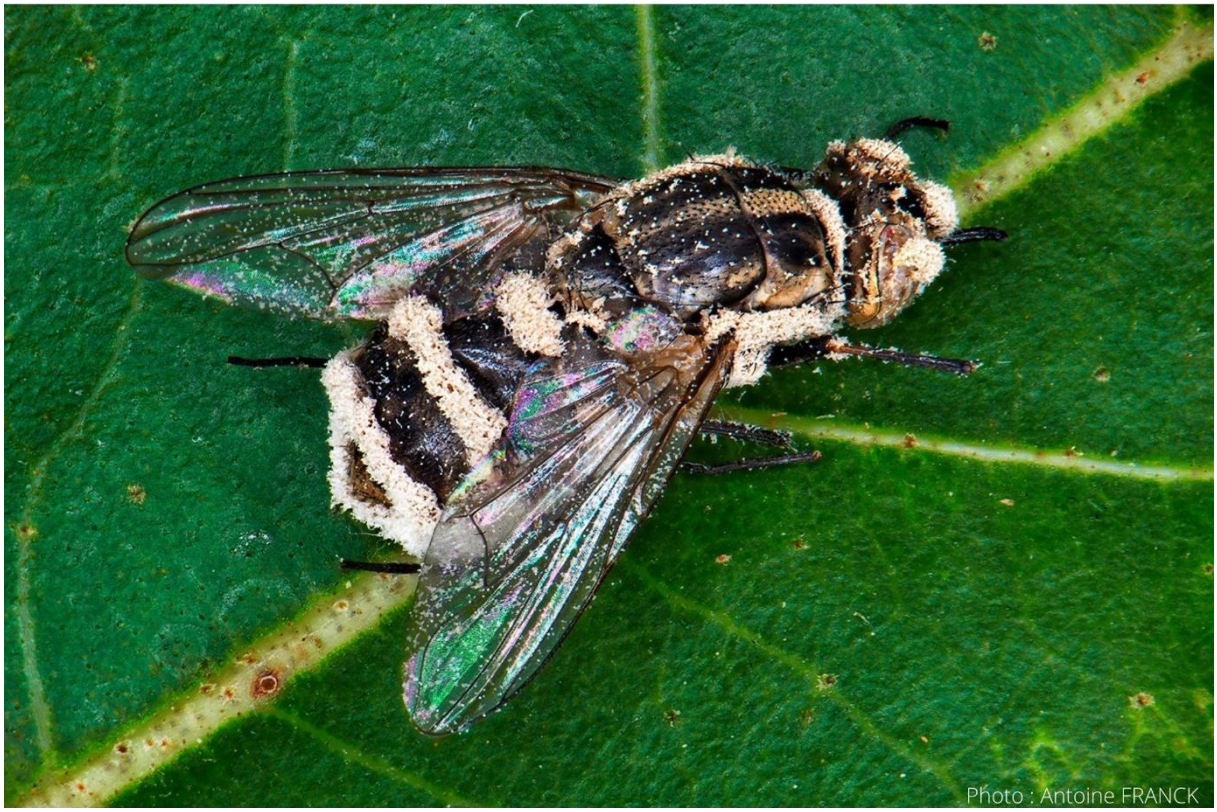
Master Gestion Intégrée des Maladies Animales et Tropicales (GIMAT)

Rapport de stage

Caractérisation et distribution d'un champignon entomopathogène des stomoxes à La Réunion

WIN CHIN Jessica



Réalisé sous la direction de M. BALDET Thierry (UMR Astre) et Jérémy BOUYER (UMR Astre) et COSTET Laurent (UMR PVBMT)
Au Cirad de La Réunion du 11 janvier 2021 au 30 juin 2021
Date de soutenance : 16 juin 2021

REMERCIEMENTS

Je remercie Laurent, Thierry et Jérémy pour leurs conseils d'experts tout au long de ce stage.

Merci au personnel du 3P St Pierre, techniciens, ingénieurs et chercheurs, pour leur aide précieuse.

Un remerciement tout particulier à Tara et Irénée, techniciens du Cirad, pour leur support technique mais surtout pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Je remercie le GDS 974 pour leur aide. Yannick et Catherine merci pour votre disponibilité et votre engagement dans ce travail.

Enfin un grand merci aux éleveurs qui ont accepté de participer et qui nous ont ouvert les portes de leur exploitation.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 1
A. Le genre *Stomoxys* 1
i. Classification 1
ii. Généralités 1
B. Les stomoxes à La Réunion 2
i. Critères morphologiques de distinction 2
ii. Alimentation 2
iii. Reproduction 2
iv. Répartition 3
v. Pouvoir pathogène direct 4
vi. Pouvoir pathogène indirect : le rôle de vecteur mécanique 4
vii. Conséquences économiques des stomoxes dans les élevages bovins 5
C. La lutte intégrée anti-stomoxes à La Réunion 5
D. Des champignons entomopathogènes pour la lutte biologique 6
i. Le phylum *Entomophthoromycota* 7
ii. Le genre *Batkoa* (Humber 1989) 9
iii. Etat des connaissances : un champignon entomopathogène des stomoxes à La Réunion ... 9
MATÉRIEL ET MÉTHODES 10
A. Distribution du champignon dans les élevages à l'échelle de l'île 10
B. Récolte des stomoxes mycosés sur le terrain 11
C. Caractérisation des stomoxes 11
D. Isolement du champignon 11
E. Culture du champignon 12
F. Caractérisation morphologique du champignon 12
G. Caractérisation moléculaire du champignon 14
H. Test de pathogénicité sur *Ceratitis capitata* 14
RÉSULTATS 16
A. Distribution du champignon dans les élevages à l'échelle de l'île 16
B. Récolte des stomoxes mycosés sur le terrain 18
C. Caractérisation moléculaire des stomoxes 20
D. Isolement et culture du champignon 21
E. Caractérisation morphologique 22
F. Caractérisation moléculaire 24
G. Test de pathogénicité sur *Ceratitis capitata* 26
DISCUSSION 27
CONCLUSION 29
BIBLIOGRAPHIE 31
ANNEXES 31

INTRODUCTION

Sur l'île de La Réunion, l'élevage bovin a connu un développement rapide à partir du milieu des années 1970. La fédération des exploitations autour d'organisations économiques (SICAREVIA pour l'élevage bovin viande et SICALAIT pour l'élevage bovin laitier) a permis l'essor de ses filières sur l'île (Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et des Forêts 2016).Ce développement accéléré, combiné au climat tropical de la région, ont fait de La Réunion une zone aux conditions optimales pour la pullulation de stomoxes (*Stomoxys* sp. Diptera : Muscidae), communément appelés mouches des étables ou *stable flies* en anglais, notamment dans les élevages bovins (Barré 1981).

Deux espèces cohabitent sur l'île, *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) et *S. niger niger* (Macquart, 1851) (Barré 1981). Diptères hématophages diurnes, ils sont responsables de nuisances directes et indirectes envers les animaux d'élevage, en particulier les bovins (Barré 1981). Leur contrôle est devenu une problématique essentielle.

L'intérêt pour la lutte biologique contre les insectes d'intérêt médical et vétérinaire s'intensifie d'année en année avec le problème croissant des résistances aux insecticides et la prise en compte de considérations environnementales légitimes (Inglis et al. 2001).L'un des domaines grandissants de la lutte biologique est l'utilisation de micro-organismes en tant qu'agent de lutte contre les nuisibles, et notamment l'utilisation de champignons entomopathogènes (Butt, Jackson, et Magan 2001). A La Réunion, des observations d'une mycose infectant les stomoxes et provoquant des épidémies massives dans leurs populations sont relatées dès 1981 (Barré 1981). Des travaux succincts ont été réalisés entre temps sur l'identification du champignon et des essais de contamination directe entre stomoxes adultes (Barré 1981; Bouyer et Stachurski 2009). Mais aucun résultat écrit n'est disponible.

Le premier objectif de ce travail était de caractériser ce champignon sur la base de critères morphologiques et de méthodes moléculaires. Le second objectif était de réaliser une étude de distribution de ce champignon dans les élevages bovins à l'échelle de l'île. Enfin le dernier objectif était l'étude de pathogénicité du champignon sur *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) (Diptera : Tephritidae), mouche méditerranéenne des fruits, nuisible des cultures fruitières et légumières à La Réunion.

A. Le genre *Stomoxys*

i. Classification

D'après Zumpt (1973) :

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

ii. Généralités

Les insectes du genre *Stomoxys*, qui compte 18 espèces, sont des diptères de la famille des *Muscidae* (Zumpt 1973). Comme d'autres genres de la sous-famille des *Stomoxynae* (*Haematobia* et *Haematobosca* notamment), les stomoxes ont un impact économique et sanitaire non négligeable dans le domaine de l'élevage par leur pouvoir pathogène direct et leur rôle de vecteur de maladie (Zumpt 1973).

Le genre *Stomoxys* se retrouve quasi exclusivement sur le continent africain, à l'exception de *S. calcitrans* qui est cosmopolite (Zumpt 1973). Leur taille et apparence générale est similaire aux mouches domestiques mais la trompe suceuse est remplacée par un appareil piqueur : un rostre dirigé vers l'avant parallèle au reste du corps (Zumpt 1973). Hématophages

diurnes pour les deux sexes, ces insectes peuvent également se nourrir de nectar et de pollen mais la prise de sang conditionne leur reproduction (Barré 1981).

B. Les stomoxes à la Réunion

Deux espèces du genre *Stomoxys* sont retrouvées sur l'île de La Réunion (Barré 1981; Bouyer et al. 2011; Grimaud 2013) : l'espèce cosmopolite *S. calcitrans* et *S. niger niger* répartie uniquement sur le continent africain et les îles Mascareignes.

i. Critères morphologiques de distinction

Plusieurs caractéristiques morphologiques permettent la distinction entre les deux espèces, elles sont décrites dans la clef de détermination de Zumpt (1973). Elles sont synthétisées dans le schéma suivant (Figures 1).

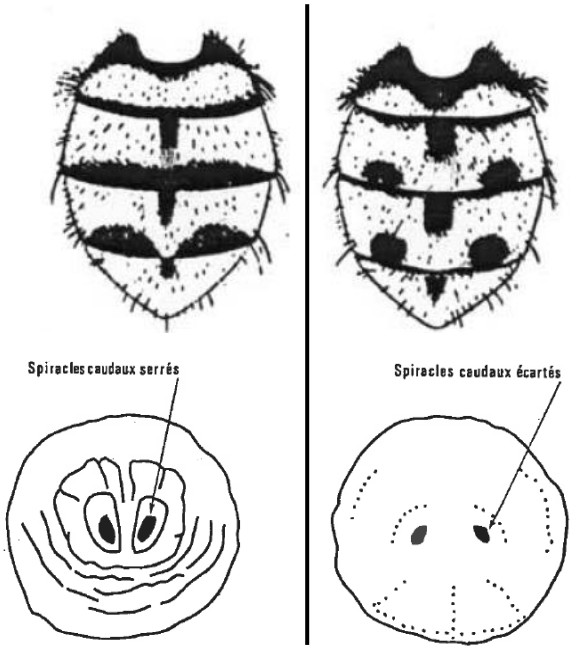


Figure 1 : Critères de distinction entre les deux espèces de stomoxes présentes à La Réunion : *Stomoxys niger niger* (gauche) et *Stomoxys calcitrans* (droite). En haut : motifs de l'abdomen des adultes (d'après Zumpt 1973). En bas : morphologie des pupes (d'après Barré 1981).

Le mâle et la femelle se distinguent par l'écartement entre les yeux : il est plus faible chez les mâles (Zumpt 1973).

ii. Alimentation

La prise de sang conditionne la reproduction. Les stomoxes piquent le bétail et éventuellement l'homme avec un ordre de préférence, de manière décroissante : bovins, chevaux, porcs, caprins, ovins (Barré 1981). Sur les bovins, les stomoxes piquent préférentiellement les parties les plus difficiles à protéger pour les animaux : les zones inférieures des membres, la pointe du sternum et fanons, le ventre (Barré 1981).

iii. Reproduction

La durée du cycle de reproduction température-dépendant est relativement similaire entre les deux espèces : 13 jours à 30°C et 71 jours à 15°C pour *S. calcitrans* contre 14 jours à 30°C et 69 jours à 15°C pour *S. n. niger* (Gilles, David, et Duvallet 2005).

Les adultes se reproduisent dès deux jours, un mâle peut s'accoupler avec plusieurs femelles et un seul mâle suffit à féconder tous les œufs d'une femelle. Celle-ci ne peut pondre qu'après quatre repas de sang (Barré 1981). Les lieux de ponte sont riches en matière

organique : *S. calcitrans* privilégie la végétation en décomposition et le fumier ; *S. n. niger* pond dans des végétaux en décomposition en particulier à La Réunion les feuilles de canne à sucre laissées au sol après la coupe (Barré 1981). La phase larvaire est composée de trois stades (Zumpt 1973). A la fin du troisième stade, la larve s'immobilise et sa cuticule se durcit : c'est la pupaison. A l'intérieur de cette pupe, la nymphe se développe jusqu'à son émergence au stade adulte.

L'influence de la température sur la durée des différents stades immatures a été mise en évidence par Gilles, David, et Duvallet (2005) : à partir de 15°C lorsque la température augmente, la durée de développement diminue jusqu'à atteindre un plateau à 15 jours entre 30 et 35°C. A 25°C et 70% d'humidité, l'œuf éclot entre 24 et 48 heures, la phase larvaire dure en moyenne huit jours, enfin le stade pupal se déroule en six à sept jours pour les deux espèces (Gilles, David, et Duvallet 2005a).

iv. Répartition

L'île de La Réunion, île volcanique de 2 512km^2 située dans l'Océan Indien, est unique par sa variété de microclimats. Ces derniers conditionnent la répartition des stomoxes sur le territoire. D'après Barré (1978), leur distribution sur l'île peut être divisée en trois zones distinctes :

- Les bas : les régions à basse altitude et au climat relativement sec où le niveau d'infestation est plutôt faible (dix stomoxes/vache) tout au long de l'année à l'exception d'un bref pic d'infestation entre février et juin. Les populations de *S. calcitrans* prédominent sauf pendant le pic.
- Les zones humides de basses et moyennes altitudes aux niveaux d'infestation élevés toute l'année (minimum 50 stomoxes/vache) avec un pic entre février et mai. *S. n. niger* domine tout au long de l'année (minimum 50% des mouches totales).
- Les hauts avec des niveaux d'infestation plutôt faibles (maximum 20 stomoxes/vache) accompagnés d'un petit pic d'infestation entre janvier et février (maximum 40 stomoxes/vache). *S. calcitrans* prédomine sauf pendant le pic.

Les pics d'infestation sont observés entre décembre et juin, et centré sur février/mars. Ces périodes correspondent à l'occurrence de la saison chaude/humide et à la coupe des cannes à sucre.

Cette répartition s'explique principalement par les différences de taux de reproduction entre les deux espèces selon la température : *S. calcitrans* possède l'avantage reproductif en basse température, son taux de reproduction est plus élevé que *S. n. niger* à 15°C. Mais cette dernière la devance dès que 20°C sont atteints (Gilles, David, et Duvallet 2005). A basse altitude où les températures sont plutôt chaudes, les deux espèces débutent leur période de pullulation en même temps mais la capacité de reproduction de *S. n. niger* est telle qu'elle dépasse vite *S. calcitrans*. Au contraire, à haute altitude où les températures sont fraiches la plupart de l'année, *S. calcitrans* a l'avantage et débute sa reproduction plus rapidement.

L'impact potentiel du changement climatique sur les dynamiques de population de stomoxes à La Réunion a été étudié par Gilles et al. (2008). Les stomoxes adultes ont été observés sur sept exploitations réparties sur un gradient altitudinal (100 à 1 600m d'altitude) pendant 90 semaines. Si l'abondance maximum et moyenne ne semblent pas dépendre de l'altitude, en hiver l'abondance minimum est supérieure à basse altitude. En général, *S. calcitrans* est prédominante, cependant à basses altitudes les populations de *S. n. niger* augmentent plus rapidement et prennent l'avantage. Par cette capacité à dominer les basses altitudes où les températures sont plus élevées et au regard des changements climatiques en cours et à venir, *S. n. niger* pourrait représenter un potentiel danger si introduit dans des zones d'altitudes où les hivers sont doux et où les larves peuvent trouver un habitat favorable à leur développement. Néanmoins, les données de distribution spatiale et les dynamiques saisonnières des deux espèces à La Réunion mériteraient d'être actualisées au vu des tendances actuelles d'augmentation des températures à La Réunion avec le risque de densités plus importantes en hiver et dans les hauts de l'île.

La température n'est pas le seul paramètre important influant sur la répartition des stomoxes : d'autres facteurs biotiques et abiotiques sont à prendre en compte et notamment

l'hygiène de l'exploitation. Effectivement, il a été observé sur des élevages proches (situés à moins d'un kilomètre) des différences significatives des niveaux d'infestation : la différence majeure entre ces deux élevages étaient la propreté (Gilles et al. 2008). Une exploitation moins entretenue est plus sujet à des infestations des deux espèces en effet on peut imaginer que ce type de pratique peut être à l'origine d'une augmentation des sites de pontes et des zones propices au développement des larves.

v. Pouvoir pathogène direct

Les stomoxes ont un pouvoir pathogène direct (Zumpt 1973) par :

- Les lésions et la douleur qu'ils provoquent par leurs piqures ;
- La spoliation sanguine : Barré (1978) suggère jusqu'à un litre de sang spolié/bovin/jour dans les cas extrêmes ;
- Le stress causé par le harcèlement.

Cela entraîne également des conséquences secondaires chez les bovins comme la réduction de la prise alimentaire et la baisse de l'immunité qui favorise les infections (Bouyer et al. 2011).

vi. Pouvoir pathogène indirect : le rôle de vecteur mécanique

Les stomoxes ont un rôle de vecteurs mécaniques pour plusieurs agents pathogènes (Baldacchino et al. 2013) :

- Des bactéries comme *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910) responsable de l'anaplasmose bovine ;
- Des parasites tels que *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges, 1916) responsable de la besnoitiose bovine ;
- Des virus comme celui de la leucose bovine enzootique (LBE) qui est une maladie infectieuse et contagieuse causée par un rétrovirus : le virus leucémogène bovin (BLV) (Toma, Eloit, et Savey 1990). Elle touche exclusivement les bovins et est universellement répandue même si le taux d'infection dépend du pays considéré. Elle se retrouve chez 65% des individus séropositifs sous forme asymptomatique, 0,1 à 5% sous forme tumorale et chez 30% des animaux infectés elle se développe en lymphocytose (augmentation du nombre de lymphocytes B) (Panei et al. 2019). Seuls les cas tumoraux présentent une perte économique car dédiés à mourir.

Le BLV se transmet de façon directe (par le colostrum, les aérosols, *in utero*) mais le rôle des insectes piqueurs et notamment des stomoxes a également été mis en évidence. En effet, le suivi d'une exploitation sur trois ans au Japon démontre une fluctuation du taux de séroconversion du BLV dans le troupeau associée aux variations de densité de population des stomoxes : ce taux augmente en été avec la hausse de densité des stomoxes, et diminue en hiver où les populations d'insectes piqueurs baissent (Kohara et al. 2018). Dans cette même étude, le taux de séroconversion diminue davantage lors de la mise en place de mesures de contrôle des populations des stomoxes.

Dans les années 90, plusieurs pays d'Europe décident d'éliminer la leucose de leur territoire et de réglementer l'entrée de nouveaux animaux. Pour assurer la continuité de ses exportations, la France met en place un arrêté le 31 décembre 1990 fixant les mesures de dépistage et d'éradication de la LBE. En 1999, la Commission européenne déclare la France indemne de cette maladie (décision CE/1999/465) (Perrin, Gay, et Stephen 2014). En France, l'île de La Réunion reste l'exception : pour différentes raisons (exportation des bovins quasi nulle, faible indemnisation en cas d'abattage, peu d'impact de la maladie sur les élevages locaux), La Réunion est tenue à l'écart des réglementations métropolitaines. Au 31 décembre 2018, 100% des cheptels laitiers, 55% des cheptels bovins-viande adhérents à une coopérative et 38% des cheptels bovins-viande indépendants possèdent des animaux positifs à la LBE (DAAF de La Réunion 2016). Un plan global de maîtrise sanitaire en filière bovine (PGMSFB) a été créé en 2016 : il recense une cinquantaine de mesures de lutte contre les maladies bovines dont la leucose (Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et des Forêts de La Réunion 2016). Il s'articule en 3 grands axes :

- La réduction de la mortalité

- La lutte contre les insectes piqueurs
- La mise en œuvre de plans d'assainissement de plusieurs maladies (la rhinotracheite infectieuse bovine, la leucose bovine enzootique, la paratuberculose et la maladie des muqueuses)

vii. Conséquences économiques des stomoxes dans les élevages bovins

Si l'estimation des pertes économiques liées à la mortalité est difficile, l'impact sur la production est plus facilement observable.

Le suivi de la croissance de 129 veaux aux Etats Unis a été réalisé (Campbell et al. 2001). Les animaux étaient placés sur pâtures, avec ou sans traitement insecticide en spray (perméthrine). Les résultats de cette étude sur trois ans démontrent l'effet délétère des stomoxes sur la prise de poids des veaux : les bêtes non traitées présentaient environ 19% de réduction de poids par rapport aux animaux traités à l'insecticide.

C. La lutte intégrée anti-stomoxes à la Réunion

Sur l'île de La Réunion, le Groupement de Défense Sanitaire (GDS) est le principal organisateur de la lutte intégrée contre les stomoxes. La lutte intégrée est définie dans l'Union Européenne comme "l'application rationnelle d'une combinaison de mesures biologiques, biotechnologiques, chimiques, physiques, culturales [...] dans laquelle l'emploi de produits chimiques phytopharmaceutiques est limité au strict nécessaire" (« Directive 91/414/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991 » 1991). Plusieurs types de lutte contre les stomoxes sont appliquées à La Réunion (Grimaud 2013) :

- La lutte environnementale consiste en la destruction des sites de ponte et de repos des stomoxes. Elle passe par exemple par la gestion du fumier et l'élimination des reposoirs (débroussaillage) ;
- La lutte physique ou mécanique passe par l'utilisation de pièges (vavoua, fils à colle, …) ;
- La lutte chimique utilise des molécules naturelles ou synthétiques ayant un effet létal sur les nuisibles : contre les insectes ces molécules sont appelées insecticide.

La lutte chimique peut être associée à la lutte physique par des pièges ou écrans imprégnés d'insecticides. En Asie du sud, une récente étude a mis en évidence l'efficacité d'écrans imprégnés ou "fly screen" dans le contrôle des insectes nuisibles hématophages. L'expérience a été réalisée sur 16 fermes de Thaïlande centrale, 20 à 40 écrans imprégnés de deltaméthrine ont été installés dans chaque ferme. Durant les cinq mois suivants la pose des écrans, la densité d'insectes nuisibles totale a été diminuée d'environ 60% et de 37% à neuf mois post-pose (Desquesnes et al. 2021).

