19

F. Caractérisation moléculaire du champignon et des Stomoxys sp. 19

Discussion 20

Bibliographie .....

Annexes .....

Liste des figures

Figure 1. Abdomen et écartement oculaire des femelles et mâles (A) Stomoxys calcitrans et (B) Stomoxys niger niger (d'après Barré (1981) et Zumpt (1973)). 2

Figure 2. Cycle de vie des stomoxes à 25°C et 75% d'humidité relative (d'après Gilles et al. 2005). La durée de chaque stade est notée en jaune pour S. calcitrans, en bleu pour S. niger niger et en rouge pour les deux espèces. 3

Figure 3. Stomoxes mycosés. (A) Stomoxes mycosés en groupe fixés ventralement sur une feuille, les ailes légèrement écartées (Photo : J. Win Chin). (B) Stomoxe mycosé présentant des conidies (bandes blanchâtres) sur les parties intersegmentaires de l'abdomen (Photo : J. Grillet). (C) Conidies du champignon sortant par les parties intersegmentaires de l'abdomen d'un stomoxe (Photo : J. Grillet)..... 4

Figure 4. Cycle de vie d'un *Entomophthoromycota* (*Entomophaga maimaiga*) (d'après Keller, 2007). (A) Conidie en germination après fixation sur la cuticule de l'hôte. (B) Protoplaste. (C) Hyphe. (D) Conidiophore produisant une conidie. (F) Formation d'une conidie secondaire. (G) Hyphe. (H) Jeune spore dormante. (I) Spore dormante mature. (J) Germination d'un conidiophore produisant une conidie à partir d'une spore dormante. 5

Figure 5. Isolement du champignon par technique de « conidies ascendantes » (Keller, 1987). 7

Figure 6. Récupération de spores primaires sur lame de microscope par technique de « conidies ascendantes » (Keller, 1987). 8

Figure 7. Clés d'identification de pupes de S. niger niger et S. calcitrans (Barré, 1981). 9

Figure 8. Dispositifs de contamination et de suivi individuel des insectes utilisés lors de tests de pathogénicité. (A) Schéma d'un dispositif individuel. (B) Dispositif individuel pour larve. (C) Test de *conidia shower* à partir d'une culture de *Batkoa*. (D) Test de *conidia shower* à partir d'un individu mycosé. (Photos : J. Grillet)..... 10

Figure 9. Evolution du nombre d'œufs récupérés et de cages actives par semaine dans l'élevage de S. niger niger. Les traits pointillés indiquent un changement de génération..... 12

Figure 10. Culture du Batkoa sur milieu gélosé. (A) Souche CHR01372 repiquée sur SDAYEYM. (B) Souche CHR01372 repiquée sur PDA. 13

Figure 11. Observation microscopique de spores primaires et d'hyphes du Batkoa. Les noyaux sont colorés en rouge à l'acéto-orcine. (A et B) Hyphes de la souche CHR01372 sur milieu de culture SDAYEYM. (C) Spore primaire de la souche CHR01372 sur milieu PDA. (D) Spore primaire obtenu à partir d'un stomoxe mycosé (CHR01562)..... 14

Figure 12. Courbe de survie de Kaplan-Meier de *S. niger niger* contaminés ou non par des individus morts mycosés. Les lettres indiquent en (a) la médiane de survie des individus traités égale à 6 jours et (b) celle des témoins égale à 7 jours. La p-value p = 0,013 est calculée par test de Log-Rank avec correction de Sidak. Les intervalles de confiance à 95% sont visibles. 15

Figure 13. S. niger niger mycosés, six jours après l'exposition aux spores d'un stomoxe mycosé. (A) S. niger niger mort, collé en face ventrale à la paroi du dispositif individuel par les rhizoïdes sortant du thorax et de l'abdomen. (B) Observation sous loupe binoculaire de rhizoïdes sortant de l'abdomen. 16

Figure 14. Détection par PCR du Batkoa chez les individus traités par conidia shower à partir d'individus mycosés, après observation ou non d'une mycose extérieure. 16

Figure 15. Courbe de survie de Kaplan-Meier de S. niger niger contaminés ou non par des spores d'une culture de Batkoa. Les médianes de survie des traités (a) et des témoins (b) sont égales à 5. La p-value p = 0,71 est calculée par test de Log-Rank avec correction de Sidak's. Les intervalles de confiance à 95% sont visibles. 17

Figure 16. Courbe de survie de Kaplan-Meier de S. niger niger mis en contact ou non avec culture de Batkoa. La médiane de survie des traités (a) est de 1 jour et celle des témoins (b) est de 5 jours. La p-value p = 0,79 est calculée par test de Log-Rank avec correction de Sidak's. Les intervalles de confiance à 95% sont visibles. 18

Figure 17. Courbe de survie de Kaplan-Meier de S. niger niger mis en contact ou non avec culture de Batkoa au stade larvaire. La médiane de survie des traités (a) est de 9 jours et celle des témoins (b) est de 17,5 jours. La p-value p = 0,077 est calculée par test de Log-Rank avec correction de Sidak's. Les intervalles de confiance à 95% sont visibles. 18

Liste des tableaux

Tableau 1. **Composition du milieu SDAYEYM.** Les trois préparations sont faites séparément puis mélangées sous hotte (d'après J. Win Chin, 2021)..... 7

Tableau 2. Préparations d'acéto-orcéine, de lactophénol, et de lactophénol acéto-orcéine (d'après Keller, 1987, 2007b)...... 8

Tableau 3. Tableau récapitulatif des amorces et conditions PCR utilisées lors des détection et/ou de la caractérisation moléculaire du champignon. Un mix PCR de 25 µL se compose de 5 µL Buffer Go Taq Flexi (PROMEGA), 1.8 µLMgCl2 (PROMEGA), 0.5 µL dNTPs (PROMEGA), 1 µ L par amorce, 0.25 µL Go Taq Flexi (PROMEGA), et 3 µL d'ADN..... 11

Tableau 4. Comparaison des caractères morphologiques du Batkoa avec la clé dichotomique de détermination de Humber (2012)...... 14

Tableau 5. Description des caractéristiques morphologiques et biologiques principales du Batkoa de La Réunion. Les tailles des structures sont exprimées en (min) longueur (max) x (min) largeur (max), et le nombre de noyaux est exprimé en (moyenne – marge d'erreur). 15

Liste des abréviations

SICA-REVIA : Société d'Intérêt Collectif Agricole - Réunion Viande

SICA-LAIT : Société d'Intérêt Collectif Agricole - Réunion Viande

RESIR : Réseau d'Epidémio-Surveillance de l'Ile de la Réunion

LBE : Leucose Bovine Enzootique

ANSES : Agence Nationale

GDS : Groupement de Défense Sanitaire

EPF : EntomoPathogen Fungi

PDA : Potato Dextrose Agar

SDAYEYM : Sabouraud Dextrose Agar Yeast Extract Yolk and Milk

AO : Acéto-Orcéine

LP : LactoPhénol

LPAO : Lactophénol-Acéto-Orcéine

PCR : Polymerase Chain Reaction

Introduction

Les années 1960 ont marqué le début d'un plan de développement de l'élevage bovin sur l'île de La Réunion. La création de différentes Sociétés d'Intérêt Collectif Agricoles, telles que la SICA-REVIA (élevage bovin viande) et la SICA-LAIT (élevage bovin laitier), a permis l'intensification des élevages bovins qui s'est accompagnée d'une augmentation de la taille des troupeaux (Perrot et al. 2018). Cette augmentation associée à un climat tropical chaud et humide favorise le développement de stomoxes (Stomoxys sp. Diptera : Muscidae), mouches hématophages dont l'impressionnante pullulation peut atteindre jusqu'à plusieurs millions d'individus par élevage (Gilles et al. 2005). Ils sont responsables de nuisances directes et indirectes sur les bovins et de nombreux autres animaux d'élevage (Zumpt, 1973).

D'après Zumpt (1973) :

Embranchement : Arthropode
Classe : Insecte
Ordre : Diptère
Sous-ordre : Brachycère
Famille : Muscidae
Sous-famille : *Stomoxyinae*
Genre : *Stomoxys*

Appelées « mouches des étables », les stomoxes sont des arthropodes diptères du genre *Stomoxys* qui comprend 18 espèces décrites. Ils sont souvent confondus avec la mouche domestique *Musca domestica* (Linnaeus, 1758) à laquelle ils ressemblent, mais possèdent un appareil piqueur, le proboscis, à la place d'une trompe. Ce sont des mouches très actives dont les deux sexes sont hématophages diurnes, se nourrissant préférentiellement sur les animaux d'élevage mais pouvant aussi s'attaquer à l'Homme (Baldacchino et al. 2013). Pour un même repas sanguin, ils peuvent se nourrir de multiples fois sur différents individus. En absence de bétail, ils peuvent également se nourrir de nectar (Foil et al. 1994). Cette flexibilité dans leur régime alimentaire leur permet notamment de parcourir plus de cinq kilomètres pour trouver des hôtes (Desquesnes et al. 2005).

De par l'importance de leur population, de leur forte activité et de leur hématophagie, les stomoxes sont responsables de nuisances considérables. En premier lieu, ils possèdent un pouvoir pathogène direct (Zumpt, 1973). Il est lié à l'importante spoliation sanguine pouvant atteindre jusqu'à 1 L de sang par bovin et par jour (Barré, 1981), mais également au stress entraîné par le harcèlement et les piqûres douloureuses. Ceci peut entraîner une réduction de la prise alimentaire par le bétail (Berry et al. 1983), et une immunodépression favorisant les infections (Desquesnes et al. 2005). On observe en conséquence une diminution du poids des bovins et de leur rendement, jusqu'à 130 kg de lait ainsi qu'entre 25 et 60 kg de viande par an dans les filières laitières et viandes, ce qui représente un coût économique très important sur ce marché (Catangui et al. 1997, Campbell et al. 2001, Taylor et al. 2012). Par ailleurs, les stomoxes ont également un pouvoir pathogène indirect. En piquant différents hôtes de multiples fois, ils font de très bons vecteurs mécaniques pour de nombreux pathogènes présents dans le sang et les tissus cutanés des hôtes. Il a été montré que les stomoxes sont capables de transmettre différentes hémoparasitoses. Il s'agit notamment de bactéries dont celles responsables de la fièvre Q (*Coxiella burnetii*, (Derrick, 1939), de la maladie du charbon

humaine et animale (*Bacillus anthracis* (Cohn, 1872)) et de la tularémie (*Francisella tularensis,* (McCoy et Chapin, 1912) ; de protozoaires tels que des trypanosomes ou *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges, 1916) responsable de la besnoitiose bovine ; des helminthes (*Habronema microstoma* (Creplin, 1849)); et des virus responsables notamment de la Peste Porcine Africaine, de la Fièvre de la vallée du Rift ou encore de la leucose bovine (Bouyer et al. 2011, Baldacchino et al. 2013). A La Réunion, les hémoparasitoses représentent la première cause de mortalité des bovins (15,8%) selon le RESIR (Réseau d'Epidémio-Surveillance de l'Ile de la Réunion) en 2005 (Bouyer et Stachurski, 2009). Parmi ces maladies, les stomoxes participent notamment à la transmission de l'anaplasmose bovine (*Anaplasma marginale* (Theiler, 1910)) responsable de 67% des cas d'hémoparasitoses de l'île. Ils y sont également suspectés de participer à la transmission de la leucose bovine enzootique (LBE). Bien que les expérimentations n'aient pas pu prouver la capacité de transmission mécanique de cette maladie par les stomoxes (Buxton et al. 1985, Weber et al. 1988), sa forte prévalence à La Réunion (70% dans les élevages laitiers en 2015 selon l'ANSES) suggère qu'il existe un lien entre ces insectes et cette maladie (Ehrardt, 2006).

A La Réunion, deux espèces sont décrites : *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) qui est cosmopolite, et *Stomoxys niger niger* (Macquart, 1851) dont la répartition est observée dans les îles Mascareignes et sur le continent africain (Barré, 1981, Ehrardt, 2006). Les deux espèces sont relativement simples à distinguer morphologiquement. *S. calcitrans* est reconnaissable à son abdomen gris comprenant des tâches séparées au niveau des parties intersegmentaires avec un trait médian en pointillé, tandis que l'abdomen de *S. niger niger* possède des tâches linéaires au niveau des parties intersegmentaires et un trait médian continu (**Figure 1**). La distinction entre mâles et femelles des deux espèces est visible à l'écartement des yeux, plus large chez les femelles que chez les mâles (**Figure 1**) (Zumpt, 1973, Barré, 1981). Bien que seules *S. calcitrans* et *S. niger niger* aient été observées à la Réunion jusqu'ici, des individus ne présentant pas les caractères morphologiques typiques de ces deux espèces ont été signalés et collectés par le GDS et mériteraient d'être étudiés pour confirmer que seules ces deux espèces sont présentes à La Réunion.

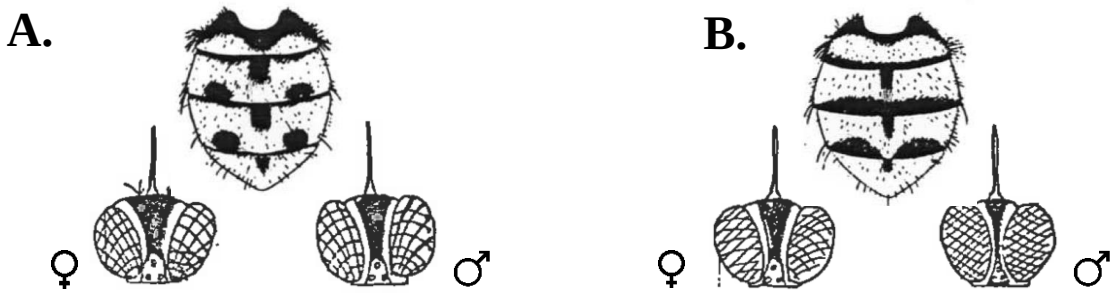


Figure 1. Abdomen et écartement oculaire des femelles et mâles (A) *Stomoxys calcitrans* et (B) *Stomoxys niger niger* (d'après Barré (1981) et Zumpt (1973)).

Les stomoxes se répartissent sur toute l'île, avec une prédominance de *S. calcitrans* à basse et haute altitude, et une prédominance de *S. niger niger* dans les zones humides et d'altitude moyenne (300 à 700m) (Barré, 1981, Ehrardt, 2006). Les stomoxes ont un cycle de vie divisé en quatre stades : l'œuf, la larve qui compte trois stades larvaires, la pupe et l'imago (**Figure 2**). Ils pondent et se développent sur des milieux organiques humides, comme le fumier et le « paillage » de feuilles de canne à sucre qui macèrent (Barré, 1981). Les stomoxes sont très présents

dans les élevages de l'île tout au long de l'année. Leur pic d'infestation, de février à juin selon les zones, est lié aux conditions météorologiques et biologiques favorables à l'humidité et à la création de sites de pontes (Barré, 1981).

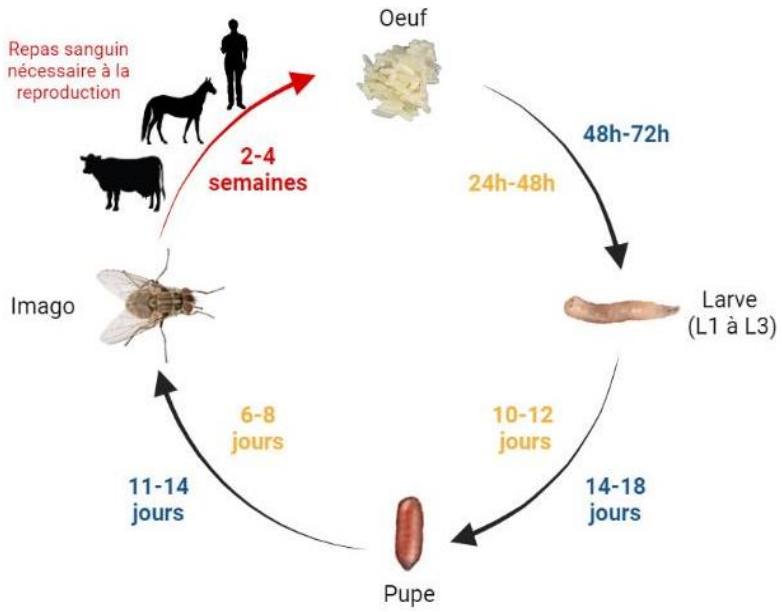


Figure 2. Cycle de vie des stomoxes à 25°C et 75% d'humidité relative (d'après Gilles et *al*. 2005). La durée de chaque stade est notée en jaune pour *S. calcitrans*, en bleu pour *S. niger niger* et en rouge pour les deux espèces.

