

UNIVERSITE DE PARIS XI
CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ETAT ES SCIENCES (SCIENCES NATURELLES)

par

Saïd KARCH

Le sujet :

ETUDES AU LABORATOIRE ET DANS LES CONDITIONS NATURELLES
DE L'ACTIVITE LARVICIDE DE *BACILLUS SPHAERICUS* NEIDE, 1904,
POUR LA LUTTE CONTRE LES MOUSTIQUES

soutenue le 23 janvier 1987
devant le jury composé de :

M. BERGERARD J.
M. COZ J.
M. CHAUVET G.
Melle LAUGE G.
M. RAMADE F.
M. SINEGRE G.

Président

AVANT-PROPOS

Avant de présenter ce travail, j'assure de ma profonde reconnaissance tous ceux qui m'ont guidé par leurs conseils ou aidé à la réalisation de cette étude.

Je prie Monsieur le Professeur BERGERARD d'accepter mes plus sincères remerciements pour avoir bien voulu présider le jury de ma thèse, après avoir contribué à ma formation scientifique. Je tiens à lui exprimer également ma profonde gratitude à la fois pour sa direction scientifique de ce travail, et pour ses conseils éclairés et ses encouragements.

Je témoigne ma gratitude à Monsieur COZ, Chef du laboratoire de recherche d'entomologie médicale de l'ORSTOM-Bondy, qui m'a accueilli et pris en charge dans son laboratoire, et m'a guidé tout au long de ce travail. Je suis heureux de pouvoir lui exprimer toute ma vive reconnaissance pour les conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Monsieur CHAUVET, Directeur de recherche à l'ORSTOM, a bien voulu faire partie du jury. Son aide au cours de l'exécution de mon travail à Montpellier et ses conseils éclairés lors de la rédaction m'ont été précieux ; qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Mademoiselle le Professeur LAUGE a bien voulu faire partie du jury ; ses conseils éclairés lors de la rédaction de ce mémoire m'ont été précieux ; je tiens à la remercier sincèrement.

Monsieur SINEGRE, Directeur du laboratoire de l'E.I.D., a bien voulu m'accueillir dans son laboratoire. Je suis heureux de pouvoir l'assurer de toute ma gratitude pour son aide et ses conseils lors de l'expérimentation sur le terrain à Montpellier ; qu'il trouve ici ma profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur RAMADE m'a fait l'honneur d'accepter de participer à mon jury. Je l'en remercie vivement.

Mes remerciements vont aussi à ceux qui m'ont aidé ou qui ont collaboré à ce travail, en particulier :

Le personnel du laboratoire de la lutte biologique II (Institut

Pasteur) et particulièrement à Jean-François CHARLES qui m'ont apporté leur aide tout au long de ce travail.

Monsieur COUSSERAN, Directeur de l'E.I.D. et particulièrement Messieurs VIGO, JULLIEN et GAVEN, qui m'ont aidé à réaliser la partie du travail sur le terrain. A leur contact, j'ai travaillé dans une ambiance sympathique et toujours accueillante.

J'adresse mes très sincères remerciements aux Docteurs VOLLHARDT et ANDRAL, respectivement Directeur départemental et Chef du laboratoire des services vétérinaires à Montpellier pour m'avoir aimablement accueilli au sein de leur laboratoire de bactériologie.

Je tiens également à adresser tous mes remerciements à Messieurs PETAVY et GAGNEPAIN du laboratoire d'entomologie de la Faculté des Sciences-ORSAY, qui m'ont aidé à réaliser la partie histologique de cette étude.

Monsieur J.M. HOUGARD, qui par son dynamisme a été une collaboration précieuse, qu'il trouve ici ma sincère amitié.

Que le personnel du laboratoire d'entomologie médicale de l'ORSTOM-Bondy, qui m'a aimablement accueilli et entouré, trouve ici l'expression de ma profonde sympathie. Je remercie tout particulièrement Mesdames BARATHE, SANNIER et ANDRE, qui ont assuré l'entretien constant de l'élevage de moustiques. Madame PASTRE, Mademoiselle N. ELISSA et Monsieur D. BOUCHARINC, qui m'ont apporté leur aide durant mon séjour à Bondy, trouvent ici mes sincères remerciements.

Madame N. MONTENY, pour sa collaboration active lors de derniers travaux à l'ORSTOM-Bondy, qu'elle trouve ici le témoignage de ma haute considération.

Que Monsieur RICKENBACH, Monsieur CHALLIER, Monsieur MOUCHET, Monsieur GUILLET et Monsieur GERMAIN, avec qui, les discussions ont été toujours précieuses et encourageantes, qu'ils trouvent ici ma profonde reconnaissance.

Mademoiselle B. ROZE s'est chargée de la frappe de ce manuscrit ;
je tiens à la remercier tout particulièrement pour sa disponibilité et
son dévouement.

Enfin, toutes mes amitiés vont à mes collègues de l'ORSTOM ainsi
qu'à tous ceux qui, soit à l'extérieur, soit au sein du laboratoire, par
leurs conseils, leurs encouragements m'ont permis de réaliser ce mémoire.

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS

INTRODUCTION 9

CHAPITRE I

ÉTUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITÉ LARVICIDE DE DIFFÉRENTES SOUCHES DE *BACILLUS SPHAERICUS*

1 - GENERALITES	17
2 - MATERIEL	17
2.1. Les souches de <i>Bacillus sphaericus</i>	17
2.2. Les moustiques testés	18
3 - METHODES	18
3.1. Techniques et conditions d'élevage	18
3.2. Méthodes de titrage biologique	19
3.3. Analyse des résultats	20
4 - RESULTATS	21
4.1. Spectre d'efficacité de la souche standard 1593-4 sur différentes espèces de moustiques	21
4.2. Relation entre le stade larvaire et l'activité lar- vicide	21
4.3. Evaluation de l'activité larvicide de diverses pou- dres à base de <i>Bacillus sphaericus</i>	22
5 - DISCUSSION - CONCLUSION	25

CHAPITRE II

ÉTUDE CYTOPATHOLOGIQUE DE L'ACTION DE *BACILLUS SPHAERICUS* SUR DES LARVES DE MOUSTIQUES SENSIBLES OU NON A CETTE BACTÉRIE

1 -	MATERIEL ET METHODES	28
	1.1. Larves de moustiques	28
	1.2. Technique histologique	28
2 -	OBSERVATION SUR L'ANATOMIE DU TUBE DIGESTIF	29
3 -	SYMPTOMES PATHOLOGIQUES DUS A L'INGESTION DE <i>BACILLUS</i> <i>SPHAERICUS</i> PAR DES LARVES DE <i>CULEX PIFIENS</i>	33
	3.1. Différents aspects de l'intoxication	33
	3.2. Etapes des altérations de cellules mésentériques	36
4 -	ACTION SUR LES LARVES D' <i>ANOPHELES STEPHENSI</i>	47
5 -	ACTION SUR LES LARVES D' <i>AEDES AEGYPTI</i>	47
6 -	ACTION SUR LES LARVES D' <i>AEDES CASPIUS</i>	47
7 -	DISCUSSION	
	7.1. Larves très sensibles : <i>Culex pipiens</i>	47
	7.2. Larves moyennement sensibles : <i>Anopheles stephensi</i>	57
	7.3. Larves très peu ou non sensibles : <i>Aedes aegypti</i> et <i>Aedes caspius</i>	57
8 -	CONCLUSION	58

CHAPITRE III

EFFET DE *BACILLUS SPHAERICUS* SUR LE CYCLE SPOROGONIQUE DU PLASMODIUM

1 -	GENERALITES	61
-----	-------------------	----

2 - MATERIEL	61
2.1. Le choix du modèle animal	61
2.2. Les anophèles	62
2.3. Souches plasmodiales	62
3 - METHODES	62
3.1. Rappel du cycle de plasmodium chez l'anophèle	62
3.2. Entretien du cycle de plasmodium	63
3.3. Modalités d'infestation	63
4 - TRAITEMENT DES LARVES D'ANOPHELES	65
5 - RESULTATS	66
5.1. Problèmes d'obtention des adultes issus d'un test larvicide	66
5.2. Action de <i>Bacillus sphaericus</i> sur le développement des oocystes	68
5.3. Action de <i>Bacillus sphaericus</i> sur le développement des sporozoïtes	68
6 - DISCUSSION	71

CHAPITRE IV

EVALUATION DE L'ACTIVITÉ LARVICIDE DE *BACILLUS SPHAERICUS* DANS DES MARES SEMI-ARTIFICIELLES À *CULEX PIPIENS* A BONDY-FRANCE

1 - LA NATURE DES MARES	73
2 - LA FAUNE DES MARES	76
3 - COMPARAISON DE LA SENSIBILITE DES LARVES DES MARES ET DU LABORATOIRE A LA SOUCHE 1593-4	76
4 - TECHNIQUE DE L'APPLICATION ET DU CONTROLE DES GITES	77
5 - RESULTATS	77
5.1. Expérimentations au laboratoire et surveillance des gîtes	77

5.1.1. Comparaison de la sensibilité des larves des gîtes et d'élevage	77
5.1.2. Tests sur les oeufs	78
5.1.3. Tests sur les larves	78
5.2. Activité larvicide sur la faune des Arthropodes	80
5.3. Efficacité et persistance de la souche 1593-4 vis-à-vis des populations préimaginales de <i>Culex pipiens</i> dans les trois gîtes	80
6 - DISCUSSION	83
7 - CONCLUSION	85

CHAPITRE V

RELATION ENTRE VIABILITÉ-NOMBRE DE SPORES DE DIFFÉRENTES FORMULATIONS DE *BACILLUS SPHAERICUS* ET EFFECTIF LARVAIRE DE *CULEX PIFIENS* EN GÎTES NATURELS

1 - MATERIEL ET METHODES	87
1.1. Gîtes expérimentaux	87
1.2. Contrôle et application des formulations de <i>Bacillus sphaericus</i>	87
1.3. Analyses bactériologiques	88
1.4. Test sur la toxicité des spores récupérées dans les gîtes traités	90
2 - RESULTATS	90
2.1. Effet des trois poudres sur l'effectif larvaire	90
2.1.1. A faible dose	90
2.1.2. A forte dose	93
2.2. Analyse statistique des résultats	95
2.2.1. Variations des effectifs L ₁ -L ₂ dans les cuves	95
2.2.2. Variations des effectifs L ₃ -L ₄	95
2.2.3. Variations des effectifs de nymphes	102
2.2.4. Conclusion	102

2.3. Viabilité des spores dans les différents gîtes	102
2.4. Efficacité des spores récupérées dans les gîtes	105
2.5. Modification morphologique au sein des spores vues par microscopie électronique à transmission	105
3 - DISCUSSION SUR LA PERSISTANCE DE <i>BACILLUS SPHAERICUS</i> DANS LE MILIEU	110

CHAPITRE VI

ÉVALUATION EN MILIEU NATUREL DE L'ACTIVITÉ LARVICIDE DE *BACILLUS SPHAERICUS* DANS DES GÎTES LARVAIRES A *CULEX PIPIENS* DU LITTORAL MÉDITERRANÉEN FRANÇAIS

1 - LA LUTTE CONTRE <i>CULEX PIPIENS</i> ET LES PROBLEMES DE RESISTANCE DANS LE SUD DE LA FRANCE	114
2 - CHOROLOGIE ET CADRE D'ETUDES	115
2.1. Répartition géographique	115
2.2. Zone d'études	117
2.2.1. Gîte de Les Matelles	117
2.2.2. Gîte de Vailhauques	120
2.2.3. Gîte de Mauguio	120
3 - METHODES D'ETUDE	124
3.1. Volet entomologique	124
3.2. Volet bactériologique	125
4 - RESULTATS	126
4.1. Mortalité larvaire et persistance de <i>Bacillus</i> <i>sphaericus</i> dans le milieu	126
4.1.1. Gîte de Les Matelles	126
4.1.2. Gîte de Vailhauques	126
4.1.3. Gîte des bassins du lagunage de Mauguio	130
4.2. Résultats des analyses bactériologiques	130
5 - DISCUSSION	135
6 - CONCLUSION	136

CHAPITRE VII

PERSISTANCE, EFFICACITÉ ET DEVENIR DES SPORES DE *BACILLUS SPHAERICUS* DANS DIFFÉRENTS MILIEUX EN FONCTION DE LA QUALITÉ DE L'EAU

1 -	GENERALITES	138
2 -	MATERIEL ET METHODES	138
	2.1. Préparation de l'eau à différents degrés de pollution et du substrat	139
	2.2. Analyses physico-chimiques de l'eau	141
	2.3. Formulation et concentration utilisées	141
	2.4. Analyse bactériologique	141
	2.5. Protocole de test larvicide	143
3 -	RESULTATS	143
	3.1. Viabilité des spores et influence des rayons solaires	143
	3.2. Numération et évolution de la séquence de la sédimentation des spores	143
	3.3. Persistance des spores en fonction de la qualité de l'eau	147
	3.3.1. Dans les aquariums sans substrat	147
	3.3.2. Dans les aquariums à substrat	147
	3.4. Influence du pH et de la température	147
	3.5. Potentiel larvicide des spores en fonction de l'existence ou non des substrats	149
4 -	DISCUSSION	152
5 -	CONCLUSION	153

CHAPITRE VIII

STABILITÉ DE *BACILLUS SPHAERICUS* ET DE *BACILLUS THURINGIENSIS* A DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES

ÉTUDE COMPARATIVE EN MILIEU AQUEUX DU DEVENIR DES SPORES ET DE LA MATIÈRE ACTIVE DE CES DEUX BACTÉRIES

1 -	MATERIEL ET METHODES	155
	1.1. Conditions du stockage	155
	1.2. Titrage biologique et numération des spores	155
	1.3. Techniques concernant la sédimentation de la matière active de deux formulations de <i>Bacillus</i> <i>sphaericus</i> 2362 et de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14	156
2 -	RESULTATS	157
	2.1. Influence de la température sur la viabilité des spores en fonction du temps de stockage	157
	2.2. Influence de la température sur la toxicité vis-à-vis de larves de moustiques	157
	2.3. Comportement et sédimentation du complexe spore-toxine de <i>Bacillus sphaericus</i> et de <i>Bacillus thuringiensis</i> H-14	163
	2.3.1. Volet entomologique	163
	2.3.2. Volet bactériologique	163
3 -	DISCUSSION	168
	3.1. Action de la température sur la stabilité du pouvoir larvicide et sur la viabilité des spores	168
	3.2. Sédimentation et devenir de la matière active	168
4 -	CONCLUSION	169

CHAPITRE IX

RECYCLAGE DE *BACILLUS SPHAERICUS* DANS LES LARVES MORTES

ACTIVITÉ LARVICIDE DES SPORES ISSUES DES CADAVRES

1 -	GENERALITES SUR LA SPORULATION DE LA BACTERIE	174
2 -	TECHNIQUES ET MATERIEL	175
	2.1. Méthodes de l'exposition des larves à des doses létales de la souche 1593-4	175
	2.2. Technique de culture	175
	2.3. Numération des spores et des "CFU"	176
	2.4. Principe d'un test insecticide à partir des spores ingérées par les larves	177
3 -	RESULTATS	178
	3.1. Accélération du pouvoir larvicide due aux spores accumulées dans des larves intoxiquées	178
	3.2. Persistance de l'activité larvicide des spores accumulées dans les larves au cours de 90 jours	178
	3.3. Recyclage de <i>Bacillus sphaericus</i> dans les larves	179
	3.4. Potentiel de la culture des spores provenant des cadavres	182
4 -	DISCUSSION	185
5 -	CONCLUSION	187
	CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	188
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	193
	RESUMÉ.....	212
	SUMMARY.....	214

INTRODUCTION

A - REVUE DES PRINCIPAUX MOUSTIQUES NUISANTS ET D'INTÉRÊT MÉDICAL

Environ 2 000 espèces de moustiques ont été recensées sur l'ensemble du globe ; elles sont groupées dans la famille des Culicidés, elle-même divisée en trois sous-familles : Toxorhynchitinae, Anophelinae et Culicinae.

Les Toxorhynchitinae sont représentés par le seul genre *Toxorhynchites*, non hématophage dont les larves sont prédatrices d'autres larves de moustiques.

Les Anophelinae sont essentiellement constitués par le genre *Anopheles* auquel appartiennent tous les vecteurs du paludisme humain.

Les Culicinae regroupent un grand nombre d'espèces vulnérantes pour l'homme et les animaux domestiques. Les genres *Culex*, *Aedes*, *Mansonia* ainsi que *Sabethes*, *Haemagogus* et *Psorophora* en Amérique sont parmi les plus importants.

Rôle des principaux vecteurs en santé humaine

Culex quinquefasciatus est un excellent vecteur de la filariose de Bancroft qui affecte des millions d'individus tant en Afrique de l'Est qu'en Asie (HAMON, 1981). Les *Culex* du groupe *pipiens*, à activité nocturne, constituent dans les villes une sérieuse nuisance pour les habitants. La sous-espèce *Culex pipiens fatigans* est particulièrement agressive et transmet en outre la filariose de Bancroft en Amérique du Sud et sur le pourtour de l'Océan Indien. Les larves sont souvent localisées dans les eaux usées résultant de l'activité humaine (drains, caniveaux, puisards, etc.) ; leur pullulation est souvent le résultat d'une urbanisation incontrôlée.

D'autres espèces de *Culex* sont vectrices d'arbovirus, comme *Culex tarsalis* en Amérique du Nord, qui est le vecteur de l'encéphalite de Saint-Louis et de l'encéphalite équine de l'Ouest. En Extrême-Orient, c'est *Culex tritaeniorhynchus* qui est le vecteur de l'encéphalite japonaise B.

Les anophèles, seuls vecteurs du paludisme, posent un gros problème. En effet, l'endémicité de cette maladie dépend de l'abondance et de la capacité vectorielle des espèces localement impliquées. *Anopheles stephensi* est parmi les moustiques les plus nuisibles dans la région qui s'étend de l'Iran à l'Inde, car ce moustique est un vecteur naturel du paludisme humain à *Plasmodium falciparum* (MOTABAR, 1974 ; SCANLON *et al.*, 1968).

Parmi les *Aedes* les plus importants en santé publique, *Aedes aegypti* vecteur épidémique de la fièvre jaune, de la dengue et d'autres arbovirus est répandu dans toutes les zones tropicales. Les larves sont associées aux réservoirs d'eau de boisson et aux récipients péri-domestiques.

Quelques rappels de la biologie et de l'écologie des moustiques

Le développement des Culicidae comprend une phase aquatique pré-imaginale et une phase aérienne adulte. Les oeufs sont différents suivant les genres et même les espèces (Fig. 1) ; chez les *Culex*, ils sont groupés en nacelles flottantes. Les *Aedes* pondent leurs oeufs isolément à proximité des surfaces aquatiques ; ces oeufs peuvent rester viables pendant les périodes de sécheresse dépassant plusieurs mois. Les oeufs éclosent dans l'eau, libérant des larves qui subissent quatre mues ; de la dernière se dégagent des nymphes, d'aspect tout différent mais qui restent aquatiques, libres et nageuses.

Après l'émergence, les adultes s'envolent ; ainsi débute la phase aérienne marquée par la reproduction de l'espèce.

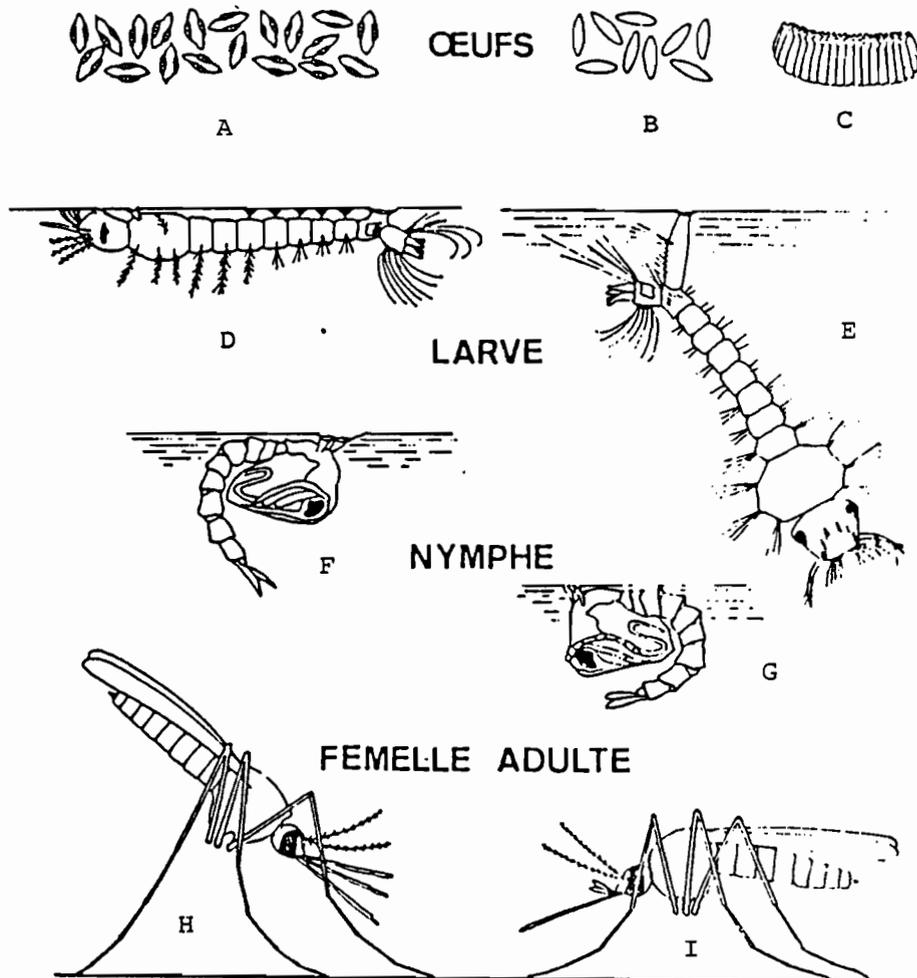
Les femelles ne s'accouplent généralement qu'une fois et peu après leur émergence. La femelle, seule hématophage, prend un repas de sang qui permet la maturation et l'évolution des ovocytes. Certaines espèces comme le moustique urbain *Culex pipiens* dit "autogène" peuvent produire une première ponte sans prendre de repas de sang.

Les mâles se nourrissent exclusivement de jus sucré, ne piquent pas et ne jouent pas de rôle vecteur.

Au point de vue écologique, les moustiques sont généralement adaptés à la plupart des climats du globe. Cependant, chaque espèce a des exigences écologiques bien définies notamment pour ses gîtes larvaires. La durée de la vie est essentiellement dépendante des facteurs climati-

ques. Généralement, le maintien de l'espèce dans les conditions climatiques défavorables de l'hiver peut se faire sous forme d'oeufs (*Aedes*), de larves quiescentes (*Mansonia*) ou de femelles fécondées hibernantes (*Culex*, *Anopheles*).

Fig. 1 : Comparaison des Anophelinae (D, F et H) et des Culicinae (E, G et I). Oeufs d'*Anopheles* (A), d'*Aedes* (B) et de *Culex* (C).



D'après MOUCHET *et al.* (1978)

B - LA LUTTE CONTRE LES MOUSTIQUES

La lutte contre les moustiques a toujours été la préoccupation de l'homme qui a voulu se protéger contre l'agression de ces insectes hématophages. Toutes sortes d'opérations ont été menées, depuis l'assèchement des collections d'eau où se développent les larves de moustiques jusqu'à l'épandage de pétrole sur les eaux stagnantes, en finissant par le trop célèbre DDT découvert en 1939 par MULLER. Depuis cette date, plusieurs produits chimiques ont été mis au point et utilisés pour les campagnes contre les vecteurs majeurs d'endémie. Des succès importants ont été tout d'abord observés, notamment dans la lutte antipaludique (BROWN *et al.*, 1976).

Les difficultés dues à l'utilisation des produits chimiques n'allaient cependant pas tarder à être rencontrées. Les phénomènes de résistance, le manque de spécificité, le déséquilibre des écosystèmes et l'effet rémanent particulièrement chez les insecticides non biodégradables, ont orienté les recherches vers de nouveaux composés qui éviteraient tous ces problèmes (HAMON *et al.*, 1972 ; CHAUVET, 1978).

Diverses méthodes de lutte ont été envisagées pour réduire le potentiel reproducteur d'espèces nocives parmi lesquelles :

- La lutte chimique par de nouvelles substances telles que les inhibiteurs de développement des insectes.
- La lutte génétique par lâcher de mâles stériles ou de mâles portant des translocations (MOUCHET, 1971 ; COZ, 1978).
- La lutte biologique :
 - . de nombreux prédateurs d'insectes d'intérêt médical sont également connus (JENKINS, 1964), parmi lesquels des poissons larvivores comme *Gambusia* ont été particulièrement utilisés.
 - . des agents pathogènes : 1 500 microorganismes sont identifiés comme des agents de lutte potentiels (MILLER *et al.*, 1983). Il semblerait que les insectes ne développent pas de résistance aux microorganismes comme ils le font pour les produits chimiques synthétiques (JULIAN *et al.*, 1973).