Cependant l'apparition de résistance aux insecticides pose un problème majeur à l'utilisation de cette stratégie de lutte. En 1957, l'Organisation Mondiale de la Santé décrit la résistance aux insecticides telle que « l'apparition dans une population de la faculté de tolérer des substances toxiques à des doses qui exerceraient un effet létal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce ». Une étude de 2019 réalisée en Allemagne a mis en évidence cette résistance. La chimiosensibilité à la deltaméthrine des stomoxes (*S. calcitrans*) de 40 fermes laitières bovines allemandes a été comparée à celle des stomoxes de souche UBA, référence de sensibilité à cet insecticide. Les résultats ont révélé que 100% des stomoxes des fermes étaient résistantes à la deltaméthrine avec un pourcentage de paralysie de 36,7 ± 23,7% contre 95 ± 5,7% pour la souche UBA 24 heures après une exposition à 55 mg/m^2 de deltaméthrine pendant 10 secondes (Reissert-Oppermann et al. 2019).

Sur l'île de La Réunion, le BUTOX® 50‰ (deltaméthrine, famille des pyréthrinoïdes) est utilisé depuis 1994 en pour-on contre le stade adulte des stomoxes. Des travaux préliminaires d'étude de l'efficacité paralytique du BUTOX® 50‰ montrent une diminution de la sensibilité des populations locales de stomoxes par rapport à des populations mauriciennes

supposées sensibles (Ehrhardt 2006). Des larvicides sont également largement utilisés (Neporex® à base de cyromazine de la famille des triazines).

- La lutte biologique est une stratégie de lutte contre les nuisibles utilisant des agents biologiques : des organismes vivants prédateurs, parasites ou pathogènes de l'espèce cible. Le développement de méthodes de lutte biologique est une alternative à la lutte chimique. Quatre catégories de luttes biologiques sont distinguées (Eilenberg, Hajek, et Lomer 2001) :

  - *La lutte classique* : "l'introduction de façon intentionnelle d'un agent de lutte biologique exotique, qui a généralement co-évolué avec l'espèce cible, pour un établissement permanent et un contrôle sur le long terme".
  - *L'augmentation par inoculation* : "la libération intentionnelle d'un organisme vivant en tant qu'agent de lutte biologique dans l'espoir qu'il se multiplie dans la population cible et contrôle le ravageur sur une période prolongée mais pas de façon permanente".
  - *L'augmentation par inondation :* "l'utilisation d'un organisme vivant dans le but de lutter contre un ravageur, son contrôle est exclusivement assuré par cet organisme". C'est une stratégie utile sur le court terme étant donné qu'elle ne s'appuie que sur l'organisme libéré lui-même et non sa progéniture : c'est par cette caractéristique qu'elle se différencie de l'inoculation qui se repose sur l'espoir d'un maintien de l'agent de biocontrôle dans la population sur plusieurs générations.
  - *La conservation* : "la modification de l'environnement ou des pratiques dans le but de protéger et augmenter l'ennemi naturel ou d'autres organismes pour réduire l'effet d'un ravageur"

Sur l'île de La Réunion, les premiers essais de lutte biologique contre les stomoxes datent de 1996 et se basent sur l'utilisation de trois parasitoïdes : *Spalangia endius* (Walker, 1839) (1996-2009), *Trichopria sp*. (1996-2001) qui s'attaque aux œufs et aux pupes, déjà présents sur l'île avant la lutte, et *Tachinaephagus stomoxicida* (SubbaRao, 1978) (1996-2001) exotique de l'île en lutte classique. Malheureusement suite à des essais avec une efficacité mitigée et face notamment aux difficultés d'élevage, aucune mesure de lutte biologique à base de parasitoïdes n'est utilisée à La Réunion contre les stomoxes depuis 2009.

D. Des champignons entomopathogènes pour la lutte biologique

Les champignons entomopathogènes sont présents dans plusieurs divisions du règne Fungi : *Entomophtoromycetes, Ascomycetes, Deuteromycetes, Chytridiomycetes et Oomycetes*. L'embranchement des *Entomophtoromycètes* et l'ordre des *Hyphomycetes* (*Deuteromycetes*) sont les plus représentés (Sharma et al. 2020).

Historiquement, la première utilisation de champignon en tant qu'agent de lutte biologique date de 1888 en Russie : *Metarhizium anisopliae* ((Metchnikoff) Sorokin, 1883) (Ascomycètes: Hypocreales) fut utilisé pour contrôler les populations de charançons des cultures de betterave (*Cleonus punsiventris*) (Lord 2005). Aujourd'hui, *M. anisopliea* et *Beauveria bassiana* ((Bals.-Criv.) Vuill., 1912) composent la plupart des mycoinsectides et mycoacaricides sur le marché mondial : à eux deux, ils représentent plus de la moitié des produits commercialisés (De Faria et Wraight 2007).

A La Réunion, l'utilisation de champignons entomopathogènes (ou EPF pour EntomoPathogenic Fungi) n'est pas nouvelle : pour lutter contre le ver blanc *Hoplochelus marginalis* (Fairmaire 1889), nuisible de la culture de canne à sucre, le Betel® est utilisé depuis le milieu des années 1990. Ce moyen de lutte biologique se présente sous la forme de billes renfermant des spores de *Beauveria hoplocheli* (Robène-Soustrade &.Nibouche 2015) pathogène des larves de *H. marginalis* (Robene-Soustrade et al. 2015).

i. Le phylum Entomophthoromycota

L'ancien ordre *Entomophthorales*, de l'embranchement *Zygomycota* (aujourd'hui dissous) a récemment été reclassé en son propre embranchement : *Entomophtoromycota* monophylétique (Humber 2012b). Ce phylum contient, en 2016, 280 espèces organisées en trois classes et six familles (Annexe 1). De nombreux genres sont entomopathogènes, les familles *Neozygitaceae* et *Entomophthoraceae* sont exclusivement des pathogènes d'insectes (Keller et Wegensteiner 2007). Certains affectent également d'autres règnes : algues (*Ancylistaceae*), nématodes (*Meristacraceae)*, vertébrés incluant l'homme (*Conidiobolus, Basidiobolus*). Le spectre d'hôte des champignons de cet embranchement est large (Annexe 2). Sur la centaine d'espèces hôtes connues des *Entomophthromycota*, 70 sont considérées comme nuisibles soutenant le potentiel rôle de ces champignons dans la lutte biologique (Keller et Wegensteiner 2007).

Des tests de pathogénicité in vitro ont été réalisés avec des champignons du phylum *Entomophthromycota*. Différentes méthodes d'infection peuvent être appliquées (infection par *conidia shower*, par contact avec un support contaminé ou encore trempage dans une solution de conidies) et sont décrites dans les ouvrages de Hajek, Papierok, et Eilenberg (2012) et Papierok et al. (2007). Elya et al. (2018) ont abouti à une infection par *Entomophthora muscae* Berkeley (Entomophthoromycota : Entomophthoraceae) de *Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830) (Diptera : Drosophilidae) par mise en contact des drosophiles saines avec des cadavres infectés en phase de projection des conidies.

Structures morphologiques

Les *Entomophthoromycota* possèdent un large panel de structures ayant chacune un rôle bien défini dans le développement du champignon, sa dispersion et son infection. La caractérisation morphologique de ces structures permet la description taxonomique des espèces. L'identification d'une espèce repose sur l'observation des caractères morphologiques qui ont permis de décrire l'espèce. Ces structures sont bien décrites par Keller (2007c).

Hyphes

Les hyphes sont présents chez toutes les espèces. Elles peuvent être le premier stade produit dans l'hôte infecté ou se développent à partir de protoplastes. Les hyphes possèdent une paroi et se présentent sous différentes formes et tailles, chez certaines espèces elles peuvent être polymorphiques (Annexe 3). Leur forme est un critère important de classification. Le nombre et la taille des noyaux sont souvent espèce-spécifiques. Les hyphes sont les structures à partir desquelles les conidiophores, les rhizoïdes, les cystides et les spores dormantes sont produits.

Cystides

Elles sont aussi appelées " conidiophores stériles" et sont considérées comme responsables de la rupture de la cuticule de l'hôte par pression mécanique. Les cystides ne sont pas présentes chez toutes les espèces.

Conidies

Les conidies ou spores sont responsables de l'infection. Elles sont de tailles et formes diverses, mono, oligo ou plurinucléées, et contiennent des vacuoles ou des gouttelettes lipidiques (Annexe 4). Elles sont activement éjectées afin d'infecter un nouvel hôte. Certaines espèces produisent des conidies aquatiques ou étoilées au contact de l'eau : les conidies sont rondes avec des protrusions au niveau de leurs axes. Elles seraient libérées de façon passive dans les courants d'eau. Les conidies germinent sur le côté pour donner des conidies secondaires et germinent par la papille ou l'apex pour produire des hyphes. Lorsque la conidie primaire a échoué à infecter un nouvel hôte, une conidie secondaire est produite : plus petite que la primaire elle possède également un pouvoir pathogène supérieur. Elle est éjectée dans l'espoir d'infecter un hôte.

Conidiophores

Les conidiophores émergent d'un hyphe. Ils peuvent être simple ou ramifié de façon "dichotomique" ou "digitalement", le second étant le plus répandu des deux (Annexe 5). Les conidiophores simples produisent des conidies à deux ou plusieurs noyaux. Les conidies des conidiophores ramifiés sont mononucléées. Chez la majorité des espèces la terminaison du conidiophore, où la conidie est formée, est plus large que le reste de la structure : cet élargissement est appelé "épaule", un "cou" est formé en amont de la terminaison. Les conidiophores secondaires émergent des conidies primaires pour former des conidies secondaires et peuvent être soit courts et épais soit longs et fins.

Rhizoïdes

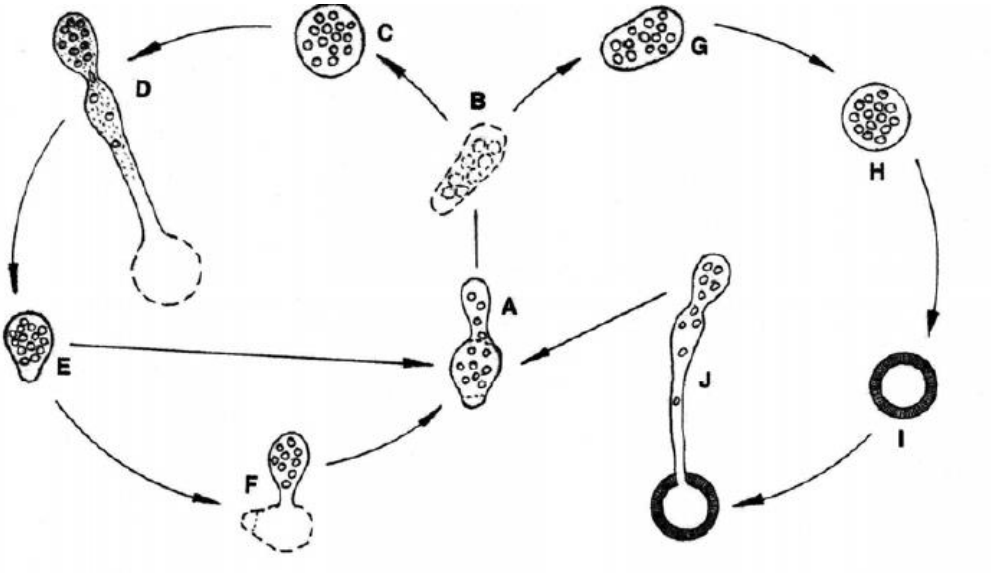
Ce sont les structures responsables de l'adhésion de l'hôte au substrat. Ils se développent à l'extérieur de l'insecte, après sa mort, par sa face ventrale, généralement au niveau des zones faibles en cuticule. Ils peuvent être simples ou composés (Annexe 6). A maturité, les deux types ne présentent ni cytoplasme ni noyau.

Spores dormantes

Ce sont les structures impliquées dans la survie en conditions défavorables. Elles possèdent une paroi épaisse et sont de tailles et formes diverses. Le mécanisme de formation est peu connu mais il est admis qu'elles peuvent être produites de façon sexuée par la conjugaison de deux hyphes ou de façon asexuée par la modification d'un hyphe. Elles sont retrouvées à l'intérieur de l'hôte mort. Les spores dormantes ne sont pas capables d'infecter un nouvel hôte : lorsque des conditions favorables sont atteintes, elles produisent une ou plusieurs conidies. Le stade spores dormantes est inconnu pour plusieurs espèces.

Cycle de reproduction

Ces champignons ont généralement deux cycles : un cycle asexué qui fait intervenir les conidies et un cycle qui s'appuie sur le développement de spores dormantes (Figure 2).



A : une conidie germine après adhésion à la cuticule de l'insecte
B : formation d'un protoplaste
C : hyphe
D : conidiophore se forme à partir de l'hyphe
E : conidie primaire
F : conidie secondaire
G : hyphe
H : spore dormante immature
I : spore dormante mature
J : conidiophore germine à partir de la spore dormante pour donner une conidie

Figure 2 : Exemple de cycle de reproduction d'un *Entomophthoromycota : Entomophaga maimaiga* (Humber, Shimazu, and R.S. Soper (1988)) (d'après Keller 2007b)

ii. Le genre *Batkoa* (Humber 1989)

Embranchement : Entomophthoromycota
Classe : Entomophthotomycetes
Ordre : Entomophthorales
Famille : Entomophthoraceae
Sous-famille : Entomophthoroidae
Genre : *Batkoa*

Le genre *Batkoa* (Humber 1989) compte dix espèces connues à ce jour : *Batkoa amrascae* (S. Keller & Villac. 1997), *Batkoa apiculata* ((Thaxt.) Humber 1989), *Batkoa cercopidis* ((S. Keller) B. Huang, Humber & K.T. Hodge 2007), *Batkoa dysderci* ((Viégas) Humber 1989), *Batkoa gigantea* ((S. Keller) Humber 1989), *Batkoa hydrophila* (Keller 2007b), *Batkoa limoniae* ((S. Keller) Niell & Santam. 2001), *Batkoa major* ((Thaxt.) Humber 1989), *Batkoa papillata* ((Thaxt.) Humber 1989), *Batkoa pseudapiculata* ((S. Keller) B. Huang, Humber & K.T. Hodge 2007). Auxquels nous pourrions rajouter les espèces aujourd'hui rattachées au genre *Batkoa* par les études moléculaires de Nie et al. (2020) et Gryganskyi et al. (2013) : *Entomophaga australiensis* (Humber (sp. nov., unpublished)) et *Entomophaga conglomerata* ((Sorokin) S Keller).

Batkoa était précédemment classé comme un sous-genre d'*Entomophaga* (Batko et Weiser 1965). Sa reclassification en son propre genre date de 1989 (Humber 1989).
Par leur proximité morphologique avec le genre *Conidiobolus* ((Bref. 1884) Humber 1989), la distinction des deux genres a longtemps été confuse. Le développement des techniques moléculaires a permis une classification plus rigoureuse. Une récente étude de phylogénie sur plusieurs gènes (ARN nucléaire ribosomique, ARN mitochondrial ribosomique et le facteur d'élongation EF1α) a permis la réorganisation totale du genre *Conidiobolus* et sa distinction du genre *Batkoa* (Nie et al. 2020) (Annexe 7).

Toutes les espèces sont obligatoirement entomopathogènes. Le spectre d'hôte de ce genre est généralement plus large que la moyenne : *Diptera, Coleoptera, Homoptera, Lepidoptera* (Keller 2007a).

La première caractérisation morphologique correcte du genre date de 1989 par Humber (Humber 1989) (Annexe 8) : «Hyphes avec paroi à l'intérieur de l'hôte. Noyau large, à l'aspect granuleux lors de l'interphase par la condensation de la chromatine. […] Conidiophores simples […] avec une tendance à former un 'cou' au niveau de l'apex. Conidies primaires globuleuses, multinucléées éjectées par '*papillar evasion'*. Rhizoïdes occasionnellement présents […] avec un disque de crampon. Spores dormantes présentes. Obligatoirement entomopathogènes, la majorité des espèces infectent les ordres des *Hemiptera* et *Homoptera*».

iii. Etat des connaissances : un champignon entomopathogène des stomoxes à La Réunion

En 1981, N. Barré relatait l'observation d'une mortalité exceptionnelle des stomoxes par une mycose. D'après ses observations sur trois ans, cette mycose se retrouve sur toutes les altitudes de la région ouest de l'île (de 10m à 1 200m d'altitude) exclusivement dans la période de la mi-avril à la mi-juin, pendant le pic de pullulation des populations de stomoxes (Barré 1981). Les deux espèces réunionnaises sont touchées et représentent la majorité des insectes mycosés mais d'autres espèces sont également sensibles comme la mouche domestique et les mouches du genre *Calliphora*. Les insectes sont retrouvés morts, ailes entrouvertes sur la végétation autour des animaux d'élevage. L'insecte est lié au substrat par des filaments blanchâtres sortant par la face ventrale de l'hôte et des bandes blanches recouvrent l'abdomen. Les spores sont en « forme de poire ».

Des échantillons de stomoxes mycosés ont été envoyés à l'Institut Pasteur où le Dr Papierok identifie *Conidiobolus apiculatus* par caractérisation morphologique. Aucun document ne permet de confirmer ce résultat. En 2007, Didier Pastou à l'aide d'une clé

d'identification de Keller de 2007, confirme l'identification du champignon qui a été renommé depuis *Batkoa apiculata* ((Thaxt.) Humber 1989) (Bouyer et Stachurski 2009). Des essais d'infection entre individus adultes sont alors réalisés par trempage des stomoxes dans une solution aqueuse contenant des spores et par contact des stomoxes avec un broyat de mouches mycosées. Ces tentatives de contamination directe entre mouches adultes n'ont pas donné de résultats positifs. Aucun document ne reprend ces données, aucune étude rigoureuse n'a été réalisée à ce jour sur ce champignon à La Réunion.

L'objectif de cette étude est de réaliser une caractérisation morphologique et moléculaire du champignon. Dans un second temps une étude de sa distribution dans les élevages bovins de l'île sera réalisée. Enfin une étude de pathogénicité sera menée sur *Ceratitis capitata* mouche nuisible des cultures fruitières et légumières à La Réunion (n'ayant pas d'élevage de stomoxes disponible).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Distribution du champignon dans les élevages à l'échelle de l'île

Une plaquette de présentation des objectifs de l'étude, et une fiche d'autorisation de collecte a été rédigée (Annexe 9) à destination des éleveurs. L'ensemble de la procédure permettant de respecter le Règlement Général pour la Protection des Données (RGPG) a été suivi, les données sensibles sont stockées sur un serveur sécurisé pour la durée du projet puis seront détruites à son issue.

85 élevages ont été sélectionnés sur toute l'île de La Réunion suivant une liste initiale utilisée pour une étude récente sur les moucherons piqueurs *Culicoides* vecteurs d'intérêt vétérinaire réalisée par Yannick GRIMAUD du GDS 974 (Grimaud et al. 2020). Deux équipes de deux personnes (un agent du Cirad et un GDS) ont été formées pour réaliser les mêmes protocoles d'observation et d'échantillonnage. L'île est divisée en deux secteurs : le secteur nord (46 élevages) et le secteur sud (39 élevages). Chaque équipe couvre un secteur. Les élevages sélectionnés couvrent un gradient d'altitude allant de 10 à 1 718 m et différents microclimats de l'île. La prospection s'est déroulée du 19 avril au 30 avril 2021, en période de pullulation des stomoxes à La Réunion, à l'exception du cirque de Salazie réalisée le 3 mai.

Un élevage a été considéré positif si au moins un stomoxe mort collé à un support (végétation ou non) par un champignon de type *Entomophthoromycota* (voir clé Table 3) est observé. Dans le cas contraire, l'élevage est noté négatif pour la présence du champignon. Les données sont présentées graphiquement à l'aide de QGIS (V 3.16.1 Hannover)

Si un élevage est positif, des prélèvements de stomoxes mycosés sont réalisés :

- 30 stomoxes sont mis en tube Eppendorf individuel rempli d'alcool 95° pour des études ultérieures ;
- Cinq stomoxes sont collectés dans des tubes Eppendorf individuels vides. Le champignon sera caractérisé par observation microscopique.

Les tubes sont conservés au congélateur à -30°C.

Afin d'avoir 1) une estimation des densités de population de stomoxe et 2) la prévalence du champignon dans ces individus : pour chaque élevage, un piège Vavoua (Vestergaard®) est posé et récupéré le lendemain. Les stomoxes sont attirés par le contraste de couleur du tissu en coton bleu et noir, ils se dirigent ensuite naturellement vers le haut du piège où ils sont capturés dans un pot en plastique transparent. Le tissu est imprégné d'insecticide (deltaméthrine). Le traitement de ces échantillons n'ayant pas pu être réalisé dans la période de cette étude, ils sont mis dans un pot stérile et conservés au congélateur à -20°C pour des études ultérieures. Ils seront comptés, typés morphologiquement et moléculairement par espèce (*S. calcitrans* ou *S. n. niger*). Un test de diagnostic de présence

du champignon sera mis au point pour permettre de déterminer sa prévalence dans les populations de stomoxes pour chaque élevage échantillonné.

B. Récolte des stomoxes mycosés sur le terrain

Sur le terrain, les stomoxes mycosés sont prélevés à l'aide d'une pince stérile. Ils sont identifiés par espèce sur critères morphologiques cités en Figure 1 (Zumpt 1973). Ils sont individualisés en tube Eppendorf rempli d'alcool 95° pour des travaux de caractérisation moléculaire et en tube Eppendorf vide pour une caractérisation morphologique du champignon et son isolement sur milieu gélosé. Les tubes sont conservés au congélateur à -30°C.

C. Caractérisation des stomoxes

Les stomoxes ont été identifés morphologiquement à l'aide des critères de détermination de Zumpt (1973) en Figure 1.

Une caractérisation moléculaire par « *barcoding* » des stomoxes a été réalisée avec les amorces disponibles au laboratoire afin de s'assurer de l'identité des insectes avec lesquels nous travaillons et de valider l'identification visuelle que nous réalisons. Le code-barre ou « *barcode* » ADN correspond à un fragment standard d'ADN dont la séquence est caractéristique de l'espèce. Pour les insectes il s'agit du gène de la sous unité COI (cytochrome C oxydase mitochondrial). Les données génétiques sont standardisées à partir de spécimens référencés dans des collections et identifiés par des taxonomistes. Pour les insectes la base de données BOLD (« Barcode of life data system V4 » 2006) est la référence. La confrontation du *barcode* avec la base de données permet d'identifier des individus prélevés dans leur environnement.