Les stomoxes posent un problème économique et sanitaire à La Réunion et le contrôle de leurs populations représente un objectif crucial pour les élevages. Pour répondre à cette problématique, le Groupement de Défense Sanitaire (GDS) a mis en place un programme de lutte intégrée contre les stomoxes. Il inclue la prophylaxie par l'élimination des gîtes larvaires, la lutte mécanique par la disposition de pièges dans les élevages, et la lutte chimique par l'utilisation d'insecticides (Grimaud, 2013). Cependant, ces moyens s'avèrent insuffisants pour contrer la prolifération des stomoxes. L'utilisation d'insecticides est très répandue mais nécessite des traitements réguliers, toutes les deux à quatre semaines, représentant un coût économique et environnemental non négligeable (Desquesnes, 2021). Elle présente aussi une nouvelle limite face à l'apparition de résistances au sein des populations d'insectes. Selon une étude de 2019 menée dans 40 élevages bovins laitiers allemands, 100% des populations de stomoxes y présentaient une résistance à la deltaméthrine, un composé très utilisé dans les insecticides (Opperman et al. 2019). A La Réunion, on observe déjà une résistance des stomoxes au BUTOX® (Intervet), un insecticide à base de deltaméthrine (Ehrardt, 2006). Ainsi, pour pallier à toutes ces limites, la lutte biologique est une stratégie intéressante à développer. Elle permet l'utilisation d'organismes vivants (parasites, pathogènes ou prédateurs) contre les nuisibles. Une première stratégie a été mise en place de 1996 à 2009, dans le cadre du programme « POSEIDOM vétérinaire » visant à associer lutte chimique et lutte biologique contre les stomoxes et tiques à La Réunion. Trois parasitoïdes d'œufs et de pupes de stomoxes (*Trichopria* sp., *Tachinaephagus stomoxicida* Subba Rao, 1978 et *Spalangia endius*, Walker, 1839) ont été utilisés pour infester les populations sauvages de stomoxes (Squarzoni, 2001), mais cette méthode a été abandonnée en 2009 par manque de résultats et par la difficulté associée à l'élevage des parasitoïdes. Néanmoins, les parasitoïdes ne sont pas les seuls organismes à impacter les populations de stomoxes à La Réunion. En 1981, N. Barré décrit une forte mortalité des deux espèces de stomoxes pendant leur pic de prolifération de mi-avril à mi-juin, provoquée par une mycose entomopathogène (Barré, 1981). 40 ans plus tard, en 2021, J. Win Chin

lors ce ces travaux de master retrouve ce champignon dans 80% d'élevages bovins (N=85) répartis sur toute l'île, révélant que ce champignon est responsable d'une véritable épizootie (Win Chin, 2021). Si elle touche principalement les stomoxes, elle a également été observée infectant des mouches domestiques ou des mouches du genre *Calliphora* (Barré, 1981, Win Chin, 2021). Les insectes mycosés sont retrouvés morts sur de la végétation autour du bétail, les ailes légèrement écartées et fixés ventralement à la surface des feuilles par des filaments blancs mycéliens. Après quelques jours, les parties intersegmentaires de l'abdomen sont recouvertes des conidies du champignon, formant des bandes blanches (**Figure 3**).

Figure 3. Stomoxes mycosés. (A) Stomoxes mycosés en groupe fixés ventralement sur une feuille, les ailes légèrement écartées (Photo : J. Win Chin). (B) Stomoxe mycosé présentant des conidies (bandes blanchâtres) sur les parties intersegmentaires de l'abdomen (Photo : J. Grillet). (C) Conidies du champignon sortant par les parties intersegmentaires de l'abdomen d'un stomoxe (Photo : J. Grillet).

N. Barré émet l'hypothèse d'une régulation des populations de stomoxes par ce champignon entomopathogène, voire d'une potentielle utilisation comme agent de lutte biologique. Les champignons entomopathogènes (aussi appelées EPF pour EntomoPathogen Fungi) se retrouvent dans différents embranchements du règne Fungi : les *Ascomycota*, les *Chytridiomycota*, les *Deuteromycota*, les *Entomophthoromycota* et les *Oomycota* (Sharma et al. 2020). Leur utilisation en lutte biologique n'est pas nouvelle : dans le monde, on compterait plus de 1000 espèces d'EPF appartenant à plus de 100 genres différents provoquant des infections chez les insectes (Vega et al. 2012). Au moins 12 de ces espèces d'EPF ont déjà été utilisées pour développer environ 170 formulations en lutte biologique (Faria et Wraight, 2007). Parmi cette diversité, des espèces appartenant au phylum des *Entomophthoromycota* sont particulièrement étudiées (Sharma et al. 2020). Il est constitué de trois classes, six familles et 280 espèces, qui s'attaquent à une centaine d'hôtes (insectes, algues, nématodes et vertébrés). Parmi eux, 70 espèces sont considérées comme nuisibles (Keller, 2007a). Les EPF sont souvent hautement spécialistes et sont capables de provoquer des épizooties spécifiquement contre ces nuisibles, leur conférant un bon potentiel pour la lutte biologique (Chandler, 2017). Toutefois, les *Entomophthoromycota* sont des parasites biotrophes obligatoires, se nourrissant des cellules de leur hôte vivant (Lovett et Leger, 2017, Chandler, 2017). Leur culture et leur formulation sont donc difficiles. Leur utilisation en tant d'agents de lutte biologique se situe donc principalement dans la lutte par augmentation, consistant à introduire en grande quantité le pathogène dans l'environnement pour réguler les populations (Chandler, 2017).

La description taxonomique des champignons et l'identification d'une espèce se basent sur la caractérisation morphologique. Les *Entomophthoromycota* ont bien été décrits par Keller (2007) et Humber (2012). Ils ont

généralement un cycle asexué basé sur les conidies et un cycle sexué impliquant des spores dormants (**Figure 4**) (Keller, 2007b).

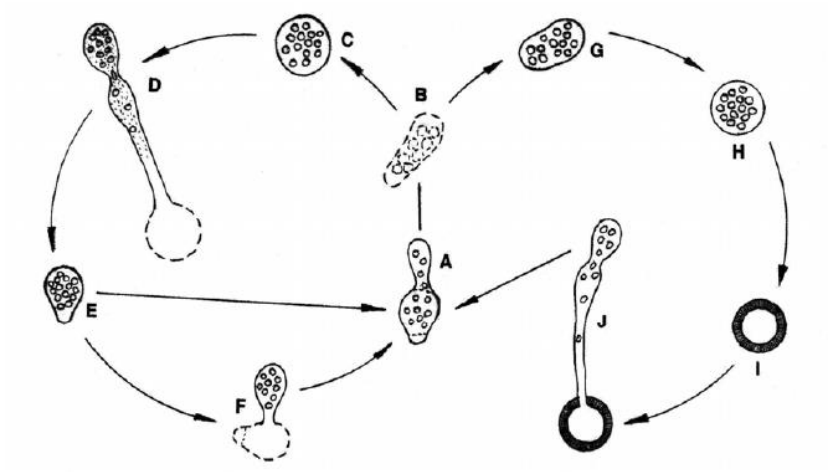


Figure 4. Cycle de vie d'un *Entomophthoromycota* (*Entomophaga maimaiga*) (d'après Keller, 2007). (A) Conidie en germination après fixation sur la cuticule de l'hôte. (B) Protoplaste. (C) Hyphe. (D) Conidiophore produisant une conidie. (F) Formation d'une conidie secondaire. (G) Hyphe. (H) Jeune spore dormante. (I) Spore dormante mature. (J) Germination d'un conidiophore produisant une conidie à partir d'une spore dormante.

Toutes les espèces de ce phylum possèdent des hyphes : ce sont des structures mycéliales végétatives multinucléées, produites par germination de conidies (Keller, 2007b, Humber, 2016). Leur forme et leur taille ainsi que la forme et le nombre de leurs noyaux varient selon les espèces, et sont donc de bons critères de classification et d'identification (Keller, 2007b, Humber, 2016). C'est à partir de ces hyphes que sont produits les conidiophores, les spores dormantes, les cystides, et les rhizoïdes. Les conidiophores émergent des hyphes et produisent des conidies (ou « spores ») primaires, les structures infectieuses du champignon. Ces dernières sont projetées activement par *papillar ejection* (Humber, 2016) et peuvent à leur tour produire des conidies secondaires en cas d'échec de la première infection. Leur forme, leur taille, la forme et le nombre de leurs noyaux sont également des critères d'identification des genres voire des espèces (Keller, 2007b, Humber, 2016). Il existe un troisième type de spores, les spores dormantes, permettant la survie du champignon en conditions environnementales défavorables (Keller, 2007b, Humber, 2016). Elles ne sont pas infectieuses, mais peuvent produire des conidies primaires lorsque les conditions sont favorables. Elles sont souvent peu décrites et absentes chez certaines espèces. C'est également le cas des cystides, structure permettant de rompre la cuticule de l'hôte (Keller, 2007b, Humber, 2016). Enfin, les rhizoïdes sont les structures filamenteuses blanchâtres, fixant l'hôte au substrat en poussant extérieurement en face ventrale (Keller, 2007b, Humber, 2016).

Malgré les difficultés associées à la culture des entomophthorales, le champignon a été isolé sur milieu de culture à partir de stomoxes mycosés (Win Chin, 2021). Sur la base de critères morphologiques, des observations préliminaires le positionneraient dans le genre *Batkoa* (Win Chin, 2021). D'après Keller (2007b) :

Règne : Fungi
Embranchement : Entomophthoromycota
Class : Entomophthoromycetes
Ordre : Entomophthorales
Famille : Entomophthoraceae
Genre : *Batkoa*

Ce genre compte dix espèces officiellement décrites (Bensch, 2018). On pourrait y ajouter deux autres espèces assignées à ce genre via les études moléculaires de Nie et al. (2020) et Grygianskyi et al. (2013), basées sur la diversité de séquences de gènes : *Entomophaga australiensis* Humber (sp. nov., unpublished) et *Entomophaga conglomerata* (Sorokin) S Keller 1988. Morphologiquement, la clé de détermination de Keller (2007b) conduit le champignon isolé sur stomoxes à l'espèce *Batkoa apiculata* (Entomophthoromycota : Entomophthoraceae*)*. Les conidies primaires sont sphériques à ovoïdes avec une papille ronde. Ses conidies secondaires sont morphologiquement similaires mais de plus petite taille. Les rhizoïdes et les conidiophores sont simples, avec un apex plus large que le reste de la structure. Chaque branche produit une conidie (Win Chin, 2021). Une analyse phylogénétique réalisée sur le 28S (nucLSU et nucSSU) a placé ce champignon proche de *Batkoa australiensis* (95,4% d'identité) et d'une souche brésilienne encore non décrite (97,2% d'identité). Bien que cette étude phylogénétique soit seulement préliminaire et que les ressources génétiques concernant les entomophthorales soient encore limitées, il est possible que le champignon isolé à La Réunion soit une nouvelle espèce du genre *Batkoa*. Les descriptions morphologiques fines et moléculaires en cours sont nécessaires pour répondre à cette question.

Les perspectives d'utilisation de ce champignon en tant qu'agent de lutte biologique impliquent également de connaître son cycle et les interactions hôte/pathogène liées. Diverses études de pathogénicité et d'infection *in vitro* ont déjà été menées sur des espèces du phylum *Entomophthoromycota*, que ce soit par contact d'un individu avec un support contaminé, avec une solution de spores ou par projection de spores (Papierok et Balazy, 2007, Hajek et al. 2012). Ces tests de pathogénicité permettent d'une part dans certains cas la validation des postulats de Koch (Ali-Shtayeh et al. 2003, Sun et Liu, 2008), dont l'objectif essentiel est de prouver le caractère pathogène d'un agent biologique. Ils reposent sur quatre principes : (i) l'organisme pathogène doit être retrouvé chez tous les hôtes affectés par la maladie, (ii) il doit pouvoir être isolé et cultivé en laboratoire, (iii) à partir de la culture, il doit être inoculé expérimentalement chez un individu sain qui doit développer la maladie, (iv) il doit être isolé à partir de l'individu inoculé et doit être identique à l'organisme pathogène de départ. Les postulats II et III sont particulièrement importants pour les approches de lutte biologique, leur validation permettant d'envisager des stratégies de lutte augmentatives (Eilenberg et al. 2001, Gacheri et al. 2015).

Un des enjeux est le développement de stratégies de lutte biologique basées sur l'utilisation de ce champignon qui s'intégreraient à la stratégie intégrée de lutte contre les stomoxes et plus généralement du contrôle des hémoparasitoses. Il est nécessaire pour cela pour mieux comprendre et caractériser les facteurs biologiques et épidémiologiques de cette épizootie. Cette étude s'inscrit dans la continuité de ces travaux préliminaires et vise à poursuivre la description de ce champignon entomopathogène, son cycle de vie et son pouvoir pathogène vis-à-vis des stomoxes. Un premier objectif visera à poursuivre la caractérisation morphologique et moléculaire du champignon. Le second objectif consistera à la mise en place de tests de pathogénicité pour étudier le cycle du champignon et la réalisation des postulats de Koch.

Matériel et méthodes

A. Isolement et culture du champignon

L'isolement et la culture du champignon se font en continu tout au long du stage en suivant le protocole mis en place par J. Win Chin (2021). Toutes les manipulations se font sous hotte avec des milieux et du matériel stérilisé par autoclave. Le champignon est isolé à partir d'un cadavre de stomoxe mycosé prélevé sur le terrain dans un tube Eppendorf vide. L'isolement se fait par technique dite de « conidies ascendantes » (**Figure 5**) (Keller, 1987) : afin de réduire la contamination, la cuticule du stomoxe est nettoyée en le plongeant successivement dans un bain de javel à 2,6% puis dans un bain d'eau distillée stérile. L'insecte est ensuite déposé sur un buvard imbibé d'eau distillée stérile dans le couvercle d'une boîte de Pétri, et le fond de la boîte rempli d'un milieu de culture gélosé est placé par-dessus le stomoxe pour recueillir les spores projetées vers le haut. Le tout est mis à l'étuve pendant 24 h à 25°C et 75% d'humidité relative. Le lendemain, le stomoxe est retiré et placé dans un tube Eppendorf vide pour identification moléculaire, et le couvercle de la boîte de Pétri est remplacé. Le champignon isolé est gardé à l'étuve à 25°C et 75% et maintenu par repiquage.

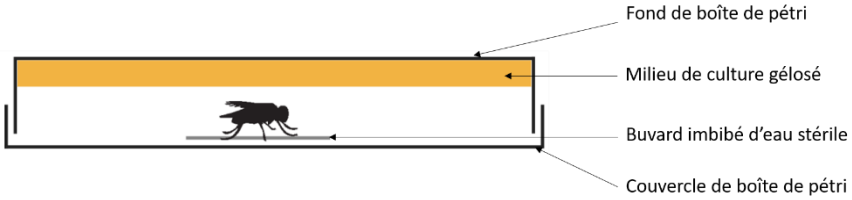


Figure 5. Isolement du champignon par technique de « conidies ascendantes » (Keller, 1987).

Divers milieux de cultures sont utilisés. Il peut être cultivé sur PDA (Potato Dextrose Agar) mais sa culture sur SDAYEYM (Sabouraud Dextrose Agar Yeast Extract Yolk and Milk) (**Tableau 1**) est privilégiée car plus rapide (Win Chin, 2021).

Tableau 1. **Composition du milieu SDAYEYM.** Les trois préparations sont faites séparément puis mélangées sous hotte (d'après J. Win Chin, 2021).

Sabouraud 4% Glucose Agar*	Extrait de levure*	Mélange lait-œufs
65g Sabouraud 4% Glucose Agar (84088-500G Sigma-Aldrich)	5g d'extrait de levure (64343 Bio-Rad)	370mL de lait entier bio*
1L d'eau stérile	10g de glucose (G-8270 Sigma)	15 jaunes d'œufs bio
	10g d'agar (A-1296 Sigma)	
	500mL d'eau stérile	

* = autoclavage préalable

B. Caractérisation morphologique du champignon

La caractérisation morphologique du champignon se fait directement à partir de boîtes de culture mais également à partir d'individus mycosés. A partir des boîtes de culture, les structures du champignon sont récupérées à l'aide

d'une aiguille fine et étalées directement sur une lame. A partir d'individus mycosés, les structures du champignon sortant des parties ventrales et dorsales des insectes sont prélevées à la pince puis placées dans un tube Eppendorf contenant une solution tampon Tris-Tween (Win Chin, 2021). La solution est vortexée pour bien séparer les structures. Une goutte de cette solution est ensuite disposée sur une lame. Les conidies peuvent également être récupérées sur lame par technique de « conidies ascendantes » (Keller, 1987). Un stomoxe mycosé est disposé sur sa face ventrale sur un buvard humide dans une boîte de Petri. Une lame est disposée par-dessus cette boîte de Petri (**Figure 6**). La récupération de spores d'une culture se fait par la même technique, en remplaçant le stomoxe mycosé par un morceau de culture sur PDA.

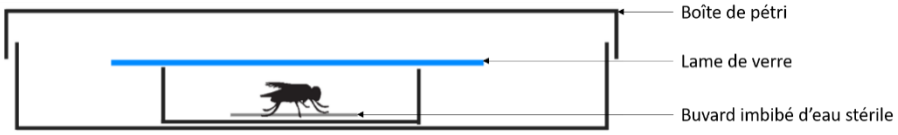


Figure 6. Récupération de spores primaires sur lame de microscope par technique de « conidies ascendantes » (Keller, 1987).

Deux colorations sont testées selon la littérature pour l'observation des noyaux : l'acéto-orcéine (AO) et le lactophénol acéto-orcéine (LPAO). Celles-ci sont connues pour bien marquer les noyaux (Keller, 2007b, Humber, 2012). Ces colorations sont préparées selon les recettes de Keller (1987, 2007b) (**Tableau 2**). Les lames sont ensuite observées en microscopie optique. Les noyaux sont comptés et mesurés avec le logiciel Piximètre (Henriot & Cheype, 2020). Les tailles des structures sont exprimées en (min) longueur (max) x (min) largeur (max), et le nombre de noyaux est exprimé en (moyenne – marge d'erreur).

Tableau 2. Préparations d'acéto-orcéine, de lactophénol, et de lactophénol acéto-orcéine (d'après Keller, 1987, 2007b).