Parmi les agents pathogènes, quatre groupes (Bactéries, Champignons, Protozoaires et Virus) sont proposés par l'OMS ; ils ne peuvent être utilisés sans réserve tant que leur innocuité sur la faune non-cible et l'environnement n'a pas été déterminée (OMS, 1982).

Déjà il ressort que *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus* présentent toutes les garanties d'innocuité et l'on peut raisonnablement envisager dans un proche avenir leur emploi à grande échelle.

On dispose donc actuellement de deux agents pathogènes antilarvaires. Le premier est *Bacillus thuringiensis* H-14 ; cette bactérie synthétise lors de la sporogénèse un cristal protéique inclus dans le cytoplasme de la bactérie (δ -endotoxine) qui est toxique pour les larves de moustiques (WATANABE *et al.*, 1967 ; PRASAD and SHETHNA, 1976). C'est le cristal qui constitue le produit larvicide. Cette bactérie peut être formulée essentiellement sous forme de poudre mouillable ou de suspension concentrée (KIRSCHBAUM, 1985). L'action larvicide est donc due à une substance chimique d'origine biologique puisque c'est une bactérie qui l'élabore. L'évaluation en milieu naturel, en Afrique de l'Ouest, de l'activité de *Bacillus thuringiensis* H-14 révèle qu'il ne constitue pas un larvicide idéal ni pour le traitement des gîtes à *Culex quinquefasciatus* (HOUGARD *et al.*, 1983) ni pour celui des gîtes à *Aedes aegypti* (HOUGARD *et al.*, 1985 a). Par contre, le deuxième agent *Bacillus sphaericus*, est très prometteur pour la lutte contre les larves de moustiques, particulièrement les moustiques du genre *Culex*. Son recyclage, envisagé par HERTLEIN *et al.* (1979) et sa spécificité augmentent son intérêt et rendent les perspectives de lutte encore plus prometteuses.

C - *Bacillus sphaericus*

La première souche de *Bacillus sphaericus* var. *fusiformis* a été isolée à partir des larves moribondes de *Culiseta incidens*, en Californie, USA, dénommée K par KELLEN *et al.* (1965). Depuis, plusieurs souches pathogènes pour les larves de moustiques ont été isolées (SINGER, 1973). Quelques années plus tard, le nombre de souches isolées a augmenté, atteignant à peu près 48 souches dont 16 pathogènes et 32 non pathogènes (YOUSTEN *et al.*, 1980). En 1985, de BARJAC *et al.* ont classifié les souches pathogènes de *Bacillus sphaericus* sous les sérotypes H 5a, 5b et H 25.

En fait, depuis 1980, *Bacillus sphaericus* est considéré par le groupe scientifique de travail sur le contrôle biologique des vecteurs (OMS, 1980), comme priorité numéro deux, c'est-à-dire comme agent susceptible d'être expérimenté dans la nature. Ceci stimule certainement les nombreux travaux sur cette bactérie.

La nature de la toxine de *Bacillus sphaericus* n'est pas encore connue ; elle est présente dans la bactérie pendant toute la durée de sa croissance (FAST, 1982) et notamment à la phase de sporulation. C'est dans cette dernière phase que la plupart des souches pathogènes montrent leur plus grande toxicité (MYERS and YOSTEN, 1978 et 1980). La toxine ne se présente pas comme un cristal parasporal, comme dans le cas de *Bacillus thuringiensis* (SINGER, 1973 et 1974 ; MYERS and YOSTEN, 1978). Une inclusion dans les spores de la souche 1593 a été mise en évidence ; elle est localisée dans la tunique "cell wall" et, avec une moindre fréquence, dans le protoplasme (DAVIDSON, 1981 a). Toutefois, cette inclusion est indifféremment rencontrée chez les souches pathogènes et non pathogènes. DAVIDSON and MYERS (1981) ont démontré la présence d'une inclusion parasporale toxique dans les spores de la souche 2297 ou MR 4. La toxine de *Bacillus sphaericus* est stable, ce qui fait de cette bactérie un candidat pour la production industrielle (MYERS and YOSTEN, 1980). Cependant, des laboratoires ont déjà envisagé la commercialisation de *Bacillus sphaericus*, notamment la souche 2362 la plus toxique (LACEY and UNDEEN, 1986).

Le travail rapporté ici se consacre plus particulièrement à l'étude des souches 1593-4, 2362 et 2297 qui sont les plus actives. La dominance de *Culex pipiens* comme modèle d'étude est due à sa grande sensibilité parmi les espèces culicidiennes.

L'étude comprendra neuf chapitres :

- une étude comparative de l'activité larvicide de différentes souches permettra de déterminer les souches les plus actives (premier chapitre).
- le mode d'action de *Bacillus sphaericus* sur le tube digestif de quatre espèces de moustiques sera analysé. Une place importante sera accordée à la cytopathologie chez *Culex pipiens*, espèce la plus sensible (deuxième chapitre).

- une autre étude est consacrée à l'action de la bactérie sur le cycle plasmodial chez l'*Anopheles* (troisième chapitre).
- sur le terrain, des études préliminaires seront abordées dans le chapitre 4. D'autres expérimentations sur l'application des différentes formulations de *Bacillus sphaericus* dans la nature seront détaillées dans les chapitres 5 et 6 : études entomologiques et bactériologiques.
- l'influence de différents facteurs sur l'efficacité et la persistance de *Bacillus sphaericus* dans différents milieux et types d'eau (septième chapitre). D'autre part, la stabilité des poudres lyophilisées en fonction de la température et le devenir de la matière active dans le milieu aqueux seront étudiés dans le huitième chapitre.
- le neuvième chapitre se rapporte au recyclage de *Bacillus sphaericus* dans les larves de moustiques. Nous étudierons également la toxicité due aux spores recyclées dans les larves intoxiquées.

CHAPITRE I

ETUDE COMPARATIVE DE L'ACTIVITE LARVICIDE DE DIFFERENTES SOUCHES DE *BACILLUS SPHAERICUS*

1 - GÉNÉRALITÉS

La plupart des poudres de *Bacillus sphaericus* élaborées au laboratoire ou au niveau industriel dans le monde, sont distribuées par l'O.M.S. (Genève) à plusieurs laboratoires intéressés par ce problème dont celui d'Entomologie médicale des Services Centraux de l'ORSTOM à Bondy (France).

Notre rôle a été, d'une part, de contribuer à l'étude de l'activité larvicide de diverses poudres à base de *Bacillus sphaericus* essentiellement vis-à-vis de *Culex pipiens*, le moustique le plus sensible à cette bactérie, et d'autre part, d'étudier la sensibilité différente de trois genres de moustiques *Culex*, *Anopheles* et *Aedes* à la souche standard 1593-4.

2 - MATÉRIEL

2.1. Les souches de *Bacillus sphaericus*

L'activité larvicide de 17 poudres de différentes souches de *Bacillus sphaericus* a été évaluée sur *Culex pipiens*. Les poudres sont identifiées par un numéro de souche, un nom ou un numéro de code. Les produits sont de provenance différente :

Provenance des poudres à base de *Bacillus sphaericus*

<u>Souche</u>	<u>Nom ou code de la poudre</u>	<u>Provenance</u>
1593-4	RB 80	Institut Pasteur (Labo. de Lutte biologique II)
2297 ou MR 4	SPH 84	
2297	India	Dr Quelennec O.M.S. Genève
1593	India	
2362	India	
2297	Dulmage	
2362	Dulmage	
2362	ABG n° 6184	Labo. d'ABBOTT - U.S.A.
	VBC - powder	Dr Coppleston VBC - OMS Genève
	B.S. 101-51	Dr Dubitskij - OMS Genève
2297 ou MR 4	B.S. 40	O.M.S. Genève
	R 2084 A	
	R 2084 B	
	R 2089 B	
	R 2115 A	
2362	IF 109 SD	
2362	B.S. 48	

2.2. Les moustiques testés

D'après nos études préliminaires (KARCH, 1984), sur les trois genres de moustiques (*Culex*, *Anopheles* et *Aedes*), *Culex* est le genre le plus sensible à *Bacillus sphaericus*. Le choix de *Culex pipiens* pour cette étude est basé non seulement sur sa sensibilité à la bactérie mais également sur la disponibilité des larves en grande quantité dans notre laboratoire.

3 - MÉTHODES

3.1. Techniques et conditions d'élevage

Les souches des moustiques maintenues en élevage continu dans notre insectarium (à l'ORSTOM Bondy-France) sont les suivantes :

- . *Culex pipiens* Linné, 1758, souche "Montpellier" ;
elle est en élevage continu depuis 1979.
- . *Anopheles stephensi* Liston, 1901, souche "Museum" ;
elle provient de l'Irak (1973).
- . *Aedes aegypti* Linné, 1762, souche "Bora Bora" ;
elle provient de Polynésie (1974).

- . *Aedes caspius*, Pallas, 1771, souche "Koweit" ;
elle provient du Koweit (1978).

A - Les adultes

Les moustiques adultes de chaque espèce sont placés dans des cages de tulle blanc disposant d'un cristalliseur-pondeur ; pour les *Aedes*, un papier filtre plonge dans l'eau du pondeur pour y recevoir les oeufs. Les imagos sont nourris au jus sucré (mâles), sur cobayes (femelles d'*Anopheles* et d'*Aedes*), et sur coq (femelles de *Culex pipiens*). L'atmosphère est maintenue à une température de $26^{\circ} \text{C} \pm 1$ et à 70-80 % d'humidité relative.

B. Les oeufs

Les oeufs d'*Anopheles* et de *Culex* pondus sont retirés après chaque ponte et déposés dans un cristalliseur où éclosent les jeunes larves. Les oeufs d'*Aedes* sont laissés tels quels sur le papier filtre jusqu'à dessiccation. Ces oeufs peuvent être conservés à l'état sec pendant environ six mois : ceci permet un élevage aisé de cette espèce.

C. Les larves

Après éclosion, les larves, élevées dans l'eau du robinet, sont nourries une fois par jour avec de la poudre de biscuit pour souris. La durée de la vie larvaire varie suivant les conditions et notamment la température (la température du larvarium est de $26^{\circ} \text{C} \pm 1$; plus la température est basse, plus la durée de la vie est longue).

D. Les nymphes

Les nymphes sont prélevées quotidiennement à l'aide d'une pipette, et placées dans un petit cristalliseur d'eau. Ces cristalliseurs sont ensuite mis dans des cages d'où l'émergence.

3.2. Méthodes de titrage biologique

Le titrage biologique consiste à faire une évaluation de la sensibilité aux insecticides. La méthode adoptée dans cette étude est celle préconisée par l'OMS (1963). Il s'agit de préparer une suspension-mère de 10 mg/l (10 mg de poudre à tester dans un litre d'eau permutée), à partir de laquelle les dilutions inférieures sont réalisées.

Tout d'abord, nous procédons au tri des larves de moustiques par groupe de 25, dans des tubes en plastique contenant quelques ml d'eau du robinet. Afin d'éviter la baisse de concentration de la suspension bactérienne à tester par l'apport d'eau supplémentaire, les larves sont filtrées sur le tulle moustiquaire d'une petite passoire. Elles sont rapidement immergées dans un gobelet en plastique transparent contenant 150 ml d'une dilution de la souche de *Bacillus sphaericus* à tester.

La lecture d'un test sur les larves stades 3 et 4 jeunes s'effectue après 48 h et 72 h de contact. L'effet maximal bactérie-larve s'observe après 48 h de contact (OMS, 1979).

Par principe, les larves disparues sont considérées comme mortes. Les larves nécessitent un apport nutritif au cours de chaque test, étant donné qu'en l'absence de nourriture, une forte mortalité apparaît dans les lots témoins (BOURGOUIN et de BARJAC, 1980). Tous les tests ont été réalisés dans les conditions du laboratoire à une température de 25° C \pm 2.

3.3. Analyse des résultats

Le calcul du pourcentage de mortalité observée est corrigé en tenant compte de la mortalité dans le témoin grâce à une formule dite

$$\text{d'ABBOTT : } M \% \text{ corrigée} = \frac{M \% \text{ observée} - M \% \text{ témoin}}{100 - M \% \text{ témoin}} \times 100$$

Le test n'est valable que si la mortalité témoin est inférieure à 20 %.

La présentation graphique directe, en échelle arithmétique, des pourcentages de mortalité donne des courbes sigmoïdes assez peu maniables. C'est pourquoi, on préfère leur faire subir quelques transformations. Elles sont fondées sur un double changement de variable et de fonction qui permet d'obtenir une droite à partir des résultats expérimentaux. Le double changement de variable consiste à remplacer les proportions de morts par leur probit et les doses par le logarithme de leur valeur. La sigmoïde devient alors une droite de Henry. La représentation graphique aboutit donc à une droite permettant ainsi une détermination aisée des doses létales (DL 50, DL 90).

En fait, nos résultats ont été exploités par ordinateur à l'aide d'un programme d'analyse log-probit.

4 - RÉSULTATS

Afin de déterminer les DL 50 et les DL 90 pour les différentes poudres et souches de *Bacillus sphaericus*, des essais préliminaires ont été réalisés sur les larves de *Culex pipiens*. Cela permet de resserrer les concentrations entraînant une mortalité (16 à 84 %) pour mieux cerner les DL 50 et les DL 90.

En fait, la mortalité obtenue est variable du fait que les poudres de *Bacillus sphaericus* sont peu suspensibles et douées de propriété d'auto-agrégation ; ceci confère aux suspensions une certaine hétérogénéité quelle que soit l'intensité de l'agitation.

4.1. Spectre d'efficacité de la souche standard 1593-4 sur différentes espèces de moustiques

Cette étude est réalisée sur les larves de *Culex pipiens*, *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* et *Aedes caspius*. Les résultats sont portés au tableau (1) ; il ressort que les larves de *Culex pipiens* sont les plus sensibles à la souche standard 1593-4 de *Bacillus sphaericus*, les larves d'*Anopheles stephensi* sont moyennement sensibles alors que les larves d'*Aedes aegypti* sont très peu sensibles. De plus, il est à noter que les larves d'*Aedes caspius* ne sont pas sensibles à une dose de 5 mg/l ; il a fallu une forte dose de 10 mg/l, pour obtenir une légère mortalité (6 %) après quatre jours de contact.

Ces variations de sensibilité paraissent liées aux espèces de moustiques. En effet, les travaux de BOURGOUIN (1981), PILLAI (1981), DAGNOGO et COZ (1982 a) ont noté ces mêmes variations, notamment la forte sensibilité de *Culex* à un grand nombre de souches pathogènes de *Bacillus sphaericus*. C'est pour cette raison que nous avons orienté l'étude de l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* particulièrement sur *Culex pipiens*.

4.2. Relation entre le stade larvaire et l'activité larvicide

L'activité larvicide des deux souches les plus actives de *Bacillus sphaericus* 2297 (B.s. 40) et 2361 (B.s. 48) a été également évaluée sur des larves de stades 2 et 3 de *Culex pipiens* "souche Montellier".

- sur le stade 2 : la mortalité observée sur ce stade a été remarquablement significative après 24 h de contact, ce qui nous oblige à

nous fonder sur une seule lecture, qui est celle après 24 h de contact, pour le calcul de la DL 50 et la DL 90. La comparaison entre ces DL (tableau 2) pour les deux souches montre que la souche 2362 (*B.s.* 48) est relativement deux fois plus active que la souche 2297 (*B.s.* 40).

- sur le stade 3 : la mortalité de larves de stade 3 n'est effective qu'après 48 h de contact à un taux voisin ou identique à celui obtenu après 24 h avec le stade 2 (tableau 3).

Les DL 50 et DL 90 de deux souches utilisant le stade 2 (24 h de contact) ou stade 3 (48 h de contact) sont sensiblement identiques. Cette observation nous amène à un choix d'utilisation de stade larvaire en tenant compte du temps de contact. En effet, il est préférable d'utiliser le stade 3 ou le stade 4 jeune pour le titrage biologique, car les larves les plus jeunes de *Culex pipiens* sont très sensibles et difficilement maniables, alors que l'utilisation des stades 3 et 4 jeunes, facilite la manipulation. Cependant, le problème posé est que l'action de *Bacillus sphaericus* est lente, ce qui oblige à poursuivre les expériences jusqu'à 48 h ou même 72 h ; la mort n'apparaît qu'après un long temps d'observation ; aussi, l'utilisation du seul stade 4 risquerait d'entraîner une nymphose importante au cours de l'expérience. Or, il est indispensable de décompter les nymphes, particulièrement lorsqu'on évalue l'activité d'un insecticide actif par ingestion, car les nymphes ne se nourrissent pas.

4.3. Evaluation de l'activité larvicide de diverses poudres à base de *Bacillus sphaericus*

Les effets de 17 poudres à base de *Bacillus sphaericus* sont évalués sur les stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens*. Les résultats sont résumés dans le tableau (4). Il en ressort que les souches 2362 (*B.s.* 48), 2297 (*B.s.* 40) et 1593-4 sont les plus efficaces parmi les souches testées dans cette étude.

Selon leur efficacité, les 17 poudres testées peuvent être classées en quatre groupes :

- très active : 2362 (*B.s.* 48), 2297 (*B.s.* 40), 2362 ABG n° 6184, 1593-4 et VBC-powder.

- active : 1593-India, 2362 IF 109 SD, 2297 (SPH 84), 2297 Dulmage, 101-51, 2362 Dulmage et 2397-India.

Tab. 1 : Efficacité de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* sur le 3ème stade larvaire de trois espèces de moustiques.

Espèce	48 H		72 H	
	DL 50	DL 90	DL 50	DL 90
<i>Culex pipiens</i>	0,0051	0,0265	0,0025	0,0092
<i>Anopheles stephensi</i>	0,064	0,296	0,041	0,164
<i>Aedes aegypti</i>	4,81	44,65	-	-

Tab. 2 : Efficacité de deux souches de *Bacillus sphaericus* sur le stade 2 de *Culex pipiens*.

La lecture est effectuée après 24 h de contact.

souche	DL 50 (mg/l)	DL 90 (mg/l)
2297 (B.S. 40)	0,0029	0,0119
2362 (B.S. 48)	0,0014	0,0064

Tab. 3 : Efficacité de deux souches de *Bacillus sphaericus* sur le stade 3 de *Culex pipiens*.

La lecture est effectuée après 48 h de contact.

souche	DL 50 (mg/l)	DL 90 (mg/l)
2297 (B.S. 40)	0,0023	0,0172
2362 (B.S. 48)	0,0019	0,0053

Tab. 4 : Activité des diverses poudres de *Bacillus sphaericus* sur les larves L₃ et L₄ jeunes de *Culex pipiens* ; résultat après 48 h de contact.

poudre à base de <i>B. sphaericus</i>		stade larvaire	DL 50 (mg/l)	DL 90 (mg/l)
souche	nom ou code de la poudre			
2362	<i>B.s.</i> 48	L ₃	0,0019	0,0053
2297 ou MR 4	<i>B.s.</i> 40	L ₃	0,0023	0,0172
2362	ABG n° 6184	L ₄	0,005	0,017
1593-4	RB 80	L ₃	0,0051	0,0265
	VBC-powder	L ₃	0,0082	0,0672
1593	India	L ₄	0,01	1,540
2362	IF 109 SD	L ₃	0,012	0,075
2297 ou MR 4	SPH 84	L ₄	0,013	0,0316
2297	Dulmage	L ₄	0,017	1,06
	<i>B.s.</i> 101-51	L ₃	0,019	-
2362	Dulmage	L ₄	0,022	0,07
2397	India	L ₄	0,032	0,778
2362	India*	L ₄	-	-
	R 2089 B	L ₃	0,188	2,077
	R 2084 B	L ₃	0,375	1,579
	R 2084 A	L ₃	1,513	4,662
	R 2115	L ₃	1,78	5,385

* Cette souche 2362-India n'était guère active. La mortalité corrigée a été de 20 % à la dose de 10 mg/l.

- activité moyenne : R 2089 B et R 2084 B.
- peu active : R 2084 et R 2115 A.

5 - DISCUSSION - CONCLUSION

Il est à noter que les larves de *Culex pipiens* sont onze fois plus sensibles que celles d'*Anopheles stephensi*. Quant aux larves d'*Aedes aegypti*, elles sont peu sensibles, ce qui va dans le sens des résultats de SINEGRE *et al.* (1980 b) ; RAMOSKA and HOPKINS (1981) ; DAGNOGO et COZ (1982 a), qui ont montré également qu'il existe une sensibilité différente des larves d'*Anopheles* non seulement entre les espèces mais également entre les souches d'une même espèce.

Plusieurs auteurs (BOURGOUIN *et al.*, 1984 ; LACEY *et al.*, 1984 ; MULLA *et al.*, 1984) ont trouvé que les souches 2362 et 1593 étaient très toxiques pour les larves de *Culex quinquefasciatus*, *Culex tarsalis* et *Anopheles stephensi*.

Les résultats des titrages biologiques des différentes préparations des poudres mouillables sur les larves de *Culex pipiens* indiquent que la toxicité de la même souche diffère d'une poudre à l'autre, cela est apparemment dû à la préparation des poudres de cette même souche sous des conditions différentes d'un laboratoire à l'autre. Par exemple, la souche 2362-India n'est guère active, contrairement à la souche 2362 (B.s. 48) qui est très active et dont la poudre est suspensible dans l'eau, alors que celle de la souche 2362-India l'est très peu, du fait de sa formulation compacte qui occasionne une sédimentation rapide de la matière active (spores). Les souches peu actives (R 2084 et R 2115 A) avaient, elles aussi, ce caractère mais à un moindre degré.

Ces observations nous amènent à prendre en compte le comportement des larves de moustiques avant d'envisager une préparation bactérienne, puisque l'ingestion de cette bactérie est indispensable pour provoquer l'intoxication des larves. Les larves de *Culex* se nourrissent en effet en surface contrairement aux larves d'*Aedes*, qui se nourrissent essentiellement au fond (CHRISTOPHERS, 1960).

Ce comportement vis-à-vis de la nourriture doit être pris en considération, car la sédimentation des spores de *Bacillus sphaericus* qui se produit assez rapidement, (voir chapitre VII) diminue l'activité de cette bactérie.

Enfin, de cette étude peuvent être dégagées principalement :

- la grande spécificité de *Bacillus sphaericus* pour les larves de *Culex* et à un moindre degré pour celles d'*Anopheles*, ce qui offre un matériel de choix pour la lutte contre les deux genres.

- la nette supériorité des poudres (souches 2362 *B.s.* 48 et ABG n° 6184, 2297 *B.s.* 40, 1593-4) sur les autres types de formulations.

L'amélioration des formulations peut donc être obtenue en recherchant des souches bactériennes plus toxiques et en résolvant le problème de la sédimentation rapide de cette bactérie.

Dans le chapitre suivant, nous étudierons les sites d'action de *Bacillus sphaericus* sur des larves sensibles ou non à cette bactérie.

CHAPITRE II

ETUDE CYTOPATHOLOGIQUE DE L'ACTION DE *BACILLUS SPHAERICUS* SUR DES LARVES DE MOUSTIQUES SENSIBLES OU NON A CETTE BACTERIE

1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Larves de moustiques

Cette étude est particulièrement menée sur des larves de *Culex pipiens*, les plus sensibles à *Bacillus sphaericus*. Les larves d'*Anopheles stephensi*, moyennement sensibles, et celles d'*Aedes aegypti* et *Aedes caspius* très peu sensibles, seront également étudiées.

Le 3ème stade larvaire utilisé est considéré comme le meilleur stade pour une étude histologique (RICHINS, 1945).

Selon l'espèce, des concentrations différentes de *Bacillus sphaericus* souche 1593-4 sont utilisées :

- les larves de *Culex pipiens* sont mises en contact avec une concentration de 0,01 mg/l, ce qui représente une dose double de la DL 50 = 0,0051 mg/l.

- les larves d'*Anopheles stephensi* sont mises en contact avec une concentration de 0,13 mg/l et là encore, cette dose représente une dose double de la DL 50 = 0,064 mg/l.

- les larves d'*Aedes aegypti* et *Aedes caspius* sont soumises à une dose de 5 mg/l.

1.2. Technique histologique

Les larves sont mises en contact avec la souche 1593-4. Elles sont prélevées après un temps donné (1/2, 4, 6, 24 et 48 h), les têtes et siphons respiratoires sont coupés, ensuite les larves sont fixées dans du Bouin ou du Carnoy. Parallèlement, des témoins placés dans l'eau permutée sont prélevés et fixés.