Dix stomoxes identifiés morphologiquement sur la base des critères de Zumpt (1973) ont été sélectionnés. L'ADN est extrait en utilisant le kit DNeasy Blood and Tissue (Cat N° 69504 ; QIAGEN). Une amplification d'ADN par PCR du gène de la sous unité COI (cytochrome C oxydase mitochondrial) est faite avec les amorces LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') et HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') (Folmer et al. 1994) (Annexe 10). Chaque réaction est réalisée avec un volume final de 20 µL (10µL de Type-it (QIAGEN), 0,5 µL de chaque amorce, 5 µL d'H_2O et 4µL d'ADN). Le programme du thermocycleur est le suivant : une dénaturation de 15 min à 95°C, 40 cycles de 1 min à 95°C, 1 min à 48°C, 1 min 30 à 72°C et enfin une extension de 10 min à 72°C. Après vérification de la PCR par électrophorèse capillaire (Qiaxcel Advanced ; QIAGEN), les séquences sont envoyées à Macrogen (Amsterdam, Pays Bas) pour purification et séquençage. Les séquences obtenues (5P-COI) ont été alignées à l'aide de Clustal avec l'ensemble des séquences de la zone 5' du gène du genre Stomoxys disponibles dans la base de données Bold Systems (Annexe 11). Les espèces du genre *Stomoxys* pour la zone 5P-COI sont très mal représentées. Les séquences disponibles sont classées dans les espèces *S. calcitrans* (35), *S. pullus* (10), *S. indicus* (7), *S. urma* (5), *S. sitiens* (1) et *Stomoxys* sp. (5). Un arbre phylogénétique a été réalisé, la topologie de l'arbre et les longueurs des branches ont été estimées par maximum de vraisemblance en utilisant le modèle GTR (General Time Reversible), et les probabilités postérieures calculées à l'aide d'un modèle bayésien. *Musca domestica* est représenté en tant que *outgroup*. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel MrBayes intégré à Geneious.

D. Isolement du champignon

Le champignon est isolé à partir de cadavres de stomoxes mycosés prélevés sur le terrain par technique ascendante (Keller 1987) : le stomoxe mycosé est déposé sur un morceau de papier imbibé d'eau distillée stérile, le tout dans le couvercle d'une boîte de pétri. Les ailes sont retirées ou écartées pour dégager l'abdomen. Le fond de la boîte de pétri rempli de milieu de culture gélosé est déposé au-dessus du stomoxe (Figure 3).

Les spores sont projetées naturellement vers le milieu gélosé permettant un isolement du champignon en minimisant les contaminations. La boîte de pétri est ensuite placée dans une étuve à 25°C ; 70% d'humidité pendant 24 heures. Au-delà, le stomoxe est retiré et le couvercle de la boîte de pétri est changé.

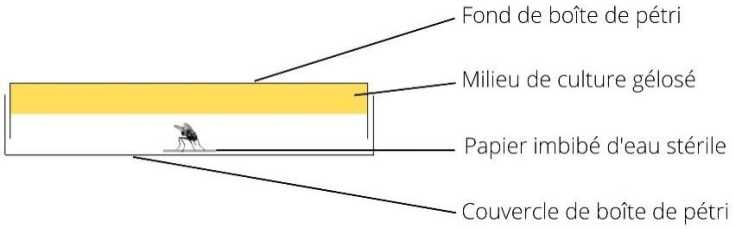


Figure 3 : Isolation des spores du champignon sur milieu gélosé par technique ascendante (Crédit : J. Win Chin)

E. Culture du champignon

Les *Entomophthoromycota* sont des champignons difficiles voire impossible à cultiver à l'heure actuelle pour certaines espèces (Jaronski 2017). Ils nécessitent généralement des milieux riches.

Le champignon est cultivé sur milieu gélosé Sabouraud supplémenté en extrait de levure, jaunes d'œufs et lait entier (SDAYEYM : Sabouraud Dextrose Agar Yeast Extract Yolk and Milk) (Papierok 1978; Papierok et al. 2007) (Table 1). Tout le matériel utilisé est stérilisé par autoclave au préalable et la manipulation des milieux se fait sous hotte.

Table 1 : Composition du milieu SDAYEYM. Après préparation des 3 milieux séparément, ils sont mélangés sous hotte.

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

* = autoclavage préalable

F. Caractérisation morphologique du champignon

Spores primaires et secondaires

Les spores primaires sont récupérées sur une lame de verre par technique ascendante : le stomoxe mycosé est placé sur un papier imbibé d'eau distillée stérile, les ailes sont écartées pour découvrir l'abdomen (Figure 4). Après 24 heures en étuve 25°C ; 70% d'humidité, les lames sont ensuite observées en microscopie optique après une coloration au cotton blue lactophénol (CBLP).

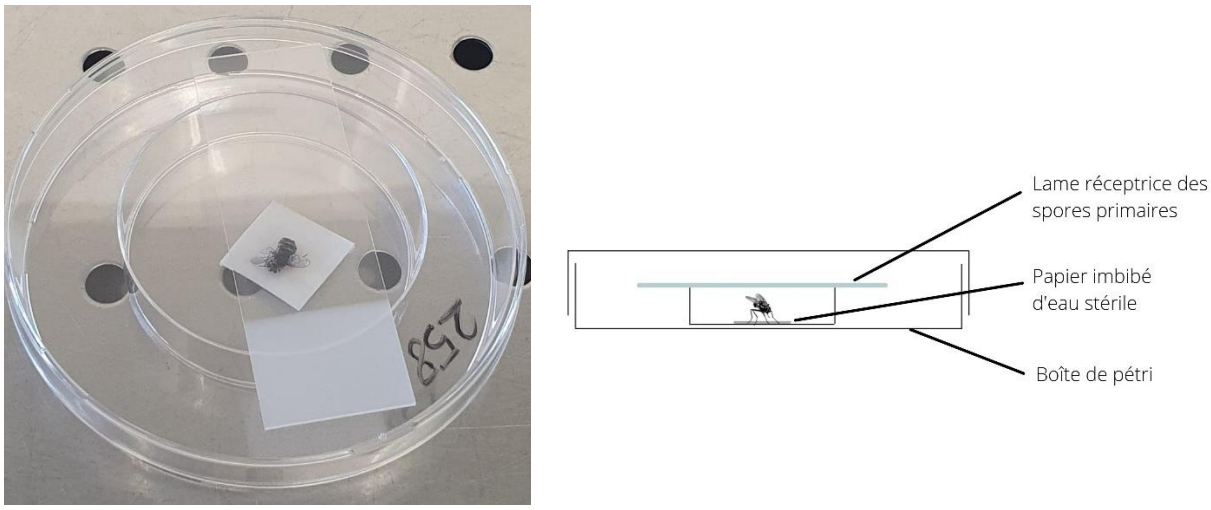


Figure 4 : Dispositif de récupération des spores primaires du champignon sur lame par technique ascendante (Photo et crédit : J. Win Chin)

Les spores secondaires sont isolées par technique ascendante à partir d'une lame de spores primaires. Un morceau de papier imbibé d'eau distillée stérile est placé entre les 2 lames pour former un espace d'environ 1 à 2 mm (Figure 5). Après 24 heures à 25°C ; 70% d'humidité, la lame supérieure est observée au microscope optique avec une coloration CBLP.

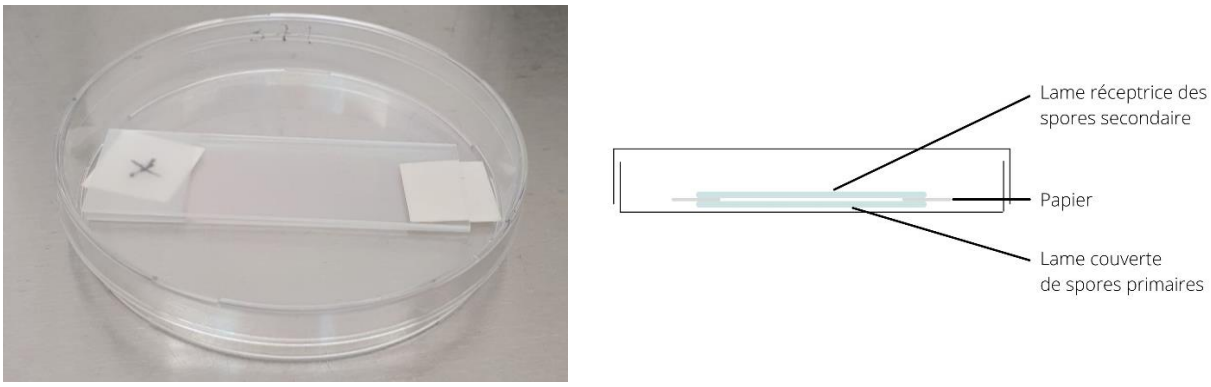


Figure 5 : Dispositif de récupération des spores secondaires du champignon sur lame (Crédit et photo : J. Win Chin)

La taille des conidies primaires et secondaires est mesurée pour deux lots de 20 conidies, issues de stomoxes différentes, sur le logiciel Piximètre (Version 5.10) avec les paramètres suivants : mode statistique, forme développée, intervalle de confiance 95%.

Autres structures morphologiques

Les structures sortant des régions intersegmentaires de l'abdomen, en face dorsale du stomoxe, sont prélevées avec une pince fine et placées dans un tube Eppendorf de 2mL rempli de 30µL d'une solution tampon (exemple : Tris). Le tube est ensuite vortexé : cela permet aux structures de se séparer, facilitant l'observation sur lame. Le liquide est ensuite transféré sur une lame en verre et observé au microscope optique avec une coloration CBLP. Le même procédé est utilisé pour les structures sortant de l'insecte par sa face ventrale.

Dix mesures au niveau de l'extrémité de conidiophores sont réalisées sur le logiciel Piximètre (Version 5.10) avec les paramètres suivants : mode statistique, forme développée, intervalle de confiance 95%.

La clé dichotomique de Humber (2012a) a été utilisée pour la classification taxonomique du champignon au regard des critères morphologiques.

G. Caractérisation moléculaire du champignon

Les régions génomiques ciblées dans notre étude correspondent à celles utilisées pour réaliser les études phylogénétiques qui font référence pour le règne *Entomophthoromycota* (Gryganskyi et al. 2013; Nie et al. 2020). Il s'agit de portions de gènes nucléaires et mitochondrial : l'espaceur interne transcrit (ITS) il s'agit du barcode universel pour les champignons, les grandes et petites sous-unités ribosomales (nucLSU et nucSSU), la deuxième plus grande sous unité de l'ARN polymérase II (RPB2), le facteur d'élongation EF-1α, et la petite sous unité mitochondriale (mtSSU). Ces gènes sont utilisés pour caractériser la diversité génétique et les liens phylogénétiques chez les champignons car ils présentent des régions hautement conservées mais aussi des régions variables qui révèlent du polymorphisme exploitable pour séparer les individus au niveau du genre ou de l'espèce de certains groupes (Papierok et al. 2007; De Fine Licht et al. 2016; Hajek, Papierok, et Eilenberg 2012).

Les échantillons utilisés proviennent tous de stomoxes mycosés issus d'un élevage situé à une altitude de 1080 m à la Plaine des Palmistes. L'ADN du champignon est extrait avec le kit d'extraction DNeasy Plant Mini Kit (Cat. No. 69104 ; QIAGEN). L'extraction est réalisée avec des stomoxes mycosés et du champignon isolé en boîte de culture. La description précise des amorces, de leur localisation sur les gènes et les programmes d'amplification sont présentés en Annexe 12. Toutes les réactions sont réalisées dans un volume final de 25 µL. Les produits PCR sont vérifiés par électrophorèse capillaire (Qiaxcel Advanced ; QIAGEN). Les amplifications d'ADN obtenues après PCR sont envoyées à Macrogen (Amsterdam, Pays Bas) pour purification et séquençage.

Les séquences obtenues sont alignées à l'aide avec l'ensemble de séquences de la portion du gène du genre *Batkoa* tel que défini par Gryganskyi et al. (2013) et Nie et al. (2020) disponibles sur de la base de données GenBank (Annexe 13). Un arbre phylogénétique a été réalisé, la topologie de l'arbre et les longueurs des branches ont été estimées par maximum de vraisemblance en utilisant le modèle GTR, et les probabilités postérieures calculées à l'aide d'un modèle bayésien. *Zoophtora radicans* et *Conidiobolus thromboides* sont représentés en tant que *outgroups*. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel MrBayes intégré à Geneious.

H. Test de pathogénicité sur *Ceratitis capitata*

Ce test a deux objectifs :

- La mise au point d'un protocole d'infection directe champignon/insecte applicable par la suite aux stomoxes, lorsque l'élevage sera disponible pour la réalisation du postulat de Koch : 1) isolement, culture et identification du micro-organisme à partir d'un hôte infecté ; 2) infection in vitro d'un hôte sain par le micro-organisme cultivé ; 3) isolement du micro-organisme à partir des nouveaux hôtes infectés et identification comme l'agent infectieux original ;
- L'étude d'un effet pathogène du champignon sur une espèce invasive d'intérêt agricole à La Réunion.

La mise en place d'un élevage de stomoxe est en cours, malheureusement les délais sont longs, et dépassent la durée du stage. La demande d'autorisations auprès des services de la DAAF pour l'utilisation de sang animal a été faite et obtenue.

Un élevage de *C. capitata* est maintenu en insectarium sécurisé au Pôle de Protection des Plantes par le Cirad à Saint-Pierre (La Réunion) pour d'autres travaux, cette espèce était donc disponible pour réaliser un test de pathogénicité champignon/insecte. *Ceratitis capitata* ou mouche méditerranéenne des fruits est une espèce nuisible des productions agricoles à La Réunion depuis 1955 (Etienne 1982). Elle s'attaque à plus de 250 espèces de fruits et légumes de différentes familles par exemple mangue (Anacardiaceae), goyave (Myrtaceae), mandarine (Rutaceae) à La Réunion (Nguyen Ngoc 2000). Ces tests de pathogénicité permettent d'évaluer l'effet éventuel du champignon sur cette espèce invasive d'intérêt. 30 adultes (émergés le jour même) et 30 larves de troisième stade L3 ont été utilisés pour ce test. Ce protocole est basé sur les recommandations de Hajek, Papierok, et Eilenberg (2012)

concernant les essais d'infection par *Conidia shower* qui est la méthode privilégiée pour les test d'infection de champignon *Entomophthoromycota* sur les insectes de petites tailles.

Pendant 24h, les insectes (adulte et larves) sont placés individuellement (pour éviter toute contamination croisée entre insectes) dans une petite boîte fermée (cylindre de diamètre 3 cm et hauteur 4,5 cm) contenant une culture du champignon sur milieu gélosé SDAYEYM datant du jour même projetant des conidies primaires (Figure 8). Les adultes sont ensuite déplacés dans des boîtes d'élevage individuelles (cylindre de diamètre 5 cm, hauteur 7,5 cm) avec un accès permanent à de l'eau et de l'eau sucrée (200 µL, dilution au 10e). Les larves sont déplacées dans une petite boite fermée (cylindre de diamètre 3 cm et hauteur 4,5 cm) remplie à moitié de sable autoclavé pour leur pupaison, le tout dans une boite d'élevage individuelle où elles émergeront (Figure 6). L'émergence des adultes et la mortalité des individus sont suivies quotidiennement sauf le samedi et dimanche. Les cadavres sont ensuite placés en chambre humide à 25°C et l'apparition de mycose est suivie.

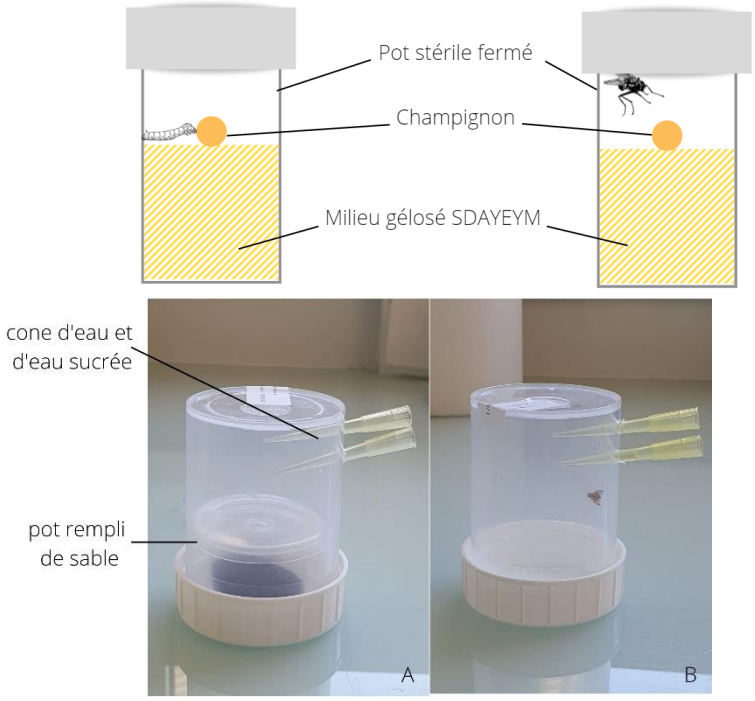


Figure 6 : Dispositif du test de pathogénicité champignon/insecte. Haut : une mouche adulte ou une larve de stade L3 est placée individuellement dans une boîte au contact du champignon cultivé – Bas : après 24 heures en contact avec le champignon, les individus sont mis en boîte d'élevage individuelle, les adultes ont accès à l'eau et à de la nourriture en permanence (B) et les larves sont placées dans un pot de sable pour pupaison (A). A l'émergence, ils sont mis dans le même type de boîte que les adultes. (Photo et crédit : J. Win Chin)

RÉSULTATS

A. Distribution du champignon dans les élevages à l'échelle de l'île

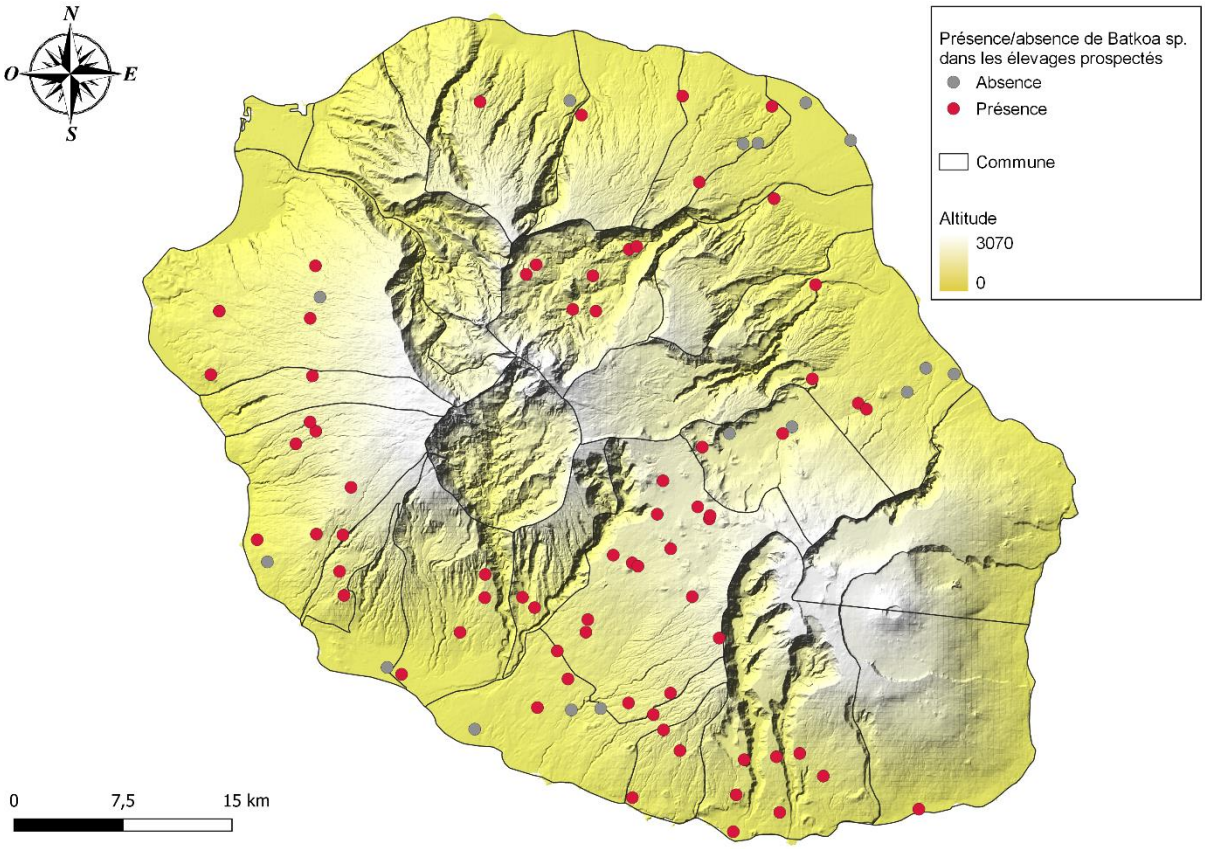


Figure 7 : Résultats de l'étude de distribution de *Batkoa sp. Reunion* dans l'île de La Réunion (avril 2021)

La réalisation de cette étude de la distribution s'est bien déroulée malgré des conditions climatiques particulièrement éprouvantes avec orages et fortes pluies en particulier dans le secteur sud.

Des stomoxes (mycosés ou non) ont été observés dans 90% des exploitations (76/85). Le vavoua a piégé des stomoxes dans 80% des exploitations (67/85). Les données quantitatives piégeage (comptage des mouches) n'ont pas encore été réalisées, néanmoins, on note de fortes variations en fonction des exploitations.

Les résultats de ces observations révèlent également qu'un champignon ou des champignons de type *Entomophthoromycota* (voir clef de détermination Table 3) sont présents sur la globalité de l'île avec plus de 80 % élevages bovins prospectés positifs (69/85) (Figure 7). Plus de 90% (36/39) des élevages du secteur sud et 70% (33/46) pour le secteur nord sont positifs. La présence de la mycose est observée de 10 m à 1718 m d'altitude. La quantité de stomoxes infectés par les champignons de ce type dans les élevages était très fluctuant. Le nombre d'insectes mycosés identifiés variait entre un et plusieurs centaines par élevage (Figure 8). Il était possible de retrouver une vingtaine de mouches collées à une seule feuille, celle-ci pliant parfois sous le poids des insectes morts. Nous observons bien une épizootie d'un champignon de type « *entomophtorale* » sur les stomoxes de La Réunion.

Il a été remarqué que les stomoxes mycosés étaient souvent répartis inégalement sur la végétation de l'élevage. Ils se retrouvaient à proximité des parcs à animaux certes, mais certaines plantes semblaient représenter un reposoir favorisé pour les stomoxes. Ainsi il était

généralement sûr de retrouver des mouches infectées sur : les bringeliers marrons, les cannes fourragères et graminées. A contrario il était presque impossible de les observer sur les feuilles de bananier, par exemple, alors que les stomoxes vivants s'y reposent.

Figure 8 : Amas de stomoxes mycosés retrouvés dans différents élevages bovins de l'île de La Réunion (Photos : J. Win Chin)

D'autres espèces d'insectes ont été retrouvées mycosées de la même façon que les stomoxes (Figure 9) : *Musca domestica*, des mouches du genre *Calliphora* et *Lucilia* (« mouches à merde »), un individu de la famille des Sarcophagidae et d'autres hôtes encore non identifiés. Ces observations représentent 2,68% (18/671) des prélèvements totaux du secteur sud et jusqu'à 11% (99/889) du secteur nord (Table 2). Cette différence pourrait être

expliquée par un biais d'observateur ou un contraste de proportion des populations d'insectes nuisibles dans les élevages entre les deux secteurs de l'île.