Acéto-orcéine (AO)	Lactophénol (LP)	Lactophénol-acéto-orcéine (LPAO)
1g de poudre d'orcéine	20g de cristaux de phénol	1 volume d'acéto-orcéine
100mL 50% acide acétique (v/v)	20g d'acide lactique	1 volume de lactophénol
	10mL de glycérol	
	20mL d'eau distillée	

C. Mise en place et suivi de l'élevage

L'étude du cycle du *Batkoa* et les différents tests de pathogénicité doivent être effectués sur des individus indemnes de la mycose. Nous avons donc commencé par mettre en place un élevage de stomoxes pour travailler sur des individus sains en conditions contrôlées. Ils sont élevés en chambre climatique à 25°C et 75% d'humidité relative, qui sont les conditions les plus adéquates pour un bon taux de survie et de reproduction (Gilles et al. 2005). Pour la mise en place de l'élevage, deux techniques ont été testées. La première consiste à récupérer des larves de stomoxes au niveau des sites de pontes (fumier, canne fourragère en macération) au sein des élevages. Elles sont ensuite placées dans des substrats larvaires composés de 7/8ème de canne fourragère et 1/8ème de son de blé en attendant la pupation. Les pupes sont ensuite récupérées, triées à la loupe binoculaire selon les clés d'identification de Barré (1981) (**Figure 7**), puis placées par espèces dans des cages. La seconde technique consiste à récupérer des adultes vivants sur le terrain à l'aide de pièges Vavoua (Vestergaard®), puis à les placer en cage avec un dispositif de ponte sans trier les

espèces. Les œufs sont récupérés quotidiennement et placés dans les substrats larvaires. Les pupes sont ensuite récupérées, triées et placées par espèces dans les cages (**Annexe 1**).

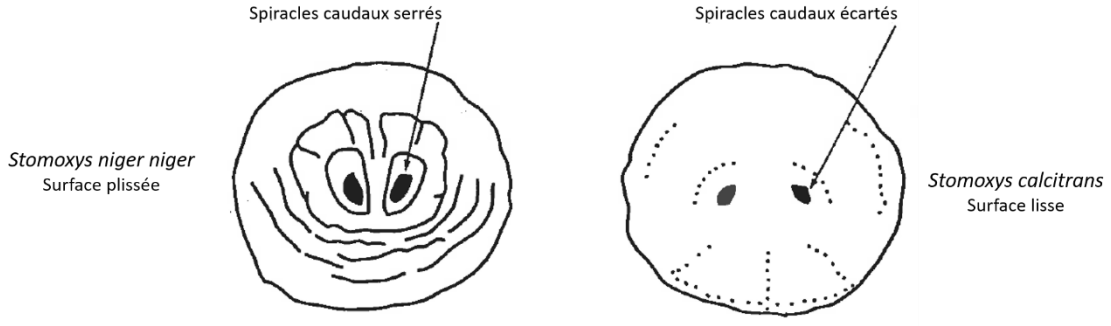


Figure 7. Clés d'identification de pupes de *S. niger niger* et *S. calcitrans* (Barré, 1981).

Les stomoxes prennent un à deux repas sanguins par jour. Pour le maintien de l'élevage, ils sont nourris deux fois par jour pendant une heure à l'aide d'une éponge imbibée de sang de bovin citraté, préalablement chauffée au bain-marie à 50°C et disposée sur la cage. Le sang de bovin est récupéré hebdomadairement à l'abattoir et mélangé à une solution de citrate de sodium à 40% (30 mL pour 1 L de sang) empêchant la coagulation. Dans les cages sont aussi disposés une éponge trempée dans un bol d'eau sucrée à 20% ainsi qu'un dispositif de ponte qui sont changés tous les 3 jours. Les pontes sont récupérées quotidiennement et placées dans le substrat larvaire. A partir de 4 jours, la pupation est vérifiée quotidiennement.

D. Tests de pathogénicité et vérification des postulats de Koch

Différents tests de pathogénicité ont été mis en place pour étudier les mécanismes d'infection des stomoxes par le champignon. Ils se basent sur la capacité des champignons à infecter leurs hôtes grâce au contact de structures infectantes avec la cuticule des hôtes (Hajek, 2012). Un premier test (i) consiste à infecter un individu sain à partir de la projection de spores d'un individu mycosé, et un second (ii) à partir des spores d'une culture du champignon. Ils sont basés sur le principe de *conidia shower* (Hajek, 2012). Un troisième (iii) consiste à mettre un individu sain directement en contact avec une culture du champignon. Pour réaliser ces tests, nous avons conçu des dispositifs de contamination et de suivi individuel adaptés de ceux utilisés au laboratoire pour la réalisation des tests de pathogénicité sur les mouches des fruits (Rohrlich et al. 2018). Les individus sont issus de l'élevage et placés dans les dispositifs individuels permettant d'éviter toute contamination croisée inter-individus (**Figure 8**). Quatre types de tests de pathogénicité ont été réalisés sur des adultes et /ou des larves.

- (i) Pour le premier test, un individu mycosé est récupéré sur le terrain. Sous hotte et avec du matériel stérile, il est d'abord nettoyé avec un bain d'eau de javel à 2,6% et un bain d'eau distillée stérile, puis disposé sur sa face dorsale sur une grille au-dessus du dispositif individuel contenant un individu sain. L'individu mycosé est ensuite recouvert d'un buvard humide et d'un couvercle de boîte de Pétri. Au bout de 48h, il est retiré et mis en tube pour génotypage ultérieur. Les témoins sont placés en dispositifs individuels, sans individus mycosés par-dessus. Ce test a été répété trois fois sur des lots de 30 individus adultes.

- (ii) Pour le second test, une boîte de culture repiquée la veille est placée par-dessus le dispositif individuel. Pour les témoins, une boîte de Pétri avec milieu sans repiquage est placée au-dessus. Les boîtes sont retirées au bout de 24h. Ce test a été répété une fois sur un lot de 30 individus adultes.
- (iii) Pour le troisième test, quelques gouttes de solution stérile de Tris-Tween (0.05% TWEEN® 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)) sont déposées sur une boîte de culture de SDAYEYM pour permettre la mise en suspension de structures fongiques (Rorhlich et al. 2018). Un individu est placé pendant 4h dans cette boîte de culture avant d'être mis en dispositif individuel. Les témoins sont simplement disposés pendant 4h sur SDAYEYM sans champignon. Une seule répétition a pu être réalisée sur un lot de 30 adultes des adultes et un lot de 30 larves en stade L3.

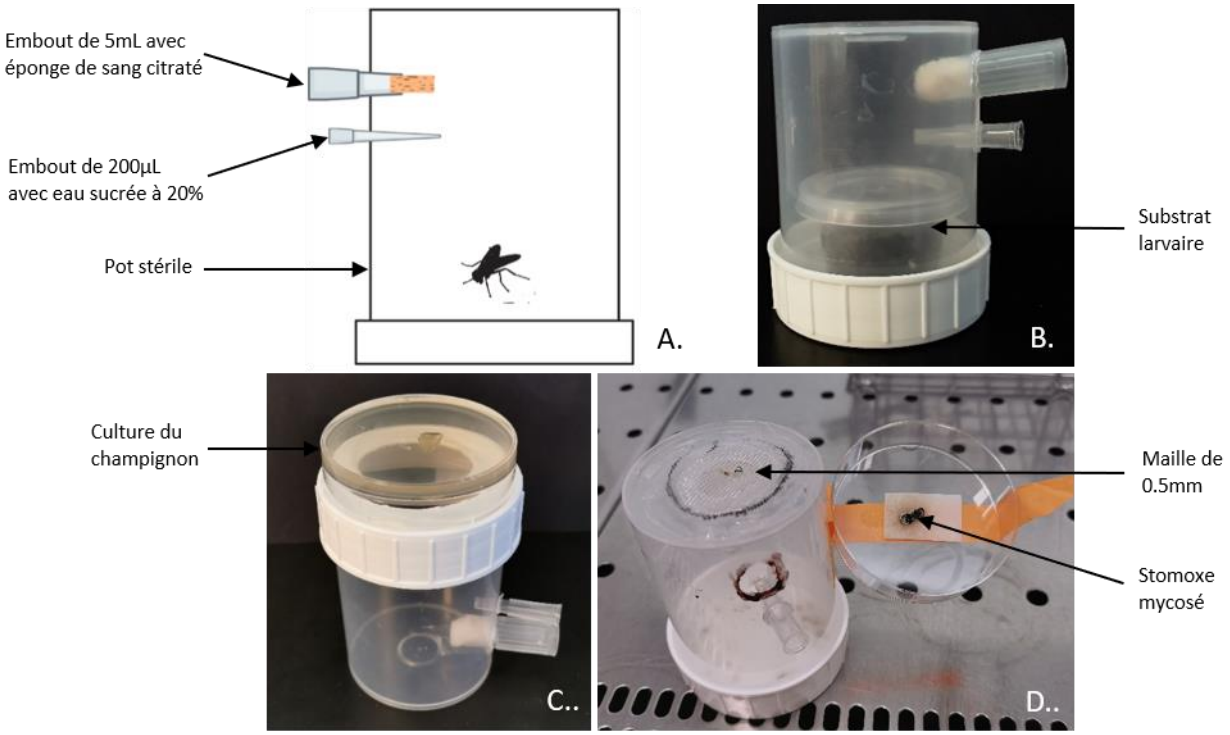


Figure 8. Dispositifs de contamination et de suivi individuel des insectes utilisés lors de tests de pathogénicité. (A) Schéma d'un dispositif individuel. (B) Dispositif individuel pour larve. (C) Test de *conidia shower* à partir d'une culture de *Batkoa*. (D) Test de *conidia shower* à partir d'un individu mycosé. (Photos : J. Grillet)

Chaque répétition correspond à un lot de de 60 insectes, chaque modalité (contamination avec le champignon ou témoins) étant représentée par 30 insectes (15 mâles et 15 femelles). N'ayant élevé que des *S. niger niger*, les tests sont effectués sur cette espèce. Les adultes issus de l'élevage sont transférés dans les dispositifs de contamination et de suivis individuels vides. Les larves sont placées à l'intérieur des dispositifs individuels, dans un pot troué contenant du substrat larvaire. Tout au long du test, les individus sont nourris par deux embouts de pipette : un premier changé une fois par jour contient une éponge imbibée de sang de bovin citraté à 40% et chauffée au bain-marie à 50°C, et un second rempli d'eau sucrée à 20% est changé toutes les semaines. Ils sont gardés en chambre climatique à 25°C, 75% d'humidité relative et en cycle de lumière 16:8 (L:D). Une fois qu'un individu meurt, il est placé en chambre humide dans une boîte de Pétri sur un buvard humide et gardé à l'étuve à 25°C et 75% d'humidité relative pendant 10 jours pour favoriser la croissance et la sporulation du champignon, et permettre de révéler des insectes morts sans symptômes mais possiblement infectés. Plusieurs paramètres sont notés quotidiennement au cours d'un essai : l'émergence des larves, la mort des individus et l'état de mycose des individus morts placés sur buvard humide à

l'étuve. Lorsqu'une mycose apparaît sur un individu, un isolement de celle-ci est réalisé par technique ascendante. L'individu mycosé est ensuite placé en tube vide et conservé à 4°C pour génotypage ultérieur.

E. Caractérisation moléculaire du champignon et des stomoxes

Les souches du champignon cultivées en laboratoire et les souches infectant les insectes mycosés sont caractérisées moléculairement à l'aide d'amorces ciblant plusieurs portions de gènes, utilisés dans le cadre des études phylogénétiques des entomophthorales. Il s'agit de gènes et régions qui ont des régions très conservées et d'autres plus variables pour permettre de séparer les genres voire les espèces (Hajek et al. 2012, Papierok et Balazy, 2007, Gryganskyi et al. 2021). Dans cette étude, nous avons ciblé trois gènes : l'espaceur interne transcrit (ITS) qui correspond au barcode universel des champignons, la grande sous-unité ribosomale du 28S (28S nucLSU), et la deuxième plus grande sous-unité de l'ARN polymérase II (RPB2). L'ADN du champignon est extrait à l'aide du kit DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur.

Les stomoxes adultes ayant des caractéristiques morphologiques différentes des clés d'identification de Picard (1908) et Zumpt (1973) sont également caractérisés moléculairement par barcode afin de vérifier leur espèce. Le gène ciblé est le cytochrome C oxydase mitochondrial (COI), servant d'outil d'identification moléculaire universel pour les insectes, à l'aide d'amorces disponibles au laboratoire. L'ADN des insectes est extrait avec le kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur.

Les séquences des amorces et les conditions de PCR utilisées dans cette étude sont présentées dans le **Tableau 3**. Les produits d'amplifications PCR sont vérifiés par électrophorèse capillaire (Qiaxcel Advanced System, QIAGEN). Les amplicons sont ensuite envoyés pour séquençage à Macrogen (Pays-Bas).

Tableau 3. Tableau récapitulatif des amorces et conditions PCR utilisées lors des détection et/ou de la caractérisation moléculaire du champignon. Un mix PCR de 25 µL se compose de 5 µL Buffer Go Taq Flexi (PROMEGA), 1.8 µLMgCl2 (PROMEGA), 0.5 µL dNTPs (PROMEGA), 1 µ L par amorce, 0.25 µL Go Taq Flexi (PROMEGA), et 3 µL d'ADN.

Espèce	Gène cible	Nom de l'amorce	Séquence (5'-3')	Taille de l'amplicon	Programme PCR	Publication de référence
Batkoa sp.	28S (nucLSU)	Cir_Bs_LSU_001_F	AGTTGGAACTATCGAGGGGGA	232pb	95°C - 5min, 40 cycles (95°C - 1min, 55°C - 2min, 72°C -2min), 72°C - 10min	Cette étude
		Cir_Bs_LSU_002_R	TTGGTTTGAGCTACAGGTTTTCTT			
	ITS1	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	911pb	94°C - 5min, 35 cycles (94°C - 45sec, 55°C - 50sec, 72°C -1min), 72°C - 10min	Grygianskyi et al. 2021
		5.8S	CGCTGCGTTCTTCATCG			
	ITS2	ITS3	GCATCGATGAAGAACGCAGC	639pb	94°C - 5min, 35 cycles (94°C - 45sec, 55°C - 50sec, 72°C -1min), 72°C - 10min	Grygianskyi et al. 2021
		ITS4sub	TGGAGCAAGTACAAACAACACT			
	RPB2	BatRPB2f	ACCCTCAGAAACCTCTCGTC	584pb	95°C - 4min, 34 cycles (95°C - 1min, 50°C - 1min, rampe de température de 0,3°C/sec jusqu'à 72°C, 72°C -1min), 72°C - 10min	Grygianskyi et al. 2021
		BatRPB2r	CAAACCGAGCCAGCAATTTG			
Stomoxys spp.	COI-5P	LepF1	ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	657pb	95°C - 1min, 40 cycles (95°C - 30sec, 55°C - 45sec, 72°C -1 min), 72°C - 10min	Changbunjong et al. 2016
		LepR1	TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA			

Les séquences obtenues pour le champignon sont alignées avec les séquences du 28S (nucLSU) du genre *Batkoa* disponibles sur GenBank. Les séquences obtenues pour l'identification des *Stomoxys* sp. sont alignées avec les séquences du COI-5P disponibles sur BOLD (« Barcode of life data system V4 » 2006). Un arbre phylogénétique

est réalisé sur Geneious, les longueurs de branches et la topologie de l'arbre sont estimées par maximum de vraisemblance avec le modèle GTR, et les probabilités postérieures sont calculées avec un modèle bayésien.

F. Analyse de survie

Nous avons utilisé l'estimateur de Kaplan-Meier, une statistique non paramétrique, pour comparer les effets des traitements sur la survie des insectes. Les courbes de survie ont été modélisées à l'aide des packages « surviver » et « survminer » sur R (version 4.2.0). Un test de Log-Rank a été effectué pour détecter les différences significatives entre les traitements. Étant donné que les comparaisons multiples entre les deux traitements augmentent l'erreur de type 1 globale, la correction de Sidak a été appliquée pour ajuster les p-values au seuil de 0,05. Les temps moyens de survie et la marge d'erreur (moyenne marge d'erreur) sont également calculés sur R.

Résultats

A. Elevage

Le lancement de l'élevage n'a pas pu se faire à partir des larves de stomoxes, leur nombre dans les gîtes larvaires sur le terrain étant insuffisant. L'élevage a donc été relancé en introduisant de nouveaux adultes sauvages, majoritairement des *S. niger niger*. Les *S. calcitrans* récupérés n'ont pas assez pondus pour que cette espèce soit disponible à l'élevage. La génération 0 de *S. niger niger* a pondu de manière assez constante, nous permettant d'obtenir cinq cages d'individus adultes. Chaque cage pouvait contenir jusqu'à 800 individus. L'élevage est marqué d'une augmentation du nombre de pontes les deux à trois premières semaines de chaque génération (en moyenne 1501,7 œufs récupérés de G1 à G3), suivi d'une forte diminution des pontes les deux dernières semaines de chaque génération (en moyenne 310,8 œufs récupérés de G1 à G3). Le nombre de cages actives suit cette même tendance, avec un grand nombre de nouveaux individus émergés en début de génération et leur mort en fin de génération.