Les pièces, après déshydratation dans l'alcool à concentration croissante, et passage pendant deux semaines au moins dans un mélange de

benzoate de méthyle et celloidine, sont incluses dans la paraffine. Les coupes sériées, longitudinales et transversales, d'une épaisseur de 5 μm , sont colorées selon la technique de l'AZAN de Heidenhain (azocarmin et orangé G colorants acides rouges, bleu de Heidenhain colorant basique, acide phosphotungstique, alcool aniliné et alcool acétique) (MARTOJA et MARTOJA, 1967). Les préparations après déshydratation à l'alcool et passage dans le toluène, sont montées au Baume du Canada.

2 - OBSERVATIONS SUR L'ANATOMIE DU TUBE DIGESTIF

Nous avons choisi comme modèle d'étude, le tube digestif d'une larve de *Culex pipiens*. Ce choix est basé sur le fait que les larves de *Culex pipiens* sont les plus sensibles à la bactérie parmi les larves de moustiques.

Notons que cette étude histologique a été inspirée des travaux de plusieurs auteurs (de BOISSEZON, 1930 ; WIGGLEWORTH, 1942 ; CLEMENTS, 1963).

Le tube digestif, précédé de la cavité préorale, est constitué de trois parties : le stomodeum ou l'intestin antérieur, le mésentéron ou intestin moyen et le proctodeum ou intestin postérieur (Fig. 2).

A. Le stomodeum, recouvert d'une intima cuticulaire, comprend deux parties : le pharynx et l'oesophage. A la base de l'hypopharynx confluent des glandes salivaires paires. L'épithélium de l'oesophage s'invagine légèrement dans sa partie distale à l'intérieur du cardia avant de former l'oesophage proprement dit.

B. Le mésentéron, entouré des muscles circulaires internes et des muscles longitudinaux externes, comprend quatre parties : le cardia, les caeca gastriques, l'estomac antérieur et l'estomac postérieur.

. Le cardia : constitue une partie courte, à microvillosités réduites, responsable de la sécrétion de la membrane péritrophique (PETERS, 1976) qui emballe la nourriture pendant son passage le long du mésentéron, assurant la protection de l'épithélium intestinal (Planche 1 : 1,3).

. Les caeca gastriques : constitués de huit évaginations du tractus digestif qui s'ouvrent au voisinage de la valvule oesophagienne ; les cellules sont aplaties, dotées de microvillosités apicales assez longues, jouant un rôle important dans le phénomène d'absorption et les échanges entre les cavités des caeca et l'hémolymphe (Planche 1 : 2,4).

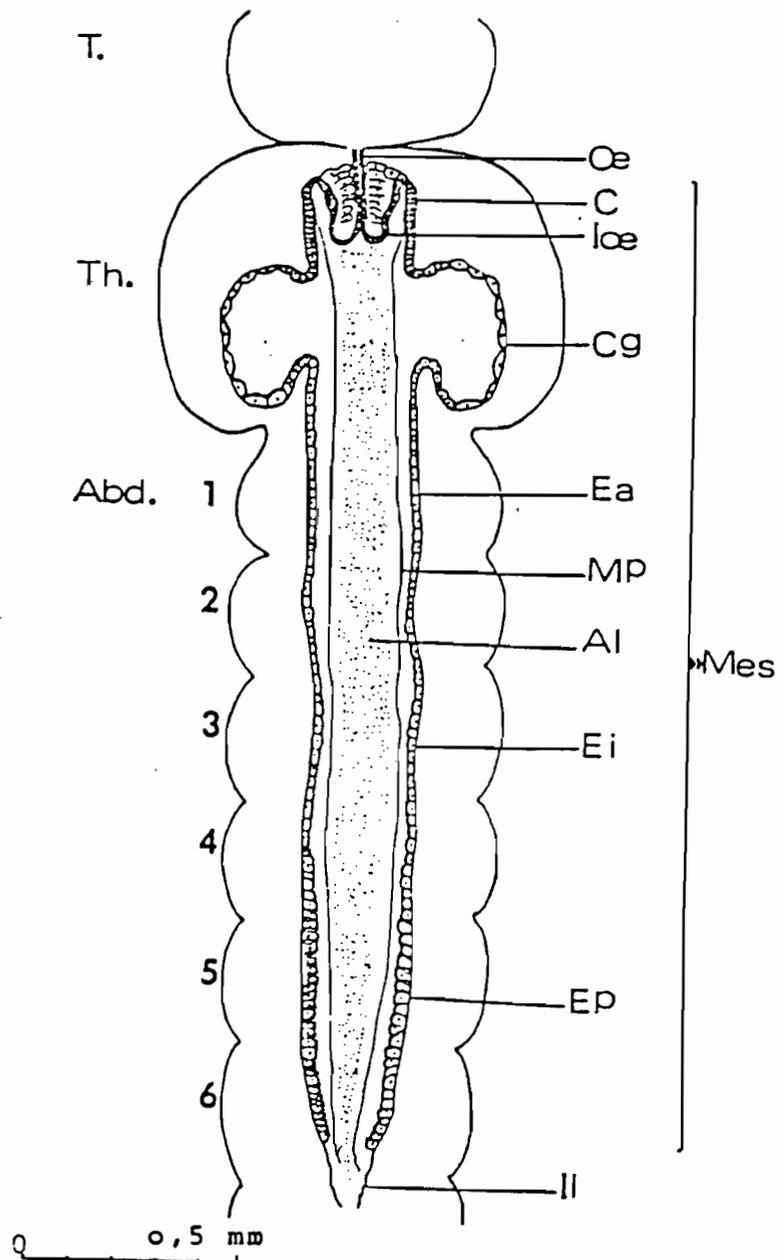


Fig. 2 : Tube digestif d'une larve au stade 3 de *Culex pipiens*;
Organisation générale.

Al : aliments ; C : cardia ; Cg : caeca gastriques ; Ea : estomac antérieur ; Ei : estomac intermédiaire ; Ep : estomac postérieur ; Il : iléon ; Ioe : invagination oesophagienne ; Mes : mésentéron ; Mp : membrane péritrophique ; Oe : oesophage ; T : tête ; Th : thorax ; Abd : abdomen.

Planche 1 : Histologie des différentes parties du stomodeum et du mésentéron, d'une larve de 3ème stade de *Culex pipiens* (Témoin). L'avant de la larve est situé vers le haut de chaque photo. Echelle : le trait représente 100 µm.

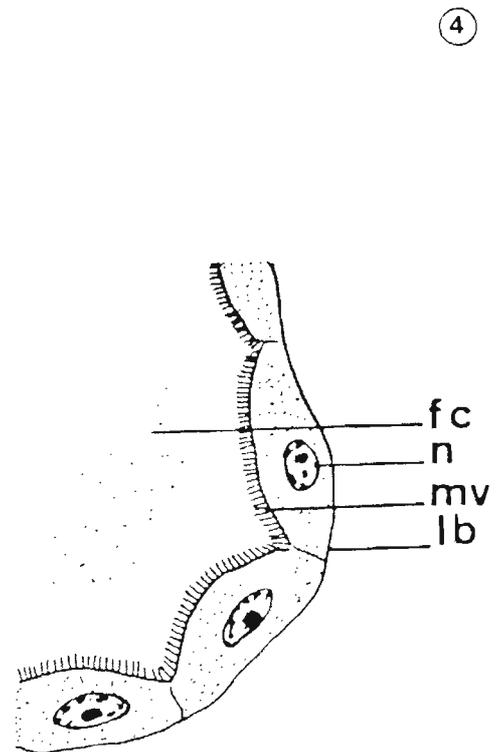
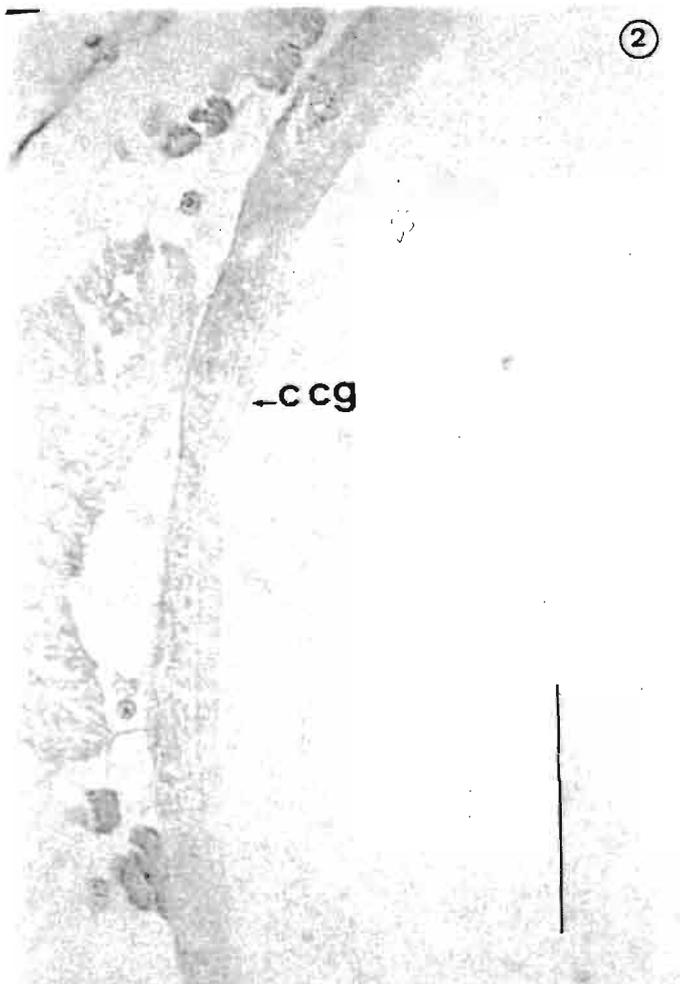
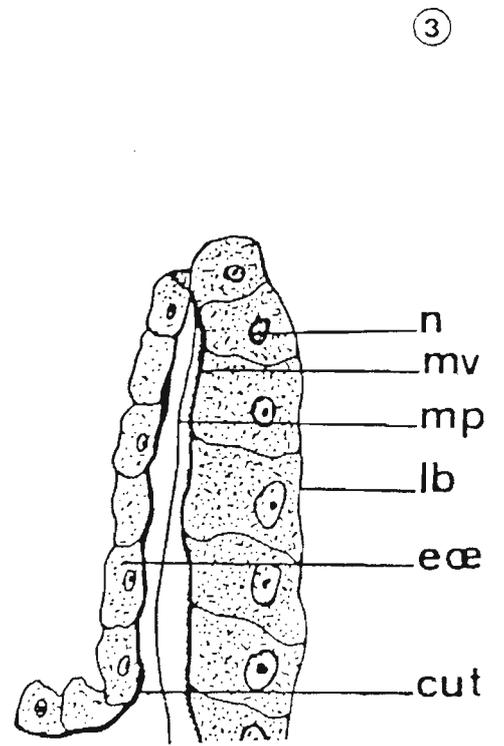
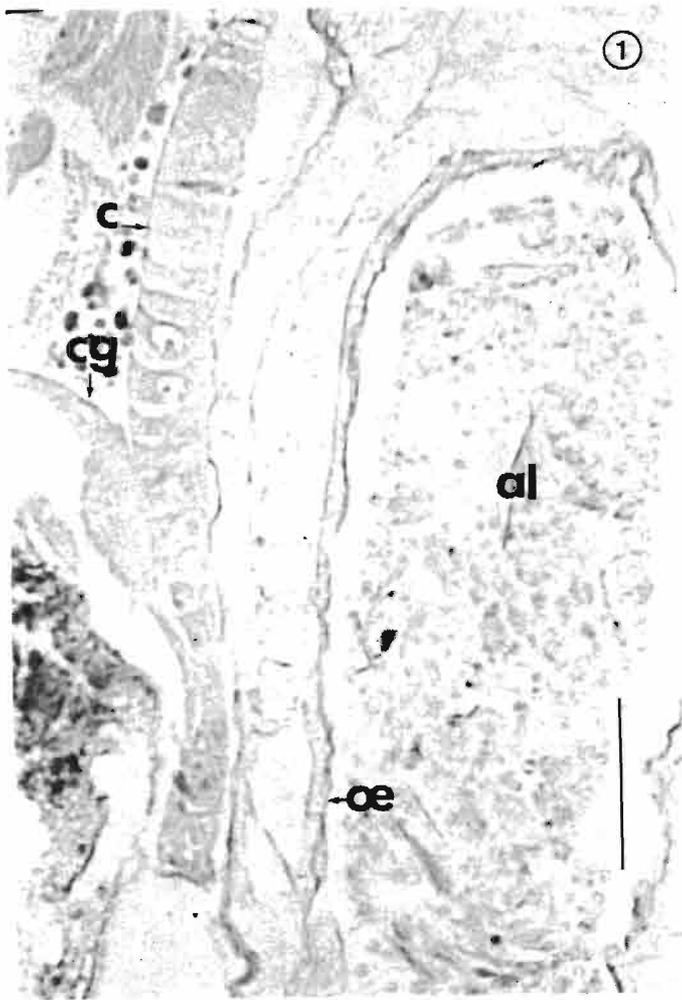
1 : Oesophage et cardia

2 : Cellules des caeca gastriques

3 : Schéma des cellules du cardia

4 : Schéma des cellules des caeca gastriques

al : aliments ; c : cellules du cardia ; ccg et cg : cellules des caeca gastriques ; cut : cuticule de l'épithélium oesophagien ; oe : épithélium oesophagien ; fc : fluide colorable ; lb : lame basale ; mp : membrane péritrophique ; mv : microvillosités apicales ; n : noyau.



. L'estomac antérieur : les cellules sont aplaties, à microvillosités courtes par rapport à celles de l'estomac postérieur (Planche 2 : 5,7).

. L'estomac postérieur : cette région du mésentéron est caractérisée par des cellules à microvillosités longues et fines ; le labyrinthe basal est peu contourné, toujours parallèle à la lame basale. De plus, il y a chez les témoins, des séparations à la base des cellules (Planche 2 : 6,8).

La région entre l'estomac antérieur et l'estomac postérieur est une zone à caractère mixte ou estomac intermédiaire.

C. Le proctodeum : la limite entre le mésentéron et le proctodeum est marquée par une valvule au niveau de laquelle débouchent les 5 tubes de Malpighi. Le proctodeum, recouvert d'une intima cuticulaire, est différencié en une section antérieure ou iléon, et une section postérieure ou rectum qui se termine par le canal anal et ensuite l'anus.

3 - SYMPTOMES PATHOLOGIQUES DUS À L'INGESTION DE *Bacillus sphaericus* PAR DES LARVES DE *Culex pipiens*

L'emploi d'une concentration de 0,01 mg/l de *Bacillus sphaericus* 1593-4 permet d'étudier les modifications cytopathologiques au niveau des cellules mésentériques lors des différentes étapes du processus réactionnel. En fait, seul l'intestin moyen subit de profondes modifications (DAVIDSON, 1979).

3.1. Différents aspects de l'intoxication

Les quatre différentes régions du mésentéron : le cardia, les caeca gastriques, l'estomac antérieur et l'estomac postérieur, ne réagissent pas de la même façon à l'intoxication. Les cellules du cardia ne subissent pratiquement pas de modification, contrairement à celles des caeca gastriques, de l'estomac antérieur et de l'estomac postérieur. Seul ce dernier subit des modifications importantes.

Planche 2 : Histologie des différentes parties du mésentéron, d'une larve du 3ème stade de *Culex pipiens* (Témoin).

5 : Estomac antérieur

6 : Estomac postérieur

7 : Schéma des cellules de l'estomac antérieur

8 : Schéma des cellules de l'estomac postérieur

al : aliments ; cr : cellules de remplacement ; ea : estomac antérieur ; ep : estomac postérieur ; l : lumière du mésentéron ; lb : labyrinthe basal ; mp : membrane péritrophique ; mv : microvillosités apicales ; n : noyau ; sb : séparation à la base des cellules.

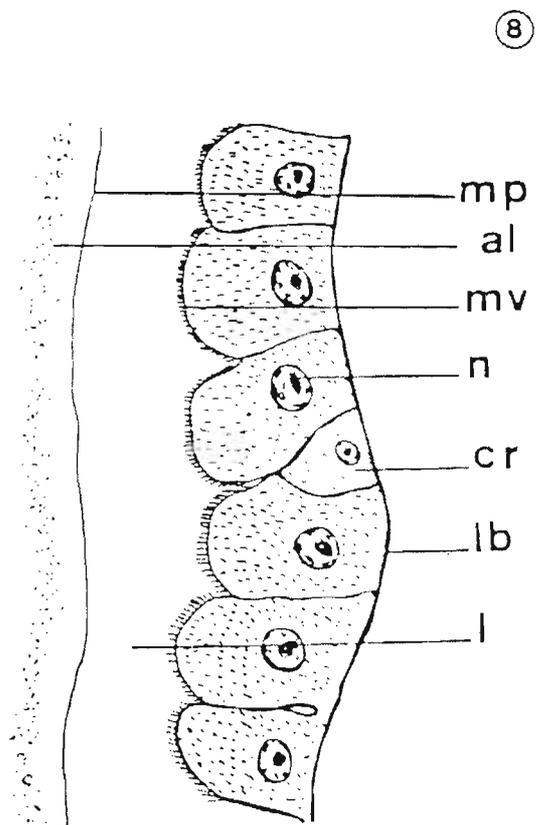
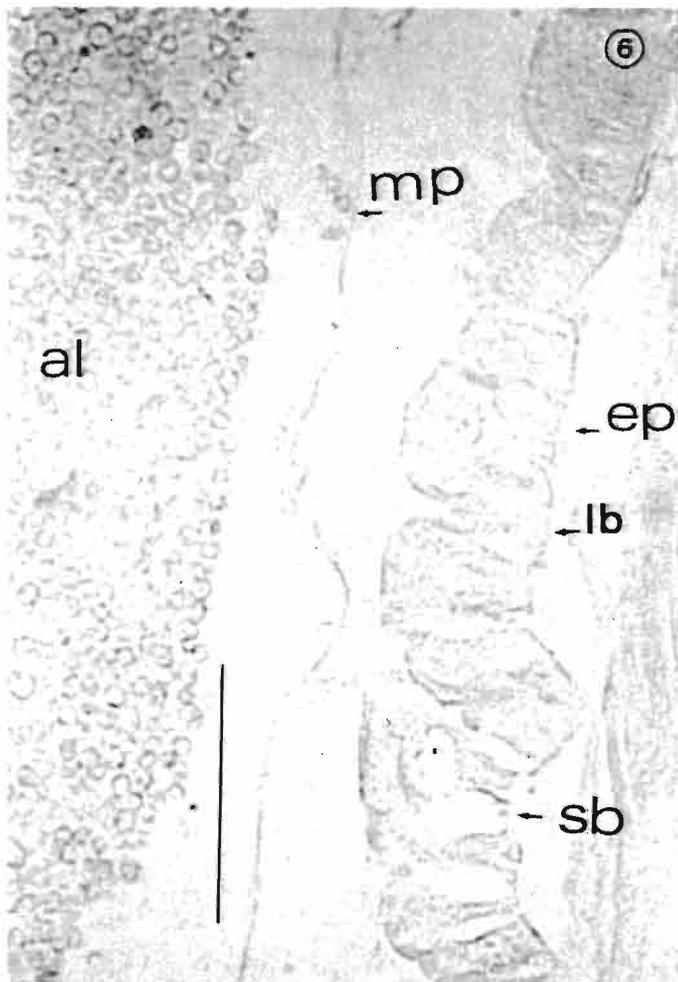
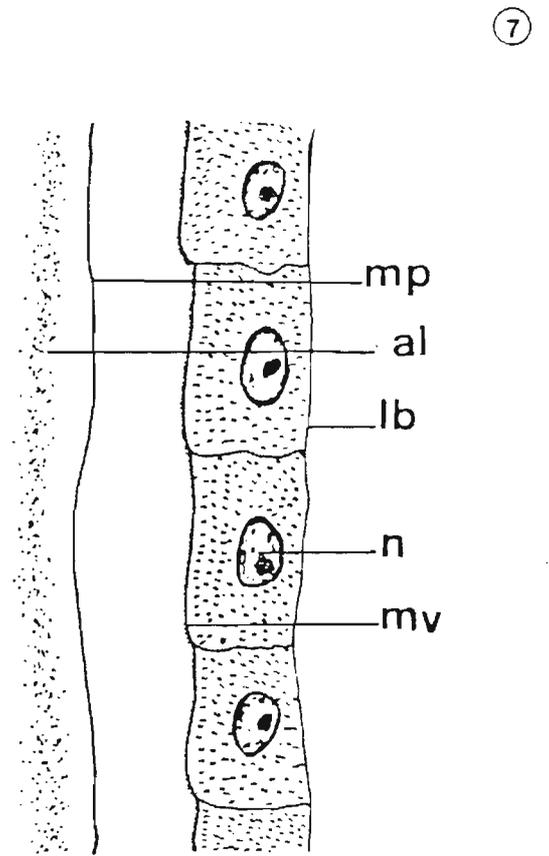
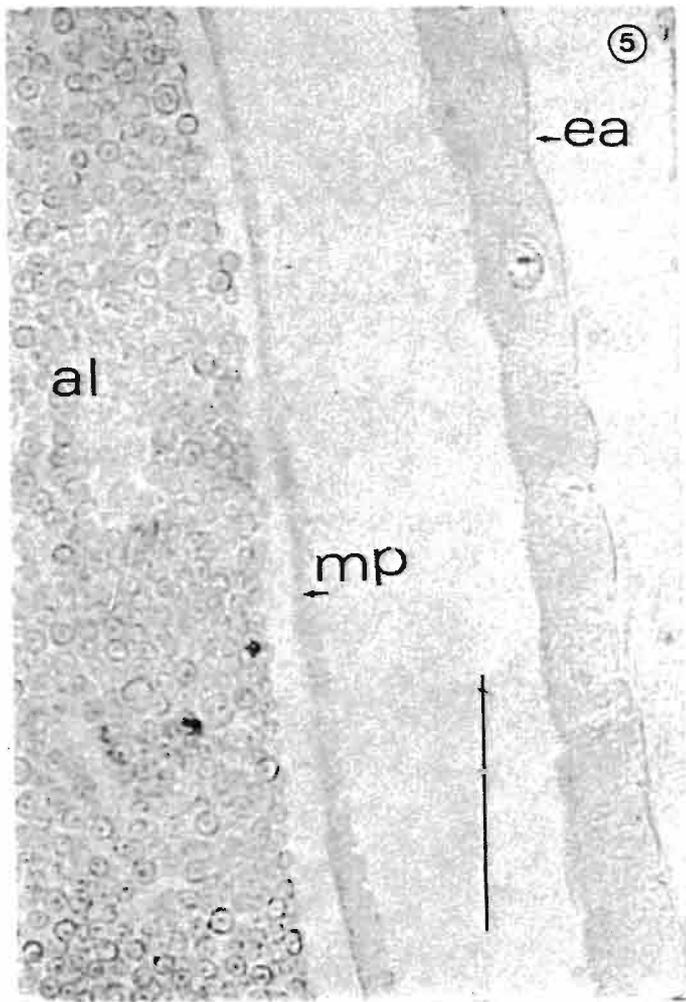


Fig. 3 : Schéma des modifications cytologiques au niveau de l'estomac postérieur dues à *Bacillus sphaericus* (3ème stade larvaire de *Culex pipiens*).