Table 2 : Diversité d'hôtes du ou des champignons de type *Entomophthoromycota* à La Réunion

	Effectif		
Hôte	***Nord***	***Sud***	***Total***
Stomoxys	*791*	*653*	*1444*
Musca domestica	*78*	*0*	*78*
Lucillia, Calliphora (« Mouches à merde »)	*20*	*2*	*22*
Sarcophagidae	*1*	*0*	*1*
Non déterminé	*0*	*16*	*16*

Figure 9 : Insectes mycosés autres que le genre Stomoxys trouvés en conditions naturelles dans les élevages réunionnais (Photos : J. Win Chin)

B. Récolte des stomoxes mycosés sur le terrain

Les stomoxes infectés sont retrouvés morts, collés à la surface, supérieure et inférieure, des feuilles autour des parcs des animaux. Les ailes sont entrouvertes. Toutes sortes de végétaux sont concernées : canne fourragère, fougère, bringellier, graminées, arbres à fruits (pêcher, avocatier, …), palmier, etc. Néanmoins, ils peuvent également être retrouvés sur des substrats non végétaux (Figure 10-C) : câbles, poteaux, etc. La majorité des cadavres sont retrouvés entre 10 cm et 2m au-dessus du sol.

Les rhizoïdes apparaissent comme des filaments blancs faisant le lien entre le substrat et l'insecte (Figure 10-B) : c'est généralement le premier signe observable de l'infection.

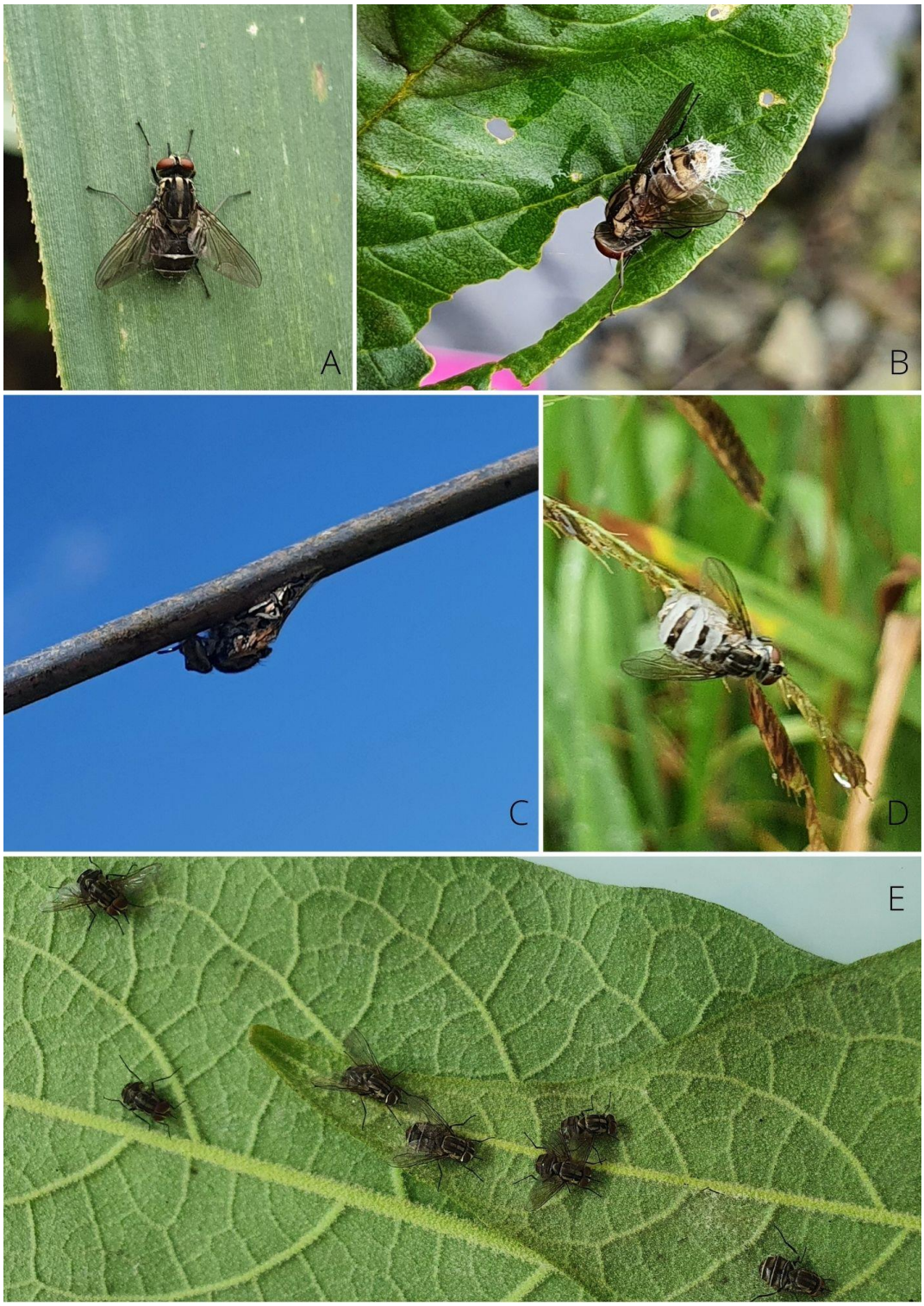


Figure 10 : Stomoxes mycosés en conditions naturelles dans les élevages bovins réunionnais. A : sur une feuille de canne fourragère - B : les rhizoïdes du champignon sont visibles sous forme de filaments blancs faisant le lien entre le stomoxe et le substrat – C : sur un câble en métal – D : champignon visible entre les segments de l'abdomen – E : stomoxes mycosés rassemblés sur une feuille de bringellier marron (*Solanum mauritianum* Scop., 1788). (Photo : J. Win Chin)

Aux premiers stades de l'infection, les conidiophores forment un liseré blanchâtre est observable au niveau des zones intersegmentaires de l'abdomen (Figure 10-D). Lorsqu'un stade avancé est atteint, les conidiophores émergent également des côtés du thorax, à l'arrière de l'abdomen et par toute zone pauvre en cuticule.

C. Caractérisation des Stomoxes

Pour dix stomoxes identifiés comme *S. n. niger* avec les critères morphologiques de Zumpt (1973) nous avons amplifié un fragment 5P-COI de 587 pb, seul le fragment « *forward* » a été commandé mais la qualité des séquences est très bonne. Deux haplotypes ont été identifiés : deux séquences pour l'une et huit pour l'autre. Les séquences se classent dans l'arbre phylogénétique construit à l'aide des 62 séquences 5P-COI d'individus classées dans le genre Stomoxys de la base de données BOLD (Figure 11). Elles se regroupent dans deux clades. Deux séquences se regroupent dans un clade associant des souches d'origines cosmopolites (Canada, USA, Pakistan, Equateur, Inde, Turquie, Afrique du Sud, Thaïlande, Chine). Les huit autres séquences se classent avec des souches d'Afrique du sud.

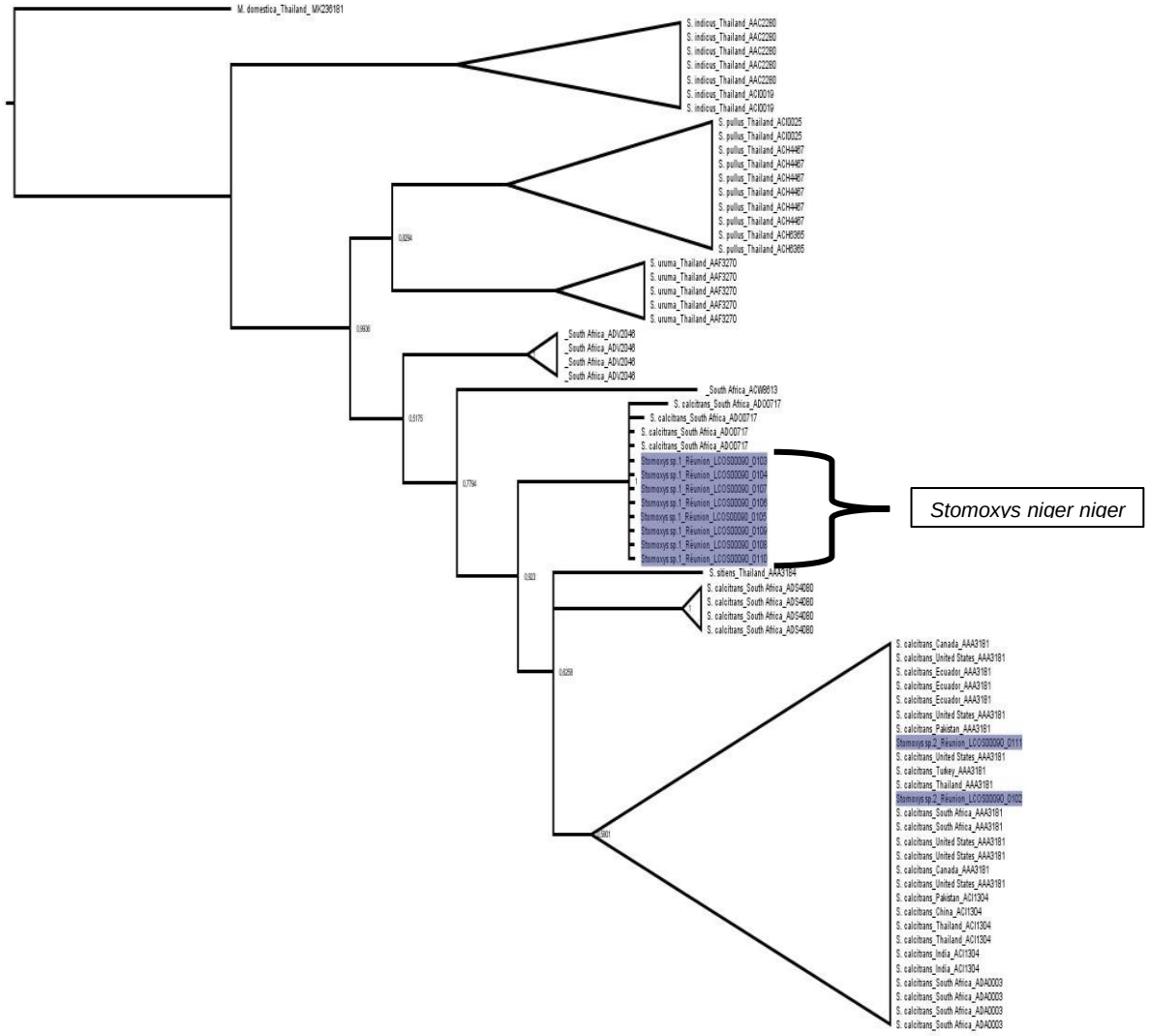


Figure 11 : Arbre phylogénétique dont la topologie et les longueurs des branches ont été estimées par maximum de vraisemblance en utilisant le modèle GTR pour une portion du gène COI en 5' (alignement de 587 pb) d'insectes du genre *Stomoxys* extraite de la base de données BOLD, *Musca domestica* est représenté en tant que *outgroup*. Les valeurs des probabilités postérieures bayésiennes sont indiquées le long des branches. La barre d'échelle indique les substitutions par site. Les analyses ont été réalisées à l'aide de logiciel *MAFFT aligment* et *MrBayes* intégrée au logiciel d'analyse de séquences Geneious

D. Isolement et culture du champignon

Les colonies poussent sur le milieu riche SDAYEYM, mais aussi sur milieu PDA classique sur lequel la croissance n'est que légèrement plus lente (Figure 12). Sur milieu de culture, le champignon a une apparence blanchâtre à jaunâtre, à forme irrégulière, plutôt rugueuse structuré comme un cal formé de protoplastes (Figure 13). Des conidies sont produites et projetées, elles sont observables sur le couvercle des boîtes de pétri les premiers jours après repiquage et sont à l'origine de nouvelles colonies sur le milieu.

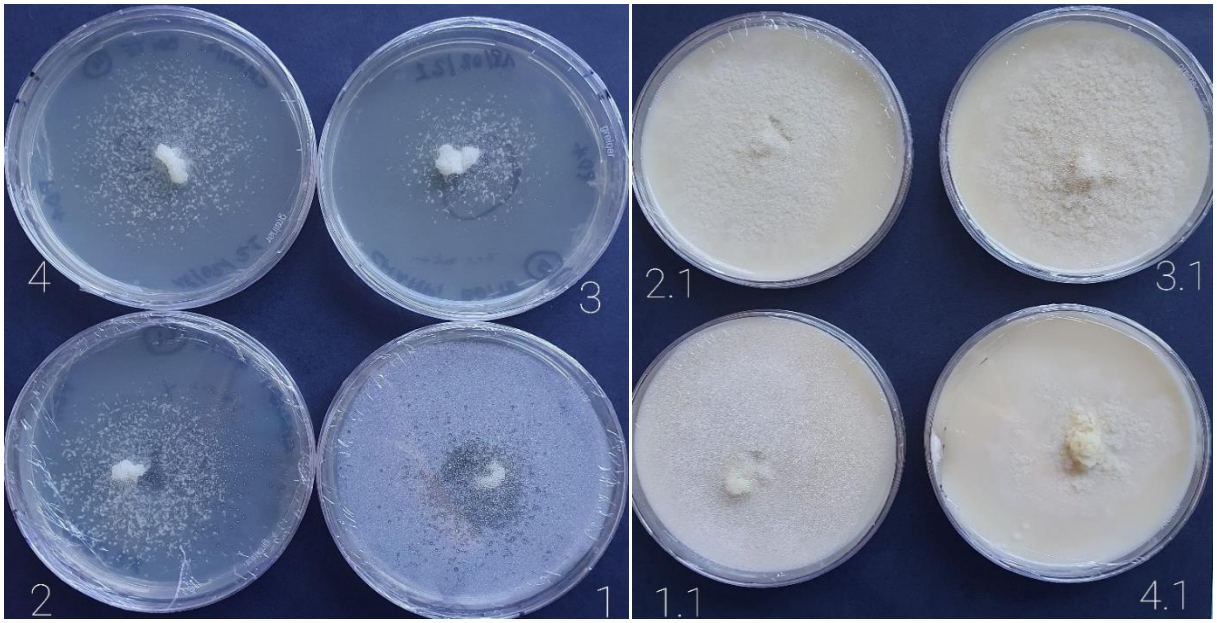


Figure 12 : Croissance du champignon à J+6 sur PDA (gauche) et SDAYEYM (droite). (Photos : J. Win Chin)

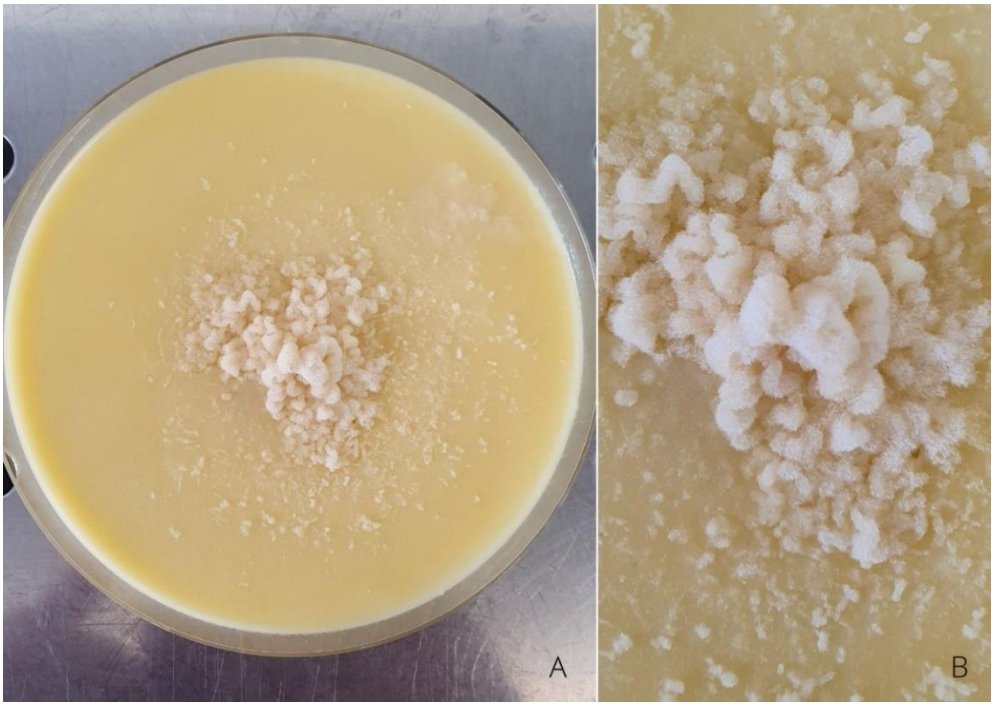


Figure 13 : Caractéristiques du champignon sur milieu gélosé SDAYEYM (Photo : J. Win Chin)

E. Caractérisation morphologique du champignon

Table 3 : Confrontation des caractéristiques morphologiques de *Batkoa sp. Réunion* à la clé de détermination dichotomique de Humber (2012a)

Clé dichotomique de détermination (Humber 2012a)	Etat	Commentaire
1. Host arthropod is terrestrial or, if aquatic, no flagellate zoospores are form.....2	Oui	Figure 10
2. Spores and hyphae or other fungal structures visible on or cover host; few or no spores form inside the host body 3	Oui	Figure 10
3a. Fungal growth may cover all or part of the host but large, projecting structures (synnemata or club-like to columnar stromata) are absent.....11	Oui	Figure 10
11a. Host partially to completely covered by wispy, cottony, woolly, or felt-like growth or by a darkcolored, extensive patch having columns and chambers below its surface but not forming a dense stroma.....13	Oui	Figure 10
13a. Fungal hyphae emerging from or covering host are colorless to light colored, wispy to cottony, woolly, felt-like, or waxy-looking mat.....14	Oui	Figure 10
14a. Spores (conidia only) form on external fungal surfaces; no sexual structures (perithecia) are present.....15	Oui	Figure 15
15a. Conidia forcibly discharged and may rapidly form forcibly or passively dispersed secondary conidia (Entomophthorales).....25	Oui	Conidies (primaires et secondaires) produites en moins de 24h
25a. Primary conidia obviously multinucleate or nuclei not readily seen (in aceto-orcein).....29	En attente	Pas de coloration disponible mais selon (Keller 2007c) les champignons qui forment des conidiophores simples produisent généralement des conidies multinucléées.
29. In aceto-orcein, nuclei staining readily, with obviously granular contents..... 30	En attente	Pas de coloration disponible
30a. Conidia without apical projection and discharged by eversion of a rounded (not flat) papilla..... 31	Oui	Figure 14 et 15
31a. Conidia globose with papilla emerging abruptly from spore outline; formed on conidiogenous cells with a narrowed neck below the conidium if present, rhizoids 2 to 3 times thicker than hyphae with discoid terminal holdfast.....Batkoa	Oui	Figure 14 et 15. Ratio rhizoïde/hyphe à réaliser

L'utilisation de la clef de détermination morphologique de Humber 2012, conduit clairement au genre *Batkoa* (Table 3).

Les conidies primaires observées à partir d'insectes sont sphériques parfois ovoïdes avec une papille ronde nettement dessinée, de 40,6-42,3 × 35-36,9 µm (Figure 14-B), libérées par *papillar ejection*. Elles produisent rapidement des conidies secondaires morphologiquement similaires mais de plus petite taille (Figure 14-C) : 31,5-33,2 × 26,4-27,5 µm, libérées par *papillar ejection*.

Les conidiophores sont simples, chaque branche donne une conidie. L'apex est souvent légèrement plus large que le reste de la structure (Figure 15-B à 15-D), 21,9 - 27,1 µm de diamètre à l'extrémité.

Les rhizoïdes sont simples. Un disque de crampon est visible (Figure 15-A).

A titre de comparaison, l'annexe 14 synthétise les relevés morphologiques des conidies primaires et secondaires ainsi que des conidiophores extraits de la littérature pour les espèces *B. hydrophila, B. major, B. apiculata, Conidiobolus obscurus*.

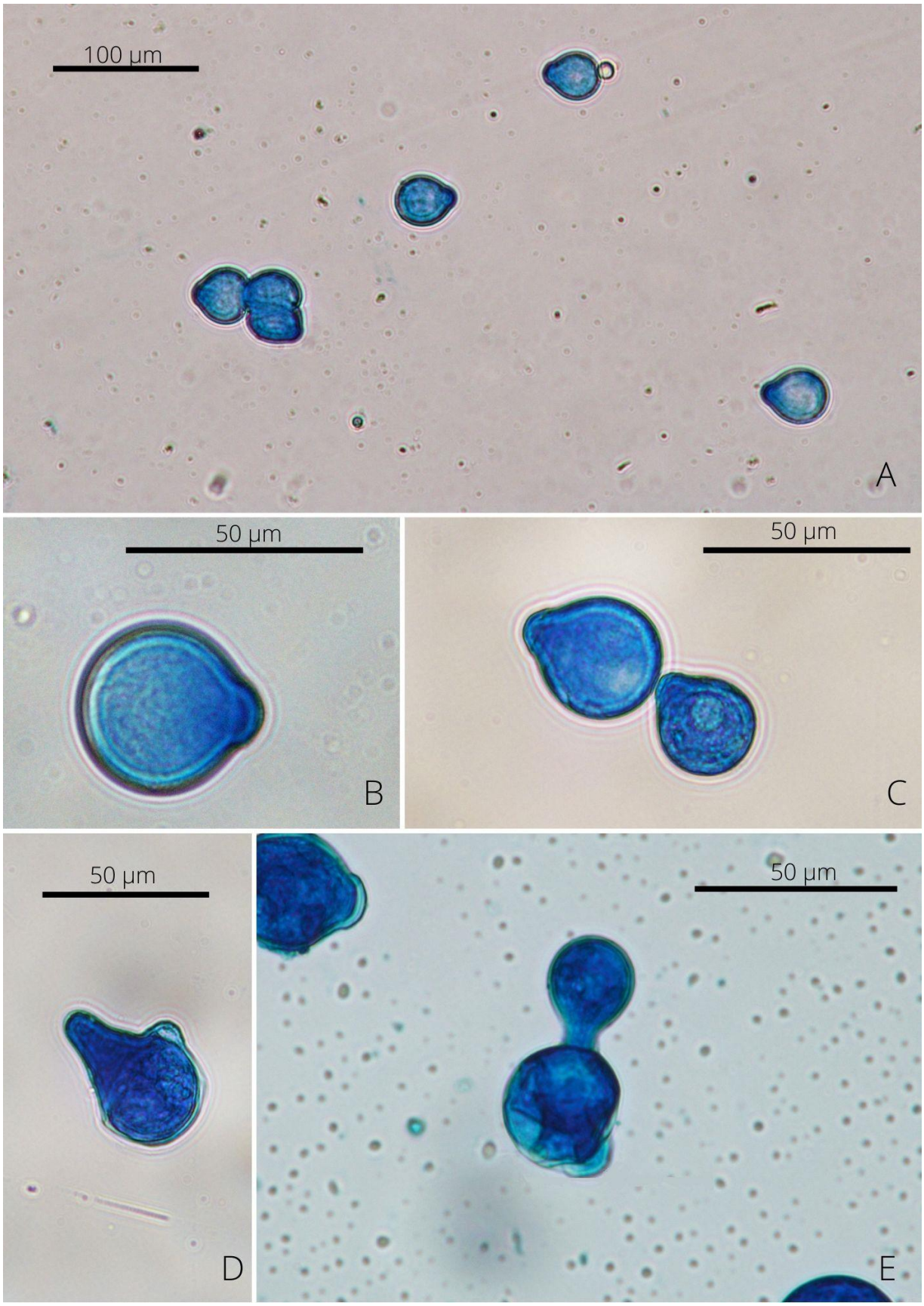


Figure 14 : Conidies primaires et secondaires du champignon. A et B : spores primaires – C : une conidie primaire (gauche) et une conidie secondaire (droite) – D et E : spore primaire germinant pour donner une spore secondaire. Observations au microscope optique avec une coloration au CBLP (Photo : J. Win Chin).