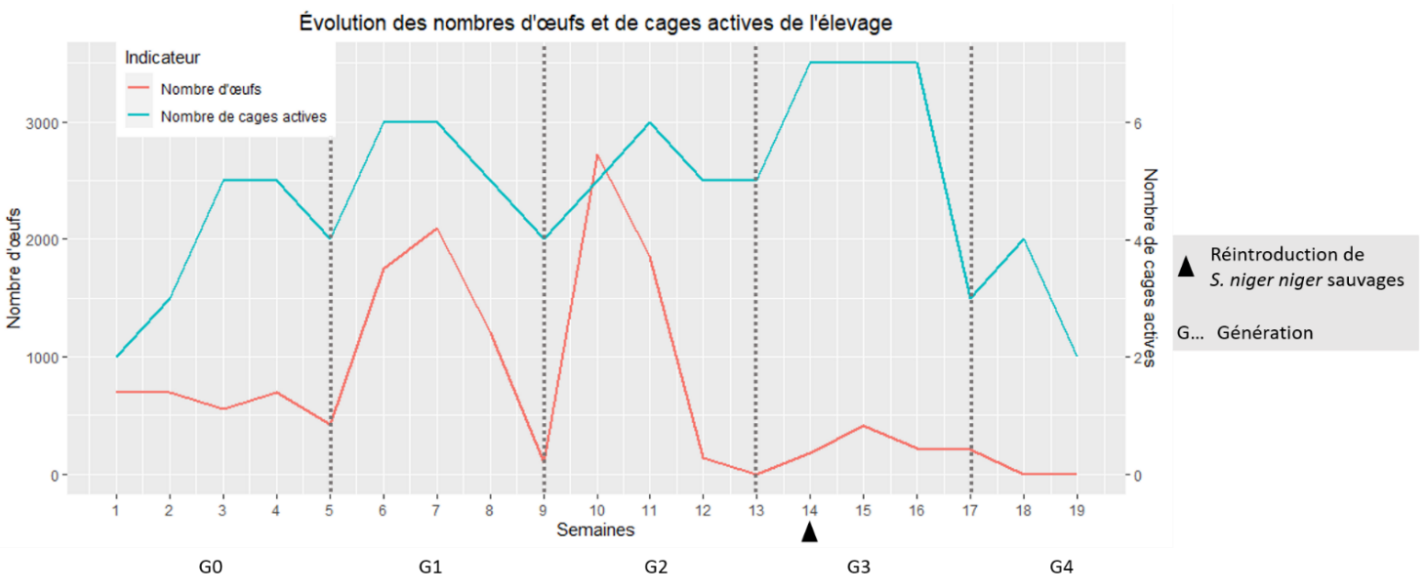


Figure 9. Evolution du nombre d'œufs récupérés et de cages actives par semaine dans l'élevage de *S. niger niger*. Les traits pointillés indiquent un changement de génération.

(Figure 9). Cependant, à la troisième génération (G3), les individus ont pondu au maximum 410 œufs. Pour essayer de relancer l'élevage nous avons réintroduits des individus *S. niger niger* sauvages à la 14ème semaine, sans succès.

B. Isolement et culture du champignon

La caractérisation de l'épizootie nécessite d'appréhender la diversité génétique du champignon dans l'environnement et la variabilité du pouvoir pathogène liée à celle-ci. Pour cela, nous avons pu isoler neuf souches à partir de 275 stomoxes mycosés collectés sur le terrain, soit un taux d'isolement de 3,3%. Parmi celles-ci, seules quatre souches ont pu être maintenues par repiquage : les souches CHR01372, CHR01474, CHR01499, et CHR01588. Ces souches proviennent de quatre élevages différents à des altitudes comprises entre 435 et 1086 m. Leurs dates d'isolement et le lieu d'échantillonnage des stomoxes mycosés sont détaillés dans l'**annexe 2**.

Le champignon a montré une croissance différente selon les milieux de culture utilisés. Sur milieu PDA, il pousse plus lentement et forme plusieurs colonies sur la boîte de Pétri par sporulation (**Figure 10**). Sur milieu SDAYEYM, il a tendance à s'étendre par pousse végétative à partir du repiquage, et sporule de moins en moins au cours des repiquages sur ce milieu (**Figure 10)**. Cependant, après deux à trois repiquages sur milieu PDA, il recommence à sporuler sur la boîte de Pétri.

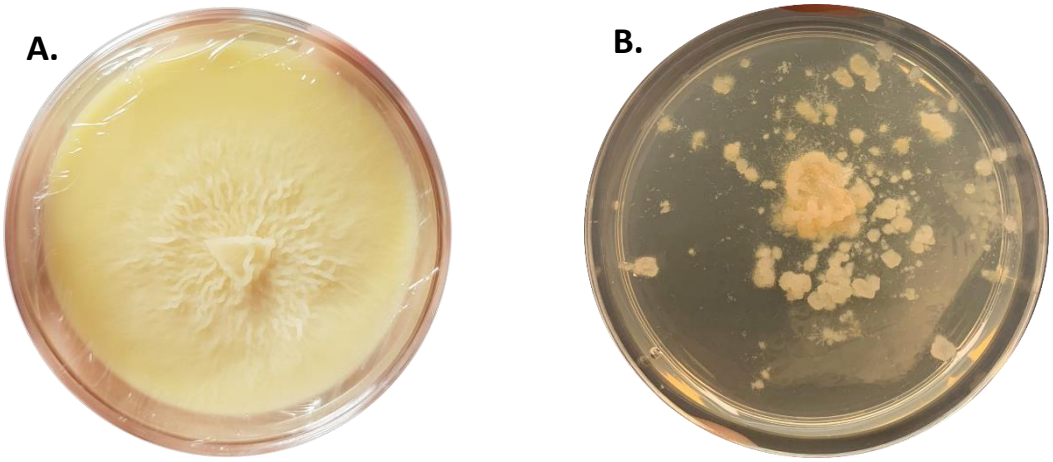


Figure 10. Culture du *Batkoa* sur milieu gélosé. (A) Souche CHR01372 repiquée sur SDAYEYM. (B) Souche CHR01372 repiquée sur PDA.

C. Caractérisation morphologique

Après plusieurs essais infructueux de coloration des noyaux des structures fongiques au lactophénol-acéto-orcéine, c'est finalement le protocole à base d'acéto-orcéine qui a permis de les révéler. A partir de cultures sur milieu SDAYEYM, seuls les hyphes, structures végétatives du champignon, ont pu être observés en microscopie. Ceux-ci sont polymorphiques avec des structures arrondies ou allongées, multinucléés à noyaux granuleux (**Figure 11**). Il n'a pas été possible d'estimer correctement leur nombre de noyaux en raison de ce polymorphisme. Huit lames de conidies primaires de la souche CHR01372 ont été obtenues à partir de cultures de PDA (**Figure 11**). Elles possèdent (18) 20 (23) noyaux (N = 80) mesurant (3.0) 3.4 - 4.2 (4.9) × (2.7) 3.1 - 3.8 (4.5) µm. Ces mesures nous permettent de finaliser la caractérisation des structures principales nécessaires à l'identification d'une espèce entomophthorale. La clé dichotomique de détermination de Humber (2012) nous mène bien au genre *Batkoa* (**Tableau 4**).

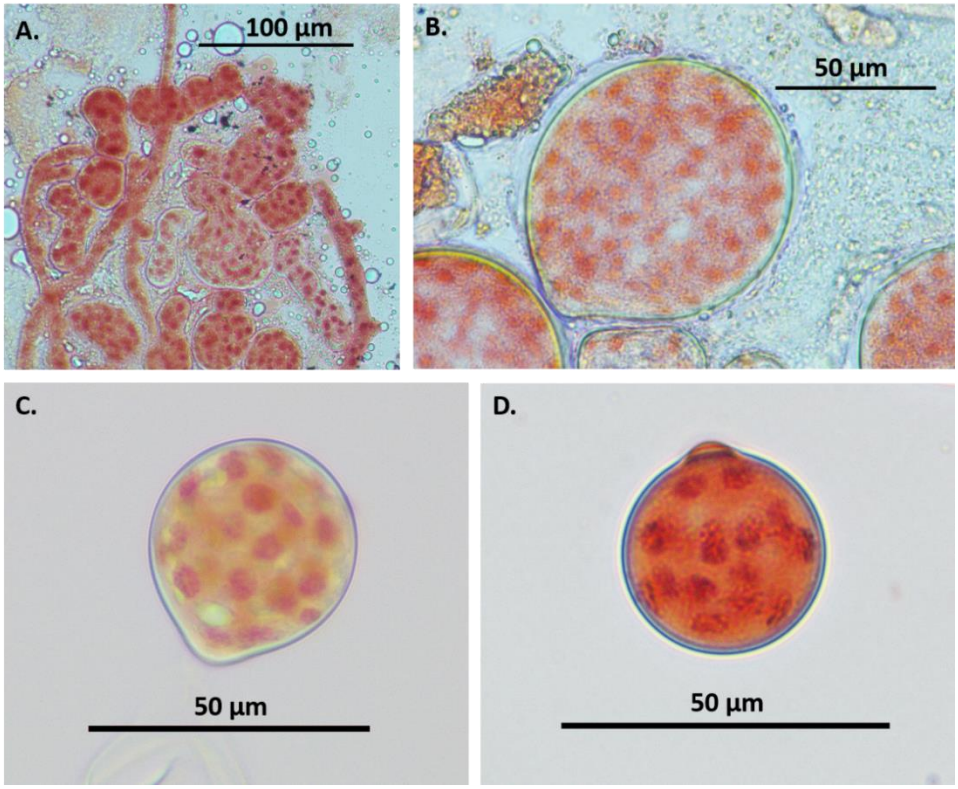


Figure 11. Observation microscopique de spores primaires et d'hyphes du Batkoa. Les noyaux sont colorés en rouge à l'acéto-orcine. (A et B) Hyphes de la souche CHR01372 sur milieu de culture SDAYEYM. (C) Spore primaire de la souche CHR01372 sur milieu PDA. (D) Spore primaire obtenu à partir d'un stomoxe mycosé (CHR01562).

Tableau 4. Comparaison des caractères morphologiques du *Batkoa* avec la clé dichotomique de détermination de Humber (2012).

Clé dichotomique de détermination (Humber, 2012)	Etat	Figure associée
1. L'hôte arthropode est terrestre ou, si aquatique, aucun zoospore flagellé n'est formé.	Oui	Figure 3
2. Des conidies, hyphes ou autres structures fongiques sont visibles sur l'hôte ou le recouvrent; quelques voire aucuns spores ne sont formés à l'intérieur de l'hôte.	Oui	Figure 3
3a. Une croissance fongique peut couvrir tout ou une partie de l'hôte, mais de grandes structures projetées (telles que des corémies ou stroma) sont absentes.	Oui	Figure 3
11a. L'hôte est partiellement à complètement recouvert par une croissance fongique fine, laineuse ou cottoneuse, ou par une plaque sombre mais ne formant pas de stroma dense.	Oui	Figure 3
13a. Les hyphes émergeant de l'hôte ou le recouvrant sont incolore à clair, fin à laineux ou cireux.	Oui	Figure 13
14a. Les conidies se forment sur sur les surfaces externes du champignon; aucunes structures sexuelles (perithecia) ne sont présentes.	Oui	Figure 3
15a. Les conidies sont projetées activement et peuvent produire rapidement des conidies secondaires, éjectées passivement ou activement.	Oui	Annexe 3
25a. Les conidies primaires sont multinuclées.	Oui	Figure 11
29. Dans l'acéto-orcéine, les noyaux sont bien marqués avec des contenus granuleux.	Oui	Figure 11
30a. Les conidies n'ont pas de projection apicale et sont libérées par l'éversion d'une papille ronde.	Oui	Annexe 3
31a. Les conidies sont globuleuses avec une papille émergeant de leur contour; elles sont formées à partir de conidiophores ayant un cou étroit sous la conidie; les rhizoïdes sont deux à trois fois plus épais que les hyphes et ont un crampon discoïdal terminal.	Oui	Annexe 4

Le détail des structures du *Batkoa* sont synthétisées dans le **Tableau 5**. Elles sont également comparées avec les caractéristiques de *B. major*, *B. hydrophila*, *B. apiculata* et *Conidiobolus obscurus* (**Annexe 5**).

Tableau 5. Description des caractéristiques morphologiques et biologiques principales du Batkoa de La Réunion. Les tailles des structures sont exprimées en (min) longueur (max) x (min) largeur (max), et le nombre de noyaux est exprimé en (moyenne – marge d'erreur).

Structures et biologie	Caractéristiques	Batkoa étudié
Conidies primaires	Forme et taille	Sphériques avec une papille ronde : (36.8) 38.8 - 44.7 (49.2) × (32.1) 33.4 - 40.4 (44.2) µm, n=40
	Nombre et taille des noyaux	20 noyaux (20,425 ± 0,265) granuleux : (3.0) 3.4 - 4.2 (4.9) × (2.7) 3.1 - 3.8 (4.5) µm, n=80
	Mode de formation et de libération	Formation à partir d'un conidiophore simple : (19.3) 21.9 - 27.1 (28.5) µm, n=10 Libération active par *papillar evasion*
Conidies secondaires	Forme et taille	Sphériques avec papille ronde : (27.4) 28.7 - 36.1 (38.7) × (22.1) 24.8 - 28.9 (30.9) µm, n=40
Spores dormantes	Forme et taille	Non observées
Cellules végétatives	Forme et taille	Hyphes polymorphiques multinucléés à noyaux granuleux
	Présence de cystides	Non observées
	Présence de rhizoïdes	Simples avec disque de crampon
Pathobiologie	Spécificité d'hôte	Principalement sur stomoxes, retrouvés sur d'autres mouches (mouches domestique et genre *Calliphora*). Spectre d'hôte à étudier.
	Processus d'infection	Contact de conidies infectieuses avec la cuticule de l'hôte
	Mort de l'hôte	6 jours en moyenne après l'infection, mort à la sortie des hyphes du champignon en face ventrale

D. Tests de pathogénicité

La quantité de stomoxes élevés a permis de réaliser trois du test d'infection à partir de stomoxes mycosés, et une seule répétition pour les autres tests. Le dispositif individuel créé pour les tests de pathogénicité a permis de maintenir vivants les adultes en moyenne 7,65 ± 0,99 jours. Les individus étant émergés depuis 7 jours au lancement de chaque test sur adultes, certains ont survécu 33 jours au stade adulte. Pour comparer la survie entre les témoins et les traités de chaque test, nous avons effectué des courbes de survie de Kaplan-Meyer.

(i) Test de conidia shower à partir d'individus mycosés

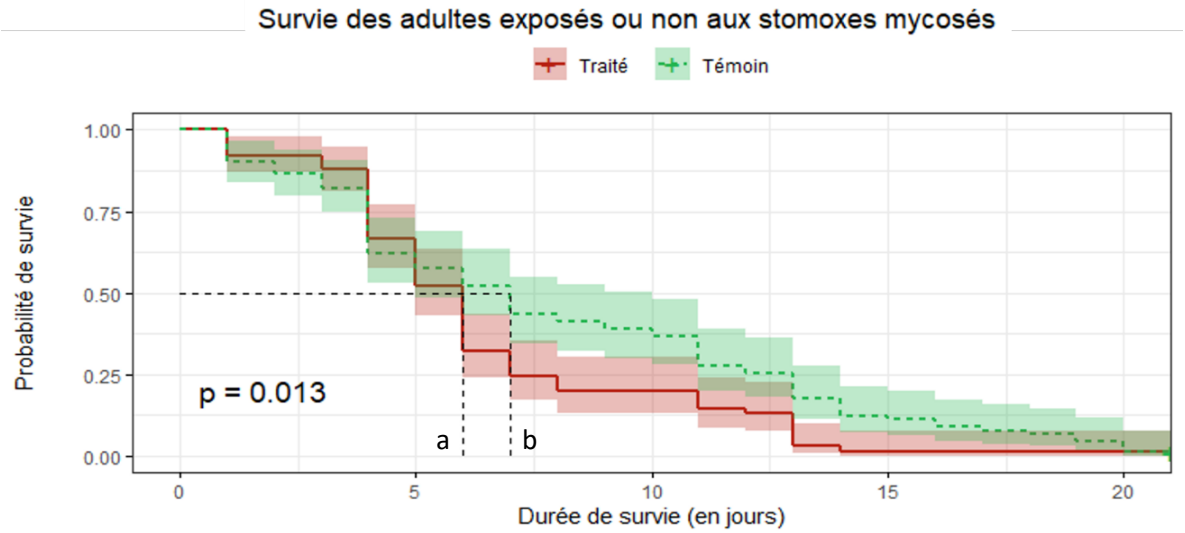


Figure 12. Courbe de survie de Kaplan-Meier de *S. niger niger* contaminés ou non par des individus morts mycosés. Les lettres indiquent en (a) la médiane de survie des individus traités égale à 6 jours et (b) celle des témoins égale à 7 jours. La p-value p = 0,013 est calculée par test de Log-Rank avec correction de Sidak. Les intervalles de confiance à 95% sont visibles.

Durant le test de contamination par *conidia shower* avec des individus mycosés, la survie moyenne des individus traités était de 6.47 ± 0.39 jours et celle des individus témoins de 8.14 ± 0.57 jours. Leurs courbes de survie, toutes répétitions confondues, montrent une différence significative de survie entre les individus traités et les témoins (test de Log Rank, p-value = 0,013 < 0.05) (**Figure 12**). On peut remarquer une diminution plus forte de la survie des individus traités par rapport à celle des témoins au sixième jour (**Figure 12**). Celle-ci concorde avec l'apparition de mycoses chez les individus traités, retrouvés morts fixés à la paroi du dispositif individuel par des rhizoïdes en face ventrale (**Figure 13**). Au total, 14 individus traités sur 90 ont été mycosés, soit un taux de mycoses observées de 15,56% (± 7,6%). Le temps moyen de mycose était de 5,8 ± 0,37 jours, et le temps médian de 6 jours. Aucune mycose n'a été observée chez les témoins ni chez les autres individus morts mis en chambre humide. Les individus mycosés mis en chambre humide n'ont pas développé de conidies en face dorsale.