A : contact de 30 minutes

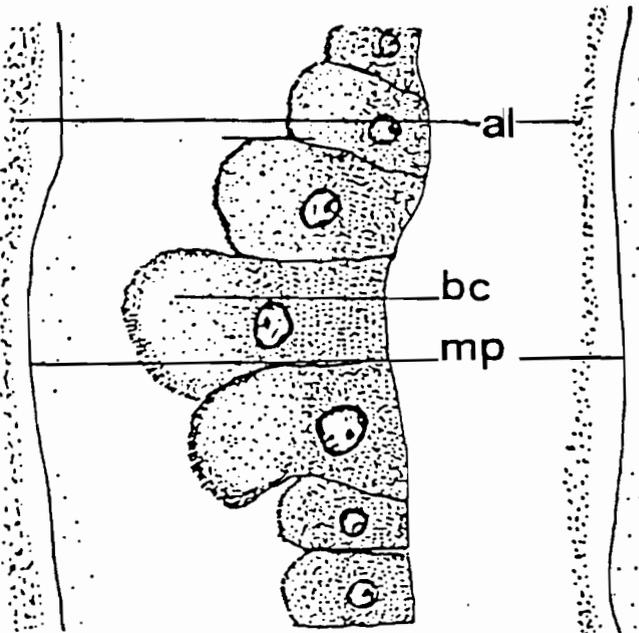
B : contact de 4 heures

C : contact de 6 heures

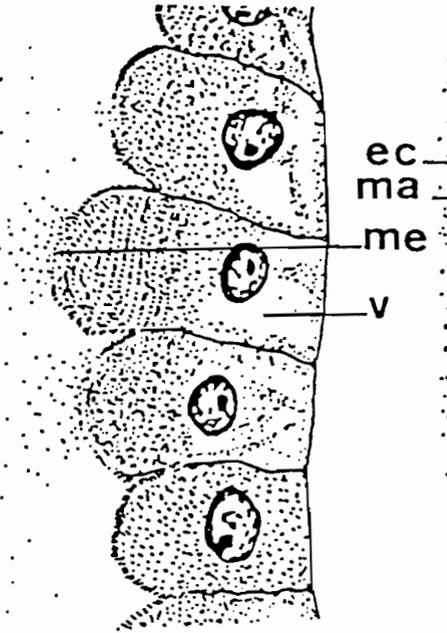
D : contact de 24 heures

E : contact de 48 heures

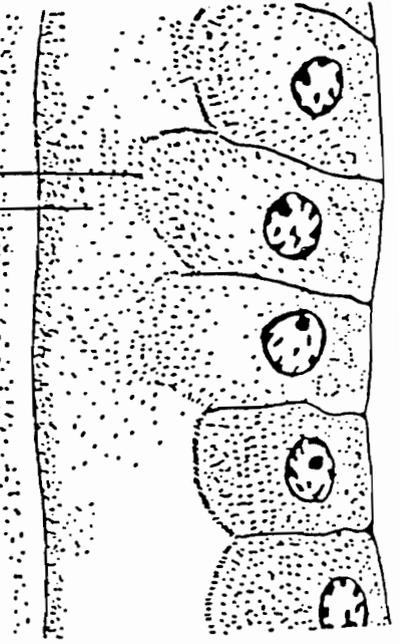
al : aliments ; bc : ballonnement cellulaire ; ec : éclatement cellulaire ; lyc : lyse cellulaire ; ma : matériel cytoplasmique ; me : microvillosités estompées ; mp : membrane péritrophique ; n : noyau ; v : vacuole.



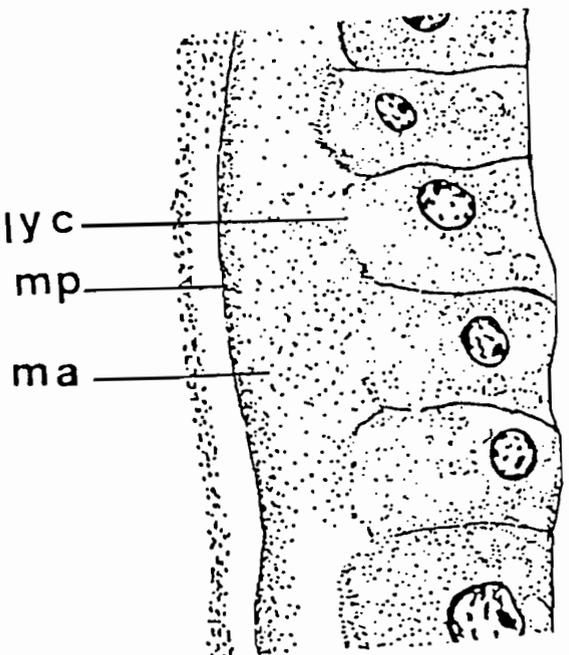
A



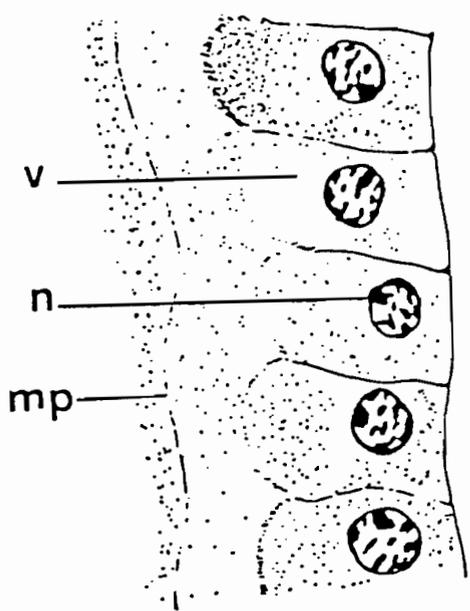
B



C



D



E

Planche 3 : Modifications histologiques au niveau de l'estomac postérieur d'une larve du 3ème stade de *Culex pipiens* après un temps donné de contact avec *Bacillus sphaericus* (coupes longitudinales).

- 9 : après 30 minutes de contact
- 10 : après 4 heures de contact
- 11 : après 6 heures de contact

al : aliments ; b : ballonnement ; e : éclatement cellulaire ;
mp : membrane péritrophique ; v : vacuole à la partie basale des cellules.

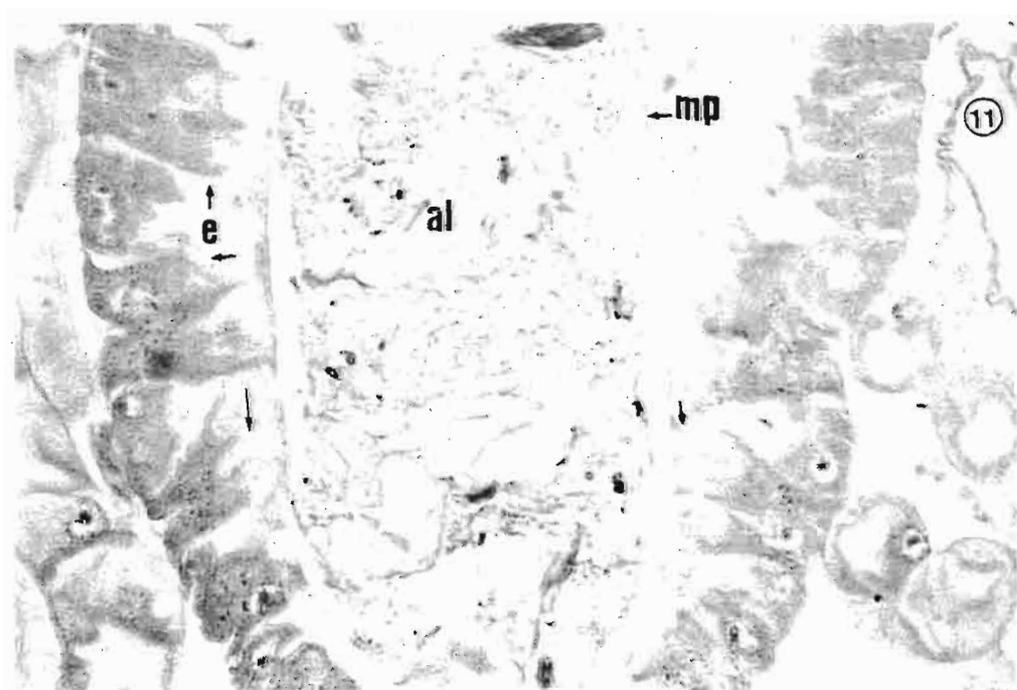
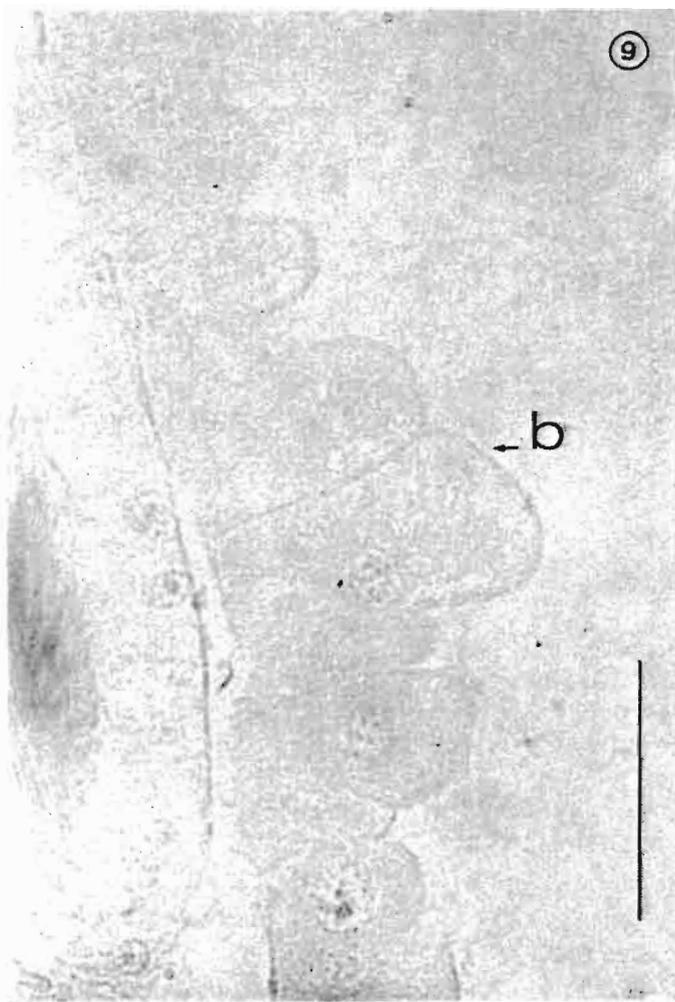


Planche 4 : Modifications histologiques, chez une larve du 3ème stade de *Culex pipiens*, après 24 heures de contact avec *Bacillus sphaericus* (coupes longitudinales).

12 : caeca gastriques et une partie de l'estomac antérieur

13 : estomac postérieur

al : aliments ; b : ballonnement ; ce : cellules éclatées ;
e : éclatement cellulaire ; lyc : lyse cellulaire ; mp : membrane péritrophique.

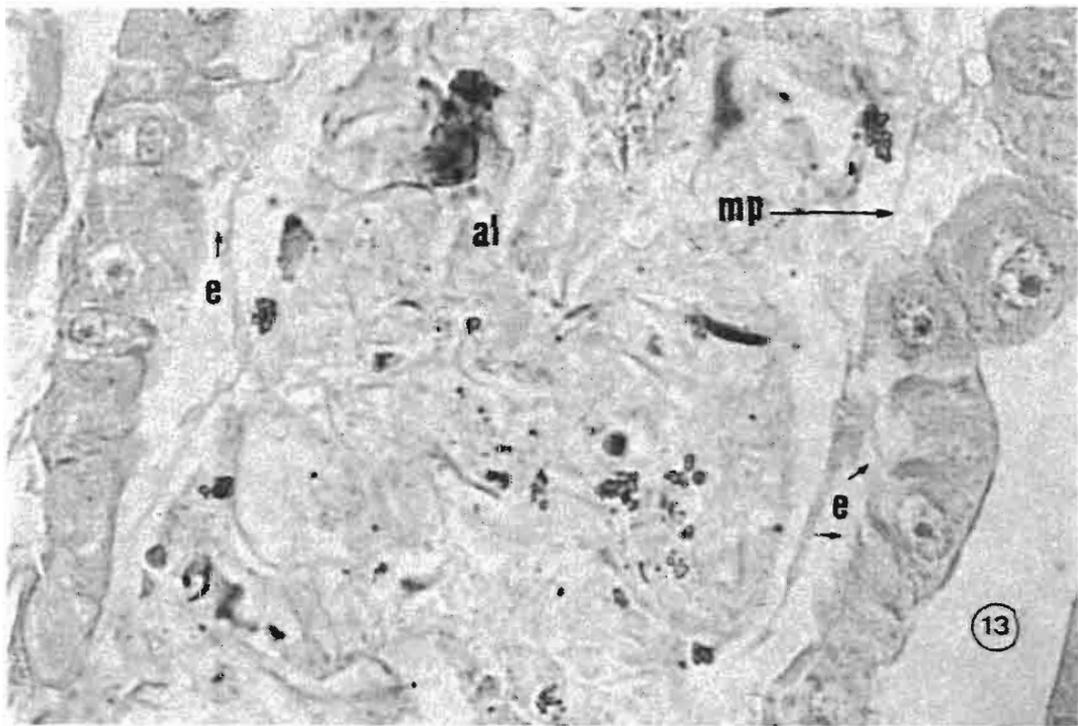
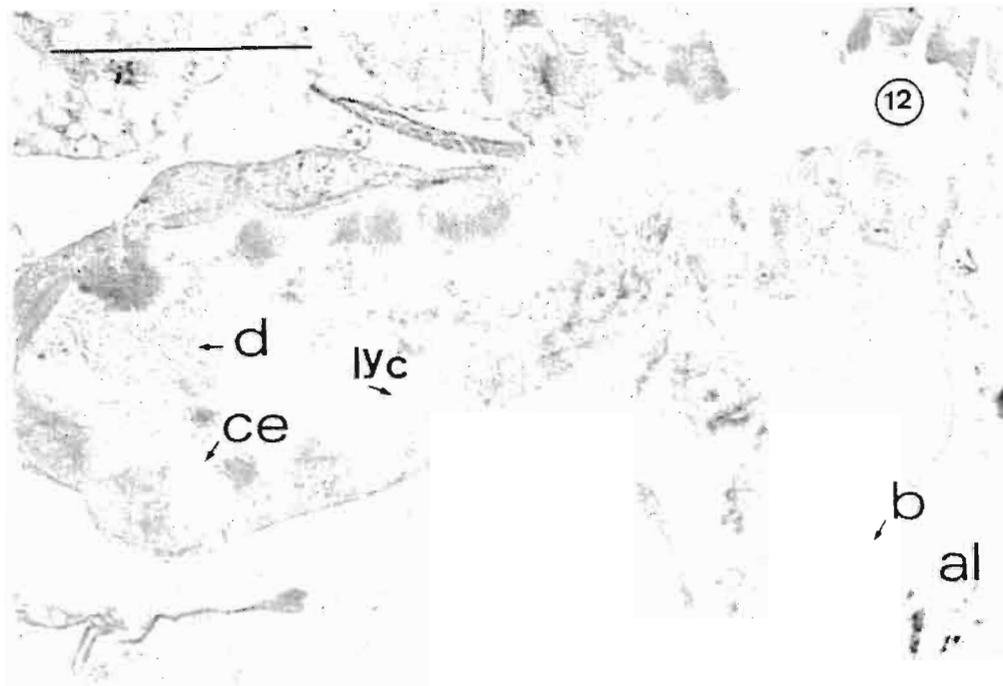


Planche 5 : Modifications histologiques, chez une larve du 3ème stade de *Culex pipiens*, après 24 heures de contact avec *Bacillus sphaericus*.

14 : estomac postérieur (coupe longitudinale)

15 : estomac antérieur (coupe transversale)

16 : estomac intermédiaire (coupe longitudinale)

al : aliments ; b : ballonnement ; e : éclatement cellulaire ;

lyc : lyse cellulaire ; mp : membrane péritrophique.

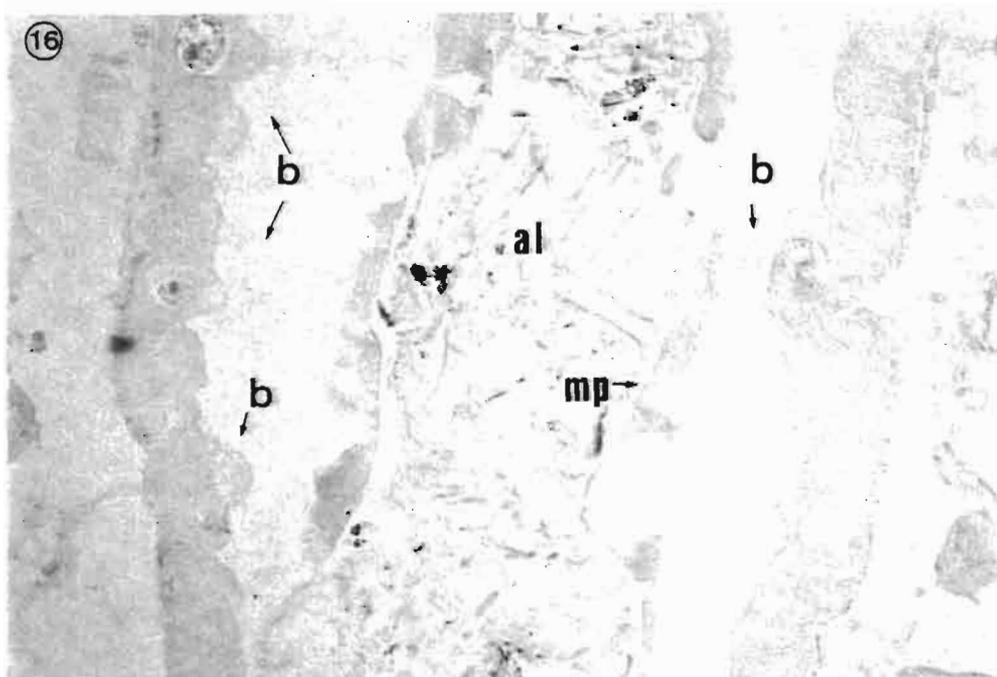
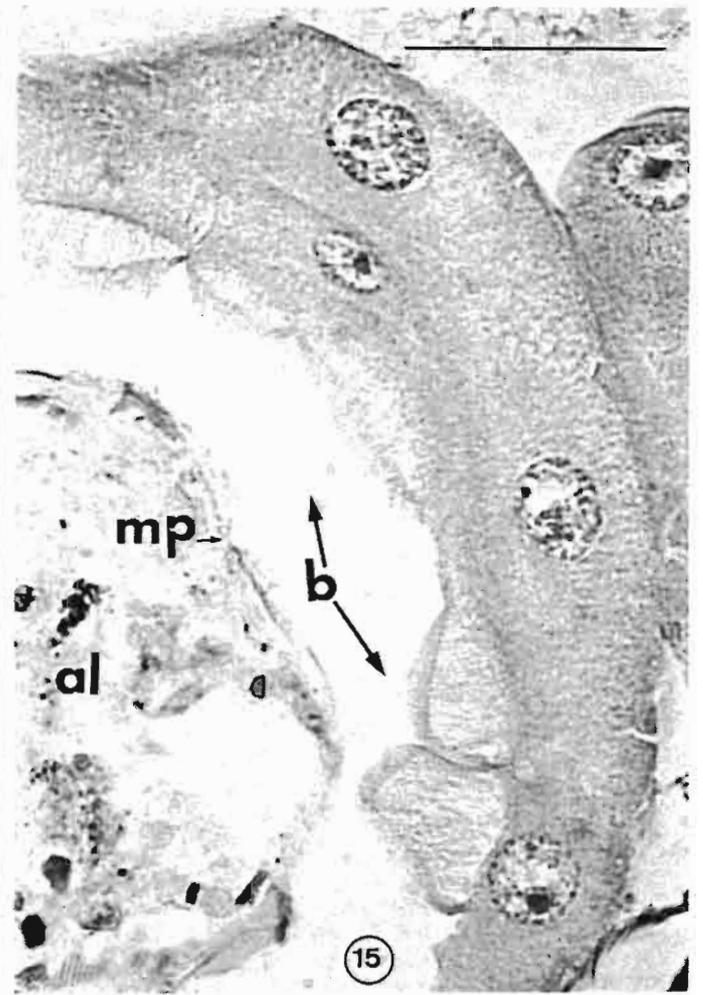
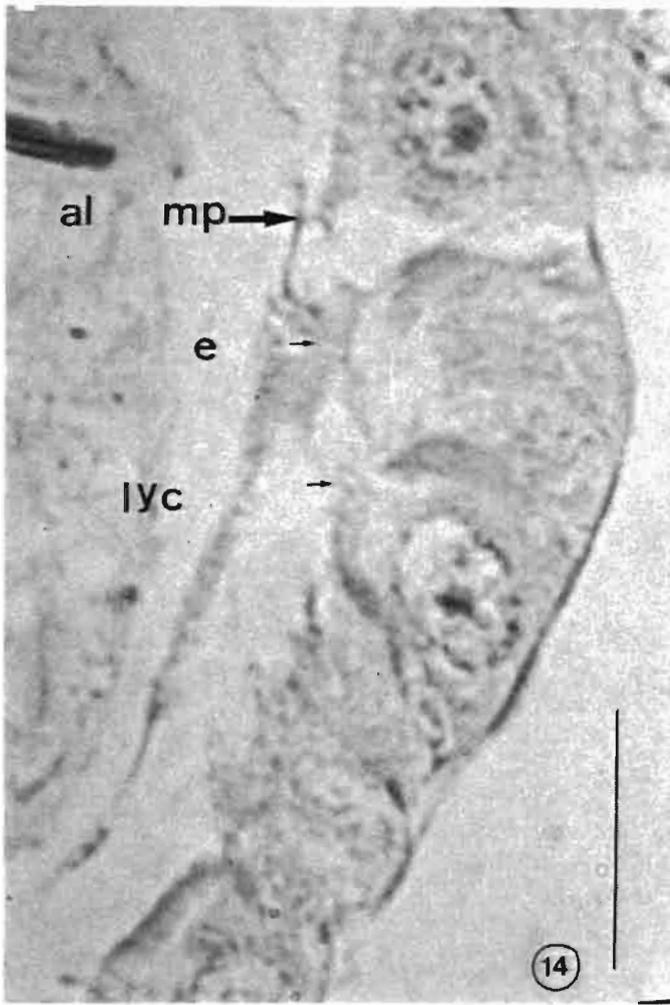


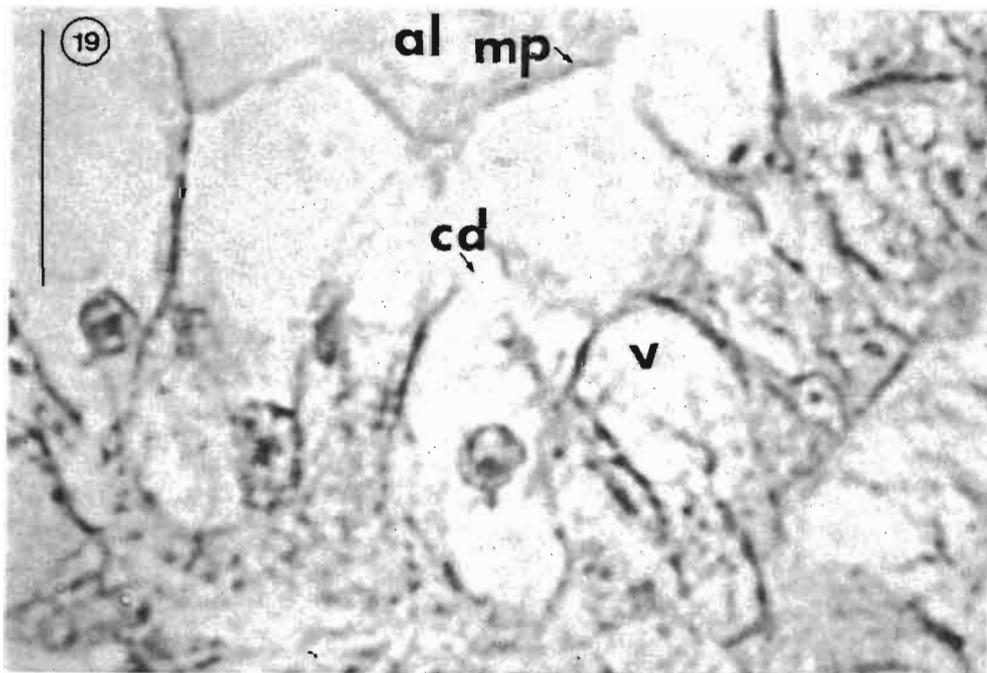
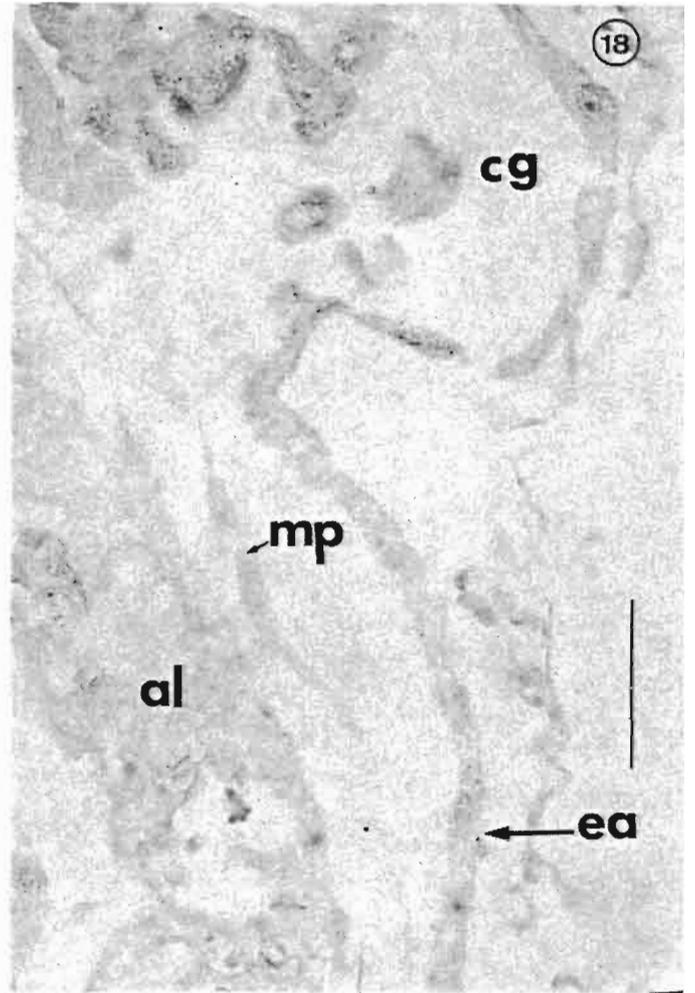
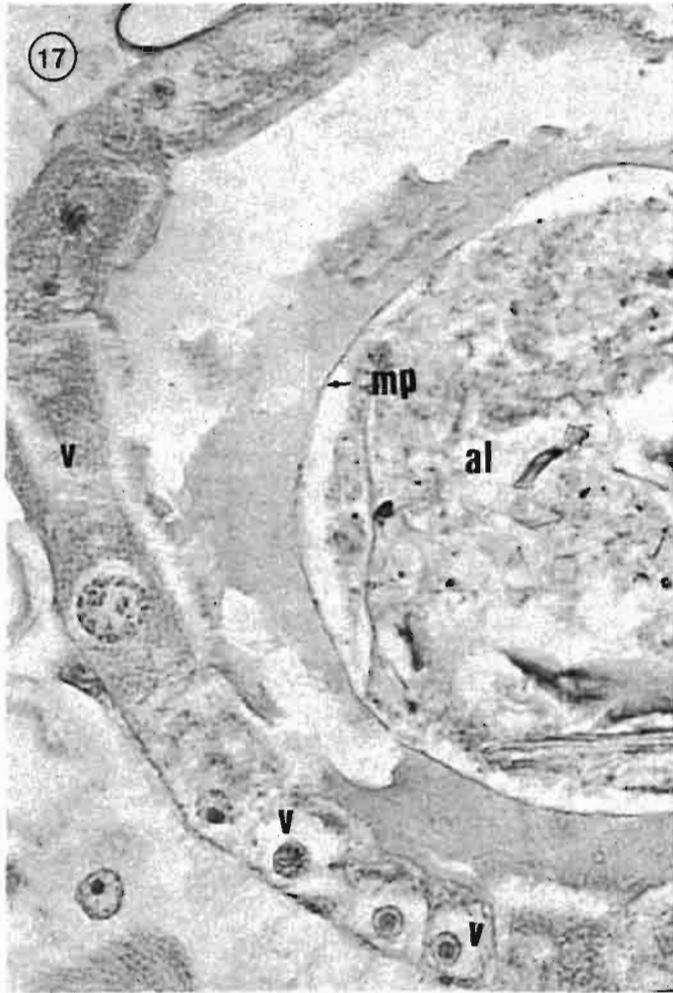
Planche 6 : Modifications histologiques, chez une larve du 3ème stade de *Culex pipiens*, après 48 heures de contact avec *Bacillus sphaericus*.