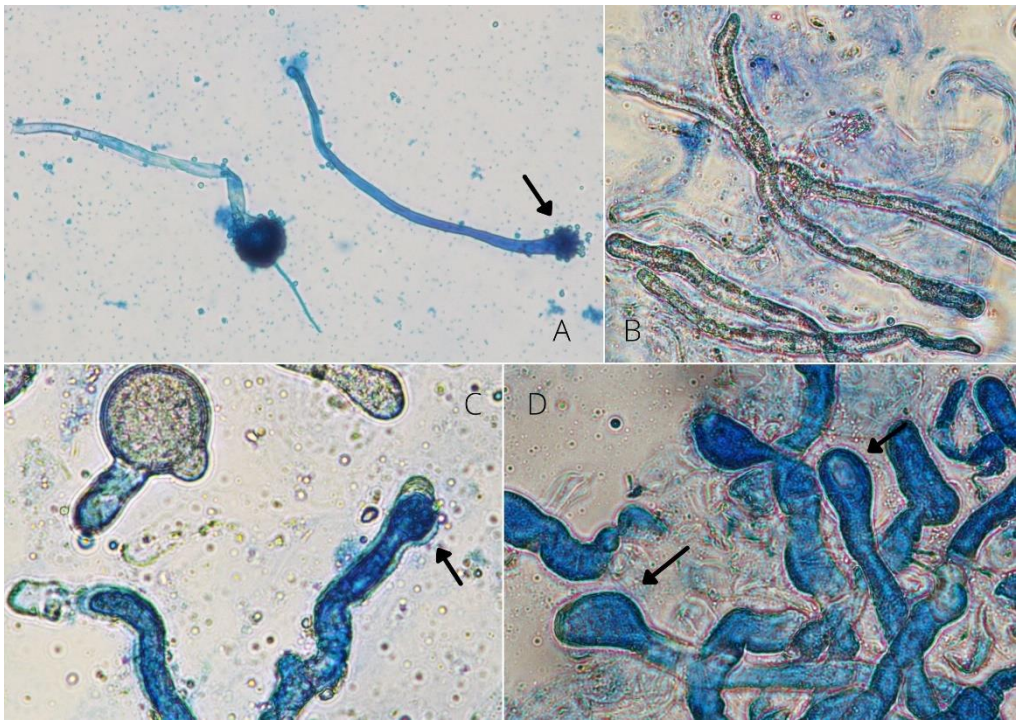


Figure 15 : Rhizoïdes et conidiophores du champignon. A : rhizoïdes simples (flèches = disque de crampon) – B, C et D : conidiophores simples (flèches = épaule à l'apex du conidiophore, signe de la formation d'une conidie). Observations au microscope optique avec une coloration CBLP. (Photo : J. Win Chin)

F. Caractérisation moléculaire du champignon

Nous avons testé différents couples d'amorces pour amplifier les portions des gènes nucLSU, nucSSU, ITS, EF1α, RPB2 et mtSSU. Un total de 241 PCR a été réalisé. L'ensemble de ces résultats est synthétisé dans la table 4 ci-dessous. Nous n'avons pas réussi à amplifier et obtenir des séquences pour les portions de gènes nucSSU à l'aide du jeu d'amorces nssu0021/nssu1780, ITS à l'aide des jeux d'amorces ITS1F/ITS4 et emITS1/emITS4, RPB2 (fRPB2-5f/fRPB2-7cR) et mtSSU (mtSSU1/mtSSU2R). De nouvelles conditions PCR seront testées afin d'obtenir ces fragments.

Nous avons l'amplification d'ADN du champignon pour les portions de gènes nucLSU (jeu d'amorces LR0R/LR5) et nucSSU (jeu d'amorces nssu1080R/NS24), ITS (jeu d'amorces Nu5.8/ITS4), EF-1α (jeu d'amorces EF983 EF1aZ-1R). Ces amplifications ont été obtenues aussi bien sur les ADN extraits des insectes mycosés que sur les ADN des champignons mis en culture. Ce résultat est une première étape pour démontrer que le champignon que nous avons isolé sur boite est bien celui qui est responsable des mycoses. Les meilleurs BLAST obtenus sur NCBI (table 4) confirment que le champignon qui nous intéresse est probablement un *Entomophthromycota*.

A ce stade où nos résultats ne sont que préliminaires, la portion du gène nucLSU est la plus intéressante. Elle fait partie des zones génomiques intégrées dans les études phylogénétiques de référence de Gryganskyi et al. (2013) et Nie et al. (2020)

Table 4 : Synthèse des séquences obtenues durant l'étude et meilleure correspondance après confrontation à la base de données génomiques BLAST

Portion de gène	Couple d'amorces	Nombre de séquences obtenues	Meilleur Blast	% identité
nucLSU	LR0R/LR5	22	MZ145379 : *Batkoa sp.* strain CG1454 =Entomophthoromycota	97.2
nucSSU	nssu1080R/NS24	28	AF296757 : *Conidiobolus obscurus* Isolate 560 =Entomophthoromycota	90.1
	nssu1780/nssu0021	0		
ITS	ITS4/Nu5.8	3	NR_119625 : *Zoophthora radicans* ARSEF 6003 =Entomophthoromycota	99.8
	ITS1/ITS4	0		
	emITS1/emITS4	0		
EF-1α	EF983/EF1aZ-1R	10	DQ275343 : *Entomophthora muscae* isolate AFTOL-ID 28 =Entomophthoromycota	84.5
RPB2	fRPB2-5F/fRPB2-7cR	0		
mtSSU	mtssu1/mtssu2R	0		

Les analyses phylogénétiques réalisées sur la portion de gène nucLSU (Figure 16) révèlent que la structure de l'arbre obtenu est semblable à celle de Gryganskyi et al. (2013) construite avec les portions de gène nucLSU, nucSSU, RPB2 et mtSSU. La souche de champignon que nous étudions vient se placer dans le genre *Batkoa*, et plus précisément dans une branche qui regroupe *Batkoa australiensis* (95.4 % d'identité avec la souche référence ARSEF 328) et la souche brésilienne pathogène de *Dalbulus maidis* (DeLong 1923) (Hemiptera: Cicadellidae) ravageur du maïs au Brésil (séquence libérée sur NCBI le 12 mai 2021) (97,2% d'identité).

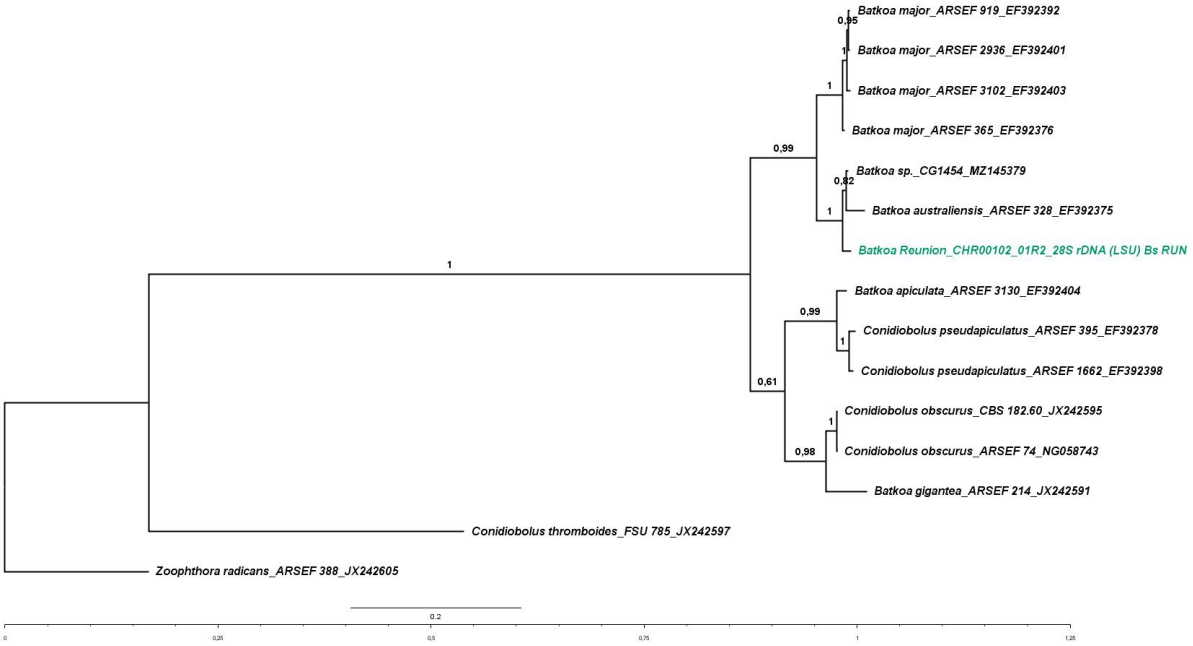


Figure 16 : Arbre phylogénétique dont la topologie et les longueurs des branches ont été estimées par maximum de vraisemblance en utilisant le modèle GTR pour une portion du gène nucLSU (alignement de 1012 pb) de champignon du genre genre *Batkoa* tel que défini par Gryganskyi et al. (2013) et Nie et al. (2020). *Zoophthora radicans* et *Conidiobolus tromboides* sont représentés en tant que *outgroups*. Les valeurs des probabilités postérieures bayésiennes sont indiquées le long des branches. La barre d'échelle indique les substitutions par site. Les analyses ont été réalisées à l'aide de logiciel *MAFFT aligment* et *MrBayes* intégrée au logiciel d'analyse de séquences Geneious.

Ces résultats confirment que le champignon étudié appartient au genre *Batkoa*, proche d'une souche originaire d'Australie, apparaissant dans l'étude de Gryganskyi et al. (2013) sous la dénomination de *Entomophaga australiensis* (ou Batkoa australiensis (Nie et al. (2020))), cette espèce n'est pas encore officiellement décrite.

Ce champignon entomopathogène réunionnais pourrait aussi être une nouvelle espèce du genre *Batkoa*. Cependant, les données préliminaires obtenues durant cette étude seule ne permettent pas de l'affirmer.

G. Test de pathogénicité sur *Ceratitis capitata*

Quatre individus adultes, sur 30, ont montré des signes d'infection par mycose. Les caractéristiques morphologiques du champignon chez ces individus mycosés sont différentes de celles observées chez le genre *Batkoa.* Le genre *Aspergillus* (Micheli 1768) (Ascomycetes) est suspecté au regard des observations microscopiques : champignon filamenteux, spores rondes de moins de 5 µm, les conidies sont rassemblées à la tête des conidiophores. (Figure 17). Aucune larve ni adulte émergé n'a montré de signes de mycose.

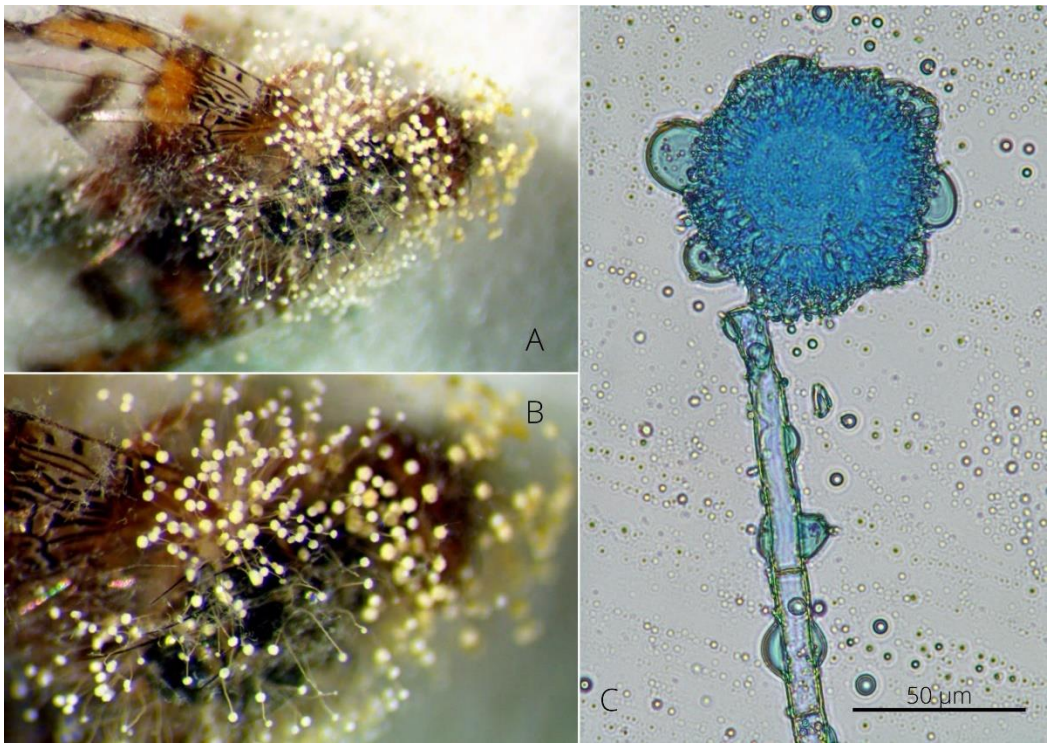


Figure 17 : Infection de *Ceratitis capitata* par *Aspergillus sp*.. A et B : caractéristiques macroscopiques. Observations à la loupe binoculaire – C : conidiophores observés au microscope optique avec une coloration CBLP (Photos : J. Win Chin)

La mise au point du test de pathogénicité sera poursuivie, nous avons obtenu toutes les autorisations nécessaires pour la mise en place de l'élevage de stomoxe, indispensable à la réalisation du postulat de Koch.

DISCUSSION

Pour ces travaux il est indispensable de connaître le matériel biologique sur lequel nous travaillons. Dans un contexte de crise de la taxonomie, la notion de taxonomie intégrative est introduite en 2005 (Dayrat 2005). Trois causes ont poussés les taxonomistes à développer ce nouvel outil (Schlick-Steiner et al. 2010) : 1) parfois la caractérisation morphologique ne suffit pas à distinguer deux espèces, 2) même dans les cas où une distinction peut se faire par critères morphologiques, il existe des méthodes et techniques plus rapides et efficientes, et enfin 3) l'utilisation de diverses disciplines en symbiose dans un travail de taxonomie permet d'éviter les désaccords entre chaque domaine individuel et d'aller au-delà du simple fait de nommer une espèce. Ainsi le but de la taxonomie intégrative n'est pas de remplacer les protocoles de taxonomie classique mais plutôt de coordonner différentes disciplines (étude morphologique, génomique, chimique, écologique, comportementale, etc) autour d'une même procédure pour un travail taxonomique plus rigoureux.

Hesperomyces virescens (Thaxt. 1891) (Ascomycota, Laboulbeniales) est un complexe d'espèces cryptiques (*cryptic species*) de champignons parasites des coccinelles (Coleoptera, Coccinellidae). « 2 ou plusieurs espèces sont cryptiques si elles sont, ou ont été, classées sous un même nom d'espèce du fait qu'elles soient morphologiquement impossible à distinguer » (Bickford et al. 2007). Un travail associant l'étude morphologique, morphométrique, moléculaire (ITS, nucLSU, nucSSU) et écologique (hôte) de ce complexe d'espèces suggère qu'en réalité huit différents clades sont réunis dans ce complexe. Ces clades sont considérés par les auteurs comme des espèces à part entières ayant chacune un genre d'hôte spécifique (Haelewaters, De Kesel, et Pfister 2018).

Aujourd'hui que ce soit pour les *Stomoxydae*, ou les *Entomophthoromycota*, ce travail de taxonomie est en cours. Très peu de ressources génétiques et moléculaires sont disponibles actuellement ce qui ne facilite pas l'identification des espèces.

L'identification des stomoxes est importante notamment lorsqu'il s'agira de déterminer la prévalence du champignon sur chacune des deux espèces présentes à La Réunion. Les résultats de la caractérisation moléculaire des stomoxes que nous avons réalisée ne correspondent pas à la caractérisation morphologique réalisée en amont : en effet les séquences de dix stomoxes identifiés comme *S. n. niger* par critères morphologiques sont classées comme *S. calcitrans* à partir d'un fragment 5P-COI. Ces séquences sont classées dans deux clades différents (Figure 11). Deux séquences se classent dans un clade de *S. calcitrans* cosmopolite, ce qui correspond bien à ce que l'on attend pour cette espèce. Les huit autres séquences se classent avec un clade de *S. calcitrans* d'Afrique du Sud. Une hypothèse pourrait être que ce dernier clade correspond à des *S. n. niger* assignés faussement comme *S. calcitrans* dans Bold. La seconde hypothèse serait que les deux séquences de stomoxes réunionnais classées parmi les *S. calcitrans* cosmopolites soient véritablement des *S. calcitrans* que nous avions faussement identifié comme *S. n. niger* sur les critères morphologiques.

Ces résultats suggèrent 1) que nos capacités actuelles d'identification des deux espèces sur la base des critères morphologiques ne sont pas suffisantes. En plus des motifs de l'abdomen, unique critère de distinction utilisé durant l'étude, la mesure des palpes maxillaires est un caractère morphologique permettant la distinction des deux espèces (Garros, Gilles, et Duvallet 2004) (Annexe 15) : il est plus grand chez *S. n. niger* que chez *S. calcitrans*. Mais comme pour les motifs de l'abdomen ce critère n'est pas absolu et la gamme de valeurs est chevauchante entre les deux espèces (Garros, Gilles, et Duvallet 2004). 2) le travail de caractérisation moléculaire de ces deux espèces doit être fait en utilisant les portions de gènes COI en 3', cytochrome B et de l'ITS 2 utilisés par les études récentes de phylogénétique pour le genre *Stomoxys* (Dsouli et al. 2011). Et 3) la base de données BOLD d'où sont tirées les séquences ne contient aucune donnée de *S. n. niger*. Ces travaux sont en cours.

La taxonomie ainsi que les relations phylogénétiques au sein des *Entomophthoromycota* est très imparfaite et en pleine évolution. La ségrégation des genres *Batkoa* et *Entomophaga* date de 1989 par Humber sur la base de caractères morphologiques (Humber 1989). L'application d'une taxonomie intégrative pour la caractérisation des *Entomophthoromycota* est en cours. La distinction entre *Batkoa* et *Conidiobolus* est plus récente : Nie et al. (2020) ont réalisé la révision taxonomique du genre *Conidiobolus*. Mais très peu de ressources génétiques et moléculaires sont disponibles actuellement.

Nos travaux de caractérisation morphologique et moléculaire bien que préliminaires permettent néanmoins de démontrer que le champignon étudié est un E*ntomophthoromycota* et qu'il appartient au genre *Batkoa* (Table 3 et Figure 16). Les travaux de caractérisation moléculaire le placent phylogénétiquement proche d'une souche originaire d'Australie, apparaissant dans l'étude Gryganskyi et al. (2013) sous la dénomination de *Entomophaga australiensis* ou *Batkoa australiensis* pour celle de Nie et al. 2020, cette espèce n'est pas encore officiellement décrite. Pour finaliser ces travaux de description du champignon, il sera nécessaire 1) au niveau morphologique d'obtenir, les caractéristiques des noyaux, des hyphes, mais aussi des spores dormantes et cystides si elles sont présentes pour cette espèce, 2) au niveau moléculaire d'obtenir les séquences de nucSSU en 3', RPB2 et celles de mtSSU.

Finaliser la description du champignon nécessitera de mieux préciser sa spécificité d'hôte qui aujourd'hui ne résulte que d'observations de terrain. En effet d'autres espèces d'insectes ont été retrouvés mycosés notamment *Musca domestica* et des mouches des genres *Calliphora* et *Lucilia*. Pour cela, il est important de pouvoir réaliser le postulat de Koch avec des tests de transmission du pathogène et des tests de pathogénicité. Les connaissances actuelles sur le mode d'infection des E*ntomophthoromycota* associées aux résultats obtenus durant notre l'étude montrent que la projection des spores à partir des cadavres constituerait le mécanisme majeur d'infection de l'hôte. Nos tests de pathogénicité sur *C. capitata* ne sont pas concluants et cet aspect du travail devra être poursuivi. Elya et al. (2018) proposent un protocole optimisé d'infection de mouche adulte à adulte : des drosophiles *Drosophila melanogaster* jeunes adultes (moins d'un jour) ont été placées en contact rapproché avec des cadavres mycosés par *Entomophthora muscae* Berkeley à 18°C et 100% d'humidité pendant 24 heures avec un cycle 12:12 lumière:obscurité. Après ces 24 heures, le confinement est réduit et les paramètres de température et humidité sont modifiés (21°C et 60% d'humidité). Enfin, après ces 48 heures en contact avec les cadavres mycosés, les drosophiles sont placées dans une cage neuve à 21°C et leur mortalité peut être suivie. Ainsi, dans l'éventualité de la mise en place d'un élevage de stomoxes, ce protocole pourrait être utilisé pour mettre au point un test de pathogénicité et l'optimiser pour son application sur les stomoxes. Le cycle du champignon pourrait être ainsi étudié en conditions expérimentales, ainsi que les paramètres précis d'infestation et de mortalité sur les deux espèces de stomoxes présentes à La Réunion.

Dans les élevages bovins de l'île, notre étude révèle 1) que l'on a bien une présence généralisée de stomoxes dans les élevages avec des densités variables et 2) que l'on trouve bien comme décrit par Barré (1981) des attaques massives d'un champignon ou de champignons qui possèdent toutes les caractéristiques des *Entomophtoromycota*. On observe des attaques dans plus de 88 % des exploitations, la présence du champignon est avérée dans toute les zones de l'ile et ne semble pas être dépendante de l'altitude. Il s'agit donc bien d'une épizootie pour les stomoxes de la Réunion. A notre connaissance, c'est la première fois que ce type d'épizootie est rapportée sur stomoxes, elle semble remarquable autant par son intensité, sa distribution généralisée dans des conditions très diverses, et sa pérennité (observée depuis plus de 40ans (Barré 1981)).

La suite de notre travail sera de savoir si le champignon participe et à quel niveau au contrôle de ces insectes. Pour cela de nombreux travaux complémentaires sont nécessaires. Une étude danoise sur deux ans a mis en évidence la prévalence de champignons entomopathogènes dans les élevages bovins du Danemark (Steenberg et al. 2001). Des captures d'insectes hématophages au filet fauchoir, directement sur les animaux, ont été réalisées régulièrement au cours de l'étude. Les mouches piégées étaient séparées par espèce et mises en cages de 20 individus. La mortalité était suivie et les cadavres étaient placés en chambre humide. Si une sporulation apparaissait, le champignon était caractérisé morphologiquement. Ce type d'étude plusieurs fois dans l'année et sur plusieurs années est nécessaire pour 1) étudier les paramètres environnementaux et les paramètres à l'échelle des élevages (hygiène, type d'élevage, animaux …) qui favorisent le champignon sur l'île et 2) étudier la prévalence du champignon dans les populations sauvages de stomoxes réunionnais.