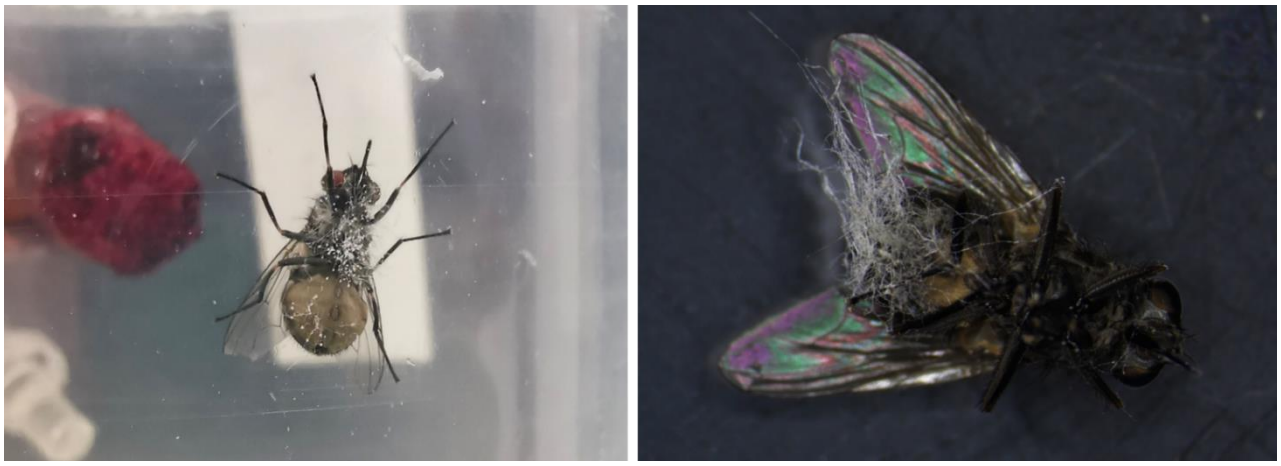


Figure 13. *S. niger niger* mycosés, six jours après l'exposition aux spores d'un stomoxe mycosé. (A) *S. niger niger* mort, collé en face ventrale à la paroi du dispositif individuel par les rhizoïdes sortant du thorax et de l'abdomen. (B) Observation sous loupe binoculaire de rhizoïdes sortant de l'abdomen.

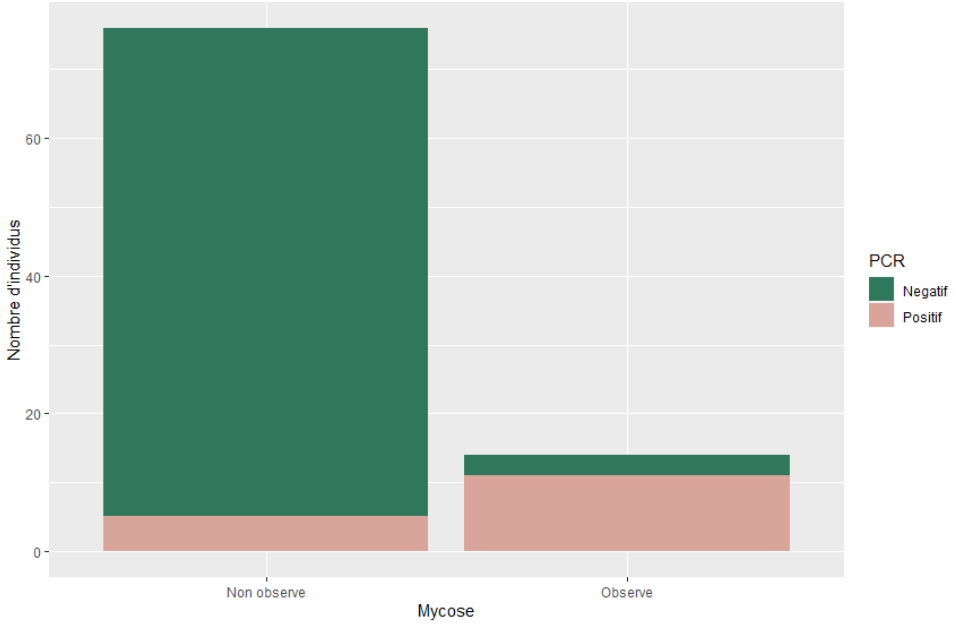


Figure 14. Détection par PCR du *Batkoa* chez les individus traités par *conidia shower* à partir d'individus mycosés, après observation ou non d'une mycose extérieure.

Pour appuyer ces observations et vérifier la présence ou l'absence du *Batkoa* chez les individus, nous avons effectué une PCR spécifique sur le 28S nucLSU pour chaque individu traité. Les amplifications ont révélé la présence du champignon chez six individus traités pour qui la mycose n'était pas observable extérieurement, soit un pourcentage de 6,57% (± 5,7%) non mycosés, positifs en PCR. A l'inverse, seulement 78,57% (± 24,6%) des individus mycosés ont été détectés positifs en PCR, avec trois individus mycosés détectés négatifs en PCR (**Figure 14**).

(ii) Test de *conidia shower* à partir d'une culture de *Batkoa*

Les traités et les témoins de ce test présentent des courbes de survie de Kaplan-Meier confondues entre elles. En moyenne, la survie des individus traités est de 5.5 ± 0.85 jours et celle des individus témoins est de 6.17 ± 1.0 jours. Il n'y a pas de différence significative de survie entre les deux groupes (test de Log Rank, p-value = 0,71) (**Figure 15**). Aucun individu de ce test n'a été mycosé ni détecté positif au *Batkoa* en PCR spécifique.

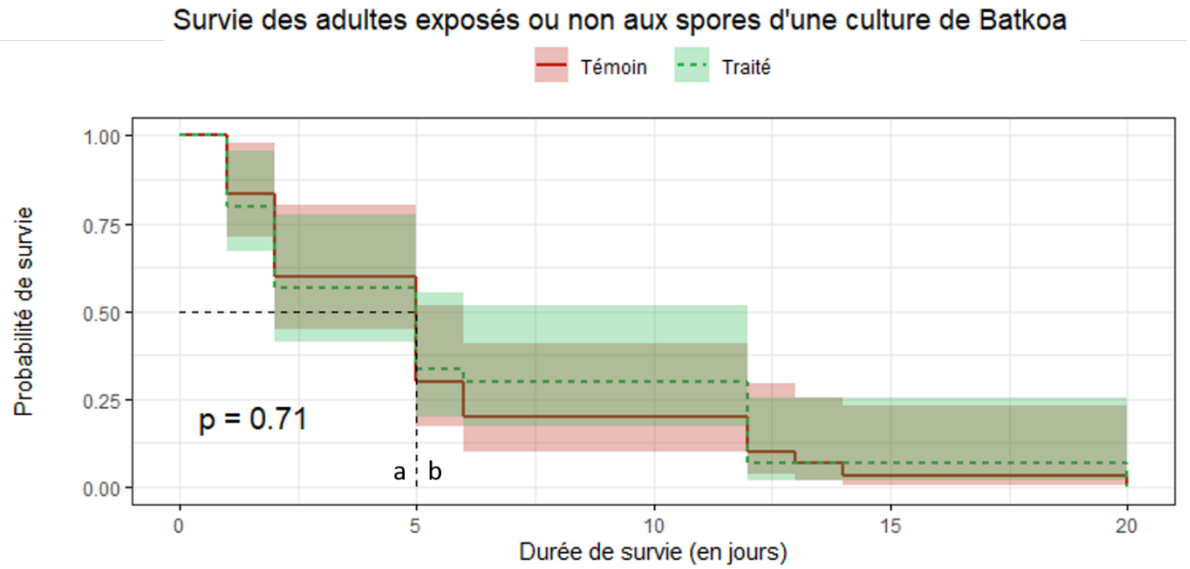


Figure 15. Courbe de survie de Kaplan-Meier de *S. niger niger* contaminés ou non par des spores d'une culture de *Batkoa*. Les médianes de survie des traités (a) et des témoins (b) sont égales à 5. La p-value p = 0,71 est calculée par test de Log-Rank avec correction de Sidak's. Les intervalles de confiance à 95% sont visibles.

(iii) Test par contact direct d'adultes avec une culture du Batkoa

Comme le second test, les courbes de survie de Kaplan-Meier des traités et des témoins sont confondues. Leur moyenne de survie est respectivement de 8,67 ± 1,61 jours et de 8,27 ± 1,71 jours. On observe cependant une forte mortalité des deux groupes dès le premier jour, avec la mort de 43,3% des traités et 53,3% des témoins. Aucune différence significative de survie n'est détectable entre les traités et les témoins (test de Log Rank, p-value =0,79) (**Figure 16**). Aucun individu de ce test n'a été mycosé ni détecté positif au *Batkoa* en PCR spécifique.

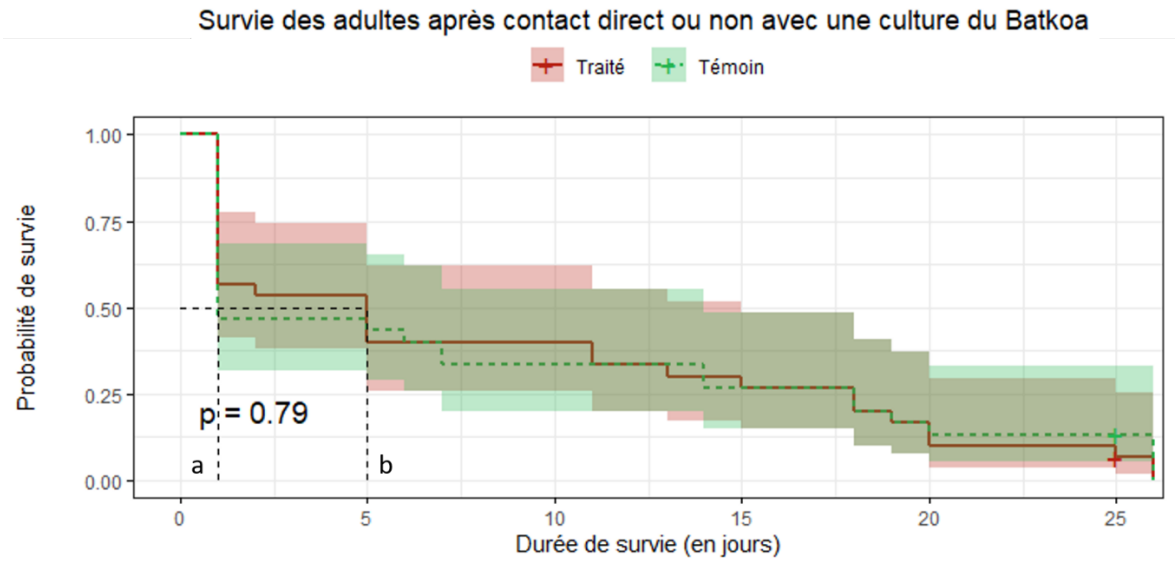


Figure 16. Courbe de survie de Kaplan-Meier de *S. niger niger* mis en contact ou non avec culture de *Batkoa*. La médiane de survie des traités (a) est de 1 jour et celle des témoins (b) est de 5 jours. La p-value p = 0,79 est calculée par test de Log-Rank avec correction de Sidak's. Les intervalles de confiance à 95% sont visibles.

(iv) Test par contact direct de larves avec une culture de *Batkoa*

L'analyse de survie des individus de ce test se base sur les adultes émergés. Cependant, le taux d'émergence total a été assez faible, avec seulement 35% d'individus émergés, dont 6 témoins et 15 traités. Parmi ces effectifs, la moyenne de survie des traités est de 9,93 ± 1,6 jours, et celle des témoins est de 15,83 ± 3,31 jours. Bien que les courbes de survie de Kaplan-Meier ne semblent pas confondues, il n'y a pas de différence significative de survie entre les traités et les témoins (test de Log Rank, p-value = 0,077) (**Figure 17**). Aucun individu n'a été mycosé ou positif au *Batkoa* par PCR spécifique.

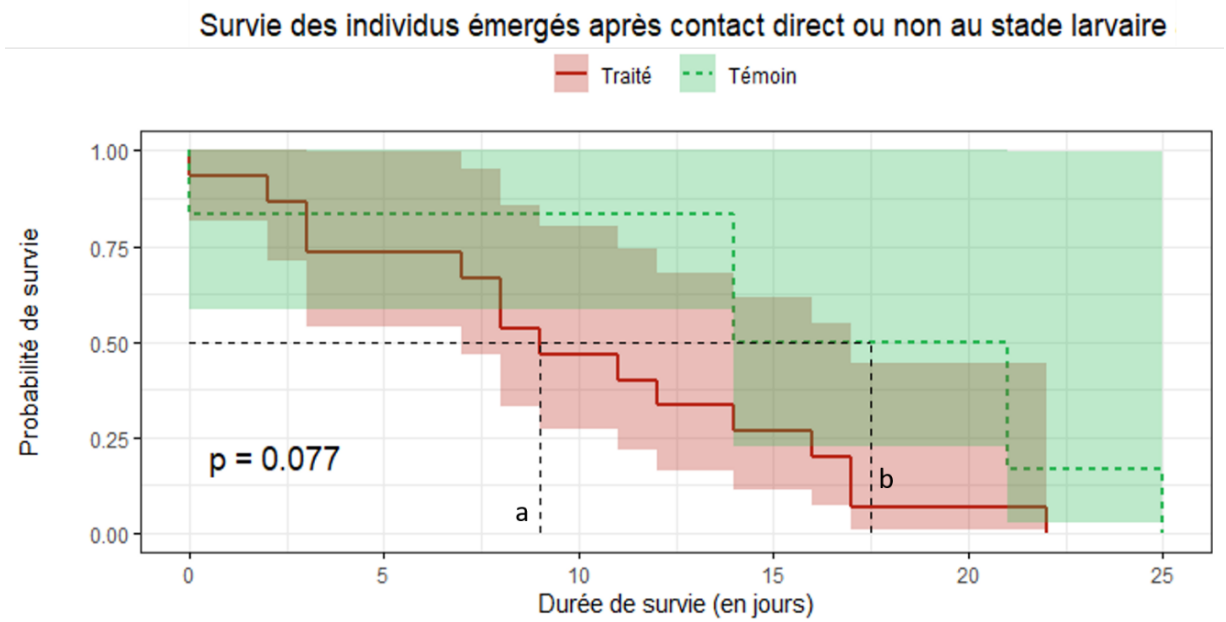


Figure 17. Courbe de survie de Kaplan-Meier de *S. niger niger* mis en contact ou non avec culture de *Batkoa* au stade larvaire. La médiane de survie des traités (a) est de 9 jours et celle des témoins (b) est de 17,5 jours. La p-value p = 0,077 est calculée par test de Log-Rank avec correction de Sidak's. Les intervalles de confiance à 95% sont visibles.

E. Caractérisation morphologique des Stomoxys sp.

Des stomoxes adultes dont les critères morphologiques ressemblaient mais ne correspondaient pas tout à fait à *S. niger niger* ont été récupérées sur le terrain. Selon la clé de détermination de Zumpt (1973) et les observations de Richard (1908), ces *Stomoxys* sp. correspondraient plutôt à *Stomoxys indicus* (Richard, 1908). Ils sont légèrement plus petits, de 4 à 6mm de longueur contre 5 à 7mm de longueur pour les *S. niger*. Leur abdomen est gris bleuâtre, il présente une ligne médiane en longueur noire et étroite, les trois premiers segments présentent une large bande noire, celle du second segment couvrant un plus grand espace que la partie grise (Richard, 1908, Zumpt, 1973) (**Figure 18**).