17 : estomac intermédiaire (coupe transversale)

18 : caeca gastriques et estomac antérieur (coupe longitudinale)

19 : estomac postérieur (coupe transversale)

al : aliments ; cd : cellule détruite ; cg : caecum gastrique ; ea : estomac antérieur ; mp : membrane péritrophique ; v : vacuole.



4 - ACTION SUR LES LARVES D'*Anopheles stephensi*

La concentration de 0,13 mg/l de la souche 1593-4, nous a permis d'observer quelques modifications, notamment sur l'estomac postérieur. En effet, après 24 h de contact, l'épithélium intestinal particulièrement celui de l'estomac postérieur manifeste une importante hypertrophie ou ballonnement, alors qu'après 48 h de contact, nous notons un éclatement des cellules et une perte des microvillosités des cellules atteintes (Planches 7 et 8). Ces planches sont comparables à celles obtenues avec les larves de *Culex pipiens*, mais avec un temps de contact inférieur.

5 - ACTION SUR LES LARVES D'*Aedes aegypti*

Placées dans une suspension à 5 mg/l de la souche 2593-4 durant 48 h, les larves d'*Aedes aegypti* ne sont guère touchées au niveau de l'épithélium intestinal, à l'exception de quelques vacuoles qui apparaissent au niveau de l'estomac postérieur (Planche 9). Ce résultat corrobore le fait que les larves d'*Aedes aegypti* sont très peu sensibles à *Bacillus sphaericus*

6 - ACTION SUR LES LARVES D'*Aedes caspius*

Les cellules du tube digestif des larves d'*Aedes caspius* ne semblent pas être touchées par l'ingestion de *Bacillus sphaericus* à une dose de 5 mg/l après 48 h et même après 72 h de contact. La planche (10) montre en section longitudinale des coupes de l'estomac postérieur de larves témoins et des larves traitées. Elles montrent chez les larves traitées quelques vacuoles, qui sont peut-être dues à l'action de la bactérie, bien que les larves d'*Aedes caspius* ne soient pas sensibles à *Bacillus sphaericus*.

7 - DISCUSSION

7.1. Larves très sensibles : *Culex pipiens*

Les altérations survenant dans le mésentéron varient d'une région à l'autre. Certaines cellules notamment celles de l'estomac postérieur paraissent les plus touchées suite à l'intoxication due à *Bacillus sphaericus*. La réaction cellulaire dans cette région se manifeste après 30 minutes par une hypertrophie ou un gonflement des cellules, alors que, dans la région de l'estomac antérieur, cette manifestation n'apparaît qu'après 24 heures.

Planche 7 : Aspect histologique de différentes parties du tube digestif d'une larve d'*Anopheles stephensi* (Témoin) (coupe longitudinale).

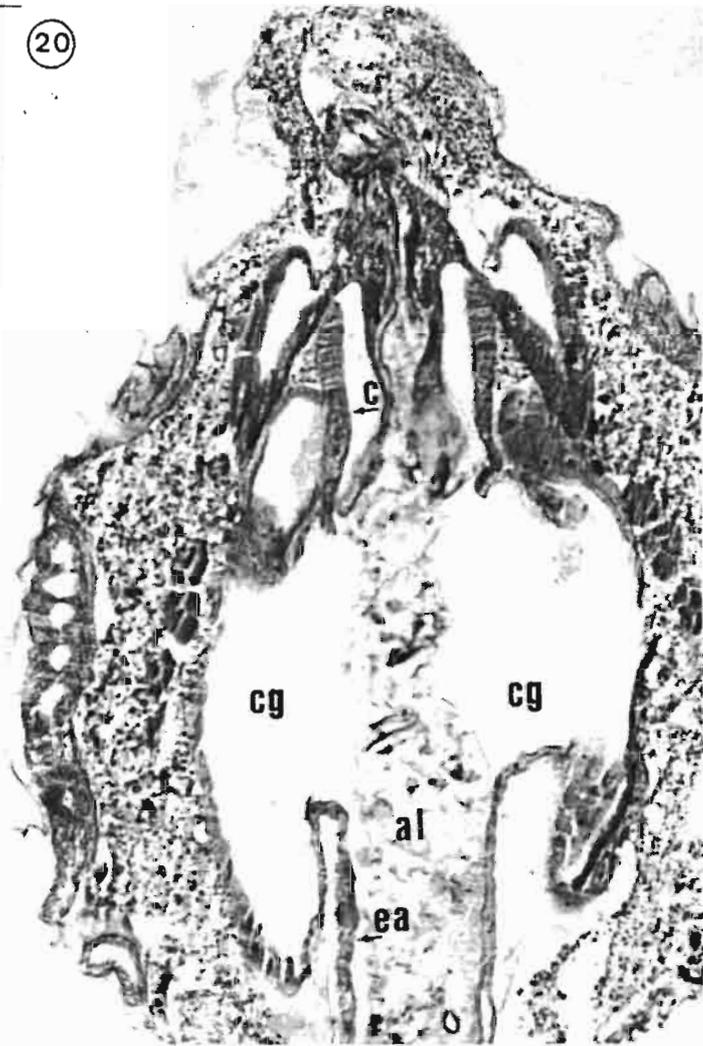
20 : le stomodeum et une partie du mésentéron

21 : cellules de l'estomac antérieur

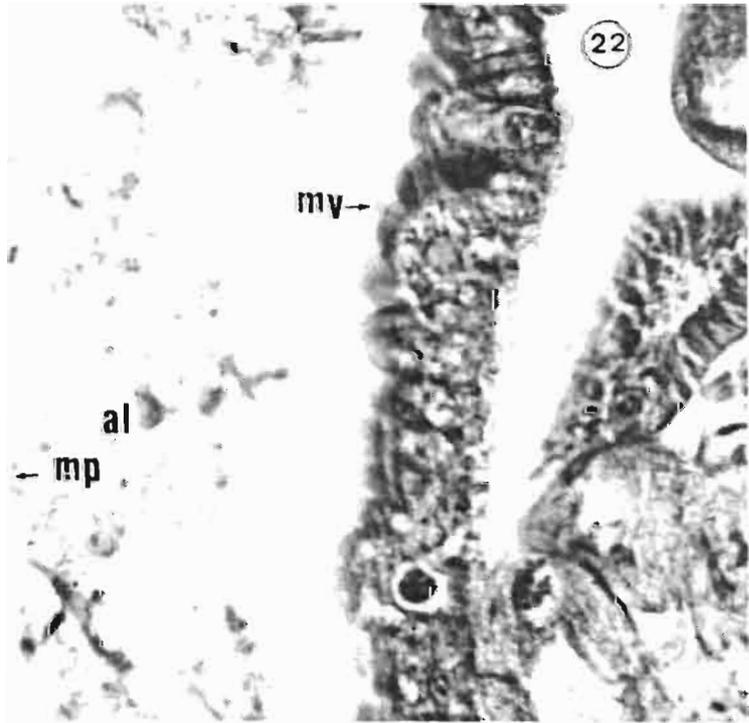
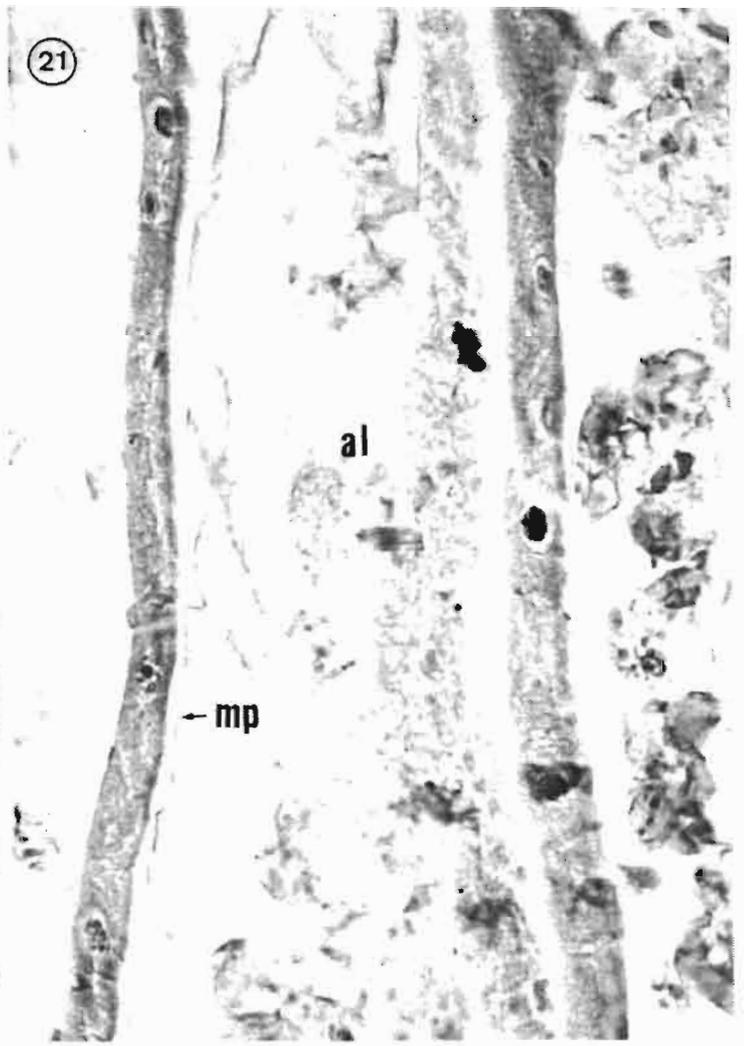
22 : cellules de l'estomac postérieur

al : aliments ; c : cardia ; cg : caecum gastrique ; ea : estomac antérieur ; mp : membrane péritrophique ; mv : microvillosités apicales.

20



21



22

Planche 8 : Modifications histologiques au niveau des cellules de l'estomac postérieur d'une larve d'*Anopheles stephensi* après 24 et 48 heures de contact avec *Bacillus sphaericus* (coupes longitudinales).

23 : cellules de l'estomac postérieur après 24 heures de contact

24 : cellules de l'estomac postérieur après 48 heures de contact

al : aliments ; b : ballonnement ; e : éclatement cellulaire ;
mp : membrane péritrophique.

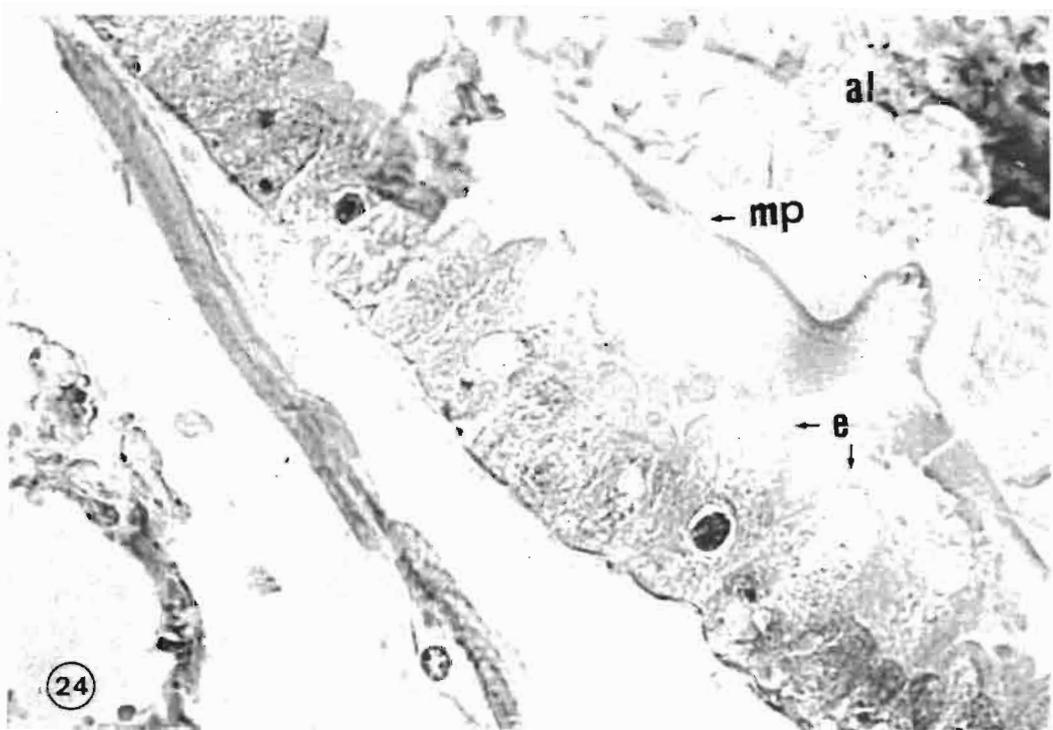
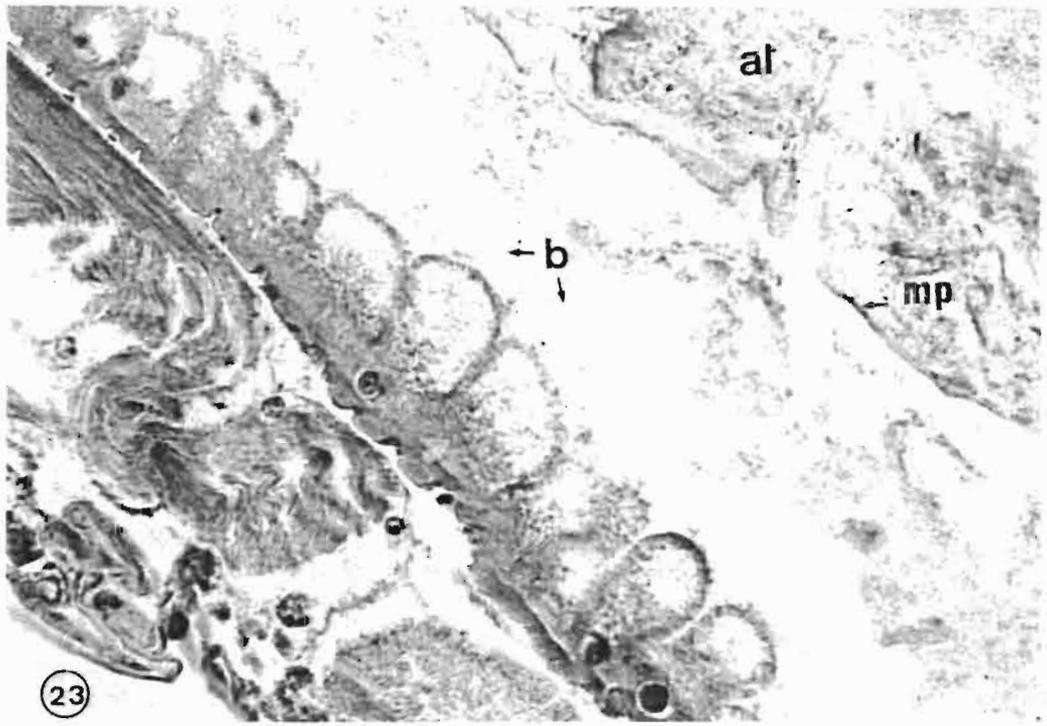


Planche 9 : Histologie de différentes parties du tube digestif d'une larve d'*Aedes aegypti*, avant et après le contact avec *Bacillus sphaericus* (coupes longitudinales).

25 : cardia, caeca gastriques et estomac antérieur (Témoin).

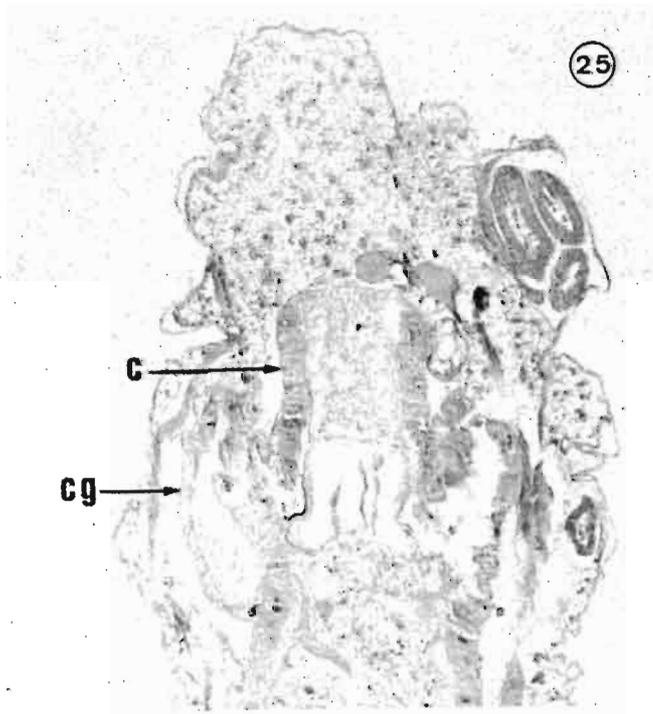
26 : cardia, caeca gastriques et estomac postérieur après 48 heures de contact

27 : estomac postérieur (Témoin)

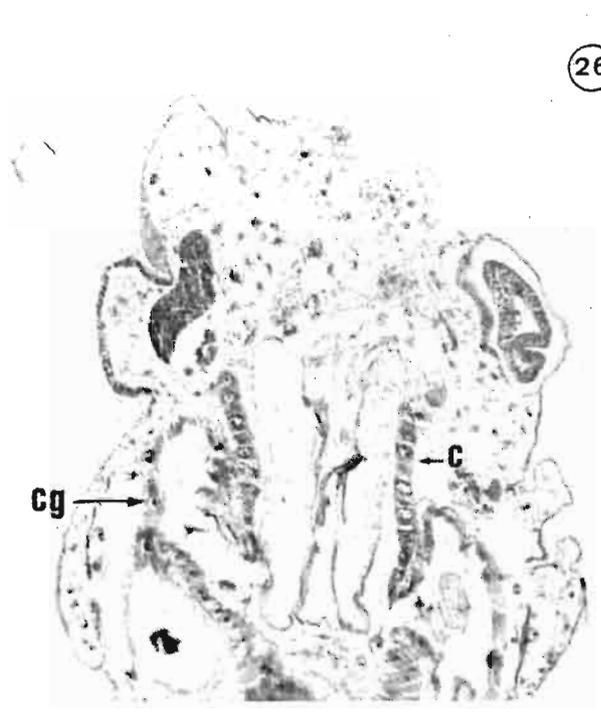
28 : estomac postérieur après 48 heures de contact

al : aliments ; c : cardia ; cg : caeca gastriques ; mp : membrane péritrophique.

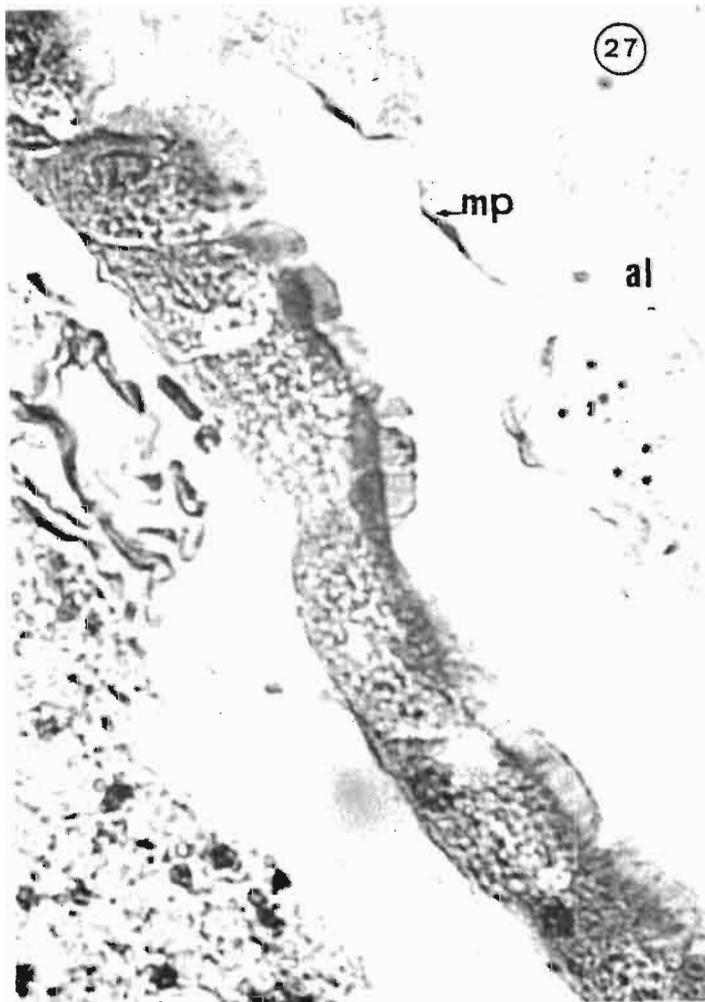
25



26



27



28

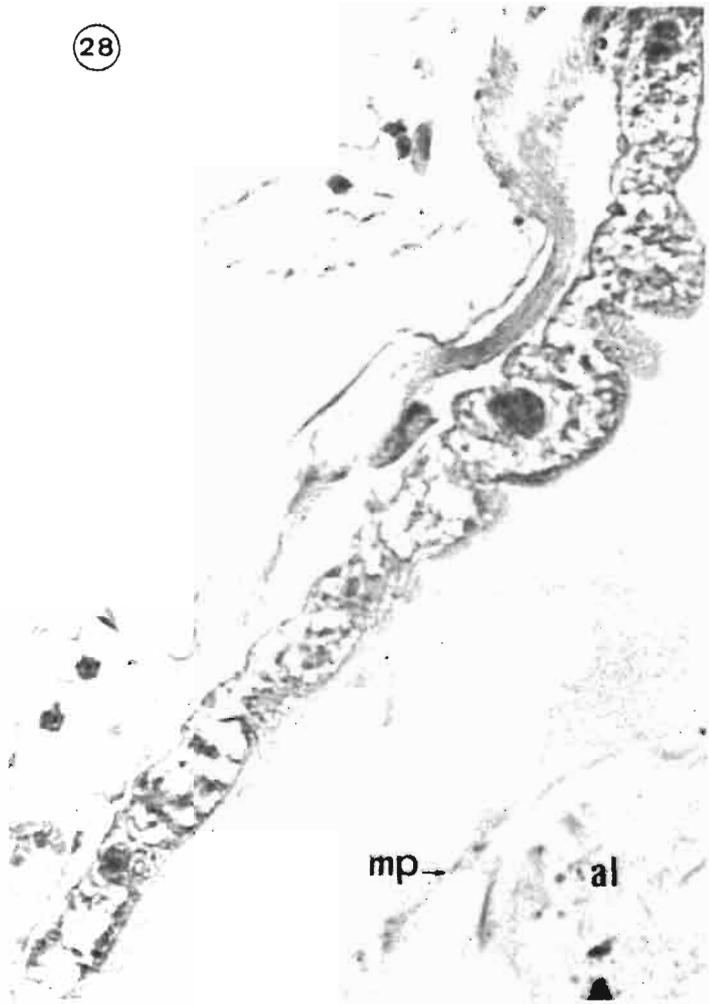


Planche 10 : Histologie de l'estomac postérieur d'une larve d'*Aedes caspius*, avant et après le contact avec *Bacillus sphaericus* (coupes longitudinales).