L'étude de la prévalence du champignon réunionnais dans les élevages bovins permettrait d'évaluer son potentiel en tant qu'agent de lutte biologique dans le contrôle des populations de stomoxes. Le développement d'un outil moléculaire de diagnostic fiable et spécifique de ce champignon entomopathogène des stomoxes serait un avantage pour les études à venir. Sur le terrain, l'utilisation d'un test de diagnostic moléculaire spécifique dans les fermes infestées permettraient ainsi d'étudier la présence du champignon dans différents compartiments (bouse, fumier, larves, nymphes, adultes de stomoxe). La synthèse d'amorces à partir des séquences obtenues (comme la large sous-unité ribosomale par exemple) pendant cette étude est en cours.

Il a été remarqué que les stomoxes mycosés étaient souvent répartis inégalement sur la végétation de l'élevage. On sait que certains champignons ont la capacité de modifier le comportement de leur hôte afin de faciliter leur propagation. C'est le cas par exemple de *Massospora cicadina* (Peck 1878), de la même famille des *Entomophthoraceae* que *Batkoa*. Il infecte les cigales périodiques (*Magiciada spp*.) (Arthropoda : Cicadidae) et modifie le comportement sexuel des adultes mâles pour favoriser la dispersion de ses spores (Cooley, Marshall, et Hill 2018). *Arthrophaga myriapodina* (K.T. Hodge & A.E. Hajek 2017), également de la famille des *Entomophthoraceae*, est un champignon entomopathogène des millipèdes (Arthropoda : Myriapoda), ces arthropodes sont poussés par le champignon à grimper en hauteur pour mourir (Hodge, Hajek, et Gryganskyi 2017).

Le *Batkoa* qui nous intéresse est-il capable de modifier le comportement des stomoxes pour les forcer à se poser sur un certain spectre d'espèces végétales ou s'agit-il uniquement de meilleur substrat d'accroche ? En effet une caractéristique commune qu'ont ces plantes « favorisées » par les stomoxes mycosés est qu'elles possèdent des feuilles non-lisses. Leurs feuilles sont souvent texturées (poils, surface rugueuse, relief, …) facilitant ainsi l'accroche du stomoxe par le champignon. Sur une feuille trop lisse, de bananier par exemple, il est possible d'imaginer qu'au moindre coup de vent et à la moindre pluie, le stomoxe mort puisse se détacher plus facilement. Pourtant cette hypothèse de la manipulation comportementale du stomoxe par le champignon n'est pas à écarter.

CONCLUSION

Ce champignon entomopathogène des stomoxes à La Réunion a été placé, par caractérisation morphologique et moléculaire, dans le genre *Batkoa*. Des travaux intégratifs complémentaires permettraient de préciser sa phylogénie et son identité spécifique. La mise au point d'un outil de diagnostic moléculaire permettrait d'étudier le cycle de ce champignon dans les conditions naturelles. En complément, l'étude au laboratoire de son cycle de

développement pourra être réalisée grâce à la disponibilité d'un élevage de stomoxes et la mise au point d'un test de pathogénicité. Sur le terrain, ce champignon infeste majoritairement les stomoxes (*S. calcitrans* et *S. n. niger*) mais peut également infecter d'autres insectes. Il est prépondérant dans les élevages bovins réunionnais et retrouvé sur l'ensemble de l'île de 10 à 1718 m d'altitude.

D'autres paramètres restent à déterminer (la détermination de sa prévalence dans les élevages de l'île tenant compte des facteurs environnementaux, climatiques et anthropiques, l'étude de son cycle y compris les conditions d'infestation des stomoxes dans les conditions naturelles, etc…) pour préciser son rôle dans le contrôle des populations de stomoxes à La Réunion.

En dehors de leur valeur scientifique, ces résultats originaux préliminaires offrent l'espoir à terme d'une possible utilisation de ce champignon en tant qu'agent de lutte biologique contre les stomoxes à La Réunion et ailleurs.

BIBLIOGRAPHIE

Baldacchino, F., V. Muenworn, M. Desquesnes, F. Desoli, T. Charoenviriyaphap, et G. Duvallet. 2013. « Transmission of pathogens by Stomoxys flies (Diptera, Muscidae): a review ». *Parasite* 20 (26). 13p.

« Barcode of life data system V4 ». 2006. https://www.boldsystems.org/.

Barré, N. 1981. Les stomoxes ou « mouches boeuf » à la Réunion - Pouvoir pathogène, écologie, moyens de lutte. GERDAT-EIMVT, Maisons-Alfort. 90p.

Batko, A., et J. Weiser. 1965. « On the taxonomic position of the fungus discovered by Strong, Wells and Apple : Strongwellsea castrans gen. et sp. nov. (Phycomycetes; Entomophthoraceae) ». *Journal of invertebrate pathology* 7: 455-63.

Bickford, D., D.J. Lohman, N.S. Sodhi, P.K.L. Ng, R. Meier, K. Winker, K.K. Ingram, et I. Das. 2007. « Cryptic species as a window on diversity and conservation ». *Trends in ecology & evolution* 22 (3): 148-55.

Binder, M., et D. Hibbett. 2003. « Resuspending freeze-dried oligonucleotides », https://www2.clarku.edu/faculty/dhibbett/Protocols_Folder/Primers/Primers.pdf 7p.

Bouyer, J., Y. Grimaud, M. Pannequin, O. Esnault, et M. Desquesnes. 2011. « Importance épidémiologique et contrôle des stomoxes à la Réunion ». *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n°43/Spécial DOM-TOM*. 53-58.

Bouyer, J., et F. Stachurski. 2009. « Mission d'appui pour les orientations du programme CMTV (Contrôle des Maladies à Transmission Vectorielle) ». Rapport de mission. UMR15 CIRAD/INRA Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes. 36p.

Butt, T. M., C. Jackson, et N. Magan. 2001. « Introduction - Fungal biological control agents : progress, problems and potential ». In *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, Butt T.M., Jackson C. et Magan N., 1-8. CAB Publishing. 390p.

Campbell, J. B., S. R. Skoda, D. Berkebile, D. J. Boxler, G. D. Thomas, D. C. Adams, et R. Davis. 2001. « Effects of stable flies (Diptera:Muscidae) on weight gains of grazing yearling cattle ». *Journal of economic entomology* 94 (3): 780-83.

Changbunjong, T., T. Weluwanarak, Y. Samung, et J. Ruangsittichai. 2016. « Molecular identification and genetic variation of hematophagous flies, (Diptera: Muscidae: Stomoxyinae) in Thailand based on cox 1 barcodes ». *Journal of Asia-Pacific entomology* 19 (4): 1117-23.

Cooley, J.R., D.C. Marshall, et K.B.R. Hill. 2018. « A specialized fungal parasite (Massospora Cicadina) hijacks the sexual signals of periodical cicadas (Hemiptera: Cicadidae: Magicicada) ». *Nature scientific reports* 8 (1): 1-7.

Dayrat, B. 2005. « Towards integrative taxonomy ». *Biological journal of the linnean society* 85 (3): 407-15.

De Faria, M.R., et S.P. Wraight. 2007. « Mycoinsecticides and mycoacaricides : a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types ». *Biological control* 43: 237-56.

De Fine Licht, H.H., A. E. Hajek, J. Eilenberg, et A.B. Jensen. 2016. « Utilizing genomics to study entomopathogenicity in the fungal phylum Entomophtoromycota : a review of current genetic resources ». In *Genetics and molecular biology of entomopathogenic fungi*, Lovette B. et St. Léger R. 94:41-65. Academic Press. 512p.

DePriest, P.T. 1993. « Small subunit rDNA variation in a population of lichen fungi due to optional group-I introns ». *Gene* 134 (1): 67-74.

Desquesnes, M., E. Bouhsira, P. Chalermwong, L. Drosne, G. Duvallet, M. Franc, G. Gimonneau, et al. 2021. « Insecticide-impregnated screens used under 'multi-target method' for haematophagous fly control in cattle: a proof of concept ». In *Innovative strategies for vector control*, C. Koenraadt, J. Spitzen, et W. Takken, 6:91-105. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. 260p.

Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et des Forêts de La Réunion. 2016. « Elevage ». https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/Elevage. Consulté le 07/05/2021.

Direction de l'Alimentation, de l'Agriculture et des Forêts de La Réunion. 2016. « Plan global de maîtrise sanitaire en filière bovine (PGMSB) ». https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/Plan-global-de-maitrise-sanitaire. Consulté le 03/03/2021.

Journal officiel n° L 230 du 19/08/1991 p. 0001 - 0032 ; OPOCE. 19 juillet 1991. « Directive 91/414/CEE du Conseil, du 15 juillet 1991 ». https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:31991L0414. Consulté le 03/05/2021.

Dsouli, N., F. Delsuc, J. Michaux, E. De Stordeur, A. Couloux, M. Veuille, et G. Duvallet. 2011. « Phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear data in haematophagous flies support the paraphyly of the genus Stomoxys (Diptera: Muscidae) ». *Infection, genetics and evolution* 11 (3): 663-70.

Ehrhardt, N. 2006. « Etude de l'activité d'une formulation à 50% de deltaméthrine sur Stomoxys calcitrans à la Réunion : résistance et rémanence ». Thèse, Ecole Vétérinaire Nationale de Toulouse ENVT. 89p.

Eilenberg, J., A. Hajek, et C. Lomer. 2001. « Suggestions for unifying the terminology in biological control ». *Biocontrol* 46 (4): 387-400.

Elya, C., T.C. Lok, Q.E. Spencer, H. McCausland, C.C. Martinez, et M. Eisen. 2018. « Robust manipulation of the behavior of Drosophila melanogaster by a fungal pathogen in the laboratory ». *ELife* 7. 34p.

Etienne, J. 1982. « Etude systématique, faunistique et écologique des Tephritides de La Réunion ». Thèse, Paris: Ecole pratique des hautes études. 100p.

Gargas, A., et P.T. DePriest. 1996. « A nomenclature for fungal PCR primers with examples from intron-containing SSU rDNA ». *Mycologia* 88 (5): 745-48.

Gargas, A., et J.W. Taylor. 1992. « Polymerase Chain Reaction (PCR) primers for amplifying and sequencing nuclear 18S rDNA from lichenized fungi ». *Mycologia* 84 (4): 589-92.

Garros, C., J. Gilles, et G. Duvallet. 2004. « A new morphological character for the identification of Stomoxys calcitrans and SI niger (Diptera: Muscidae). Comparison of La Reunion Island populations ». *Parasite* 11 (octobre): 329-32.

Gilles, J., J.-F. David, et G. Duvallet. 2005a. « 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 entomololgy* 42 (3): 6. 260-65.

———. 2005b. « Effects of temperature on the rate of increase of Stomoxys calcitrans and Stomoxys niger niger (Diptera: Muscidae) from La Réunion Island ». *Entomological society of America* 42 (6). 959-65.

Gilles, J, J.-F David, G. Duvallet, et E Tillard. 2008. « Potential impacts of climate change on stable flies, investigated along an altitudinal gradient ». *Medical and veterinary entomology* 22: 74-81.

Grimaud, Y. 2013. « Les stomoxes (DIPTERA: MUSCIDAE) à l'île de La Réunion : biologie, écologie et moyens de lutte ». GDS Réunion. 8p.

Grimaud, Y., A. Tran, S. Benkimoun, F. Boucher, O. Esnault, C. Cêtre-Sossah, E. Cardinale, C. Garros, et H. Guis. 2020. « Spatio-temporal modelling of Culicoides Latreille (Diptera: Ceratopogonidae) populations on Reunion Island (Indian Ocean) ». *Parasites vectors*. 14(1):288. 16p.

Gryganskyi, A. P., R. A. Humber, M. E. Smith, K. Hodge, B. Huang, K. Voigt, et R. Vilgalys. 2013. « Phylogenetic lineages in Entomophthoromycota ». *Persoonia* 30: 94-105.

Haelewaters, D., A. De Kesel, et D. H. Pfister. 2018. « Integrative taxonomy reveals hidden species within a common fungal parasite of ladybirds *». Nature scientific reports* 8 (1). 16p.

Hajek, A.E., B. Papierok, et J. Eilenberg. 2012. « Methods for study of the Entomophtorales ». In *Manual of techniques in invertebrate pathology*, Lacey L.A., 285-316. Academic Press. 484p.

Hodge, K., A.E. Hajek, et A. Gryganskyi. 2017. « The first entomophthoralean killing millipedes, Arthrophaga myriapodan. gen. n. sp., causes climbing before host death ». *Journal of invertebrate pathology* 149: 135-40.

Humber, R. A. 1989. « Synopsis of a revised classification for the Entomophthorales Zygomycotina ». *Mycotaxon* 34: 441-60.

———. 2012a. « Identification of entomopathogenic fungi ». In *Manual of techniques in invertebrate pathology*, Lacey L.A., 151-87. Academic Press. 484p.

———. 2012b. « Entomophthoromycota : a new phylum and reclassification for entomophthoroid fungi ». *Mycotaxon* 120 (1): 477-92.

Inglis, G. D., M. S. Goettel, T. M. Butt, et H. Strasser. 2001. « Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests ». In *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential*, Butt T.M., Jackson C. et Magan N., 1-8. CAB Publishing. 390p.

Jaronski, S.T. 2017. « Mass production of fungal entomopathogens ». In *Microbial control of insect and mite pests*, Lacey L.A., 141-55. Academic Press. 482p.

Jensen, A.B., et J. Eilenberg. 2001. « Genetic variation within the insect-pathogenic genus Entomophthora, focusing on the E. Muscae complex, using PCR—RFLP of the ITS II and the LSU rDNA ». *Mycological research* 105 (3): 307-12.

Kauff, F., et F. Lutzoni. 2002. « Phylogeny of the Gyalectales and Ostropales (Ascomycota, Fungi): among and within order relationships based on nuclear ribosomal RNA small and large subunits ». *Molecular phylogenetics and evolution* 25 (1): 138-56.

Keller, S. 1987. « Arthropod-pathogenic entomophthorales of Switzer- Land. I. Conidiobolus, Entomophaga and Entomophthora ». *Sydowia* 40: 122-67.

———, éd. 2007. Arthropod-pathogenic entomophthorales: biology, ecology, identification. Luxembourg: COST Office. 155p.

———. 2007b. « Arthropod-pathogenic Entomophthorales from Switzerland. III. First additions ». *Sydowia* 59: 75-115.

———. 2007c. « Fungal structures and biology ». In *Arthropod-pathogenic entomophthorales: biology, ecology, identification,* Keller S., 37-54. Luxembourg: COST Office. 155p.

Keller, S., et R. Wegensteiner. 2007. « Introduction ». In *Arthropod-pathogenic entomophthorales: biology, ecology, identification*, Keller S., 1-6. Luxembourg: COST Office. 155p.

Kohara, J., M. Takeuchi, Y. Hirano, Y. Sakurai, et T. Takahashi. 2018. « Vector control efficacy of fly nets on preventing bovine leukemia virus transmission ». *The journal of veterinary medical science*, août. 1524-27.

Liu, Y. J., S. Whelen, et B. D. Hall. 1999. « Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit ». *Molecular biology and evolution* 16 (12): 1799-1808.

Lord, Jeffrey C. 2005. « From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control ». *Journal of invertebrate pathology* 89 (1): 19-29.

Nguyen Ngoc, T. 2000. « Etude de la réponse des femelles de Ceratitis capitata (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) à différents types de stimuli olfactifs en tunnel de vol ». Rapport DEA. Université de Rennes 1. 56p.

Nie, Y., X.Y. Liu, D.S. Yu, S.F. Wang, et B. Huang. 2020. « A taxonomic revision of the genus Conidiobolus (Ancylistaceae, Entomophthorales) : four clades including three new genera ». *MycoKeys*, mars. 55-81.

Panei, C.J., A.E. Larsen, N.A. Fuentealba, G.E. Metz, M.G. Echeverría, C.M. Galosi, et A.R. Valera. 2019. « Study of horn flies as vectors of bovine leukemia virus ». *Open veterinary journal* 9 (1): 33-37.

Papierok, B. 1978. « Obtention in vivo des azygospores Entomophthora fhaxteriana Petch, champignon pathogène de Pucerons (Homoptères Aphididae) ». *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences. Série D, Sciences naturelles*, 1503-6.

Papierok, B., S. Balazy, J. Enkerli, F. W. Nielsen, et A. B. Jensen. 2007. « Handling of Entomophthorales ». In *Arthropod-pathogenic entomophthorales: biology, ecology, identification*, Keller S., 55-97. Luxembourg: COST Office. 155p.

Perrin, J-B., P. Gay, et V. Stephen. 2014. « Bilan favorable pour la leucose bovine enzootique en France en 2014 : maintien du statut officiellement indemne ». *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation, no 71*. 22-3.

Rehner, S.A. 2001. « Primers for Elongation Factor 1-alpha (EF1-a) ».

Rehner, S.A., et G.J. Samuels. 1994. « Taxonomy and phylogeny of gliocladium analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences ». *Mycological research* 98 (6): 625-34.

Reissert-Oppermann, S., B. Bauer, S. Steuber, et P.H. Clausen. 2019. « Insecticide resistance in stable flies (Stomoxys calcitrans) on dairy farms in Germany ». *Parasitology research* 118 (9): 2499-2507.

Robene-Soustrade, I., E. Jouen, D. Pastou, M. Payet-Hoarau, T. Goble, D. Linderme, P. Lefeuvre, et al. 2015. « Description and phylogenetic placement of Beauveria hoplocheli sp. nov. used in the biological control of the sugarcane white grub, Hoplochelus marginalis, on Reunion island ». *Mycologia* 107 (6): 1221-32.

Schlick-Steiner, B.C., F.M. Steiner, B. Seifert, C. Stauffer, E. Christian, et R.H. Crozier. 2010. « Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity ». *Annual Review of Entomology* 55 (1): 421-38.

Sharma, A., A. Srivastava, A.K. Shukla, K. Srivastava, A.K. Srivastava, et A.K. Saxena. 2020. « Entomopathogenic fungi : a potential source for biological control of insect pests ». In *Phytobiomes: current insights and future vistas*, Solanki M.K., Kashyap P.L. et Kumari B., 225-49. Springer. 403p.

Steenberg, T., J.B. Jespersen, K.-M.V. Jensen, B.O. Nielsen, et R.A. Humber. 2001. « Entomopathogenic fungi in flies associated with pastured cattle in Denmark ». *Journal of invertebrate pathology* 77 (3): 186-97.

Toma, B., M. Eloit, et M. Savey. 1990. « Les maladies animales à rétrovirus : leucose bovine enzootique, anémie infectieuse des équidés, arthrite/encéphalite caprine ». *Revue scientifique et technique (Office internationale des épizooties)* 9 (4): 983-1037.

Vilgalys, R., et M. Hester. 1990. « Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several Cryptococcus species. » *Journal of bacteriology* 172 (8): 4238-46.

White, T.J., T. Bruns, S. Lee, et J. Taylor. 1990. « Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal genes for phylogenetics ». In *PCR protocols: a guide to methods and applications*, Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. et White T.J., 315-22. Academic Press. 482p.

Zoller, S., C. Scheidegger, et C. Sperisen. 1999. « PCR primers for the amplification of mitochondrial small subunit ribosomal DNA of lichen-forming Ascomycetes ». *The lichenologist* 31 (5): 511-16.

Zumpt, F. 1973. The Stomoxyine biting flies of the world (Diptera: Muscidae). Taxonomy, biology, economic importance and control measures. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 175p.

ANNEXES

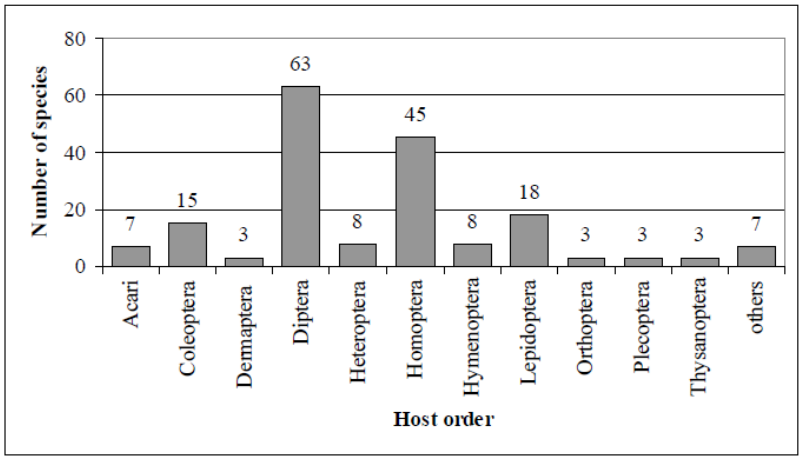
Annexe 1 : Classification du phylum des *Entomophthoromycota* (d'après Humber 2012b)

Phylum *Entomophthoromycota* Humber
- Class *Basidiobolomycetes* Humber
  - Order *Basidiobolales* Caval.-Sm.
    - Family *Basidiobolaceae* Claussen
      - *Basidiobolus* (plus undescribed new genera)
- Class *Neozygitomycetes* Humber
  - Order *Neozygitales* Humber
    - Family *Neozygitaceae* Ben Ze'ev, R.G. Kenneth & Uziel
      - *Apterivorax*, *Neozygites*, *Thaxterosporium*
- Class *Entomophthoromycetes* Humber
  - Order *Entomophthorales* G. Winter
    - Family *Ancylistaceae* J. Schröt.
      - *Ancylistes*, *Conidiobolus*, *Macrobiotophthora*
    - Family *Completoriaceae* Humber
      - *Completoria*
    - Family *Entomophthoraceae* Nowak.
      - Subfamily *Erynioideae* S. Keller
        - *Erynia*, *Eryniopsis* (in part), *Furia*, *Orthomyces*, *Pandora*, *Strongwellsea*, *Zoophthora*
      - Subfamily *Entomophthoroideae* S. Keller
        - *Batkoa*, *Entomophaga*, *Entomophthora*, *Eryniopsis* (in part), *Massospora*
    - Family *Meristacraceae* Humber
      - *Meristacrum*, *Tabanomyces*

Genera with uncertain status or excluded from phylum *Entomophthoromycota*:
- *Ballocephala* (excluded from *Meristacraceae*; reassigned to *Kickxellomycotina*; see Saikawa 1989)
- *Tarichium* (status uncertain: known from resting spores only; a mixture of fungi apparently referable to both *Entomophthoraceae* and *Neozygitaceae*)
- *Zygnemomyces* (excluded from *Meristacraceae*; reassigned to *Kickxellomycotina*; see Saikawa et al. 1997)

Les genres au statut incertain ou exclus du phylum des *Entomophthoromycota* : *Ballocephala* (exclu de la famille *Meristacraceae*, réassigné à la division des *Kickxellomycotina* par Saikawa 1989) ; *Tarichium* (statut incertain, connu pour ses spores dormantes uniquement, le genre regroupe des champignons aux caractéristiques renvoyant aux familles *Entomophthoroceae* et *Neozygitaceae*) ; *Zygnemonyces* (exclu de la famille *Meristacraceae*, réassigné à la division des *Kickxellomycotina* par Saikawa 1997)

Annexe 2 : Répartition des hôtes des champignons du phylum *Entomophthoromycota* (d'après Keller 2007a)



Nombre d'espèces de champignons entomopathogènes du phylum *Entomophthoromycota* par ordre d'hôte.