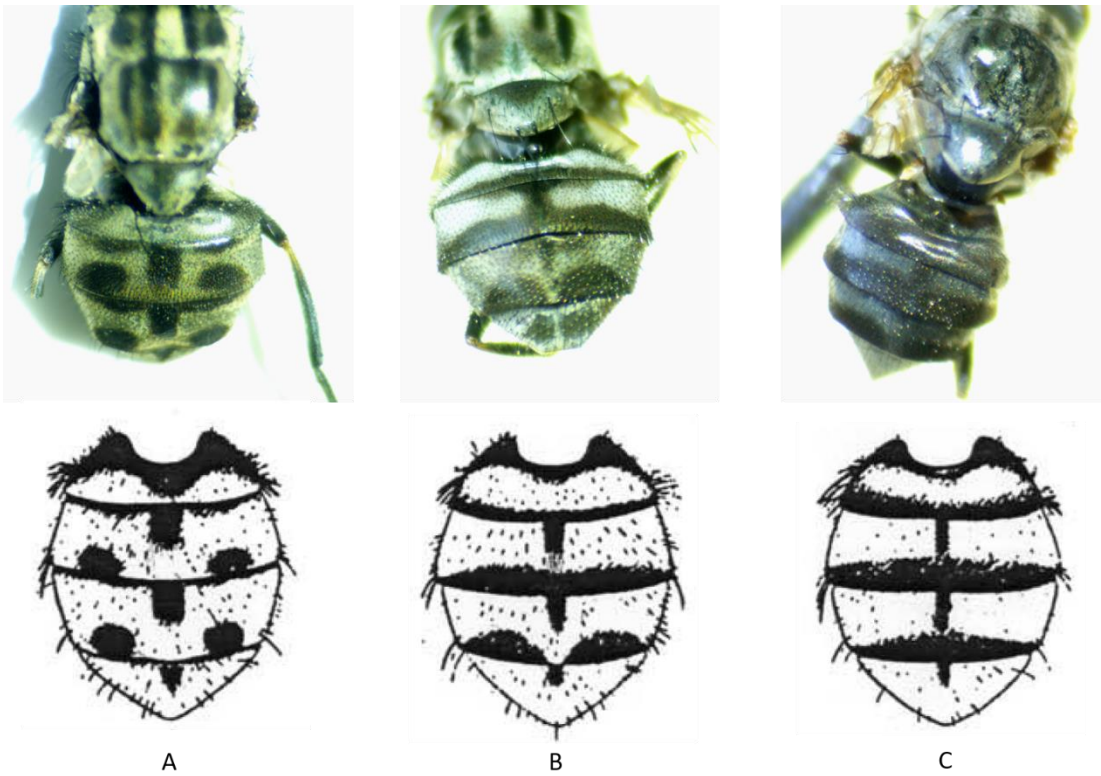


Figure 18. Photos et schémas des caractéristiques morphologiques des stomoxes (d'après Zumpt, 1973). (A) Abdomen de S. calcitrans. (B) Abdomen de S. niger niger. (C) Schéma de l'abdomen de S. indicus et photo de Stomoxys sp. de La Réunion. (Photos : Y. Grimaud)

F. Caractérisation moléculaire du champignon et des Stomoxys sp.

L'ADN des quatre souches isolées a pu être extrait et amplifié à l'aide des amorces spécifiques du 28S nucLSU. En revanche, les nouveaux couples d'amorces testés ciblant ITS1, ITS1 et RPB2 n'ont pas permis d'amplifier le champignon. Les amplicons des quatre nouvelles souches et des individus des tests de pathogénicité ont été envoyés au séquençage chez Macrogen (Pays-Bas) mais les résultats sont en attente.

Quatre séquences d'un fragment 5P-COI de 587 pb ont été amplifiées pour nos *Stomoxys* sp. Elles se classent dans l'arbre phylogénétique déjà construit par J. Win Chin (2021), parmi 72 séquences d'individus du genre *Stomoxys*. Nos séquences se classent dans deux clades : deux se classent avec des souches d'Afrique du Sud, et deux

autres se classent avec des souches de *S. indicus*. de Thaïlande, avec un pourcentage de similarité de 100% (**Figure 19**).

Figure 19. : Arbre phylogénétique utilisé pour l'assignation taxonomique des *Stomoxys* sp. à partir des amplifications d'un fragment 5P-COI (587 pb). La topologie et les longueurs des branches ont été estimées par maximum de vraisemblance avec le modèle GTR, *Musca domestica* est utilisé comme outgroup. Les valeurs des probabilités postérieures bayésiennes sont indiquées le long des branches. La barre d'échelle indique les substitutions par site. Les séquences surlignées en vert sont les séquences issues de l'étude de J. Win Chin (2021) et de cette étude. Les étoiles bleues correspondent à nos quatre séquences.

Discussion

Cette étude a reposé sur deux étapes préliminaires : la mise en place d'un élevage de stomoxes, l'isolement et la culture du champignon, pour lesquelles l'obtention de matériel biologique en quantité suffisante a été difficile.

Tout d'abord, la mise en place de l'élevage a été très chronophage et deux mois ont été nécessaires avant d'aboutir à une productivité suffisante pour lancer les premiers tests de pathogénicité. La diminution du nombre de pontes dès la troisième génération a entraîné une forte baisse de la productivité de l'élevage et empêché la réalisation de d'avantages de répétitions des tests pathogènes. Cette diminution pourrait être due à une dépression de consanguinité, souvent crainte dans les élevages (Sorenson et al. 2012). Il a déjà été démontré chez d'autres insectes hématophages, tels que les moustiques *Aedes aegypti*, que lorsque les populations en élevages sont de petites tailles (< 1000 individus), la dépression de consanguinité au bout de huit générations peut amener à une réduction de la fertilité des femelles et du succès reproductif des mâles (Ross et al. 2019). Face à cette hypothèse, nous avions introduits de nouveaux individus sauvages pour réduire cette consanguinité dans nos cages qui contenaient au maximum 800 adultes, mais cette stratégie n'a pas permis le maintien fonctionnel de l'élevage. Ce résultat associé à une diminution du nombre de pontes en seulement trois générations rend peu probable l'hypothèse de dépression de consanguinité. Une deuxième hypothèse serait que des pathogènes ou parasites de stomoxes n'aient pas été détectés

et aient limité le développement de notre élevage. L'apport d'individus sauvages n'aideraient alors pas à le relancer. Notre troisième hypothèse propose que les conditions d'élevage ne seraient peut-être pas suffisamment contrôlées. Nous avons notamment un puit de lumière dans la chambre climatique qui nous empêche de maîtriser la photopériode. La température, l'humidité ambiante ou la qualité de nutrition sont autant de paramètres à prendre en compte et dont la fluctuation, même légère, peut mener à la baisse de la fitness des individus (Colinet et al. 2015). De plus, la maîtrise de l'élevage n'était pas parfaite puisque partagée entre trois à quatre personnes au cours de la semaine et le weekend. Un meilleur contrôle de ces conditions nécessiterait de travailler à deux personnes dédiées à ce travail à plein temps.

Pour étudier la diversité génétique et la variabilité du pouvoir pathogène du champignon, il est nécessaire de disposer de collections de souche. Pour cela, il est indispensable de les isoler. Le faible taux d'isolement obtenu pourrait être lié à plusieurs paramètres : la nature récalcitrante du champignon, la sporulation des insectes mycosés et la nature du milieu de culture. Il est généralement difficile de cultiver un entomophthorale. Leur culture nécessite des milieux très riches, il n'est donc pas étonnant d'obtenir un taux d'isolement assez faible au début de l'étude d'un tel champignon (Hajek, 2012). Ensuite, tous les stomoxes mycosés mis en chambre humide ne sporulaient pas. Il est probable que dans certains cas le champignon ait déjà sporulé avant la collecte des stomoxes et ne puissent plus produire de conidies, ou que les conditions en chambre humide ne soient pas optimales pour cette sporulation. L'isolement a toujours été fait sur SDAYEYM, puisque son enrichissement en extrait de levure, en lait entier et en œufs bio permet une croissance rapide de ce champignon. Cependant, il permet également la croissance de nombreux autres micro-organismes contaminant les milieux malgré les moyens mis en œuvre pour préserver la stérilité, que ce soit à partir du microbiote des insectes ou d'acariens apportés avec. Le maintien des cultures sur ce milieu implique donc des repiquages réguliers assez chronophages. Un second point notable de la culture de ce *Batkoa* est sa différence de croissance selon son milieu de culture. La pousse végétative du champignon repiquée sur SDAYEYM par rapport à la sporulation observée sur PDA peut d'abord être due à la richesse du milieu. Sur SDAYEYM, le champignon a accès a beaucoup plus de nutriments que sur PDA où il est limité. Il a déjà été montré chez un autre EPF, *Metarhizium anisopliae* Sorokin 1883, que sa production de conidies est plus faible en absence de stress nutritionnel (Rangel et al. 2008). On peut donc avoir une adaptation du champignon à son milieu de culture qui n'a alors pas besoin de produire des conidies pour sa propagation et sa survie. Cependant, sa faible production de conidies après plusieurs repiquages sur ce milieu enrichi peut également laisser supposer à une dégénération phénotypique, déjà observée chez la plupart des entomophthorales cultivés (Butt et al. 2006, Shah et al. 2005). Celle-ci correspond à une modification de la morphologie des structures du champignon au cours des repiquages, avec un changement de pigmentation possible, une croissance plutôt végétative associée à une atténuation de la virulence des conidies et de leur production (Butt et al. 2006, Shah et al. 2005). Cette atténuation de la virulence est réversible chez la plupart des EPF, grâce à son passage à travers un hôte vivant (Hajek et al. 1990, Shah et al. 2005). Souvent non définitive, cette dégénération phénotypique peut représenter un obstacle à l'étude de la virulence d'un EPF et à sa production de masse pour la lutte biologique, devant ainsi être contrôlée (Butt et al. 2006). Il serait intéressant de vérifier l'évolution morphologique de ses structures au cours de repiquages successifs sur SDAYEYM.

Avant de pouvoir développer un agent de lutte biologique, il est absolument nécessaire de maîtriser nos connaissances sur le pathogène candidat et sur sa biologie. Nous avons pu isoler quatre souches durant cette étude.

Elles nous ont permis de compléter la caractérisation morphologique du *Batkoa* déjà commencée par J. Win Chin (2021) à travers la description de ses structures principales (**Tableau 4**). Cette caractérisation morphologique rejoint les observations de J. Win Chin et correspond bien à un *Batkoa* dont les structures sont semblables à celles de *Batkoa apiculata* (Humber, 1989, Ghavazi et al. 2008) (**Annexe 5**). Cependant, très peu de données morphologiques existent dans la littérature sur ce genre de manière générale, et elles ne sont parfois pas suffisantes pour différencier deux espèces. J. Win Chin avait associé moléculairement le *Batkoa* isolé à l'espèce *B. australiensis*, non décrite officiellement (Win Chin, 2021). Les analyses moléculaires de nos nouvelles souches sont encore en attente, mais leurs résultats nous indiqueront si elles rejoignent la souche étudiée par J. Win Chin et si nous avons bien pu décrire morphologiquement une nouvelle espèce de *Batkoa*. La taxonomie, permettant de caractériser, classifier et nommer les taxons, est essentielle pour explorer la biodiversité. Notre cas illustre bien la limite de la taxonomie dite « classique » qui se base sur la morphologie. En effet, les ressemblances morphologiques entre espèces ne permettent parfois pas de les séparer avec précision (Dayrat, 2005). La taxonomie intégrative cherche à dépasser cette limite. Elle inclut différentes approches (morphologiques, génomiques, chimiques, écologiques…) pour donner la description d'un organisme la plus complète et précise possible (Shlick-Steiner et al. 2010). Cette pluridisciplinarité nous est indispensable pour identifier correctement notre champignon, ce pourquoi il est important de le caractériser moléculairement et de mieux appréhender son cycle de vie.

Dans ce but, notre second objectif reposait sur l'exploration du pouvoir pathogène du champignon. Le dispositif de contamination et de suivi individuel mis au point au cours de ce stage a permis la survie des individus sur 7,65 ± 0,99 jours en moyenne. La diminution plutôt linéaire de la survie des individus témoins est en accord avec nos observations en élevage, puisque peu d'adultes atteignent réellement la durée maximale de leur stade de quatre semaines. Ce dispositif est un atout pour la réalisation des tests de pathogénicité, empêchant toute contamination croisée. Néanmoins, le nourrissage quotidien par le changement d'éponge reste chronophage. Nous avons réussi à évaluer le pouvoir pathogène de notre champignon, c'est-à-dire sa capacité à provoquer la maladie chez les stomoxes. Les tests de *conidia shower* à partir d'individus mycosés ont démontré que l'exposition aux conidies du champignon provoque une mortalité plus forte des individus traités par rapport aux témoins. Un taux de mycose de 15,6% est observé. On retrouve chez les individus contaminés comme dans la nature, l'apparition de rhizoïdes fixant les stomoxes à la paroi du dispositif autour du sixième jour. Les tests réalisés à partir des cultures de champignon n'ont révélé aucune différence de mortalité. Aucune mycose n'a été observée ni détectée par PCR chez les individus traités. Ces résultats doivent être répétés car nous n'avons pu réaliser qu'une seule répétition. Cependant, si les cultures de PDA étaient bien en sporulation, l'absence d'infection à partir de ces conidies pourrait indiquer une dose infectieuse trop faible. Le nombre de conidies observé sur ces cultures était très faible en comparaison de ce que l'on observe sur un insecte mycosé, et l'on sait que la réponse aux spores de champignons entomopathogènes est dose dépendante (Rohrlich et al 2018). Elle pourrait également être due à une virulence moindre des conidies produites par les cultures du champignon par rapport à celles produites par les insectes mycosés, en raison de sa culture sur milieu gélosé et des repiquages (Hajek, 1990, Hajek, 2012). En ce qui concerne les tests par contact direct, les cultures utilisées n'étaient plus en sporulation mais constituées de mycélium végétatif non infectant, comme nous avons pu l'observer en microscopie optique (**Figure 11**).

En parallèle de son pouvoir pathogène lié aux conidies, nous avons pu estimer que le temps nécessaire au développement interne du champignon avant sa sortie de l'hôte est d'environ six jours. En revanche, à ce stade de l'étude, il ne nous est pas possible de préciser si la mort de l'hôte survient avant ou après la sortie des rhizoïdes en face ventrale. Si la propagation du *Batkoa* se fait dans l'hémolymphe comme la majorité des entomophthorales, la mort de l'hôte peut être provoqué par arrêt de la circulation de l'hémolymphe lorsque tout l'espace est occupé par les structures fongiques, par privation de nutriments et par dysfonctionnement des organes (Humber, 2016). Concernant le cycle du champignon, nous pouvons avancer qu'il infecte les stomoxes par contact de ses conidies avec leur cuticule. Au bout de six jours, l'hôte meurt et les rhizoïdes du champignon sortent en face ventrale, fixant l'hôte à un substrat (la paroi du dispositif individuel en l'occurrence). Cependant, nous n'avons pas observé de sporulation à partir de la face dorsale de l'abdomen des stomoxes infectés. Il serait possible que les conditions en chambre humide ne soient pas optimales pour la sporulation. *In naturae,* les stomoxes mycosés sur la végétation sont asséchés, bien que l'humidité relative de l'air soit assez haute à La Réunion. Lorsqu'ils sont déposés sur buvard humide pour isolement, le champignon apparaît souvent déjà en face dorsale, ce qui n'était pas le cas lors des tests de pathogénicité. Il serait intéressant de regarder si les conidies du champignon apparaissent en laissant l'individu collé à la paroi du dispositif, en reproduisant les conditions environnementales naturelles.

La vérification par amplification de la présence du *Batkoa* chez les individus avec une mycose observable et son absence chez les autres n'a pas mené à un résultat aussi net qu'attendu. L'absence de détection du *Batkoa* chez des individus mycosés est probablement due à un problème lors de l'extraction ou de stockage de l'ADN, comme un expérimentateur qui aurait mélangé les échantillons à cette étape. Il est peu probable qu'une autre mycose inconnue provoquant les mêmes symptômes ait été transmise à partir des individus mycosés du terrain. La détection du *Batkoa* chez des individus non mycosés pourrait être la conséquence de ces mélanges de tubes, de contaminations entre échantillons ou d'un nettoyage insuffisant de la cuticule de l'insecte à la javel, laissant quelques structures fongiques. Il est également possible que le champignon ait pénétré l'insecte, mais n'ait pas réussi à se développer suffisamment pour provoquer une réelle infection.

Ces premiers tests de pathogénicité nous ont en plus permis de vérifier les deux premiers postulats de Koch. Pour rappel : (i) l'organisme pathogène doit être retrouvé chez tous les hôtes affectés par la maladie, (ii) il doit pouvoir être isolé et cultivé en laboratoire, (iii) à partir de la culture, il doit être inoculé expérimentalement chez un individu sain qui doit développer la maladie, (iv) il doit être isolé à partir de l'individu inoculé et doit être identique à l'organisme pathogène de départ. Le deuxième postulat est particulièrement important si l'on veut utiliser ce champignon dans des stratégies de lutte augmentatives. Les cultures du *Batkoa* n'ayant pas infecté les individus sains, le troisième postulat n'a pas été vérifiable. Pour le dernier postulat, l'isolation n'a pas été possible par absence de sporulation des stomoxes infectés. Les postulats de Koch, créés dans les années 1880 pour montrer la causalité entre un microorganisme et une maladie, ont été rediscutés de nombreuses fois. Beaucoup d'organismes pathogènes, particulièrement les parasites obligatoires comme la plupart des EPF, ne peuvent pas être cultivés et ne peuvent pas vérifier les postulats. Cependant, les avancées en matière de technologie, et notamment en séquençage d'acides nucléiques, peuvent être utilisées pour souligner la démonstration de cette causalité (Fredricks et Relman, 1996). Bien qu'elles ne se substituent pas à la vérification des postulats, les analyses moléculaires (en attente) pourront

vérifier que l'infection est bien provoquée par le *Batkoa,* autant chez les individus infectés issus des tests que chez les individus ayant servi à leur infection. Nous pourrons alors supposer une causalité entre le champignon et la maladie.

Les infections provoquées par notre *Batkoa* sont également reconnaissables à la position des stomoxes morts. Durant nos tests, les individus non infectés sont retrouvés morts au fond de la boîte, en position recroquevillée. Les individus infectés sont eux retrouvés fixés à la paroi par la face ventrale, dans la même position que les stomoxes mycosés fixés aux reposoirs végétaux dans les élevages (Barré, 1981, Win Chin, 2021). Cette disposition, en hauteur et les ailes légèrement écartées, faciliterait la dispersion des spores à leur libération. Chez les *Entomophthoraceae*, plusieurs champignons entomopathogènes sont connus pour manipuler de la sorte le comportement de leurs hôtes. Nous pouvons par exemple citer *Arthrophaga myrioapodina* Hodge & Hajek 2017 qui pousse ses hôtes à grimper en hauteur pour mourir (Hodge et al. 2017), ou *Massospora cicadina* Peck 1878 qui modifie le comportement sexuel des cigales *Magiciada spp*. pour favoriser la dispersion de ses spores (Cooley et al. 2018). Il serait donc possible que ce *Batkoa* ait développé une adaptation pour maximiser sa transmission en manipulant le comportement de ses hôtes.