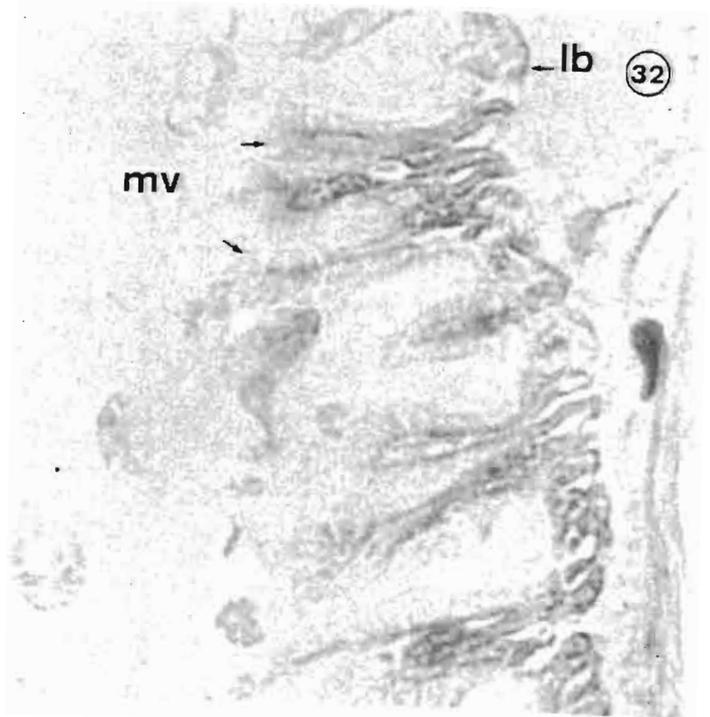
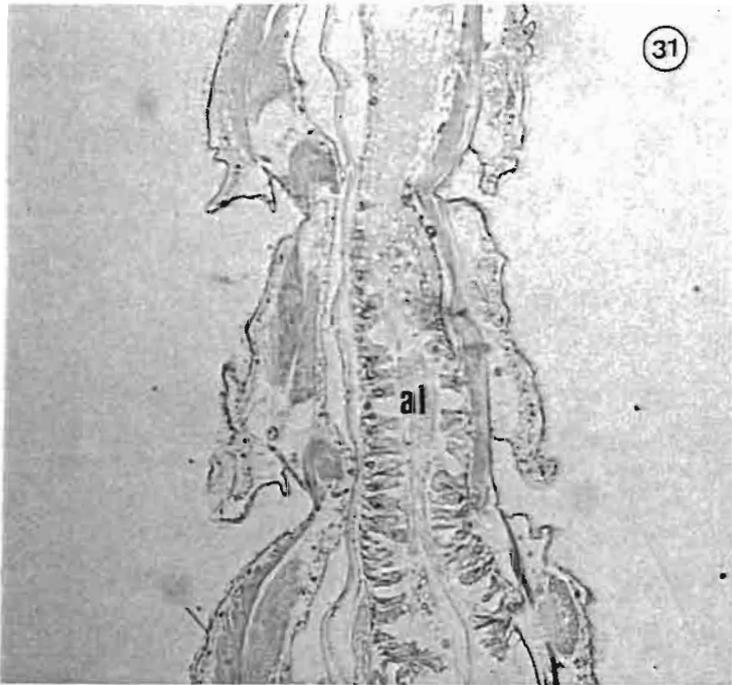
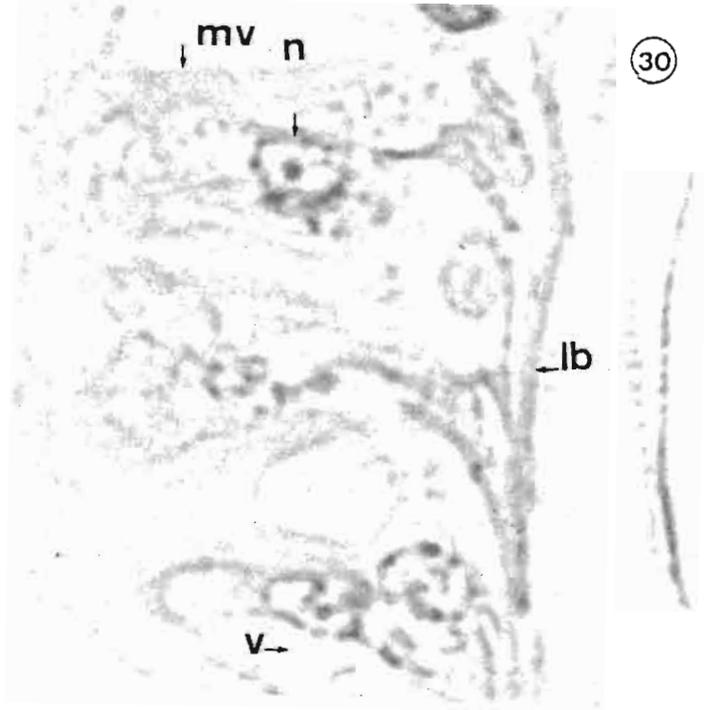
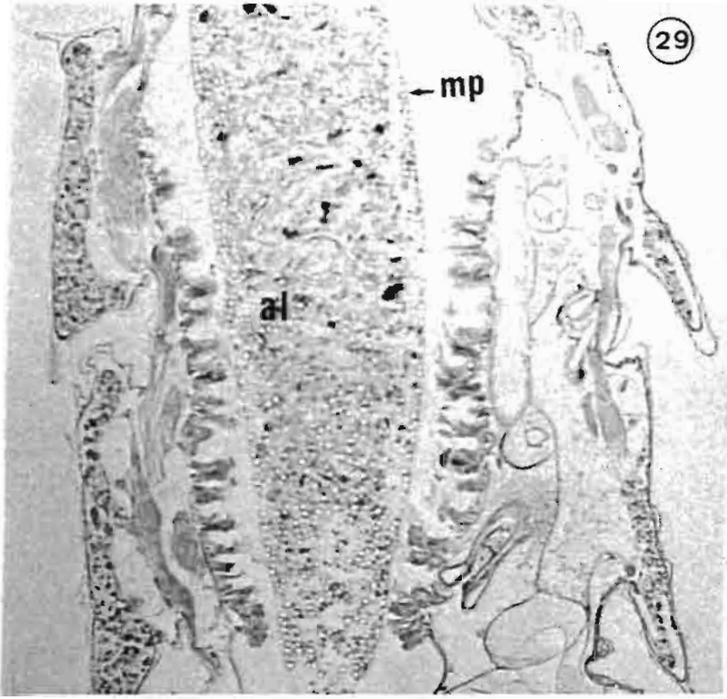
29 : estomac postérieur (Témoin)

30 : cellules de l'estomac postérieur (Témoin)

31 : estomac postérieur après 72 heures de contact

32 : cellules de l'estomac postérieur après 72 heures de contact

al : aliments ; lb : lame basale ; mp : membrane péritrophique ; mv : microvillosités apicales ; n : noyau ; v : vacuole.



Quant aux cellules des caeca gastriques, elles semblent réagir avant même 24 heures ; en effet, après 24 heures de contact, certaines cellules apparaissent éclatées avec un rejet de débris cellulaires dans la cavité de caecum. Au niveau des noyaux, nos observations ne montrent pas de modifications notables.

Les travaux de DAVIDSON (1979 et 1981 b) signalent que les cellules mésentériques des larves de *Culex quinquefasciatus*, traitées avec la souche 1593, sont séparées à leur base par une vacuolisation. Ce phénomène existe toutefois, mais à un moindre degré, chez les témoins dans la région de l'estomac postérieur (KARCH et COZ, 1983) ; il ne paraît donc pas devoir être lié à l'activité de la bactérie.

Un point qui ressort de cette étude, lors des essais de la toxicité sur les larves de *Culex pipiens*, est la grande importance de la vitesse d'ingestion des spores de *Bacillus sphaericus* qui varie suivant les larves. En effet, l'épithélium intestinal de certaines larves, après un temps de contact donné, a été moins touché que celui des autres. Donc, les variations observées doivent être prises en considération ; elles pourraient sans doute être mieux expliquées, en augmentant le nombre de larves examinées.

Le mécanisme de la pathologie de l'épithélium intestinal du mésentéron due à *Bacillus sphaericus* pourrait être en effet expliqué par le fait qu'un ou des éléments toxiques seraient libérés après l'ingestion des spores par la larve-hôte (DAVIDSON, 1979), car il n'y a passage de spores à travers la membrane péritrophique pour envahir les cellules intestinales qu'après la mort de la larve (KELLEN *et al.*, 1965 ; DAVIDSON, 1982).

La souche SS II-1 a été rapidement dégradée dans le tube digestif de la larve (DAVIDSON *et al.*, 1975). Par contre, les spores de la souche 1593 ne sont pas dégradées et une germination a été observée (DAVIDSON, 1981 b). Les modifications histopathologiques de l'intestin moyen de *Culex pipiens* sont comparables à celles observées sur *Culex tarsalis* (KELLEN *et al.*, 1965), notamment la dégénérescence cellulaire de l'estomac postérieur et la vacuolisation qui envahit les cellules pendant toutes les étapes de l'intoxication. Nos observations vont également dans le sens de celles de MENON *et al.* (1982) qui indiquent une importante dégénérescence cellulaire de l'épithélium intestinal des larves de *Culex fatigans* (= *Culex quinquefasciatus*, appartenant au complexe *Culex pipiens*).

L'aspect du ballonnement, puis de l'éclatement de l'épithélium intestinal semble lié aux fonctions physiologiques différentes des divers types cellulaires, ou des conditions enzymatiques, suivant la région du tube digestif.

7.2. Larves moyennement sensibles : *Anopheles stephensi*

La structure épithéliale de l'intestin moyen d'*Anopheles* que nous avons observée rappelle celle décrite dans les travaux de JONES (1960). Elle est généralement comparable à celle de *Culex* (HECKER, 1977).

Les altérations cytologiques observées sur *Anopheles stephensi*. élargissent en effet le spectre d'activité de *Bacillus sphaericus* dont le mode d'action sur les cellules intestinales est apparemment le même sur les larves de moustiques sensibles à cette bactérie. Néanmoins, la réaction cellulaire à l'intoxication chez l'*Anopheles* semble être lente par rapport à celle observée chez *Culex*. Ce phénomène serait peut-être lié aux conditions physico-chimiques, à l'équipement enzymatique et au pH qui sont différents dans les deux moustiques (DADD, 1975) ; selon cet auteur, le pH du mésentéron est compris entre 7 et 10,5 dans la région mésentérique, correspondant aux 1er, 2ème et parfois 3ème segments abdominaux. En effet, la présence d'enzymes protéolytiques actives à ce pH alcalin serait nécessaire pour déclencher l'activité toxique de *Bacillus sphaericus*.

Cependant, la quantité de spores de *Bacillus sphaericus* 1593-4 accumulées dans le tube digestif d'*Anopheles* est comparable à celle accumulée chez *Culex* (RAMOSKA and HOPKINS, 1981).

7.3. Larves très peu ou non sensibles : *Aedes aegypti* et *Aedes caspius*

Les cellules du mésentéron, vues au microscope optique, tant chez *Aedes aegypti* que chez *Aedes caspius* ne manifestent aucun symptôme au niveau de la structure épithéliale. En effet, après une heure de contact, le nombre de spores de la souche 1593-4 accumulées dans le tube digestif de la larve est le même chez les trois espèces *Culex*, *Anopheles* et *Aedes* (RAMOSKA and HOPKINS, 1981). Le problème serait donc maintenant de préciser la nature de la spécificité qui peut être liée à la bactérie ou/et

aux larves. En effet, l'activité enzymatique est plus importante dans le tube digestif d'*Aedes* que dans celui de *Culex* (MIAN and MULLA, 1983 a). Donc, la présence de protéases particulières ou un pH intestinal donné dans des conditions physiologiques différentes pourraient, par exemple, produire un ou plusieurs éléments toxiques spécifiques à l'espèce de moustique visée.

8 - CONCLUSION

Cette étude contribue à préciser le mode d'action de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* au niveau de l'épithélium intestinal de différentes espèces de moustiques.

Les symptômes au niveau des cellules mésentériques varient d'une région à l'autre bien que les sites pathologiques semblent être les mêmes pour les différentes espèces de moustiques sensibles à *Bacillus sphaericus* ; les cellules épithéliales, particulièrement celles du mésentéron, paraissent être les cellules-cibles de l'intoxication due à cette bactérie, tant chez les larves de *Culex pipiens* que chez celles d'*Anopheles stephensi*. Notre travail en microscopie photonique n'a pas révélé de différence importante dans la manifestation des symptômes. Par contre, CHARLES *et al.* (1984) ont montré qu'il existe quelques différences au niveau ultrastuctural entre l'épithélium intestinal des larves de *Culex pipiens* et des larves d'*Anopheles stephensi*.

Il est possible que la toxine libérée par la bactérie soit accessible particulièrement par les cellules du mésentéron qui ne sont pas protégées par une cuticule apicale, comme le sont celles du stomodeum et du proctodeum.

Au niveau du mésentéron, la zone la plus touchée est l'estomac postérieur. Ceci pourrait être dû au fait que les cellules de cette région ont des microvillosités beaucoup plus importantes que dans les autres régions, ce qui augmente certainement l'absorption à ce niveau. Par cette voie, il pourrait y avoir une infiltration des toxines vers d'autres organes, provoquant ainsi la mort de la larve.

Les travaux de DAVIDSON (1986) montrent que les extraits de spores de la souche 1593 n'ont pas nécessairement un effet cytopathologique sur la culture des cellules de *Culex quinquefasciatus*, bien que ces extraits aient une activité larvicide importante. Cet auteur suggère qu'il y a

présence d'une protoxine accompagnée par une ou plusieurs protéines dérivées des spores, après une attaque enzymatique. En effet, la libération de la toxine semblerait dépendre non seulement de l'activité enzymatique mais également de conditions autres liées à la physiologie des larves elles-mêmes, car l'activité enzymatique chez les larves d'*Aedes aegypti* (espèce très peu sensible) est plus forte que chez celles de *Culex quinquefasciatus* (MIAN and MULLA, 1983 a). En outre, la quantité de spores de la souche 1593-4 ingérées par les trois espèces, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles albimanus* et *Aedes aegypti*, est relativement identique après deux heures de contact (RAMOSKA and HOPKINS, 1981).

Les hypothèses formulées par les différents auteurs constituent en fait autant de pistes de recherche qu'il conviendrait de suivre, afin de déterminer de façon plus précise le mode d'action de *Bacillus sphaericus*.

Dans le chapitre suivant, il nous est apparu intéressant d'étudier l'influence éventuelle de *Bacillus sphaericus* sur les adultes d'*Anopheles stephensi* issus de larves qui ont déjà été en contact avec celui-ci ainsi que l'éventuelle action défavorable de ce contact sur les étapes du cycle plasmodial chez ces moustiques.

CHAPITRE III

EFFET DE *BACILLUS SPHAERICUS* SUR LE CYCLE SPOROGENIQUE DU PLASMODIUM

1 - GÉNÉRALITÉS

L'efficacité d'un insecticide est généralement basée sur sa capacité à réduire la population d'anophèles vecteurs ou sa moyenne d'âge (paramètre des épidémiologistes). Toutefois d'autres critères peuvent être étudiés concernant les modifications parasitologiques estimées par les variations de l'indice plasmodique.

En effet, peu de travaux sont consacrés à la dernière question. Cependant, récemment BITSINDOU (1983) a signalé une diminution de l'indice plasmodique chez les moustiques traités avec la deltaméthrine. De même, NOIREAU et KARCH (1983) ont observé une action défavorable sur la formation d'oocystes chez les anophèles traités à l'état larvaire par *Bacillus thuringiensis* H-14 et *Bacillus sphaericus*.

Dans le cadre de cette étude, nous avons envisagé d'étudier les effets de *Bacillus sphaericus* sur l'évolution du cycle sporogonique de *Plasmodium yoelii yoelii* chez *Anopheles stephensi* ayant survécu à une exposition à cet agent pathogène lors de leur vie larvaire.

2 - MATÉRIEL

2.1. Le choix du modèle animal

Bien que les anophèles soient les seuls vecteurs du paludisme humain, des points restent encore inconnus pour expliquer la physiologie de ces seuls vecteurs adaptés à cette transmission. En 1948, VINCKE et LIPS ont découvert le plasmodium des rongeurs *Plasmodium berghei* ; depuis cette date, de nombreux travaux ont tenté de réaliser la transmission cyclique au laboratoire de ce protozoaire (YOLI and WALL, 1951 ; RAMAKRISHNAN *et al.*, 1953).

Anopheles stephensi utilisé dans cette étude est une bonne espèce vectrice du plasmodium du rongeur (JADIN, 1967).

D'où le choix du couple *Anopheles stephensi*-*Plasmodium yoelii yoelii* dont le cycle peut être facilement entretenu sur souris blanche.

2.2. Les anophèles

Anopheles stephensi Liston 1901 est un moustique oriental du groupe Néocella dont l'aire de répartition s'étend de l'Iran à l'Inde. C'est un vecteur naturel du *Plasmodium falciparum* (MOTABAR, 1974 ; SCANLON *et al.*, 1968), jouant un rôle essentiel dans la transmission du paludisme dans cette région.

Les deux souches d'*Anopheles stephensi* utilisées sont : la souche "Museum" sensible aux insecticides chimiques et la souche "STR/m2" résistante au D.D.T. et à la dieldrine. Elles sont maintenues en élevage continu à l'ORSTOM-Bondy.

2.3. Souches plasmodiales

Plasmodium yoelii yoelii appartient au groupe vivax, parasite des rongeurs. Les souches utilisées "17 X" et "265 BH" nous ont été fournies par le laboratoire de Zoologie-Vers, du Museum d'Histoire Naturelle (Mme I. LANDAU).

Des souris blanches infectées par la souche 17 X, provenant du Museum, sont utilisées pour les expérimentations en vue de la recherche des oocystes. En raison de la disponibilité des souris infectées par la souche 265 BH, nous avons utilisé celle-ci pour la recherche des sporozoïtes.

3 - MÉTHODES

3.1. Rappel du cycle de plasmodium chez l'anophèle

Chez l'anophèle femelle s'effectue la phase sexuée ou sporogonique. En prenant son repas de sang sur un individu parasité, l'anophèle femelle absorbe des gamétocytes. Dans l'estomac du moustique, le gamétocyte mâle s'exflagelle et libère huit microgamètes qui vont féconder des gamètes femelles.

L'oeuf mobile, ou ookinète, traverse la paroi de l'estomac de l'anophèle et se fixe au niveau de sa face externe formant l'oocyste dans lequel s'individualisent des milliers de sporozoïtes. Libérés par

l'éclatement de l'oocyste, ces derniers gagnent les glandes salivaires où ils subissent une dernière maturation avant d'être pleinement infectants. Au cours de la piqure, le moustique infecté injecte dans le sang avec sa salive des milliers de parasites, sous forme de sporozoïtes.

Ces derniers vont chez l'hôte vertébré poursuivre une phase asexuée qui aboutira à la formation de gamétocytes et de schizontes (Fig. 4).

3.2. Entretien du cycle de Plasmodium

Le maintien de *Plasmodium yoelii yoelii* sur souris blanche OF1 peut être réalisé de deux façons :

- Inoculation intraveineuse de sporozoïtes : après vérification de la présence des sporozoïtes dans les glandes salivaires, 120 à 150 femelles sont déposées dans un "potter" de Thomas contenant 4 ml de RPMI 1640, à 4° C. Ces femelles sont finement broyées.

Après une première centrifugation du broyat à 2 500 tours/minute pendant cinq minutes, le surnageant est recentrifugé à 10 000 tours/minute. Le culot est récupéré dans 4 ml de RPMI. Après vérification de la présence de sporozoïtes, 0,4 ml sont injectés aux souris en intraveineuse dans la queue.

- Infestation des souris par inoculation des formes sanguines du parasite : sur une souris donneuse, 1 ml de sang est ponctionné au sinus rétro-orbitaire à l'aide d'une pipette Pasteur héparinée. Ce sang est mélangé dans un verre de montre à 1 ml de RPMI 1640 additionné à une goutte d'héparine. Ensuite, nous inoculons en intrapéritonéale 0,2 à 0,5 ml de ce mélange par souris.

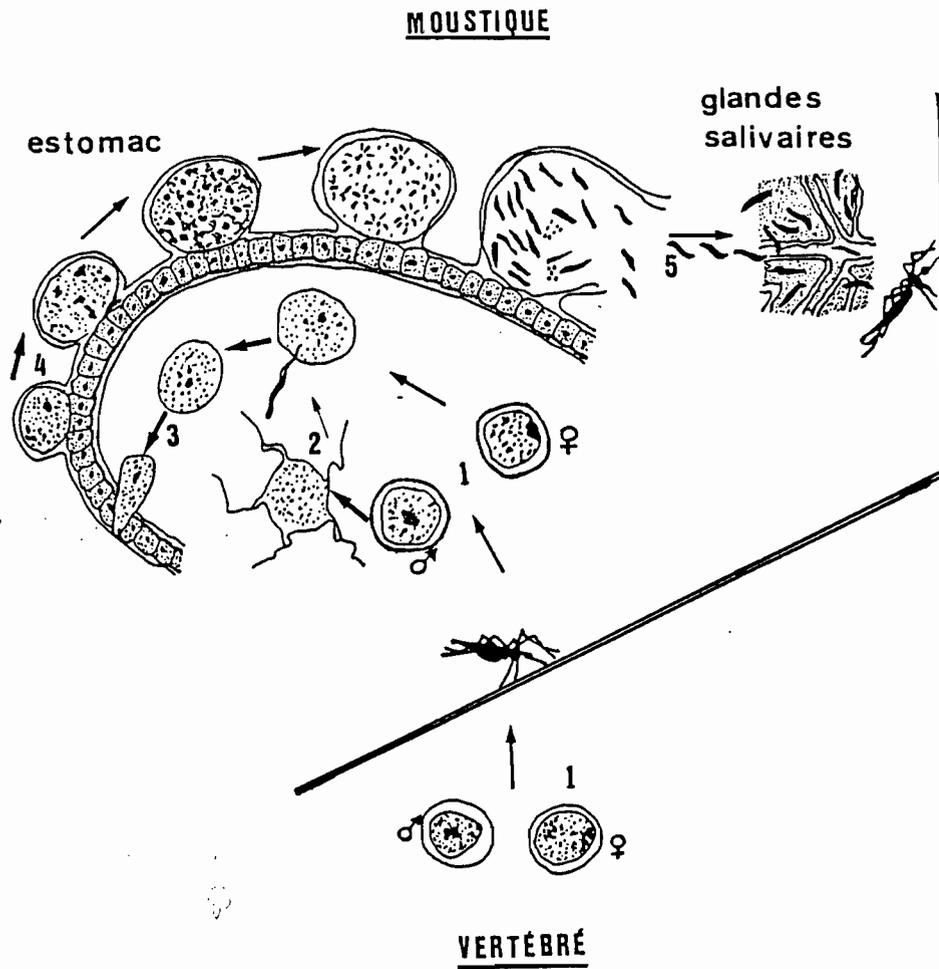
3.3. Modalités d'infestation

Des souris porteuses de gamétocytes sont immobilisées puis introduites dans les cages. Chaque souris est proposée successivement aux moustiques d'une cage témoin puis à ceux d'une cage dont les larves avaient été traitées par *Bacillus sphaericus*.