Annexe 3 : Diversité morphologique des hyphes des champignons de la sous-famille des *Entomophthoroidae* et du genre *Neozygites* (d'après Keller 2007c)

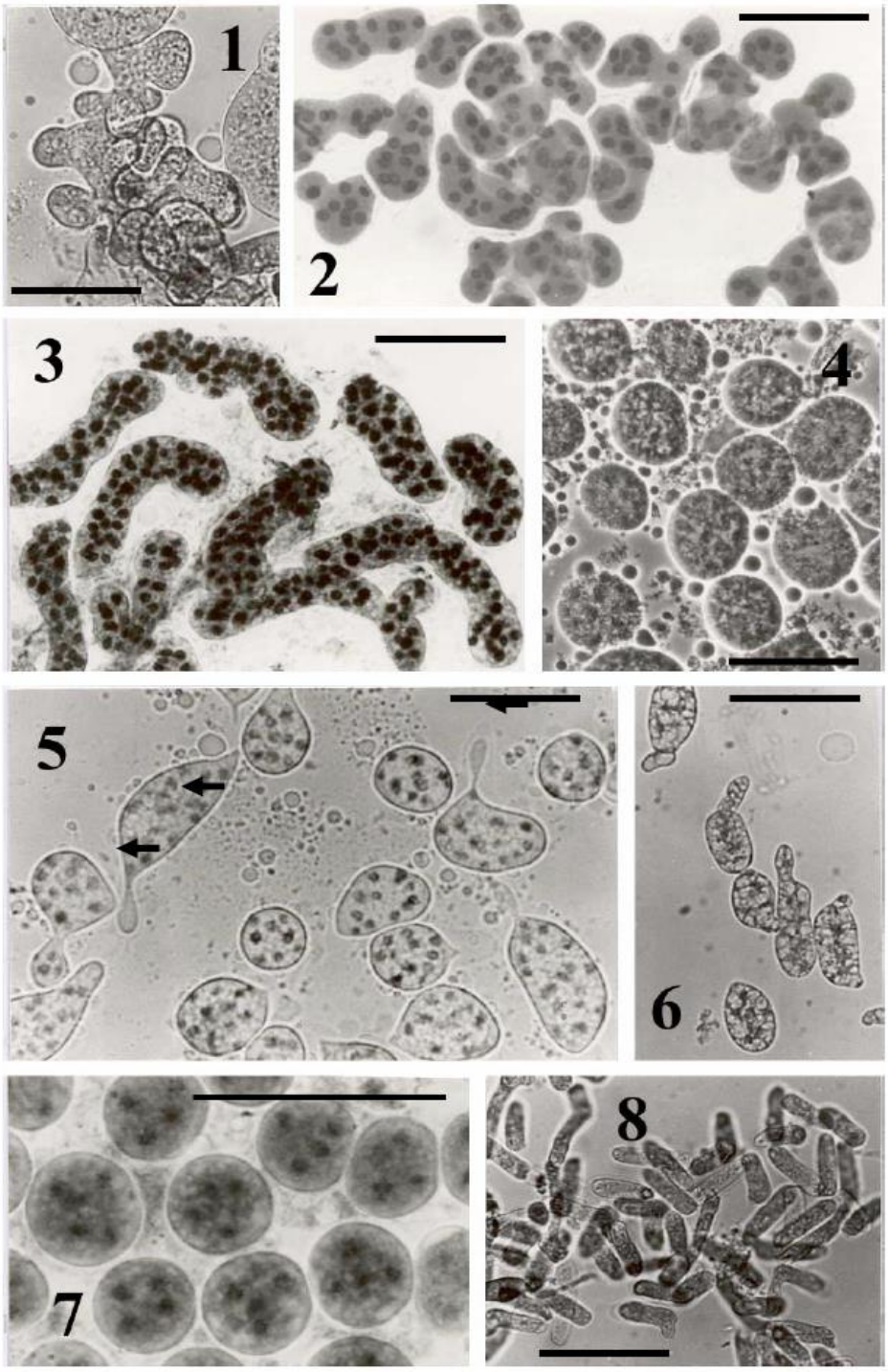


Plate 1. Hyphal bodies of Entomophthoroideae (Figs. 1-6) and *Neozygites* (Figs 7-8). 1. *Batkoa gigantea*. 2. *B. limoniae*. 3. *Entomophaga tenthredinis*. 4. *E. grylli*. 5. *Entomophthora muscae*. Some hyphal bodies multiply by budding (arrow). 6 *E. planchoniana*. 7. *Neozygites cinarae*. 8. *N. parvispora*. Nuclei stained with LPAO. Bars = 50 µm.

Hyphes d'*Entomophthoroidae* (Figures 1-6) et du genre *Neozygites* (Figures 7-8). 1. *Batkoa gigantea*. 2. *B. limoniae*. 3. *Entomophaga tenthredinis*. 4. *E. grylli*. 5. *Entomophthora muscae*. Certains hyphes se multiplient par bourgeonnement (flèche). 6. *E. planchoniana*. 7.*Neozygites cinrae*. 8.*N. parvispora*. Coloration au lactophénol acéto-orcéine. Echelle = 50 µm.

Annexe 4 : Diversité morphologique des conidies des champignons de la sous famille des *Entomophthoroidae* (d'après Keller 2007b)

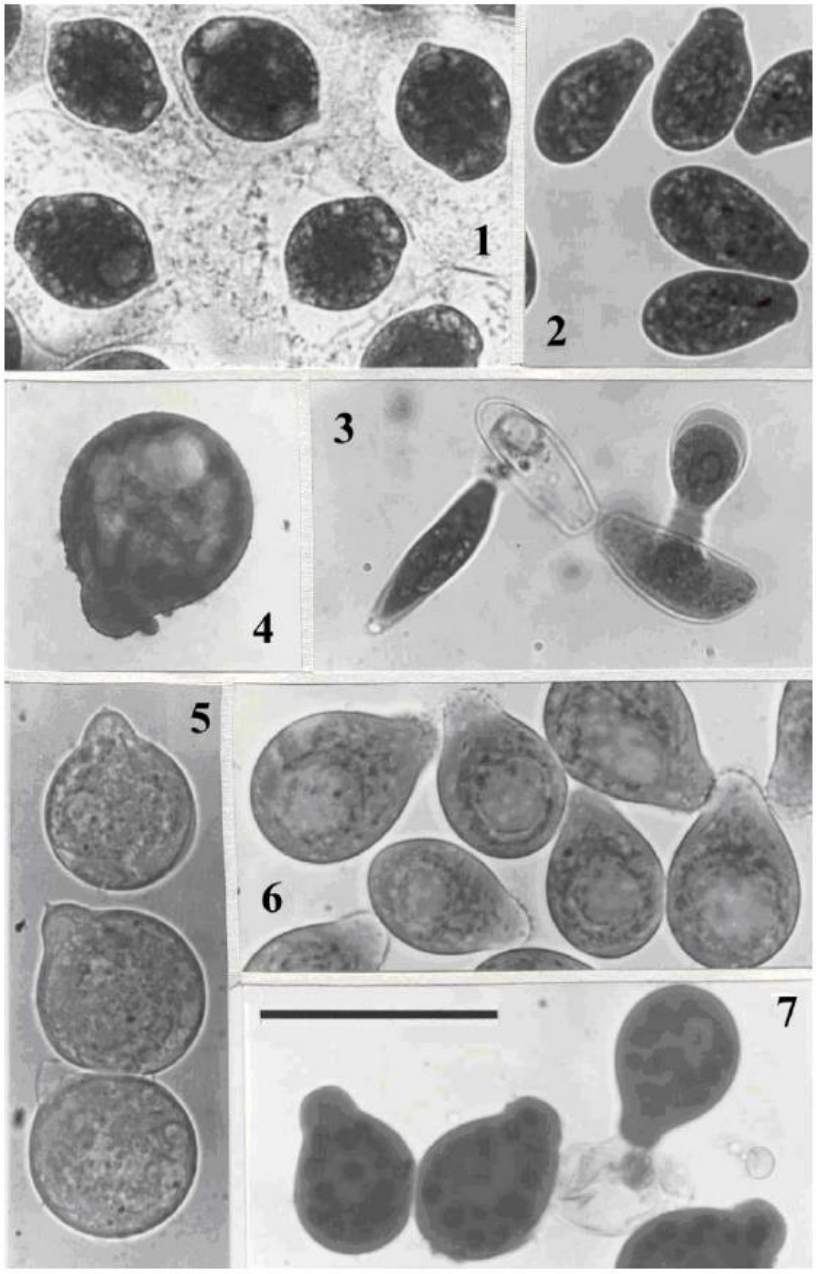


Plate 4. Primary and secondary conidia of Entomophthoroideae: 1. *Entomophthora muscae*. The pointed apex of primary conidia (bell-shaped or campanulate) is genus-specific. 2-3. *Eryniopsis caroliniana*: Primary conidia (2) and the two types of secondary conidia (3). 4. *Batkoa limoniae*. 5. *B. apiculata* with pointed papilla. 5. *Entomophaga grylli*. 6. *E. conglomerata* with nuclei. Left: Two primary conidia; right: Fully developed secondary conidium. Bar in Fig. 7 = 50 um; all figures same magnification.

Conidies primaires et secondaires de la sous-famille des *Entomophthoroidae* : 1. *Entomophthora muscae*. Les conidies primaires à l'apex pointu sont genre-spécifiques. 2-3. *Erniopsis caroliniana* : conidies primaires (2) et deux types de conidies secondaires (3). 4. *Batkoa limoniae*. 5. *B. apiculata* avec une papille pointue. 6. *Entomophaga grylli*. 7. *E. conglomerata* avec noyaux apparents. Gauche : deux conidies primaires ; droite : conidies secondaires matures. Echelle = 50 µm. Toutes les photos ont le même grandissement.

Annexe 5 : Les trois formes des conidiophores des champignons du phylum des *Entomophthoromycota* (d'après Keller 2007b)

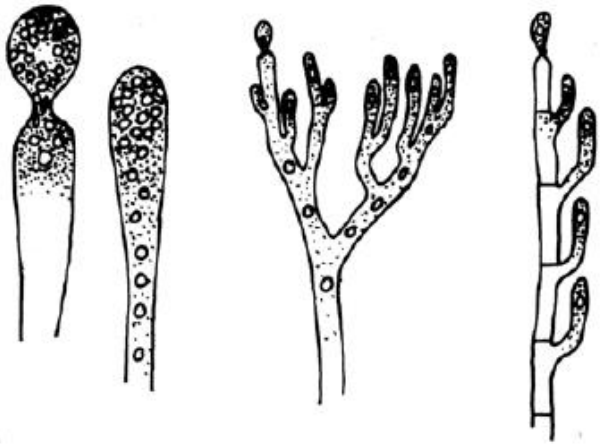


Fig. 7. Types of conidiophores: Left: two simple (unbranched) ones; central: digitally branched; right: dichotomously branched.

Gauche : deux conidiophores simples ; centre : conidiophore ramifié digitalement ; droite : conidiophore ramifié dichotomique

Annexe 6 : Les deux formes de rhizoïdes des champignons du phylum des *Entomophthoromycota* (d'après Keller 2007b)

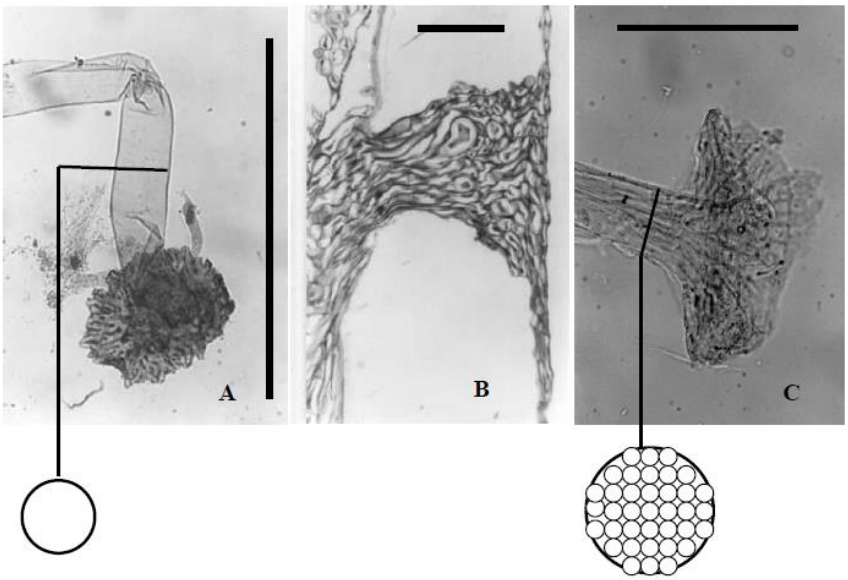
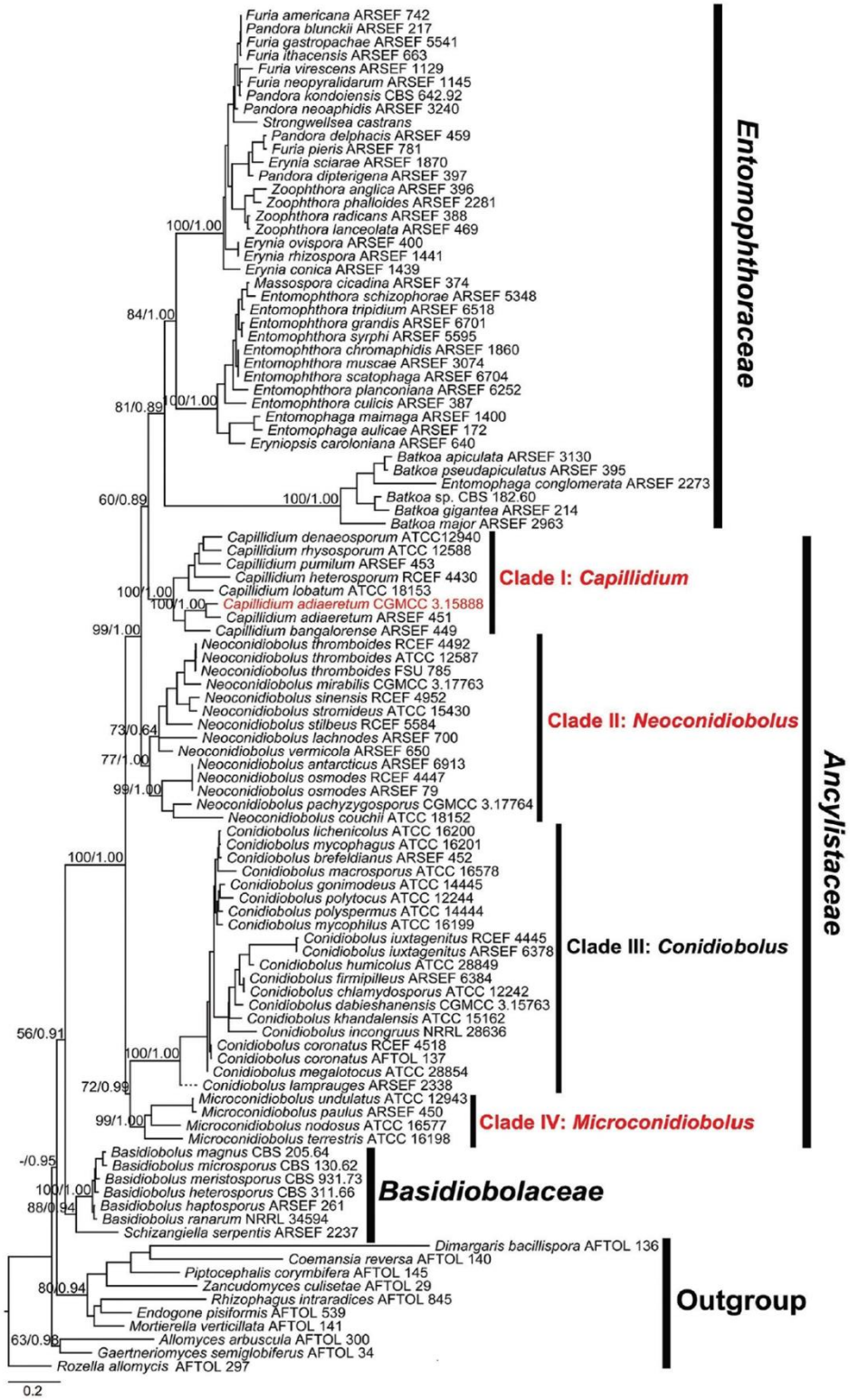


Fig. 6. Rhizoids: Simple (A, *Pandora blunckii*) and compound (B and C). B shows a histological section with the insect on the left side. The right side was fixed to a blade of grass (*Tarichium rhagonycharum*). The individual hyphae of the compound rhizoid are clearly visible. C shows a compound rhizoid of *Zoophthora radicans*. The common holdfast is clearly visible. The schematic drawings below show the monohyphal (left) and multihyphal structure of the rhizoids. Bars = 100 µm.

Rhizoïdes simples (A. *Pandora blunckii*) et composés (B et C). En B une coupe histologique avec l'insecte à gauche. Le côté droit a été fixé à un brin d'herbe (*Tarichium rhagonycharum*). Les hyphes composant le rhizoïde sont clairement visibles. En C un rhizoïde composé de *Zoophthora radicans*. Le disque de crampon est visible. Le schéma montre les structures monohyphale (droite) et multihyphale (gauche) des rhizoïdes. Echelle = 100 µm.

Annexe 7 : Arbre phylogénétique de 61 champignons du phylum *Entomophthoromycota* (d'après Nie et al. 2020)



Arbre phylogénétique construit par analyse du maximum de vraisemblance des portions de gènes nucLSU, nucSSU, EF-1α et mtSSU de 61 champignons du phylum *Entomophthoromycota*, dix espèces de champignons des divisions *Glomeromycotina, Mortierellomycotina, Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina, Blastocladiomycota, Chrytriomycota* et *Cryptolycota* ont été choisis en *outgroups*. Trois nouveaux genres et nouvel échantillon chinois sont montrés en rouge. Les valeurs maxima de vraisemblances (≥ 50%) et les probabilités postérieures bayésiennes (≥ 0,50) des clades principaux sont indiqués au niveau des branches. Echelle = substitutions par site

Annexe 8 : Description du genre *Batkoa* par Humber (1989)

Batkoa Humber, **gen. nov.**

[= *Entomophaga* subgenus *Lichia* Weiser & Batko in Batko & Weiser, 1965, J. Invertebr. Pathol. 7: 461. (*nomen nudum*, without diagnosis)]

Cellulae vegetativae hyphae vel corpora hyphalia filamentosa. Nuclei grandiusculi, granulis heterochromatis et prompte per "aceto-orcein" vel "Bismarck brown" coloratis repleto; nucleolo parvo eccentrico. Apparatus mitoticus parvus fusiformis eccentricus per metaphasem; chromosomata vermiformes spatium nuclei subtotum adsument per metaphasem. Conidiophora simplicia; apice cellulis conidiogenis plerumque attenuato exserto. Cystidia hymenica desunt. Conidia primaria globosa subglobosa, unitunicata, multinucleata; vehementer eversione papillae basalis expulsa. Rhizoidea aliquando praesentia, cellula conidiogena multo crassius, singularia (nonfasciculata), haptero apicali disciformi vel irregulariter ramoso ut in speciebus Pandorae. Sporae perdurantes ex cellula parentali pullulantes et mycelium germinale formantes per germinationem. Species Entomophthoracearum pathogeniae obligatae hospites insectorum.

Vegetative cells hyphal or in thread-like hyphal bodies, apparently with a cell wall in natural hosts. Nuclei relatively large, with prominent granules of condensed chromatin during interphase, staining readily with aceto-orcein, Bismarck brown, or other nuclear stains; nucleolus small, irregular, randomly located. Mitotic spindle small and eccentric during metaphase, chromosomal arms filling nuclear volume; chromosomal arms radiating from chromatin-free zone around spindle poles, arranged in dome-like fashion during anaphase. Conidiophores simple, conidiogenous cells with tendency for neck-like apical narrowing immediately below conidium. Cystidia absent from hymenium. Primary conidia globose to subglobose, unitunicate, multinucleate; forcibly discharged by papillar eversion. Rhizoids occasionally present; if so, distinctly thicker than vegetative hyphae or conidiophores, occurring singly, with discoid terminal holdfast (resembling that of *Pandora* species). Resting spores arising by budding from parental cell, and assumed to germinate indirectly by formation of germ mycelium. Obligately entomopathogenic, with most species affecting Homoptera, Hemiptera, or other insects in moist environments.

« Cellules hyphales végétatives ou hyphes en forme de fil, avec une paroi cellulaire à l'intérieur de l'insecte. Le noyau est relativement large, avec des granules de chromatine condensée durant l'interphase, il est facilement coloré à l'acéto-orcéine, brun Bismarck ou d'autres colorations nucléaires, le nucléole est petit, irrégulier et localisé aléatoirement. Le fuseau mitotique est petit et excentré durant la métaphase, les bras des chromosomes envahissent le volume nucléaire, les bras des chromosomes s'étendent de zone sans chromatine aux pôles du fuseau et s'arrangent en forme de dôme durant l'anaphase. Les conidiophores sont simples, plus large à l'extrémité formant un « cou » en dessous de la conidie en formation. Les cystides sont absentes de l'hymenium. Les conidies primaires sont globuleuses, multinucléées, libérées activement par *papillar evasion*. Les rhizoïdes sont occasionnellement absents, sinon ils sont généralement plus épais que les hyphes et conidiophores, avec un disque de crampon. Les spores dormantes se développent par bourgeonnement à partir des cellules parentales et germinent par la formation de mycelium. Obligatoirement entomopathogènes, la majorité des espèces infecte les ordres *Homoptera, Hemiptera* ou d'autres insectes de climats humides. »

Annexe 9 : Fiche de présentation de l'étude à destination des éleveurs et formulaire d'autorisation de collecte des données

ÉTUDE D'UN CHAMPIGNON ENTOMOPATHOGÈNE DES STOMOXES À LA RÉUNION

CONTACTS :
Yannick GRIMAUD (GDS)
yannick.grimaud@gds974.re
(+262) 0692 86 76 28

WIN CHIN Jessica (CIRAD)
jessica.winchin@cirad.fr
(+33) 06 21 58 33 80

Les stomoxes sont des insectes nuisibles des élevages. Responsables de **nuisances directes** (spoliation sanguine, harcèlement des animaux) et de **nuisances indirectes** (transmission de maladies), l'**amélioration de leur contrôle est essentielle**.

Des observations de terrain sur l'île de La Réunion ont permis la découverte d'un **champignon s'attaquant aux stomoxes,** potentiel régulateur des populations de cet insecte.

Ce travail vise à étudier la **distribution de ce champignon dans les élevages** à l'échelle de l'île.

L'objectif final est d'évaluer l'**importance de ce champignon dans le contrôle des stomoxes** à La Réunion.

Stomoxe mycosé
Photo : Antoine FRANCK

AUTORISATION DE COLLECTE D'ECHANTILLONS

Dans le cadre de la mission d'intérêt public dont il est investi pour la recherche en agronomie au service du développement des régions chaudes, le CIRAD mène une étude des champignons entomopathogènes de *Stomoxys* sp.