Enfin, notre étude démontre la présence d'une espèce de stomoxe encore jamais décrite à La Réunion : *S. indicus*. Peu de données existent dans la littérature sur cette espèce. Elle est répartie principalement en Asie orientale, centrale et du Sud-Est avec une abondance similaire à celle de *S. calcitrans* (Zumpt, 1973, Keawrayup et al. 2012). Comme pour *S. niger* et *S. calcitrans*, cette espèce est diurne et s'attaque au bétail (Baldacchino, 2013). Les stomoxes étant des vecteurs mécaniques, leur différence d'impact épidémiologique se situerait plutôt au niveau de leur activité quotidienne et saisonnière que sur leurs différences physiologiques (Keawrayup, 2012). En revanche, *S. indicus* pourrait être plus ou moins sensible aux méthodes de lutte déjà mises en place. Une bonne connaissance de la biologie et de l'écologie de toutes les espèces présentes à La Réunion serait nécessaire pour vérifier l'efficacité de ces méthodes de lutte, les adapter si nécessaire et prendre en compte cette nouvelle espèce dans nos études.

Pour conclure, les travaux complémentaires réalisés durant cette étude sur la caractérisation morphologique de ce champignon entomopathogène de stomoxes à La Réunion confirment son appartenance au genre *Batkoa*, avec des caractéristiques similaires à l'espèce *B. apiculata*. Seules les analyses moléculaires en cours et la collecte de plus de souches permettront de s'il s'agit d'une espèce proche de *B. australiensis* ou d'une nouvelle espèce. Les tests de pathogénicité réalisés sur *S. niger niger* ont permis de caractériser une partie de son pouvoir pathogène et de son cycle. Nous sommes capables d'infecter expérimentalement les stomoxes avec notre champignon. Les tests confirment le rôle infectieux des conidies par contact avec la cuticule des stomoxes et vérifient les deux premiers postulats de Koch, nécessaires dans le cadre de la production de masse du champignon pour la lutte biologique par stratégie augmentative. Cette étude permet finalement de continuer l'évaluation du potentiel du *Batkoa* pour la lutte biologique. A moyen terme, il sera nécessaire d'isoler plus de souches pour évaluer sa diversité intraspécifique, qui peut entrainer des variations de pouvoir pathogène (Humber, 2016). Ces essais biologiques devront être menés sur *S. calcitrans*, sur *S. indicus* ainsi que sur d'autres insectes en laboratoire pour appréhender son spectre d'hôte. Bien que les entomophthorales soient majoritairement spécialistes, il a été très récemment démontré que l'espèce *Batkoa major* infecte plus de cinq ordres et 23 familles différentes (Grygianskyi et al. 2021). Un spectre d'hôte aussi large peut compliquer l'utilisation d'un EPF en lutte biologique en s'attaquant à des insectes non nuisibles, d'où

l'importance de l'étudier pour estimer le potentiel de cet EPF. A long terme, une fois le champignon bien décrit et son potentiel en tant qu'agent de lutte biologique validé, plusieurs étapes seront nécessaires avant son utilisation. L'étude de sa diversité génétique permettra la sélection d'une lignée optimale pour sa commercialisation. Des méthodes de conservation et de production de masse devront être mises en place, la culture sur milieu n'étant pas adaptée à cause des repiquages et de la possible dégénération phénotypique (Hajek, 2012). Cette étude n'est que le début de la recherche sur ce champignon, et un long chemin reste encore à parcourir. Si ce projet aboutit, la commercialisation de ce *Batkoa* ne verra probablement le jour que dans plusieurs années.

Bibliographie

Ali-Shtayeh, Mohammed S., Abdel-Basit B.M. Mara'i, et Rana M. Jamous. « Distribution, occurrence and characterization of entomopathogenic Fungi in Agricultural Soil in the Palestinian Area ». *Mycopathologia* 156, nº 3 (1 octobre 2003): 235-44.

Baldacchino, Frédéric, Vithee Muenworn, Marc Desquesnes, Florian Desoli, Theeraphap Charoenviriyaphap, et Gérard Duvallet. « Transmission of Pathogens by Stomoxys Flies (Diptera, Muscidae): A Review ». *Parasite* 20 (2013): 26.

Barré, Nicolas. *Les stomoxes ou « mouches boeuf » à la Réunion*. GERDAT-EIMVT. Maisons-Alfort, 1981.

Bensch, K. « Mycobank », 2018.

Berry, I. L., D. A. Stage, et J. B. Campbell. « Populations and economic impacts of stable flies on cattle ». *American Society of Agricultural and Biological Engineers* 26, nº 3 (1983): 873-77.

Bouyer, J, et F Stachurski. « Mission d'appui pour les orientations du programme CMTV (Contrôle des Maladies à Transmission Vectorielle) », 2009, 36.

Bouyer, Jérémy. « Importance épidémiologique et contrôle des stomoxes à la Réunion ». *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* n°43/Spécial DOM-TOM (2011): 53-58.

Butt, Tariq M., Chengshu Wang, Farooq A. Shah, et Richard Hall. « Degeneration of Entomogenous Fungi ». In *An Ecological and Societal Approach to Biological Control*, édité par J. EILENBERG et H.M.T. HOKKANEN, 213-26. Progress in Biological Control. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006.

Campbell, J. B., S. R. Skoda, D. R. Berkebile, D. J. Boxler, G. D. Thomas, D. C. Adams, et R. Davis. « Effects of Stable Flies (Diptera: Muscidae) on Weight Gains of Grazing Yearling Cattle ». *Journal of Economic Entomology* 94, nº 3 (1 juin 2001): 780-83.

Catangui, Michael A., John B. Campbell, Gustave D. Thomas, et David J. Boxler. « Calculating economic injury levels for stable flies (Diptera: Muscidae) on feeder heifers ». *Journal of Economic Entomology* 90, nº 1 (1 février 1997): 6-10.

Chandler, D. « Basic and Applied Research on Entomopathogenic Fungi ». In *Microbial Control of Insect and Mite Pests*, édité par Lawrence A. Lacey, 69-89. Academic Press, 2017.

Colinet, Hervé, Brent J. Sinclair, Philippe Vernon, et David Renault. « Insects in fluctuating thermal environments ». *Annual review of entomology* 60 (7 janvier 2015): 123-40.

Cooley, J.R., D. Marshall, et K. Hill. « A specialized fungal parasite (Massospora cicadina) hijacks the sexual signals of periodical cicadas (Hemiptera: Cicadidae: Magicicada) ». *Scientific Reports* 8, nº 1432 (2018).

Dayrat, B. « Towards integrative taxonomy ». *Biological Journal of the Linnean Society* 85, nº 3 (1 juillet 2005): 407-17.

Desquesnes, Marc, Emilie Bouhsira, Piangjai Chalermwong, Léa Drosne, Gérard Duvallet, Michel Franc, Geoffrey Gimonneau, et al. « Insecticide-impregnated screens used under 'multi-target method' for haematophagous fly control in cattle: a proof of concept ». In *Ecology and Control of Vector-borne Diseases*, édité par Constantianus J.M. Koenraadt, Jeroen Spitzen, et Willem Takken, 6:91-105. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2021.

Desquesnes, Marc, Mamadou L Dia, et Geneviève Acapovi. « Les vecteurs mécaniques des trypanosomoses animales », 2005, 67.

Ehrhardt, Nicolas. « Etude de l'activité d'une formulation à 50‰ de deltaméthrine sur Stomoxys calcitrans à la Réunion : résistance et rémanence ». Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, 2006.

Eilenberg, J., A. Hajek, et C. Lomer. « Suggestions for unifying the terminology in biological control ». *BioControl* 46, nº 4 (1 décembre 2001): 387-400.

Faria, Marcos R. de, et Stephen P. Wraight. « Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A Comprehensive List with Worldwide Coverage and International Classification of Formulation Types ». *Biological Control* 43, nº 3 (1 décembre 2007): 237-56.

Foil, LD, et JA Hogserre. « Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. » *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 13, nº 4 (1994): 1125-58.

Fredricks, D., et D. A. Relman. « Sequence-based evidence of microbial disease causation: When Koch's postulates don't fit ». *Journal of NIH Research* 8, nº 10 (1996): 39-44.

Ghazavi, M, Zanganeh Sima, Zare Rasoul, et Hywel Jones N. « Batkoa Apiculata, a new species of entomophthorales for Iran » 9, nº 130 (1 janvier 2008): 130-32.

Gilles, Jeremie, Jean-Francois David, et Gerard Duvallet. « Temperature effects on development and survival of two stable flies, Stomoxys Calcitrans and Stomoxys Niger Niger (Diptera: Muscidae), in La Réunion Island ». *JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY* 42, nº 3 (2005): 6.

Grimaud, Yannick. « Les stomoxes (Diptera : Muscidae) à l'île de La Réunion : biologie, écologie et moyens de lutte ». *GDS Réunion*, 2013, 8.

Gryganskyi, Andrii P., Jacob Golan, et Ann E. Hajek. « Season-Long Infection of Diverse Hosts by the Entomopathogenic Fungus Batkoa Major ». Preprint. Ecology, 14 décembre 2021.

Gryganskyi, A.P., R.A. Humber, M.E. Smith, K. Hodge, B. Huang, K. Voigt, et R. Vilgalys. « Phylogenetic Lineages in Entomophthoromycota ». *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 30, nº 1 (30 juin 2013): 94-105.

Hajek, Ann E., Raymond I. Carruthers, et Richard S. Soper. « Temperature and moisture relations of sporulation and germination by Entomophaga maimaiga (Zygomycetes: Entomophthoraceae), a fungal pathogen of Lymantria dispar (Lepidoptera: Lymantriidae) ». *Environmental Entomology* 19, nº 1 (1 février 1990): 85-90.

Hajek, Ann E., Bernard Papierok, et Jørgen Eilenberg. « Methods for Study of the Entomophthorales ». In *Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 285-316. Elsevier, 2012.

Henriot, A., et J.-L. Cheype. *Piximètre : la mesure de dimensions sur images pour la statistique.* (version 5. 10 R 1541), 2020.

Hodge, Kathie T., Ann E. Hajek, et Andrii Gryganskyi. « The First Entomophthoralean Killing Millipedes, Arthrophaga Myriapodina n. Gen. n. Sp., Causes Climbing before Host Death ». *Journal of Invertebrate Pathology* 149 (1 octobre 2017): 135-40.

Humber, R. « Entomogenous fungi ». *Encyclopedia of Microbiology*, 2009, 443-56.

Humber, Richard A. « Entomophthoromycota: A New Overview of Some of the Oldest Terrestrial Fungi ». In *Biology of Microfungi*, édité par De-Wei Li, 127-45. Fungal Biology. Cham: Springer International Publishing, 2016..

———. « Entomophthoromycota: A New Phylum and Reclassification for Entomophthoroid Fungi ». *Mycotaxon* 120, nº 1 (28 septembre 2012): 477-92.

———. « Synopsis of a revised classification for the entomophtorales (Zygomycotina) ». *Mycotaxon* 34, nº 2 (1989): 441-60.

Keawrayup, S., G. Duvallet, S. Sukonthabhirom, et T. Chareonviriyaphap. « Diversity of Stomoxys spp. (Diptera: Muscidae) and diurnal variations of activity of Stomoxys indicus and S. Calcitrans in a farm, in Wang Nam Khiao District, Nakhon ratchasima Province, Thailand ». *Parasite* 19, nº 3 (août 2012): 259-65.

Keller, S. « Arthropod-Pathogenic Entomophthorales of Switzerland. I. Conidiobolus, Entomophaga and Entomophthora », 1987, 46.

Keller, Siegfried, éd. *Arthropod-Pathogenic Entomophthorales: Biology, Ecology, Identification*. EUR 22829. Luxembourg: COST Office, 2007a.

———. « Arthropod-Pathogenic Entomophthorales from Switzerland. III. First Additions », 2007b, 39.

Lovett, Brian, et Raymond J. Leger. « The insect pathogens ». *Microbiology Spectrum* 5, nº 2 (3 mars 2017): 5.2.01.

Nie, Yong, De-Shui Yu, Cheng-Fang Wang, Xiao-Yong Liu, et Bo Huang. « A Taxonomic Revision of the Genus Conidiobolus (Ancylistaceae, Entomophthorales): Four Clades Including Three New Genera ». *MycoKeys* 66 (30 mars 2020): 55-81.

Papierok, B., et S. Balazy. « Collecting arthropod-pathogenic Entomophthorales: how to find them in the field and how to collect, prepare and store the appropriate material for classical identification purposes? » In *Arthropod-pathogenic Entomophthorales: biology, ecology, identification*, 55-65. Luxembourg: COST Action 842, EUR 22829, COST Office., 2007.

Perrot, C., C. Le Doared, et J.-N. Depeyrot. « Exploitations laitières françaises : une diversité en mouvement ». *Renc. Rech. Ruminants* 24 (2018): 437-41.

Rangel, Drauzio E. N., Diane G. Alston, et Donald W. Roberts. « Effects of Physical and Nutritional Stress Conditions during Mycelial Growth on Conidial Germination Speed, Adhesion to Host Cuticle, and Virulence of Metarhizium Anisopliae, an Entomopathogenic Fungus ». *Mycological Research* 112, nº 11 (1 novembre 2008): 1355-61.

Reissert-Oppermann, Sophia, Burkhard Bauer, Stephan Steuber, et Peter-Henning Clausen. « Insecticide Resistance in Stable Flies (Stomoxys Calcitrans) on Dairy Farms in Germany ». *Parasitology Research* 118, nº 9 (septembre 2019): 2499-2507.

Rohrlich, Clara, Isabelle Merle, Issa Mze Hassani, Manon Verger, Michel Zuin, Samantha Besse, Isabelle Robène, Samuel Nibouche, et Laurent Costet. « Variation in Physiological Host Range in Three Strains of Two Species of the Entomopathogenic Fungus Beauveria ». Édité par Wolfgang Arthofer. *PLOS ONE* 13, nº 7 (5 juillet 2018): e0199199.

Ross, Perran A., Meng-Jia Lau, et Ary A. Hoffmann. « Does Membrane Feeding Compromise the Quality of Aedes Aegypti Mosquitoes? » *PloS One* 14, nº 11 (2019): e0224268.

Schlick-Steiner, Birgit C., Florian M. Steiner, Bernhard Seifert, Christian Stauffer, Erhard Christian, et Ross H. Crozier. « Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity ». *Annual Review of Entomology* 55, nº 1 (2010): 421-38.

Shah, Farooq A., Cheng S. Wang, et Tariq M. Butt. « Nutrition Influences Growth and Virulence of the Insect-Pathogenic Fungus Metarhizium Anisopliae ». *FEMS Microbiology Letters* 251, nº 2 (15 octobre 2005): 259-66.

Sharma, Anjney, Ankit Srivastava, Awadhesh K. Shukla, Kirti Srivastava, Alok Kumar Srivastava, et Anil Kumar Saxena. « Entomopathogenic Fungi: A Potential Source for Biological Control of Insect Pests ». In *Phytobiomes: Current Insights and Future Vistas*, édité par Manoj Kumar Solanki, Prem Lal Kashyap, et Baby Kumari, 225-50. Singapore: Springer, 2020.

Sørensen, Jesper G., Matthew F. Addison, et John S. Terblanche. « Mass-Rearing of Insects for Pest Management: Challenges, Synergies and Advances from Evolutionary Physiology ». *Crop Protection* 38 (1 août 2012): 87-94.

Squarzoni, Cécile. « Lutte biologique contre les stomoxes des bovins à la Réunion : l'exemple du "POISEIDOM vétérinaire" ». Ecole nationale vétérinaire de Toulouse, 2001.

Sun, Bing-Da, et Xing-Zhong Liu. « Occurrence and Diversity of Insect-Associated Fungi in Natural Soils in China ». *Applied Soil Ecology* 39, nº 1 (1 mai 2008): 100-108.