Après le repas infectant, les moustiques ne sont plus nourris que sur jus sucré. Les femelles non-gorgées sont éliminées.

- Pour la recherche d'oocystes : les femelles gorgées sont disséquées huit jours plus tard. Nous cherchons la présence d'oocystes sur la

Fig. 4 : Cycle du plasmodium chez l'anophèle



1. GAMETOCYTE
2. EXFLAGELLATION
DES MICROGAMÈTES ♂
3. OOKINETE
4. OCYSTE
5. SPOROZOITE

paroi externe de l'estomac. L'infection est quantifiée de la manière suivante :

- + : moins de 10 oocystes
- ++ : de 10 à 50 oocystes
- +++ : plus de 50 oocystes

- Pour la recherche de sporozoïtes : les femelles gorgées sont disséquées 16 jours plus tard. Nous cherchons la présence de sporozoïtes dans les glandes salivaires.

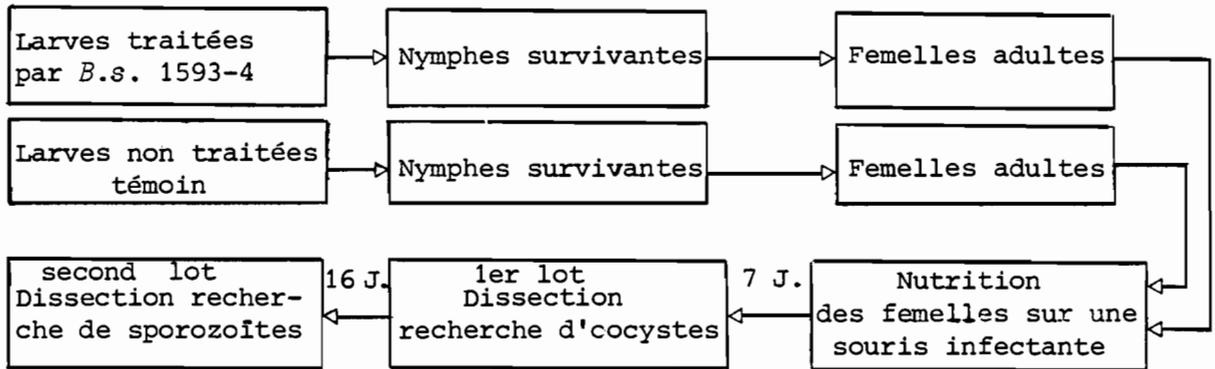
4 - TRAITEMENT DES LARVES D'ANOPHÈLES

Le protocole est celui utilisé pour les expérimentations précédentes (voir chapitre 1).

Deux lots de larves de stades 2 et 3 jeune de la souche "Museum" sont constitués. Le premier lot, qui fournira les anophèles témoins, est élevé dans les conditions classiques et sans contact avec aucun insecticide. Le second lot est laissé 48 heures dans une suspension de 0,08 mg/l de *Bacillus sphaericus* 1593-4, ce qui correspond approximativement à la DL 70. Après lavage à l'eau, les survivants des deux lots sont mis dans l'eau aux conditions d'élevage classique. Les imagos issus de ces trois lots sont répartis dans des cages et conservés huit jours avec du jus sucré, jusqu'au moment de la dissection pour la recherche d'oocystes.

Des larves stade 3 des souches "Museum" et STR/m2 sont réparties en quatre lots dont deux sont des témoins et les deux autres sont laissés 48 heures en contact avec *Bacillus sphaericus* 1593-4 à une dose de 0,08 mg/l, ensuite les larves survivantes sont lavées et remises en eau permutée. Au fur et à mesure de leur apparition, les nymphes sont séparées des larves pour être mises à éclore dans une cage en tulle. Après l'émergence, les adultes sont nourris sur jus sucré jusqu'au repas sanguin infectant. 16 jours après le repas, les moustiques sont disséqués pour la recherche de sporozoïtes dans les glandes salivaires (Fig. 5).

Fig. 5 : Schéma montrant la modalité du traitement, la nutrition des femelles et le moment de dissection pour la recherche d'ocystes et de sporozoïtes.



5 - RÉSULTATS

5.1. Problèmes d'obtention des adultes issus d'un test larvicide

Le traitement des larves d'*Anopheles stephensi* souches Museum et STR/m2 à la dose 0,08 mg/l de la souche 1593-4 a provoqué une mortalité importante après 48 h de contact. Parmi les larves survivantes lavées à l'eau après 48 h, un certain nombre de larves sont trouvées mortes par la suite dans l'élevage (Fig. 6).

Un autre phénomène, plus important, est le blocage de quelques nymphes à l'émergence aussi bien chez les espèces traitées que chez le témoin. Ce phénomène est peut être dû à la présence d'un voile bactérien important qui s'est développé dans les cristallisoirs.

Devant ces difficultés, il serait intéressant de stériliser le matériel nécessaire pour effectuer les tests et d'utiliser des cages neuves propres où les nymphes sont déposées pour l'émergence. Ces mesures pourraient éviter la mortalité provoquée par une autre cause que l'insecticide.

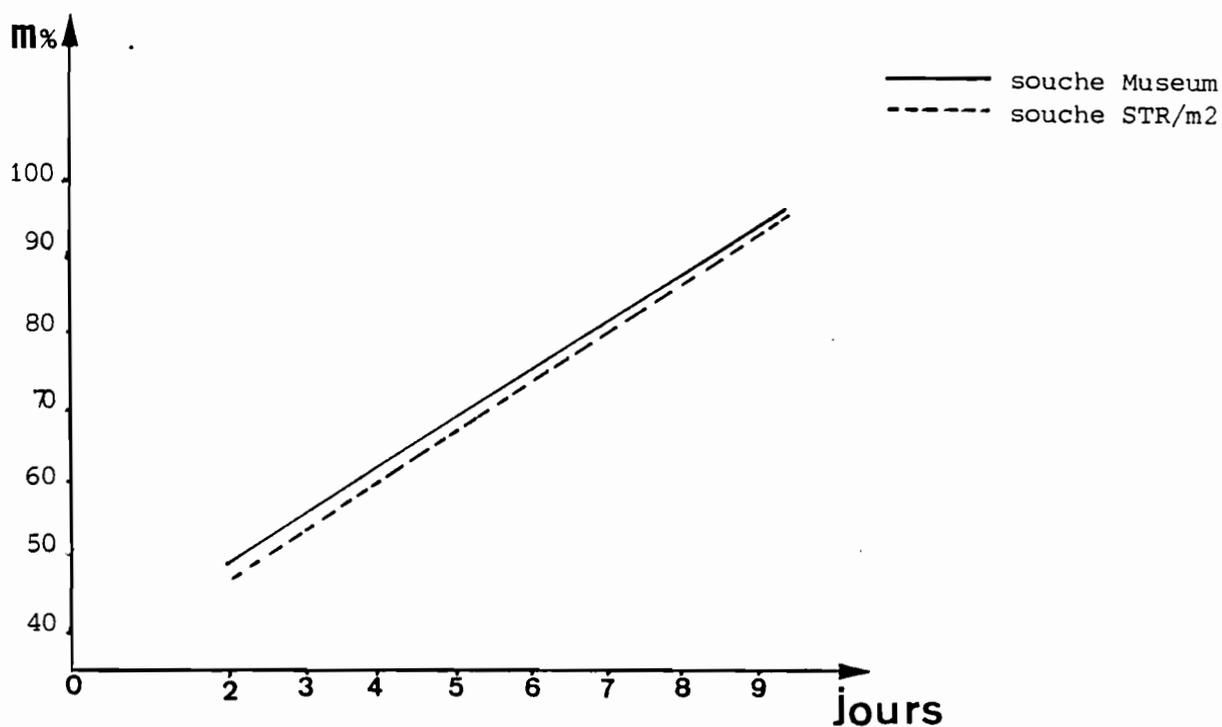


Fig. 6 : La mortalité provoquée par *Bacillus sphaericus* 1593-4 à la dose 0,08 mg/l en fonction du temps. 1 000 larves stade 3 de chaque souche d'*Anopheles stephensi* sont mises en contact. La mortalité chez le témoin atteint 1,5 % au 4^{ème} jour et 7 % au 9^{ème} jour. Mais nous remarquons une mortalité importante parmi les nymphes au moment de l'émergence aussi bien chez les traitées que chez le témoin.

5.2. Action de *Bacillus sphaericus* sur le développement des oocystes

Dans un premier temps nous avons pris comme critère d'évaluation de l'action de *Bacillus sphaericus* l'apparition d'oocystes au niveau de l'estomac. Les dissections ont été effectuées au 8ème jour après le repas sur souris infectée. L'ensemble des résultats est rapporté sur le tableau (5).

A l'analyse de chacune des quatre expérimentations effectuées, nous remarquons qu'excepté la série A, toutes vont dans le même sens, à savoir l'absence plus fréquente d'oocystes chez les anophèles traités que chez les témoins. Cependant, aucune de ces variations d'infection des moustiques n'est statistiquement significative. Ce fait tient peut-être pour une part au faible nombre de dissections effectuées dans chaque lot, en rapport avec la mortalité élevée observée depuis le contact avec l'insecticide jusqu'au huitième jour après le repas de sang.

Par contre, si nous étudions globalement ces résultats (tableau 6), les différences pressenties deviennent significatives :

- les moustiques non traités sont trouvés porteurs d'oocystes dans 95,1 % des cas (41 positifs sur 43 disséqués).

- les anophèles ayant subi un contact avec *Bacillus sphaericus* sont positifs pour 81,6 % d'entre eux, donc une réduction significative par rapport aux témoins ($p < 0,05$).

Sur le plan quantitatif (tableau 7), nous trouvons un nombre d'oocystes plus faible chez les anophèles ayant été au contact avec *Bacillus sphaericus* que chez les témoins (significatif, $p < 0,02$). Ainsi, 48,4 % des anophèles traités (15 sur 31) ont moins de 50 oocystes contre 21,9 % (9 sur 41) pour les non traités.

5.3. Action de *Bacillus sphaericus* sur le développement des sporozoïtes

Dans le but de compléter les résultats précédents, nous avons jugé utile de recommencer les expérimentations car l'évolution complète du cycle sporogonique ne peut pas être jugée uniquement sur la présence d'oocystes au niveau de l'estomac, il nous a donc paru préférable de poursuivre l'expérimentation en évaluant l'effet de *Bacillus sphaericus* sur le pourcentage de moustiques porteurs de sporozoïtes dans les glandes salivaires. Les dissections ont été effectuées 16 jours après le repas sanguin. L'ensemble des résultats est reporté sur le tableau (8).

Tab. 5 : Répartition des oocystes dans les lots témoins et les lots traités par *Bacillus sphaericus*

Série	Traitement des Anophèles	Femelles gorgées	Femelles disséquées	Recherche d'oocystes	
				présence	absence
A	Traités	8	4	4	0
	Témoin	28	22	20	2
B	Traités	17	16	13	3
	Témoin	7	4	4	0
C	Traités	7	4	4	0
	Témoin	8	6	6	0
D	Traités	20	14	10	4
	Témoin	19	11	11	0

Tab. 6 : Résultats globaux des quatre expérimentations

Traitement des Anophèles	Femelles gorgées	Femelles disséquées	Recherche d'oocystes		Différence significative par rapport aux lots témoins
			présence	absence	
Traités	52	38	31	7	oui $\chi^2 = 3,9$ $p < 0,05$
Témoin	62	43	41	2	

Tab. 7 : Aspect quantitatif de l'infection oocystique des anophèles en fonction du traitement subi

Traitement des Anophèles	Femelles avec oocystes	Nombre d'anophèles			Différence significative par rapport aux témoins **
		+ < 10 oocystes	++ 10 à 15 oocystes	+++ > 50 oocystes	
Traités	31	4	11	16	oui $\chi^2 = 5,6$ $p < 0,02$
Témoin	41	4	5	31	

** : séries + et ++ fusionnées

Tab. 8 : Répartition des moustiques porteurs de sporozoïtes dans les glandes salivaires selon les lots témoins et les lots traités par *Bacillus sphaericus*

1 : souche Museum

2 : souche STR/m2

Série	Traitement des Anophèles	Positif				Effectif	Différence significative par rapport aux lots témoins *
		Négatif	+ < 10	++ 10-40	+++ > 40		
1	Traités	8	0	2	16	26	non $\chi^2 = 2,32$
	Témoin	5	3	3	23	34	
2	Traités	14	5	3	12	34	non $\chi^2 = 0,063$
	Témoin	16	2	4	15	37	

* : les positifs sont fusionnés

La comparaison des quatre lots ne montre pas une différence significative entre les lots traités et les lots témoins. Toutefois, le nombre réduit d'expérimentations et les effectifs très faibles ont peut-être conduit à des tests manquant de valeur statistique. Des conditions différentes (température, humidité *etc.*) pourraient jouer un rôle important au cours des manipulations. Des essais avec des effectifs plus grands menés avec différentes concentrations de *Bacillus sphaericus* seraient très envisageables pour obtenir peut-être un résultat intéressant.

6 - DISCUSSION

Jusqu'à présent, peu de travaux ont été consacrés à l'étude de la réceptivité au plasmodium d'anophèles ayant survécu à des doses toxiques d'insecticides. PRASITTISUK and CURTIS (1982) n'ont observé aucun effet avec le DDT et le malathion. Par contre, BITSINDOU (1983) a observé une baisse de l'indice plasmodique après l'utilisation de la deltaméthrine. Quant à NOIREAU et KARCH (1983), ils estiment que *Bacillus thuringiensis* H-14 et *Bacillus sphaericus* ont une action défavorable sur la formation d'oocystes.

Nos résultats concernant l'indice oocystique laissent entrevoir une moindre réceptivité au plasmodium des anophèles soumis à l'effet entéropathogène de *Bacillus sphaericus*. En effet, les moustiques traités par *Bacillus sphaericus* ne permettent pas, dans 18,4 % des cas, l'infestation plasmodiale. De plus, les 81,6 % qui sont malgré tout infestés le sont moins massivement. Quant à l'indice sporozoïtique, les résultats n'ont pas été statistiquement significatifs dans nos conditions d'expérimentation. Par contre, récemment ELISSA *et al.* (1986) ont noté une réduction significative des charges oocystiques et des sporozoïtes du *Plasmodium yoelii yoelii* utilisant des doses sublétales de la deltaméthrine sur les larves d'*Anopheles stephensi*.

L'action de *Bacillus sphaericus* a donc probablement en plus de l'effet toxique sur les larves, une action défavorable sur le cycle sporogonique. Toutefois, cette moindre réceptivité au plasmodium des anophèles ne semble pas suffisante pour faire baisser le taux d'infestation en terme épidémiologique; c'est pourquoi nous n'avons pas poursuivi cette expérimentation, en espérant que d'autres souches de bactérie ou d'autres insecticides pourraient donner des résultats plus satisfaisants.

CHAPITRE IV

EVALUATION DE L'ACTIVITE LARVICIDE DE *BACILLUS SPHAERICUS*
 DANS DES MARES SEMI-ARTIFICIELLES A *CULEX PIPIENS*
 A BONDY-FRANCE

1 - LA NATURE DES MARES

Les gîtes larvaires à *Culex pipiens* sont constitués par des mares artificielles situées dans la banlieue-est de Paris à Bondy-France.

Il s'agit de trois mares à différentes densités larvaires et à différentes qualités d'eau.

Les critères du choix des mares sont les suivants (photos 1, 2 et 3) :

1. Mare (1) : . Le gîte est ombragé par des arbres et une strate herbacée.
 - . L'eau est fortement polluée, riche en matière organique.
 - . La profondeur d'eau est d'environ 20-50 cm.
 - . Le substrat au fond du gîte est constitué par de la boue mélangée à des déchets végétaux.
 - . La surface est d'environ 7 m².

2. Mare (2) : . Le gîte est semi-ombragé par des arbres.
 - . L'eau est peu polluée, teneur moyenne en matière organique.
 - . La profondeur d'eau est d'environ 15 à 50 cm.
 - . Le substrat est constitué par des débris végétaux.
 - . La surface est d'environ 5 m².

3. Mare (3) : . Le gîte est à ciel ouvert.
 - . Cette mare a été vidée et remplie par l'eau du réseau.
 - . La profondeur d'eau est d'environ 30 à 55 cm.
 - . Le fond est sans substrat.
 - . La surface est d'environ 3 m².

Photos 1, 2 et 3 : Mares situées en région parisienne (Bondy-France), constituant d'excellents gîtes à *Culex pipiens*.

Mare 1 : couverte par des arbres et une strate herbacée

Mare 2 : semi-couverte par des pommiers (5 m²)

Mare 3 : à ciel-ouvert (3 m²)



mare 1



mare 2



mare 3

Aux alentours de ces trois gîtes se trouvent des fûts et des récipients de différentes dimensions remplis d'eau dans lesquels se développent d'importantes populations larvaires de *Culex pipiens*. Ces gîtes non traités, servent de témoins et assurent le développement de nouvelles populations dans les gîtes traités.

2 - LA FAUNE DES MARES

La densité* de la population larvaire de tous les stades de *Culex pipiens* a été différente : forte, moyenne ou faible densité respectivement dans les trois mares.

A côté de *Culex pipiens*, d'autres Arthropodes ont été trouvés dans les trois mares et déterminés. L'identification et la densité de ces Arthropodes sont résumés dans le tableau suivant :

		<u>Densité de la population</u>		
		<u>Mare 1</u>	<u>Mare 2</u>	<u>Mare 3</u>
Crustacés	Daphnies	Forte	Moyenne	-
	Cyclops	Moyenne	Faible	-
Diptera Chironomidae	<i>Chironomus</i> sp.	Faible	-	-
Diptera Culicidae	<i>Aedes vexans</i>	Faible	-	-
	<i>Culiseta annulata</i>	Forte	Moyenne	Très faible
	<i>Anopheles maculipennis</i>	-	Faible	-

3 - COMPARAISON DE LA SENSIBILITÉ DES LARVES DES MARES ET DU LABORATOIRE À LA SOUCHE 1593-4

Cette étude, avant le traitement des mares, a pour but de connaître les éventuelles différences de sensibilité des larves provenant des gîtes naturels et de l'élevage. Dans un second temps, les larves d'élevage pourront servir à tester l'eau des gîtes après traitement afin d'estimer l'éventuelle activité résiduelle de la bactérie en fonction du temps.

Des larves stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens* sont prélevées des mares et ramenées au laboratoire. Parallèlement, des larves de notre

* faible : < 50 par louche ; moyenne : 50-200 et forte : > 200.

élevage du même âge sont triées. Les larves de provenances différentes sont testées dans l'eau permutée et dans l'eau de la mare. Le protocole du test est celui adopté dans le chapitre 1.

4 - TECHNIQUES DE L'APPLICATION ET DU CONTRÔLE DES GÎTES

Cette expérimentation s'est déroulée aux mois de juillet-août et début septembre 1983. Nous avons employé, sur les trois gîtes, une seule dose de 160 mg/m^2 d'une poudre primaire de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus*, soit environ dix fois plus que la DL 90 observée au laboratoire.

Après le traitement, des essais ont été réalisés au laboratoire afin de poursuivre l'évaluation de l'activité résiduelle de la bactérie. Le contrôle est effectué par les méthodes suivantes :

- . Surveillance de la réapparition des stades larvaires et préimaginaux.
- . Détermination de la mortalité après 48 h de contact, puis jusqu'à la première apparition du stade nymphal ou la mortalité totale des larves à partir de prélèvements d'eau ramenés au laboratoire pour les tester avec des larves de stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens*.
- . Observation du devenir des oeufs, sous forme de nacelles, de *Culex pipiens* grâce à des prélèvements ramenés au laboratoire et déposés dans des gobelets contenant 150 ml d'eau de la mare. En parallèle, d'autres nacelles provenant de l'élevage étaient placées dans l'eau permutée et utilisées comme témoins.

A noter qu'à chaque prélèvement, nous agitions l'eau dans les trois gîtes afin d'éviter le problème de la sédimentation des spores de *Bacillus sphaericus*.

5 - RÉSULTATS

5.1. Expérimentations au laboratoire pour surveillance des gîtes

5.1.1. Comparaison de la sensibilité des larves des gîtes et d'élevage

Les larves stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens* provenant de la mare ou de l'élevage ont une stabilité proche à l'activité larvicide de la souche 1593-4 (tableaux 9 et 10).

Ces résultats nous permettent d'utiliser les larves provenant de notre élevage pour tester l'activité résiduelle de la bactérie au cours de l'expérimentation.

5.1.2. Tests sur les oeufs

Des oeufs (nacelles) de *Culex pipiens* ont été prélevés à la surface des gîtes, disposés dans des gobelets contenant de l'eau des gîtes traités, et placés dans les conditions de l'insectarium.

. Prélèvements de la mare 1 : les jeunes larves issues des oeufs provenant de cette mare sont toutes mortes dans tous les tests effectués pendant 10 jours après traitement. Dans le prélèvement du 11ème jour, 5 % des larves issues des oeufs prélevés se sont développées, jusqu'au stade préimaginal. Au 20ème jour, une mortalité de 50 % a été observée parmi les jeunes larves et le reste a poursuivi un développement normal.

. Prélèvements de la mare 2 : jusqu'au 4ème jour, toutes les jeunes larves issues des prélèvements sont mortes. A partir du 5ème jour, une certaine survie est observée, le taux des larves survivantes atteint 50 % dans le prélèvement du 7ème jour.

. Prélèvements de la mare 3 : les oeufs prélevés après trois jours de traitement ont donné de jeunes larves qui évoluent à peu près normalement, à l'exception toutefois de quelques unes qui meurent, comparativement au témoin.

5.1.3. Tests sur des larves

Au cours de la surveillance des gîtes, des prélèvements d'eau des mares sont réalisés pour évaluer l'efficacité de la bactérie après traitement. Ces tests ont été effectués sur des larves stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens* dans les conditions du laboratoire.

. Prélèvements de la mare 1 : dans cette série d'essais, (un test à chaque jour de prélèvement), tous les tests révèlent qu'une mortalité importante est constatée dès le premier jour qui suit le traitement. Cette mortalité a diminué progressivement en fonction du temps. Cependant, l'activité résiduelle de la bactérie dans cette mare s'observe pendant plus de deux semaines (Fig. 7).

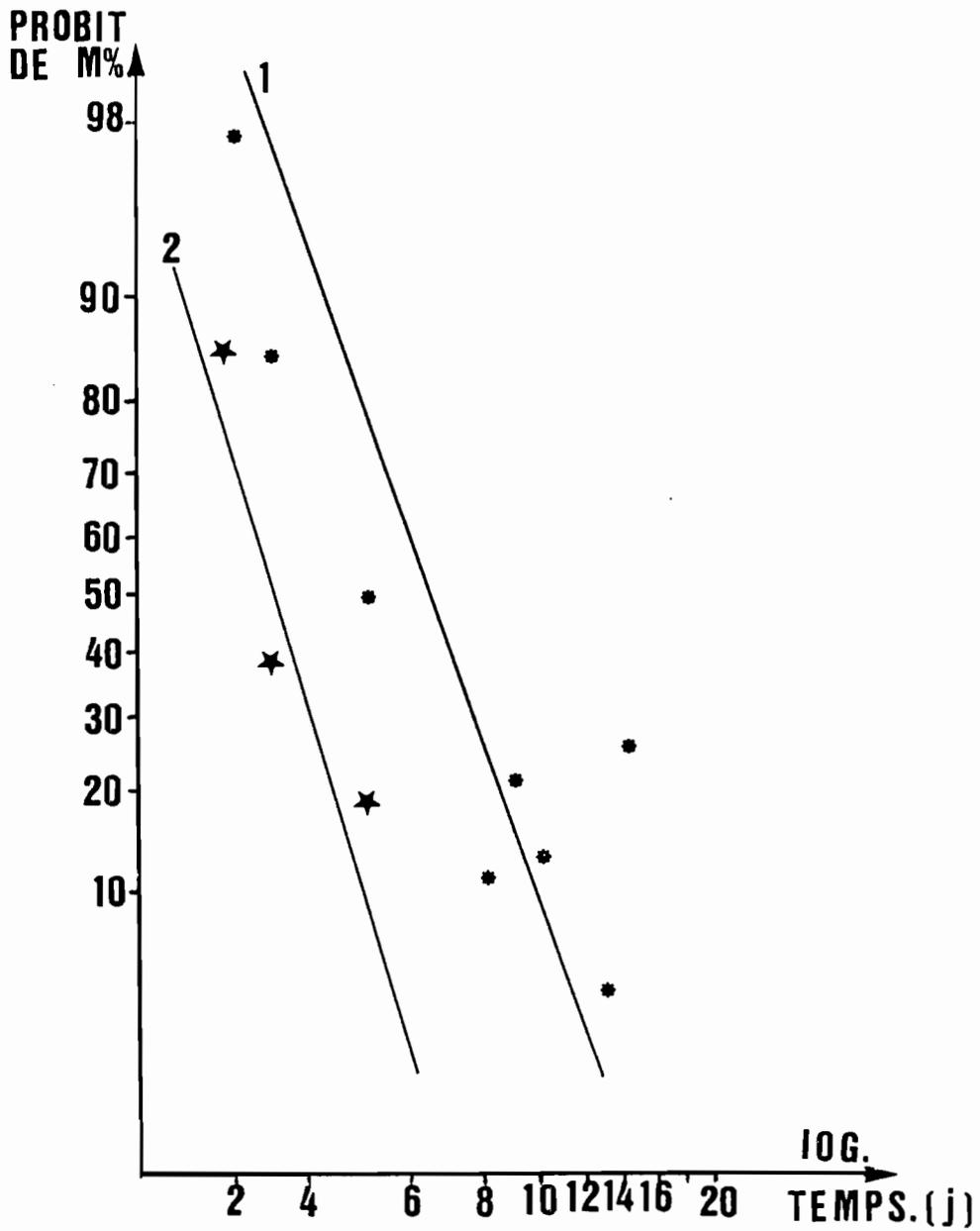


Fig. 7 : La persistance de la souche 1593-4, en eau peu polluée (mare 2), et en eau polluée (mare 1). Chaque point représente la lecture d'un test après 72 h de contact avec des larves stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens*.