Objectif de l'étude : **Détecter la présence et décrire des champignons entomopathogènes s'attaquant aux Stomoxes à La Réunion.**
Méthode utilisée : **Prélèvements de Stomoxes chez des éleveurs de bovins. Culture, caractérisation génétique et test de pouvoir pathogène des souches de champignons isolées des stomoxes.**
Durée de l'étude : **6 ans**
Responsable de l'étude**: Jérémy Bouyer**, **CIRAD ;**
Adresse à contacter pour obtenir des informations sur l'étude: **Pôle de Protection de Plantes ,7 chemin d l'IRAT, 97410 Saint-Pierre, tel : 02 62 49 27 00, Email :** jeremy.bouyer@cirad.fr
Bénéfices éventuels pour les éleveurs : **aucun**
Risques pour les éleveurs : **aucun**

Autorisation

Je, soussigné(e),

Nom, prénom(s) : .....
Contact (téléphone, email) :
.....

- Autorise par la présente **l'accès à mon exploitation** située (adresse et point GPS) : .....
  .....

Période de l'accès autorisé : .....
pour la collecte de s**tomoxes.**

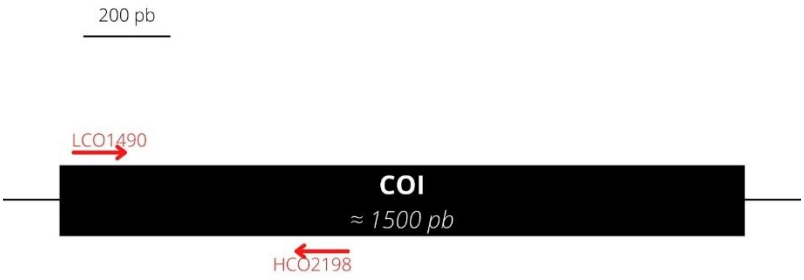
- Je suis informé(e) que mes informations personnelles figurant sur le présent document (nom, prénom, email, téléphone, adresse et GPS de l'exploitation) seront utilisées par le Cirad, Jérémy Bouyer étant responsable du traitement de ces données, sur le fondement de l'intérêt public de recherche poursuivi par le projet, afin de me contacter en cas de nécessité pour la conduite de l'étude. Ces données seront conservées toute la durée du projet, stockées sur un support informatique dont l'accès est protégé (lisible uniquement par l'équipe de chercheurs) et ne seront pas divulguées à des tiers. Je peux demander l'accès, la rectification ou la suppression de ces informations personnelles à tout moment en contactant le responsable de l'étude. Pour toute information ou exercice de vos droits sur les traitements de données personnelles gérés par le CIRAD, vous pouvez contacter son délégué à la protection des données à l'adresse dpo@cirad.fr .
- Je suis informé(e) que je peux retirer cette autorisation de prélèvement à tout moment.

Fait à ..... le .....

Signatures :

L'éleveur L'agent de terrain

Annexe 10 : Schématisation de la position des amorces LCO1490/HCO2198 utilisées pour la caractérisation moléculaire des stomoxes



Annexe 11 : Séquences BOLD utilisées dans cette étude pour l'analyse phylogénétique des stomoxes

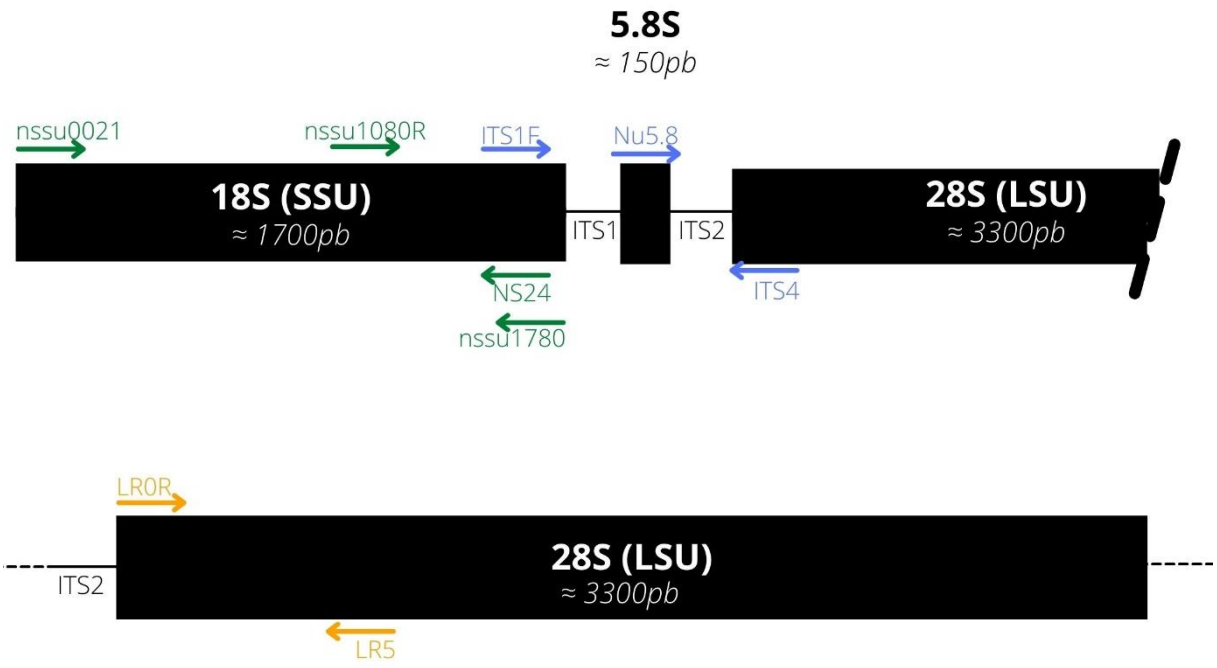
Espèce	Nom de la séquence BOLD	Origine	Barcode Index Number (BIN)
Stomoxys sitiens	5487258	Thailand	AAA3184
S. calcitrans	10946820	South Africa	ADS4080
S. calcitrans	10953198	South Africa	ADS4080
S. calcitrans	11789942	South Africa	ADS4080
S. calcitrans	11945473	South Africa	ADS4080
S. calcitrans	10948311	South Africa	ADO0717
S. calcitrans	11654818	South Africa	ADO0717
S. calcitrans	11852355	South Africa	ADO0717
S. calcitrans	12038276	South Africa	ADO0717
S. calcitrans	3348929	Canada	AAA3181
S. calcitrans	3428291	United States	AAA3181
S. calcitrans	7198743	Ecuador	AAA3181
S. calcitrans	7198763	Ecuador	AAA3181
S. calcitrans	7198770	Ecuador	AAA3181
S. calcitrans	3367327	United States	AAA3181
S. calcitrans	3367361	United States	AAA3181
S. calcitrans	3609226	Canada	AAA3181
S. calcitrans	3777636	United States	AAA3181
S. calcitrans	4447418	United States	AAA3181
S. calcitrans	4609108	Pakistan	AAA3181
S. calcitrans	4647843	Turkey	AAA3181
S. calcitrans	11865979	South Africa	AAA3181
S. calcitrans	11786432	South Africa	AAA3181
S. calcitrans	5487294	Thailand	AAA3181
S. calcitrans	5243551	Pakistan	ACI1304
S. calcitrans	10871963	China	ACI1304
S. calcitrans	5487291	Thailand	ACI1304
S. calcitrans	5487295	Thailand	ACI1304
S. calcitrans	5106805	United States	AAA3181

S. calcitrans	10885326	India	ACI1304
S. calcitrans	10885327	India	ACI1304
S. calcitrans	11646591	South Africa	ADA0003
S. calcitrans	11785440	South Africa	ADA0003
S. calcitrans	11861010	South Africa	ADA0003
S. calcitrans	10892776	South Africa	ADA0003
S. indicus	5487274	Thailand	AAC2280
S. indicus	5487276	Thailand	AAC2280
S. indicus	5487277	Thailand	AAC2280
S. indicus	5487278	Thailand	AAC2280
S. indicus	5487279	Thailand	AAC2280
S. indicus	5487275	Thailand	ACI0019
S. indicus	5487280	Thailand	ACI0019
S. pullus	5487259	Thailand	ACI0025
S. pullus	5487265	Thailand	ACI0025
S. pullus	5487266	Thailand	ACH4467
S. pullus	5487267	Thailand	ACH4467
S. pullus	5487268	Thailand	ACH4467
S. pullus	5487270	Thailand	ACH4467
S. pullus	5487269	Thailand	ACH4467
S. pullus	5487271	Thailand	ACH4467
S. pullus	5487272	Thailand	ACH6365
S. pullus	5487273	Thailand	ACH6365
S. uruma	5487253	Thailand	AAF3270
S. uruma	5487254	Thailand	AAF3270
S. uruma	5487255	Thailand	AAF3270
S. uruma	5487257	Thailand	AAF3270
S. uruma	5487256	Thailand	AAF3270
Stomoxys sp.	10877544	South Africa	ADV2046
Stomoxys sp.	10929381	South Africa	ADV2046
Stomoxys sp.	10878563	South Africa	ADV2046
Stomoxys sp.	11831975	South Africa	ADV2046
Stomoxys sp.	12059812	South Africa	ACW8613
Musca domestica	ETKD999-13	Thailand	MK236181

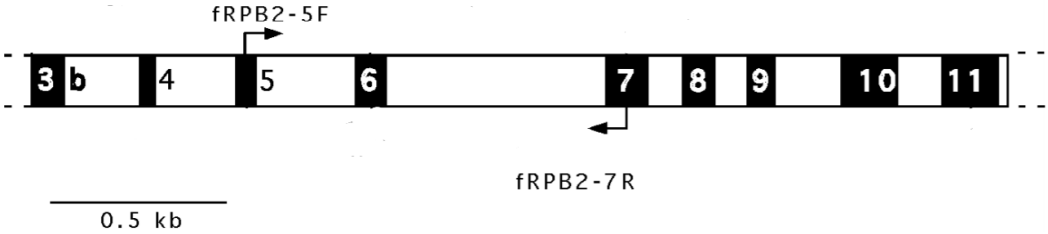
Annexe 12 : Tableau récapitulatif des paires d'amorces utilisées pour la caractérisation moléculaire du champignon et schématisation de leur position dans le génome

Gène	Nom amorce	Référence	Séquence 5' - 3'	Position	Composition du puit pour volume final de 25 µL	Programme thermocycleur
28S (nucLSU)	LR0R	(Rehner et Samuels 1994)	GTACCCGCTGAACTTAAGC	24-42	5 µL Buffer Go Taq Flexi (PROMEGA), 1,8 µL MgCl2 (PROMEGA), 0,5 µL dNTPs (PROMEGA), 1 µL chaque amorce, 0,25 µL Go Taq Flexi (PROMEGA) 3 µL d'ADN	95°C 5min ; (94°C 1min, 55°C 2min, 72°C 2min) x 35 ; 72°C 10min
	LR5	(Vilgalys et Hester 1990)	ATCCTGAGGGAAACTTC	997-981		
18s (nucSSU)	nssu1088R	(Kauff et Lutzoni 2002)	CGGCACCTTACGAGAAATCA	1069-1088	12,45 µL H2O, 5 µL Buffer Go Taq Flexi (PROMEGA), 1,8 µL MgCl2 (PROMEGA), 0,5 µL dNTPs (PROMEGA), 1 µL chaque amorce, 0,25 µL Go Taq Flexi (PROMEGA) 3 µL d'ADN	95°C 5min ; (95°C 1min, 50°C 50s, 72°C 1min) x 35 ; 72°C 10min
	NS24	(Gargas et Taylor 1992)	AAACCTTGTTACGACT TTTA	1750-1769		
	nucSSU0021	(Gargas et DePriest 1996)	CTGGTTGATTCTGCCAGT	O2-19	12,45 µL H2O, 5 µL Buffer Go Taq Flexi (PROMEGA), 1,8 µL MgCl2 (PROMEGA), 0,5 µL dNTPs (PROMEGA), 1 µL chaque amorce, 0,25 µL Go Taq Flexi (PROMEGA) 3 µL d'ADN	98°C 30s ; (98°C 10s, 58°C 20s, 72°C 1min) x 38 ; 72°C 10min
	nucSSU1780	(DePriest 1993)	AATGATCCTTCCGCACCT	1798-1777		
ITS	Nu 5.8	(Jensen et Eilenberg 2001)	TCATCGATGAAGAACGTAGT	31-51(5.8S)	11,95 µL H2O, 5 µL Buffer Go Taq Flexi (PROMEGA), 1,8 µL MgCl2 (PROMEGA), 0,5 µL dNTPs (PROMEGA), 1,25 µL chaque amorce, 0,25 µL Go Taq Flexi (PROMEGA) 3 µL d'ADN	94°C 3min ; (94°C 1min, 62°C 30s, 72°C 1min) x 35 ; 72°C 7min
	ITS4	(White et al. 1990)	TCCTCCGCTTATTGATATGC	60-41 (nucLSU)		
	emITS-1	(Elya et al. 2018)	TGGTAGAGAATGATGGCTGTTG		12,45 µL H2O, 5 µL Buffer Go Taq Flexi (PROMEGA), 1,8 µL MgCl2 (PROMEGA), 0,5 µL dNTPs (PROMEGA), 1 µL chaque amorce, 0,25 µL Go Taq Flexi (PROMEGA) 3 µL d'ADN	95°C 5min ; (95°C 30s, 51°C 30s, 72°C 1min) x 35 ; 72°C 10min
	emITS-4	(Elya et al. 2018)	GCCTCTATGCCTAATTGCCTTT			
16S (mtSSU)	mtSSU1	(Zoller, Scheidegger, et Sperisen 1999)	AGCAGTGAGGAATATTGGTC		12,45 µL H2O, 5 µL Buffer Go Taq Flexi (PROMEGA), 1,8 µL MgCl2 (PROMEGA), 0,5 µL dNTPs (PROMEGA), 1 µL chaque amorce, 0,25 µL Go Taq Flexi (PROMEGA) 3 µL d'ADN	94°C 3min ; (94°C 1min, 52°C 1min, 72°C 1min) x 35 ; 72°C 7min
	mtSSU2r	(Zoller, Scheidegger, et Sperisen 1999)	CCTTCGTCCTTCAACGTCAG			
RPB2	fRPB2-5F	(Liu, Whelen, et Hall 1999)	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG	2444-2463	12,45 µL H2O, 5 µL Buffer Go Taq Flexi (PROMEGA), 1,8 µL MgCl2 (PROMEGA), 0,5 µL dNTPs (PROMEGA), 1 µL chaque amorce, 0,25 µL Go Taq Flexi (PROMEGA) 3 µL d'ADN	95°C 5min ; (95°C 1min, 55°C 2min, 72°C 2min) x 30 ; 72°C 10min
	fRPB2-7cR	(Liu, Whelen, et Hall 1999)	CCCATRGCTTGYTTRCCCAT	3639–3620		
EFLα	EF983	(Rehner 2001)	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	336-358	12,45 µL H2O, 5 µL Buffer Go Taq Flexi (PROMEGA), 1,8 µL MgCl2 (PROMEGA), 0,5 µL dNTPs (PROMEGA), 1 µL chaque amorce, 0,25 µL Go Taq Flexi (PROMEGA) 3 µL d'ADN	100°C 5min ; (94°C 1min, 55°C 2min, 72°C 2min) x 34 ; 72°C 10min
	EF1aZ-1R	(Rehner 2001)	ACATCWCCGACACCCTTGATCTTG			

Position des amorces nucléaires (mtSSU, nucLSU, ITS)



Position des amorces du gène RPB2



Les régions noires correspondent aux régions conservées chez les eucaryotes. (d'après Binder et Hibbett 2003)

Annexe 13 : Séquences GenBank de la portion de gène nucLSU utilisées dans cette étude pour l'analyse phylogénétique du champignon

Espèce	Souche	Séquence nucLSU GenBank
Batkoa apiculata	ARSEF 3130	EF392404
B. gigantea	ARSEF 214	JX242591
Batkoa sp.	CG1454	MZ145379
*B. australiensis**	ARSEF 328	EF392375
B. major	ARSEF 365	EF392376
	ARSEF 3102	EF392403
	ARSEF 919	EF392392
	ARSEF 2936	EF392401
Conidiobolus obscurus	CBS 182.60	JX242595
	ARSEF 74	NG058743
C. pseudoapiculatus	ARSEF 1662	EF392398
	ARSEF 395	EF392378
C. thromboides	FSU 785	JX242597
Zoophthora radicans	ARSEF 388	JX242605

*****à l'origine sous le nom de *Entomophaga australiensis*, renommé en *Batkoa australiensis* par Nie et al. (2020)

Annexe 14 : Tableau comparatif des caractéristiques morphologiques des conidies primaires, conidies secondaires et conidiophores avec quatre espèces du genre *Batkoa*

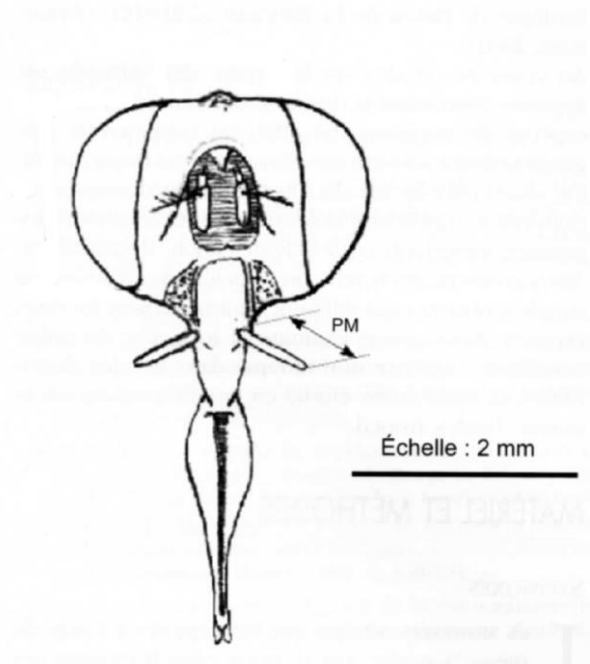
		Conidie primaire				Conidie secondaire				Conidiophore		
Espèce	**Hôte**	**Longueur**	**Largeur**	**L/l**	**Forme**	**Longueur**	**Largeur**	**L/l**	**Forme**	**Type**	**Taille à l'extrémité**	**Référence**
Batkoa sp. RUN	Diptera	(36) 40,6-42,3 (46,9)	(30,3) 35,1-36,9 (41,8)	1,14-1,17	Sphérique, papille ronde	(27) 31,5-33,2 (37,6)	(23,4) 26,4-27,5 (30,5)	1,2	Similaire à condinie primaire	Simple	(19,3) 24,2 (28,5)	Cette étude
*B. apiculata**	Diptera, Homoptera	(30) 33,5-38 (46)	(25) 29-33,5 (41)	1,11-1,21	Sphérique, papille ronde ou en pointe	(27) 29 (33)	(22) 24 (28)	NA	Similaire à condinie primaire	Simple	(3) 3,7 (5)	Keller (1987)
B. hydrophila	Plecoptera: Leuctridae	(24) 30,4-34,6 (40)	(17) 22,5-26,4 (33)	1,27-1,36	Pyriforme à ovoïde, papillle proéminente	(24) 25 (26)	(17) 18,5 (20)	NA	Similaire à condinie primaire	Simple	(13) 16 (18)	Keller (2007b)
*B. major***	Dipera: Tipulidae	(38) 47,5-52 (58)	(32) 40,5-47 (55)	1,10-1,22	Sphérique à pyriforme, papille conique à ronde	NA	NA	NA	NA	Simple	NA	Keller (1987)
*Conidiobolus obscurus****	Homoptera; Aphidina	(29) 33,5-44 (53)	(23) 28-36 (47)	1,16-1,27	Sphérique, papille ronde	(29) 32,5 (41)	(24) 30 (35)	1,09	Similaire à condinie primaire	Simple	NA	Keller (1987)

* Sous le nom de *Entomophaga domestica* dans la description de Keller (1987), renommé en *B. apiculata* par Humber (1989)

** Sous le nom de *E. limoniae* dans la description de Keller (1987), renommé en *B. major* par Humber (1989)

*** renommé en *B. sp* par Nie et al. (2020)

Annexe 15 : Schéma de la face antérieure de la tête de *Stomoxys calcitrans*. PM = longueur du palpe maxillaire (d'après Garros, Gilles, et Duvallet 2004)



Supplémentaire : tableau récapitulatif des critères morphologiques du champignon

Critère morphologique	Observé	Manquant	Commentaire
Hyphes		X	
Conidies primaires	X		sphériques avec papille ronde ; (36) 40,6-42,3 (46,9) µm x (30,3) 35-36,9 (41,8) µm
Conidies secondaires	X		morphologiquement similaires aux conidies primaires ; (27) 31,5-33,2 (37,6) x (23,4) 26,4-27,5 (30,5) µm
Conidiophores	X		simples ; apex plus large ; (19,3) 24,2 (28,5) µm
Rhizoïdes	X		simples ; disque de crampon présent
Noyaux		X	colorations simples (fuchsine et safranine) non concluantes
Spores dormantes		X	
Cystides		X	

RÉSUMÉ

Sur l'île de La Réunion, les pullulations de stomoxes sont un véritable fléau pour l'élevage bovin. Dans les années 80, une mycose provoquant des épidémies dans les populations de stomoxes est découverte. Les objectifs de cette étude étaient : 1) la caractérisation morphologique et moléculaire de ce champignon et 2) l'étude de sa distribution à l'échelle de d'île. Des observations en microscopie optique ont permis de caractériser certaines structures du champignon : conidies sphériques avec une papille, des conidiophores et des rhizoïdes simples. Ces observations morphologiques couplées à des analyses moléculaires ont permis de placer ce champignon dans le genre *Batkoa*. Enfin sur la période de fin avril, le champignon était distribué sur toute l'île, plus de 80 % des élevages étant positifs. A notre connaissance, c'est la première fois que ce type d'épizootie est rapportée sur stomoxes, elle semble remarquable autant par son intensité, sa distribution généralisée dans les conditions climatiques et altitudinales très diverses de la Réunion, mais aussi par sa pérennité. Ces travaux préliminaires seront poursuivis afin de caractériser le potentiel d'utilisation de ce champignon en tant qu'agent de lutte biologique contre les stomoxes à La Réunion en lutte par augmentation ou lutte de conservation et ailleurs par introduction.

Mots clés : La Réunion – élevage bovin – Stomoxys – lutte biologique – champignon entomopathogène – Batkoa

ABSTRACT

Stable flies are an important pest of cattle in La Reunion Island. In 1981, a fungus infecting stable flies was discovered on the island. The purposes of this study were: 1) a morphological and molecular characterization and 2) to study the geographical distribution on the island of the fungus. Microscopic observations showed round conidia with a papilla, simple conidiophores and rhizoids. Morphological characterization and molecular analysis placed the fungus in the *Batkoa* genus. In the end of April, infected stable flies were found all over the island, in all altitudes. More than 80 % of the farms were positive. To our knowledge, this is the first described fungal epizootic in *Stomoxys* populations, noteworthy by its intensity, distribution and durability. Further studies are needed to determine its potential as a biological control agent against stable flies, in conservation control in La Réunion island and in introduction control elsewhere.

Key words : La Reunion Island – cattle pest – stable flies – biological control – entomopathogenic fungus - Batkoa