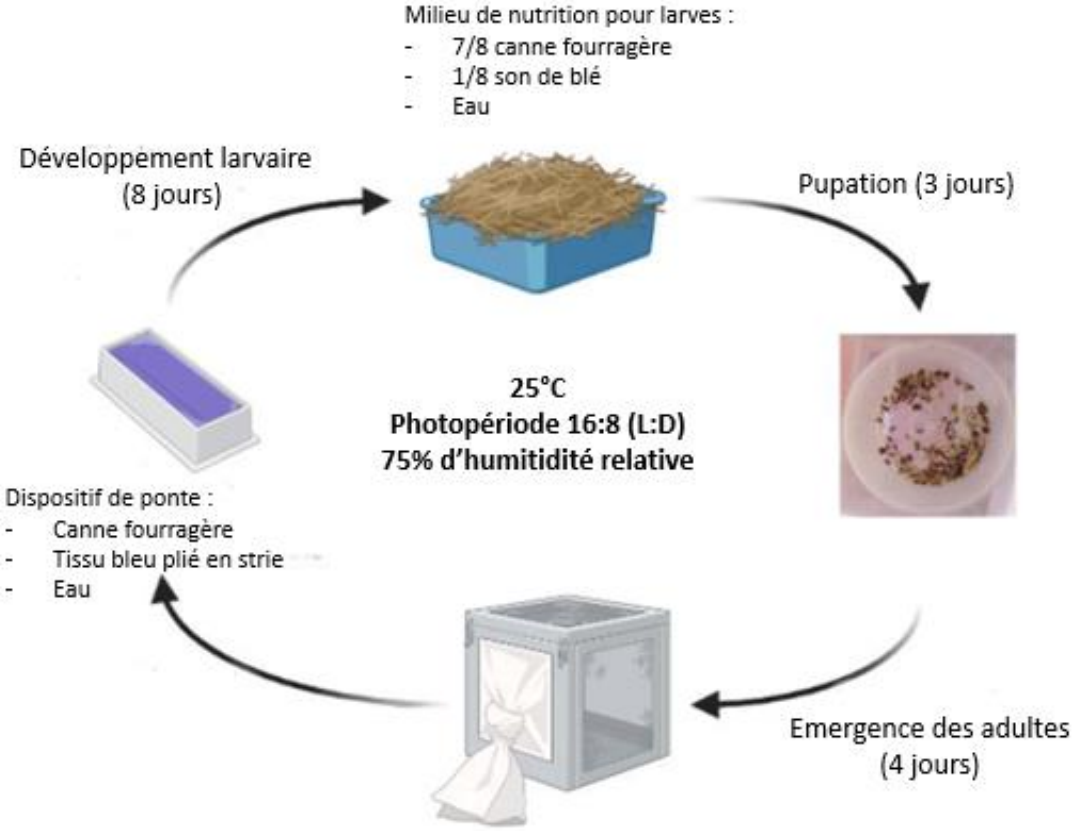
Taylor, David B., Roger D. Moon, et Darrell R. Mark. « Economic Impact of Stable Flies (Diptera: Muscidae) on Dairy and Beef Cattle Production ». *Journal of Medical Entomology* 49, nº 1 (1 janvier 2012): 198-209.

Vega, Fernando E., Nicolai V. Meyling, Janet Jennifer Luangsa-ard, et Meredith Blackwell. « Fungal Entomopathogens ». In *Insect Pathology (Second Edition)*, édité par Fernando E. Vega et Harry K. Kaya, 171-220. San Diego: Academic Press, 2012.

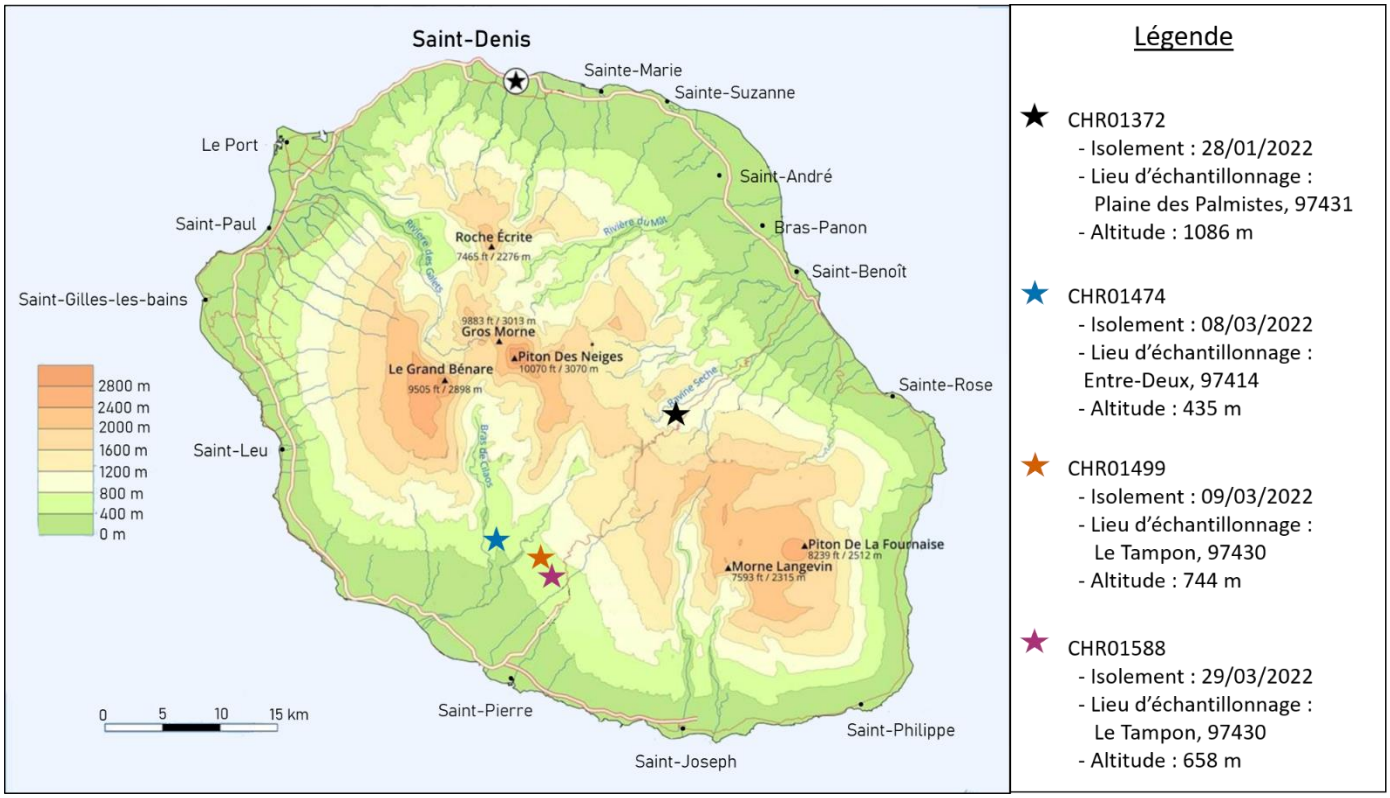
Win Chin, Jessica. « Caractérisation et distribution d'un champignon entomopathogène des stomoxes à La Réunion », 2021, 54.

Zumpt, F. *The stomoxyine biting flies of the world*. Gustav Fischer Verlag, 1973.

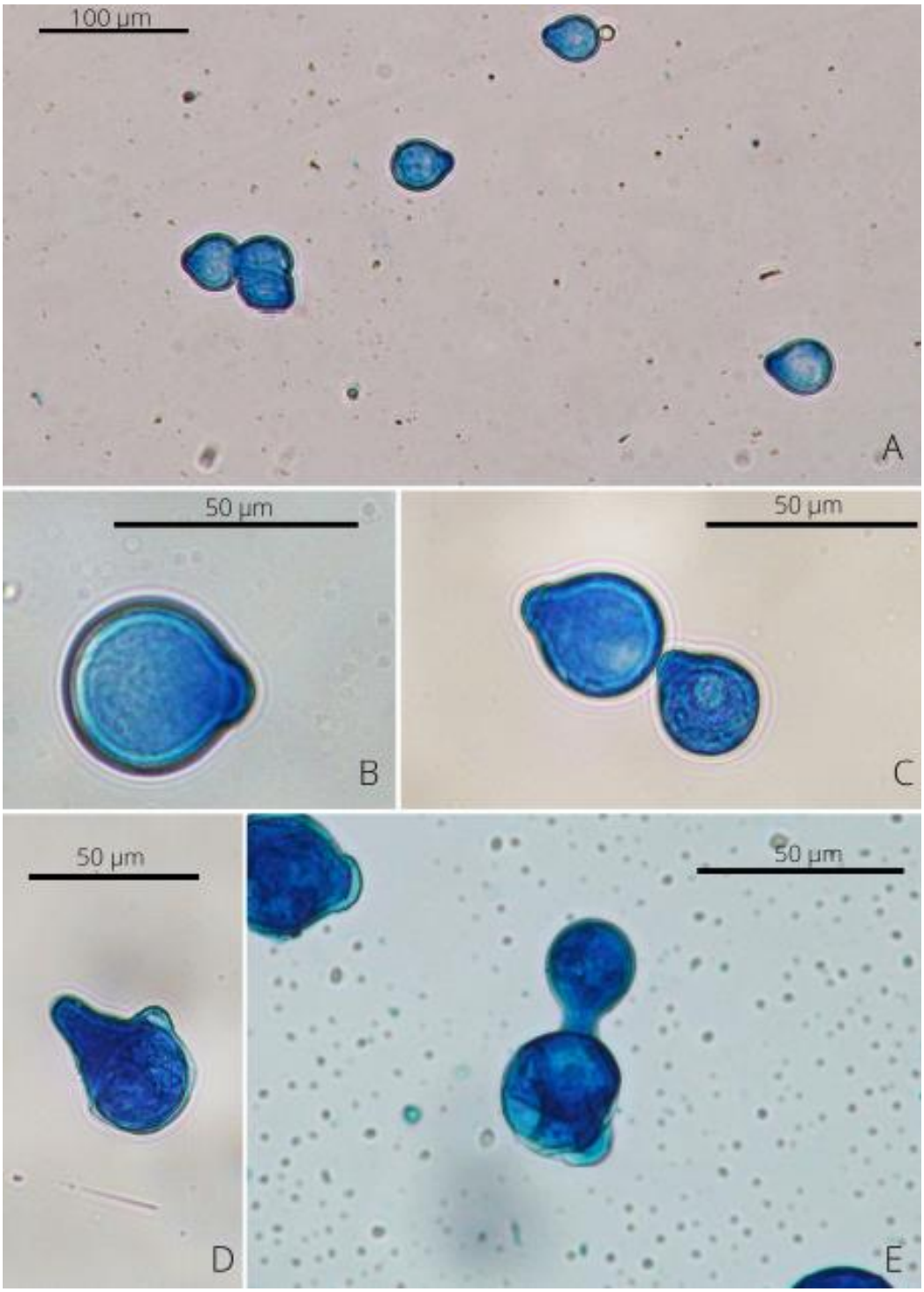
Annexes



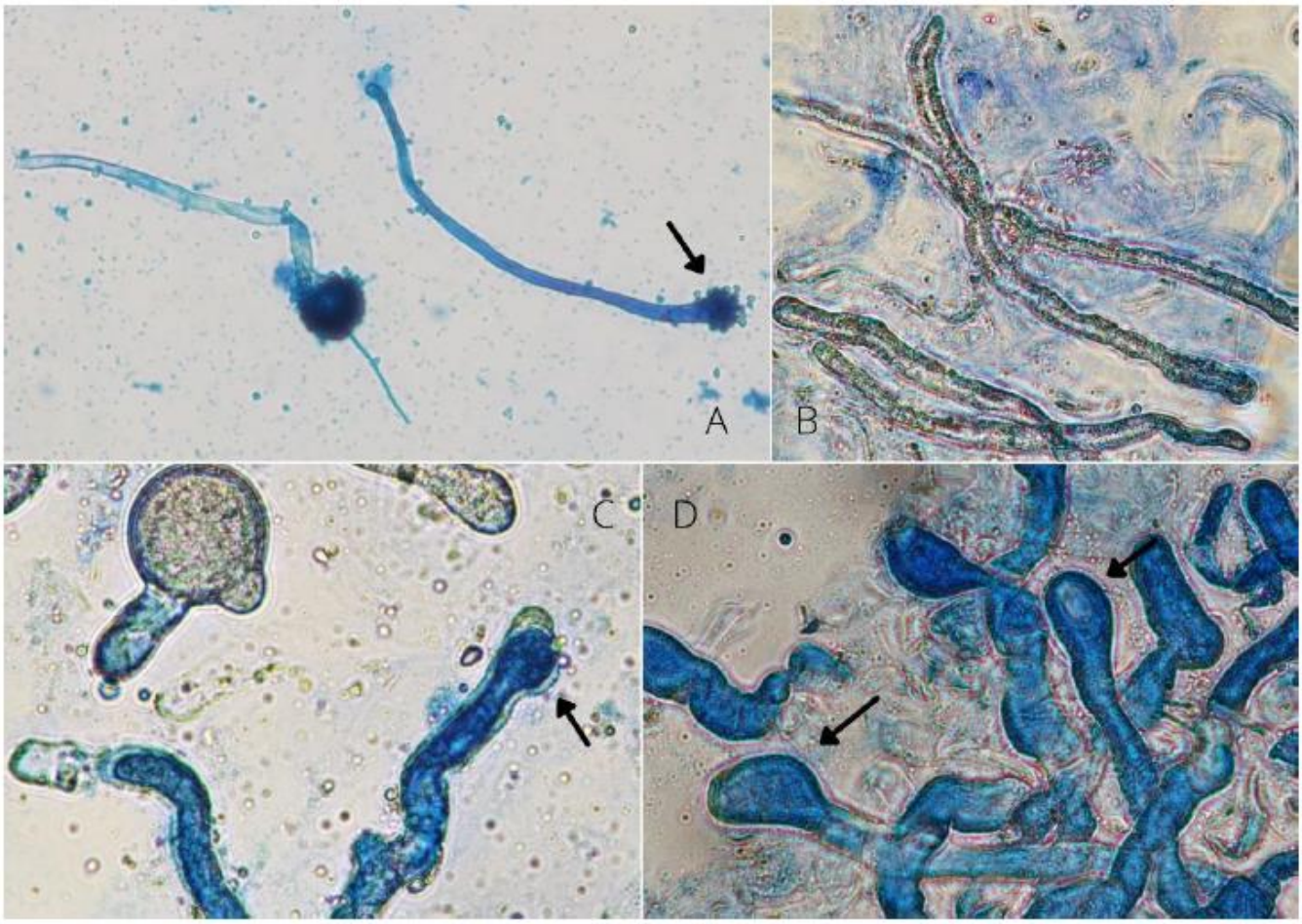
Annexe 1. Matériel et conditions d'élevage des stomoxes



Annexe 2. Lieux et dates d'échantillonnage des quatre souches isolées durant cette étude.



Annexe 3. Conidies primaires et secondaires du champignon. A et B : spores primaires – C : une conidie primaire (gauche) et une conidie secondaire (droite) – D et E : spore primaire germinant pour donner une spore secondaire. Observations au microscope optique avec coloration au CBLP (Photo : J. Win Chin)



Annexe 4. Rhizoïdes et conidiophores du champignon. A : rhizoïdes simples (flèches = disque de crampon) – B, C et D : conidiophores simples (flèches = épaule à l'apex du conidiophore, signe de la formation d'une conidie). Observations au microscope optique avec coloration CBLP. (Photo : J. Win Chin)

Annexe 5. Tableau comparatif des structures morphologiques du Batkoa de La Réunion à celles d'autres espèces de *Batkoa* répertoriées dans la littérature.

Espèce	Hôte	Conidie primaire				Noyaux			Référence
		Longueur	Largeur	L/l	Forme	Nombre	Longueur	Largeur	
Batkoa sp. Réunion	Diptera	(36) 40.6-42.3 (46.9)	(30.3) 35.1-36.9 (41.8)	1.14-1.17	Sphérique, papille ronde	(18) 20 (24)	(3) 3.4-4.2 (4.9)	(2.7) 3.1-3.8 (4.5)	(Win Chin, 2021), cette étude
B. apiculata	Diptera, Homoptera	(30) 33-38 (46)	(25) 29-34 (41)	1.11-1.21	Sphérique, papille ronde ou en pointe	NA	NA	NA	Keller, 1987
		(34) 38-48 (62)	(31) 33- 44 (45)	0.9-1.3	Sphérique, papille ronde ou en pointe	NA	3.8-6.6	3.0-2.4	Gazhavi et al. 2008
B. hydrophila	Plecoptera : Leuctridae	(24) 30.4-34.6 (40)	(17) 22.5-26.4 (33)	1.27-1.36	Pyriforme à ovoïde, papille proéminente	NA	NA	NA	Keller, 2007b
B. major	Diptera : Tipulidae	(38) 47.5-52 (58)	(32) 40.5-47 (55)	1.10-1.22	Sphérique à pyriforme, papille conique à ronde	(15) 20-39 (56)	NA	NA	Keller, 1987
Conidiobolus obscurus	Homoptera, Aphidinae	(29) 33.5-44 (53)	(23) 28-36 (47)	1.16-1.27	Sphérique, papille ronde	NA	NA	NA	Keller, 1987

Annexe 5. Suite.

Espèce	Hôte	Conidie secondaire				Référence
		Longueur	Largeur	L/l	Forme	
Batkoa sp. Réunion	Diptera	(27) 31.5-33.2 (37.6)	(23.4) 26.4-27.5 (30.5)	1.2	Similaire à conidie primaire	Win Chin, 2021 cette étude
B. apiculata	Diptera, Homoptera	(27) 29 (33)	(22) 24 (28)	NA	Similaire à conidie primaire	Keller, 1987
		36-41	33-39	1.1	Similaire à conidie primaire	Gazhavi et al. 2008
B. hydrophila	Plecoptera : Leuctridae	(24) 25 (26)	(17) 18.5 (20)	NA	Similaire à conidie primaire	Keller, 2007b
B. major	Diptera : Tipulidae	NA	NA	NA	NA	Keller, 1987
Conidiobolus obscurus	Homoptera, Aphidinaa	(29) 32.5 (41)	(24) 30 (35)	1.09	Similaire à conidie primaire	Keller, 1987

Annexe 5. Suite.

Espèce	Hôte	Conidiophore		Référence
		Forme	Taille à l'extrémité	
Batkoa sp. Réunion	Diptera	Simple	(19.3) 24.2 (28.5)	(Win Chin, 2021), cette étude
B. apiculata	Diptera, Homoptera	Simple	(3) 3.7 (5)	Keller, 1987
		Simple	12.5-17.5	Gazhavi et al. 2008
B. hydrophila	Plecoptera : Leuctridae	Simple	(13) 16 (18)	Keller, 2007b
B. major	Diptera : Tipulidae	Simple	NA	Keller, 1987
Conidiobolus obscurus	Homoptera, Aphidinaa	Simple	NA	Keller, 1987