Toutes les larves trouvées survivantes après lecture des tests sont laissées jusqu'au stade nymphal ou mortalité totale. Les nymphes n'ont commencé à apparaître que dans le test effectué après 10 jours de traitement (tableau 11).

. Prélèvements de la mare 2 : une certaine mortalité a été observée parmi les larves d'élevage testées avec de l'eau prélevée dès les premiers jours après traitement. Dans le test effectué après six et sept jours de traitement, la mortalité a été nulle (tableau 12).

5.2. Activité larvicide sur la faune des Arthropodes

Aucune toxicité de *Bacillus sphaericus* 1593-4 n'a été observée sur les Arthropodes se trouvant dans les trois mares :

Crustacés	{	Daphnies Cyclops
Chironomidae	{	<i>Chironomus</i> sp.
Culicidae	{	<i>Aedes vexans</i> <i>Anopheles maculipennis</i> <i>Culiseta annulata</i>

La densité larvaire de *Culiseta annulata* a été forte dans la mare 1 à eau polluée par rapport aux deux autres. Cette densité est liée à la qualité de l'eau, car il semble que le gîte à eau polluée serait plus favorable aux larves de *Culiseta annulata* que le gîte à eau claire.

Au laboratoire, l'activité larvicide de la souche 1593-4 sur les stades 3 et 4 de *Culiseta annulata* a été nulle même à forte dose (10 mg/l).

5.3. Efficacité et persistance de la souche 1593-4 vis-à-vis des populations préimaginales de *Culex pipiens* dans les trois gîtes

Dans les trois gîtes, la mortalité totale des larves de *Culex pipiens* a été observée trois jours après le traitement.

Les larves en faible densité sont apparues dans la mare 1 le 7ème jour après traitement, et les nymphes au 20ème jour. Cependant, il est à noter que la réapparition des nymphes dans les mêmes conditions naturelles s'effectue en environ 10 jours.

Tab. 9 : Comparaison de la sensibilité des larves stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens* d'élevage et de celles provenant de la mare 1 dans l'eau permutée et dans l'eau de la mare.

	Larves de mare testées avec l'eau permutée	Larves d'élevage testées avec l'eau de mare	Larves de mare testées avec l'eau de mare	Larves d'élevage testées avec l'eau permutée
DL 50	0,003	0,005	0,003	0,005
DL 90	0,006	0,013	0,006	0,009
χ^2	11,754 S.	2,356 N.S.	7,379 N.S.	8,488 S.
Imprécision de DL 50	35 %	14 %	19 %	20 %

Tab. 10 : Comparaison de la sensibilité des larves stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens* d'élevage et de celles provenant de la mare 2 dans l'eau permutée et dans l'eau de la mare.

	Larves de mare testées avec l'eau permutée	Larves d'élevage testées avec l'eau de mare	Larves de mare testées avec l'eau de mare	Larves d'élevage testées avec l'eau permutée
DL 50	0,0007	0,004	0,0002	0,005
DL 90	0,004	0,01	0,0025	0,009
χ^2	1,133 N.S.	7,229 N.S.	2,136 N.S.	8,488 S.
Imprécision de DL 50	76 %	36 %	97 %	20 %

Tab. 11 : Résultats des tests effectués avec l'eau du gîte larvaire (mare 1) après le traitement avec des larves stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens* d'élevage.

Dates des tests effectués après traitement	Mortalité %					Remarques
	24 h	48 h	72 h	4 J	5 J	
J + 2	51,2	82,9	97,6			apparition des nymphes
J + 3	48	82,3	84,3	94,1		
J + 5	14,3	38,8	49,2	74,6		
J + 8	1,3	4,1	11		51,6	
J + 9	7,8	10,2	21	31,7		
J + 10		3,4	12,6	34,4		
J + 13			4,1	15,1		
J + 14	6,5	9	26,5			
J + 16	0	0	0	0		

Tab. 12 : Résultats des tests effectués avec l'eau du gîte larvaire (mare 2) après le traitement avec des larves stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens* d'élevage.

Dates des tests effectués après traitement	Mortalité %		
	24 h	48 h	72 h
J + 2	44,5	79,3	85
J + 3	21,3	34,6	38,4
J + 5	4	16,3	19,2
J + 6	0	0	0
J + 7	0	0	0

Une diminution importante de la population des jeunes larves entre le 7ème et le 20ème jour a été notée. Cette diminution provoquée par l'effet résiduel de la bactérie conduit aux hypothèses suivantes :

- . Le gîte de la mare 1 est ombragé ce qui empêche les rayons solaires de détruire une grande partie des spores de *Bacillus sphaericus*.
- . Du fait que l'eau des trois mares a été agitée, il est possible que les spores soient réparties de façon homogène dans le milieu, ce qui permet aux larves d'être en contact avec les spores partout dans le gîte.

Au 21ème jour, nous observons que les populations larvaire et nymphale sont redevenues quasi-normales. Dans les deux autres mares 2 et 3, la réinstallation des jeunes larves a commencé tôt par rapport à la mare 1 (en moyenne densité au 5ème jour dans la mare 2, et en faible densité au 3ème jour dans la mare 3). Quant à la réapparition des nymphes dans la mare 2, elle a commencé le 12ème jour qui suit le traitement.

Ces résultats montrent, d'une part l'importance de la qualité de l'eau (mare 1 à eau polluée, mare 2 à eau peu polluée et mare 3 à eau claire) et d'autre part, l'importance du couvert du gîte par rapport à l'influence des rayons solaires sur les spores dans les gîtes à ciel ouvert. Il est à noter que malgré l'agitation de l'eau dans la mare 3, la bactérie n'est pratiquement plus active ; ce phénomène est sans doute lié à l'effet du soleil, en effet dans les deux autres mares et notamment dans la mare 1, une activité résiduelle s'est maintenue pendant 20 jours.

6 - DISCUSSION

Une suppression totale des populations larvaires de *Culex pipiens* est observée, trois jours après un traitement à 160 mg/l d'une poudre primaire de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus*, dans tous les gîtes traités. Cependant, aucune mortalité n'a été enregistrée après cette date dans le gîte à eau claire ; par contre, une activité larvicide résiduelle a été observée dans le gîte à eau peu polluée (durant 12 jours) et dans le gîte à eau fortement polluée (durant 20 jours).

La persistance de *Bacillus sphaericus* est plus importante en eau polluée qu'en eau claire. Nos résultats confirment ceux obtenus par HORNBY

et al. (1981 et 1984). Ces auteurs ont observé une persistance de 30 jours dans l'eau claire et de 90 jours dans l'eau polluée en utilisant une dose de $2,5 - 7,5 \times 10^4$ spores/ml contre les populations larvaires de *Culex quinquefasciatus* et de *Culex nigripalpus*. Par contre, SILAPANUNTAKUL *et al.* (1983) ont montré que la souche 1593 a, au contraire, une persistance de six mois dans l'eau polluée et de neuf mois dans l'eau claire.

D'autres expérimentations menées par MULLA *et al.* (1984) au sud de la Californie, montrent que la persistance de *Bacillus sphaericus* souche 2362, IF 117 contre les populations larvaires de *Culex tarsalis* et d'*Anopheles franciscanus* a duré plus de trois semaines avec une dose de 0,22 kg/ha. Quant à HOTI and BALARAMAN (1984), ils ont montré qu'un traitement hebdomadaire à une dose de 240 mg/m² des souches B 6 et B 64 de sérotype H 5 dans des mares à eau claire d'une surface de 2-5 m², à Pondicherry-Inde, a été efficace pour supprimer les populations larvaires d'*Anopheles subpictus* et de *Culex sitiens*.

La persistance de *Bacillus sphaericus* est donc, semble-t-il, liée à la qualité de l'eau. Toutefois, selon nos observations, d'autres facteurs peuvent intervenir et influencer la persistance comme les rayons solaires dont les effets sont apparemment destructifs pour les spores, MULLIGAN *et al.* (1980) notamment dans le gîte à eau claire (mare 3 à ciel ouvert). Par contre, dans le gîte ombragé à eau polluée (mare 1), les spores seraient mieux protégées de l'effet du soleil. Cette hypothèse est confirmée par les résultats obtenus plus loin dans le chapitre VII. De plus, d'autres observations (HORNBY *et al.*, 1984) montrent que la persistance est liée au nombre de spores et que le nombre de spores diminue plus vite dans l'eau claire que dans l'eau polluée.

Enfin, l'agitation de l'eau à chaque prélèvement avait pour but d'homogénéiser les spores dans l'eau, afin d'éviter le problème de la sédimentation. Cependant, bien que cette agitation contribue à une activité résiduelle au cours d'un certain temps, cet effet "agitation" n'est plus efficace après 20 jours dans le meilleur cas (mare 3 à eau polluée).

7 - CONCLUSION

Aucun effet toxique n'a été observé aux doses utilisées sur la faune non-cible des gîtes. Les larves de *Culiseta annulata* ne sont pas sensibles à la souche 1593-4 même à forte dose (10 mg/l).

Bien que les matières organiques et les microorganismes, en eau polluée, puissent influencer l'activité larvicide résiduelle de *Bacillus sphaericus* (LEONARD *et al.*, 1977 ; LACEY, 1982) , la persistance de la souche 1593-4 dans des gîtes à *Culex pipiens* a duré plus longtemps en eau polluée qu'en eau claire.

Dans des gîtes ombragés, il semble que la bactérie soit mieux protégée de l'effet du soleil.

L'homogénéisation des spores par agitation de l'eau au cours du traitement contribue à une certaine activité résiduelle pendant 20 jours en eau polluée.

Il est cependant intéressant d'étudier la dynamique de la population durant la période avant et après traitement et en même temps la persistance des spores dans des gîtes naturels : études entomologiques et bactériologiques (chapitre suivant).

CHAPITRE V

RELATION ENTRE VIABILITE-NOMBRE DE SPORES DE DIFFERENTES FORMULATIONS DE *BACILLUS SPHAERICUS* ET EFFECTIF LARVAIRE DE *CULEX PIPIENS* EN GITES NATURELS

1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Gîtes expérimentaux

Il s'agit de gîtes identiques, constitués par des cuves maçonnées, à ciel ouvert, de 2,7 m de côté sur 3 m de hauteur. Ces cuves ont été mises en eau pour l'expérience à partir du réseau urbain et sur une profondeur de 50 cm correspondant le plus souvent à la profondeur maximale rencontrée dans les gîtes urbains. Ces cuves sont situées dans le périmètre d'une distillerie de marc de raisin (Lansargues, région de Montpellier). En été, elles constituent d'excellents biotopes larvaires à *Culex pipiens* (photo 4).

A son début, l'expérience s'est déroulée en l'absence de substrat organique mais ce dernier ne tarde pas à se constituer après mise en eau, à partir de cadavres d'insectes et de débris végétaux. Quelques jours après leur mise en eau, les cuves commencent à se coloniser en larves. La présence d'algues vertes notée en surface de l'eau n'a pas empêché l'installation d'une population larvaire importante.

1.2. Contrôle et application des formulations de *Bacillus sphaericus*

Lorsque la densité larvaire est jugée suffisamment importante, aux jours J-3, J-2 et J-1, quatre "dippings" à la louche sont réalisés aux quatre coins de chaque cuve. Les larves et nymphes capturées, à la même heure chaque jour, sont placées dans des bocaux, ramenées au laboratoire et dénombrées.

Trois poudres de *Bacillus sphaericus* : deux formulations (Dulmage et ABBOTT n° 6184) de la souche 2362 et une formulation de la souche 2297 ou MR4 sont appliquées aux concentrations de 0,0006, 0,02, 0,5 et 1,5 mg/l dans 12 cuves. Deux autres cuves ont servi de témoin.

Les suspensions de *Bacillus sphaericus* sont appliquées à l'aide d'un pulvérisateur. Les "dippings" après application sont réalisés à J + 3, J + 7 puis deux fois par semaine jusqu'à augmentation notable de l'effectif larvaire.

L'analyse physico-chimique de l'eau de deux cuves a été effectuée au cours des essais (tableau 13).

Tab. 13 : Résultats des analyses physico-chimiques effectuées à partir de deux résultats de deux échantillons d'eau prélevés dans deux cuves avant essai.

Cuve	Matières organiques acides O ₂ /l	Matières organiques alcalines O ₂ /l	Azote ammoniacal mg/l	Nitrites mg/l	Chlorures mg/l	Bicarbonates mg/l	pH	Résistivité Ω/cm ² /cm	Indice de pollution
1	6,7	4,06	2,94	0	35,5	268	7,8	870	18
2	6,92	4,06	3,14	0	35,5	298	7,8	800	19,1

1.3. Analyses bactériologiques

Les échantillons destinés à l'analyse bactériologique ont été prélevés au fond des gîtes à l'aide d'un appareil spécial utilisé essentiellement pour des prélèvements d'eau en puits et forages pour les contrôles de potabilité (photo 5).

Les échantillons subissent, dans les premières heures qui suivent leur prélèvement, un choc thermique à 80° C pendant 12 minutes au bain-marie. De la Nystatine à 250 U/ml leur est additionnée dans un rapport de 1 à 9. Chaque échantillon est ensuiteensemé à raison de 100 µl sur milieu solide M.B.S. (KALFON *et al.*, 1983) ayant reçu auparavant 100 mg/l de Streptomycine. La lecture a lieu après 48 heures d'incubation à 35° C ; l'identification des spores est faite au microscope à contraste de phase.

Photo 4 : Les cuves cimentées constituent d'excellents gîtes à *Culex pipiens* (à Lansargues).

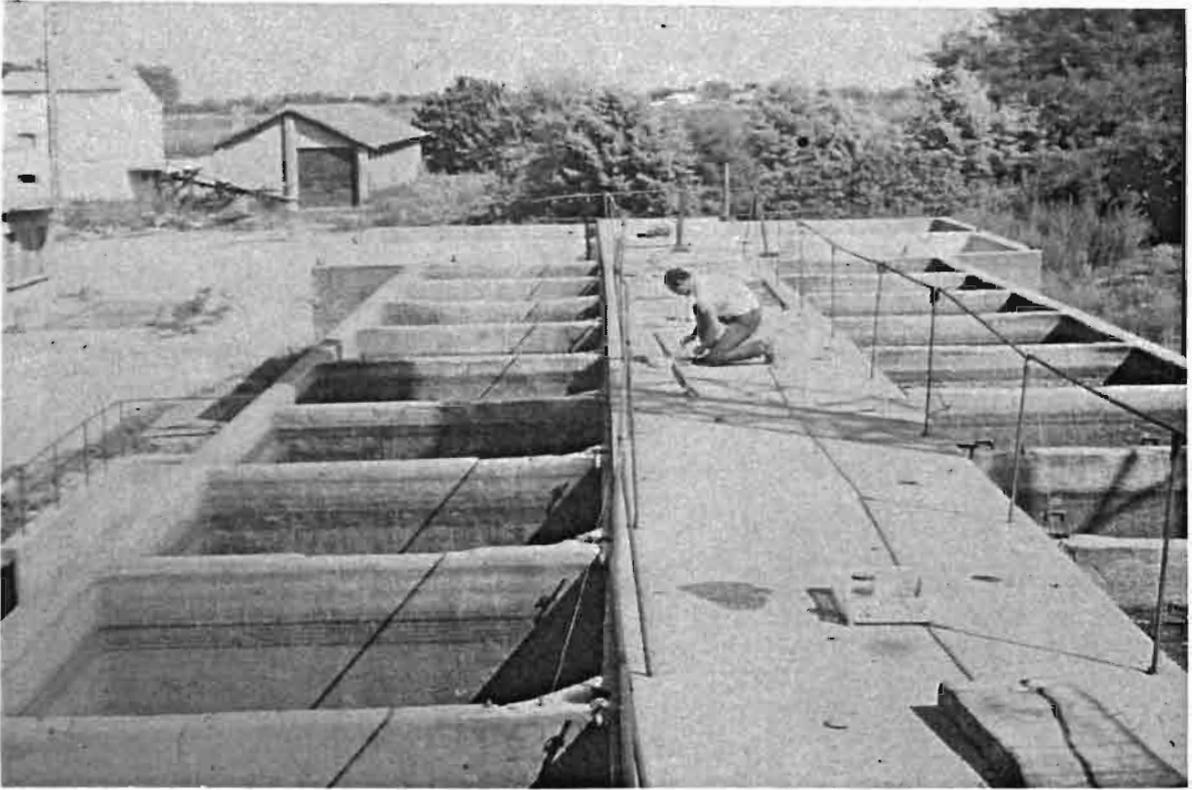
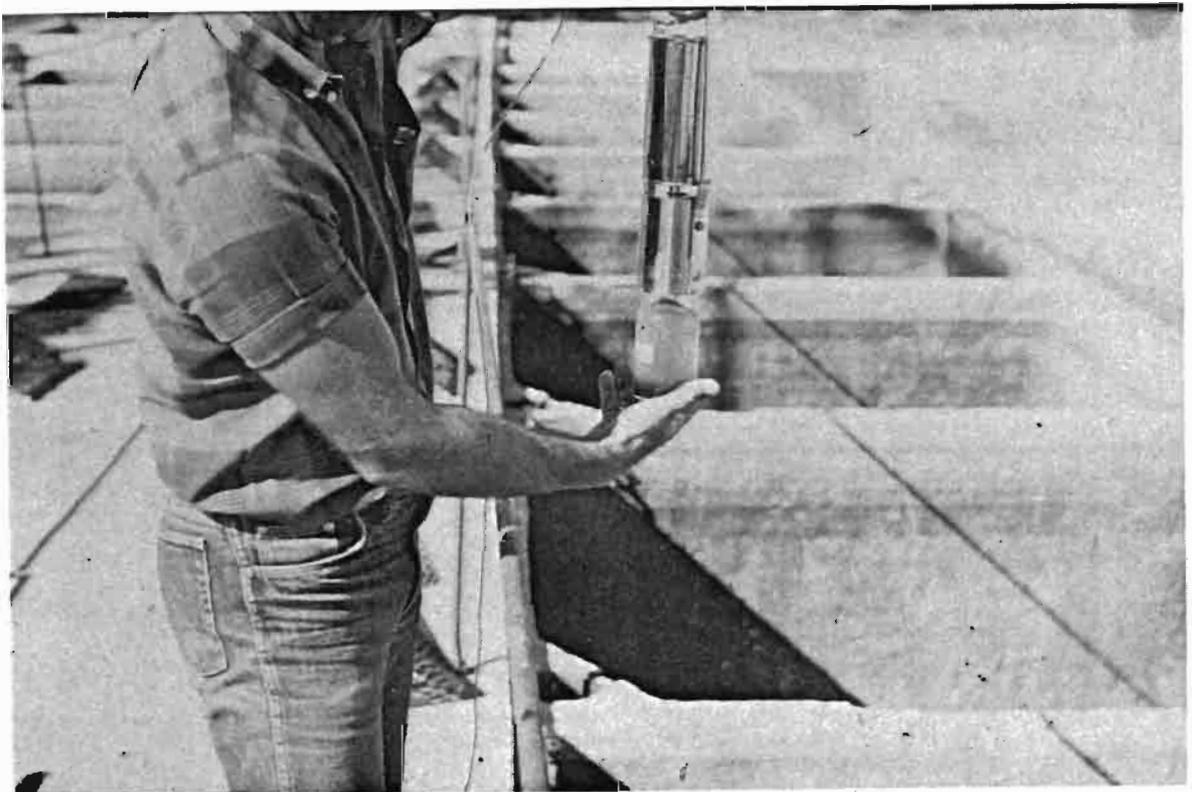


Photo 5 : Appareil de G. Sinègre pour les prélèvements d'analyse bactériologique. Prélèvements effectués au fond des cuves à l'aide de cet appareil.



1.4. Test sur la toxicité des spores récupérées dans les gîtes traités

Les échantillons précédents sont destinés d'une part à l'analyse bactériologique, d'autre part aux tests d'efficacité des spores vis-à-vis des larves de *Culex pipiens* au laboratoire.

Il s'agit de réaliser des tests larvicides sur des échantillons d'eau traités avec *Bacillus sphaericus*. La technique est celle utilisée précédemment (chapitre 1). Toutes les séries de tests sont effectuées sur les stades L₂-L₃ de *Culex pipiens* dans les conditions du laboratoire à une température de 27° C ± 1.

Cette expérience complémentaire au laboratoire a pour but, d'une part de savoir si les spores viables prélevées sont toujours toxiques, et, d'autre part, d'essayer d'expliquer le devenir des spores, dans les gîtes naturels, en relation avec leur viabilité et leur toxicité au cours du temps.

2 - RÉSULTATS

2.1. Effet de trois poudres sur l'effectif larvaire

2.1.1. A faible dose

- A la concentration de 0,0006 mg/l (0,3 mg/m²) de poudre, on ne note aucun effet significatif sur la population larvaire L₃ - L₄ de *Culex pipiens* (Fig. 8 et 9).

- A la concentration de 0,02 mg/l (10 mg/m²), au 3^{ème} jour du traitement, une légère diminution de la population larvaire a été observée, avec les deux formulations Dulmage et 2297; La formulation ABBOTT a été nettement plus active à la même concentration. Toutefois, à partir de J + 10, la densité larvaire L₃ - L₄, redevient relativement comparable à celle trouvée avant l'application (Fig. 10).

En ce qui concerne les nymphes, les résultats correspondent sensiblement à ceux obtenus avec les larves L₃ - L₄ (Fig. 11). Quant aux larves L₁ - L₂, nous notons une baisse quasi-totale à la concentration de 0,02 mg/l (10 mg/m²) pour les deux formulations de la souche 2362 (ABBOTT et Dulmage) ; par contre, à cette même concentration et avec la souche 2297, aucun effet n'a été observé sur la densité larvaire de L₁ - L₂.

Fig. 8 : Moyenne du nombre de larves stades L₃-L₄ dans les cuves témoins

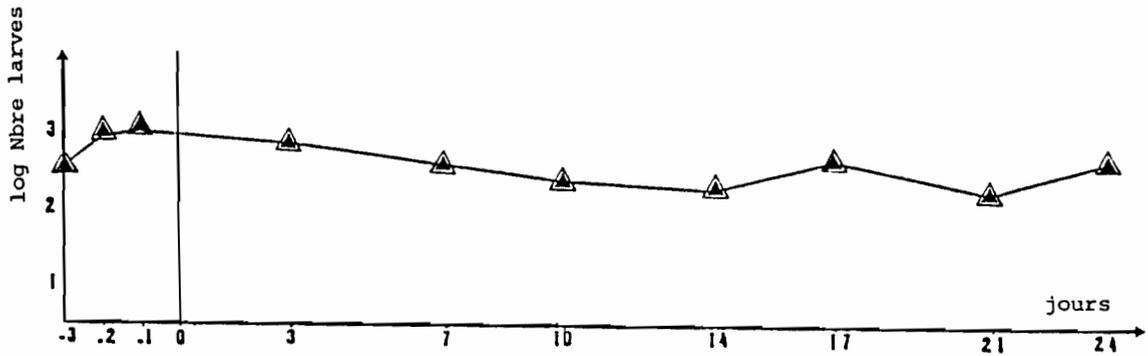


Fig. 9 : Variation des effectifs de L₃-L₄ dans les cuves traitées à la dose de 0,0006 (0,3 mg/m²)

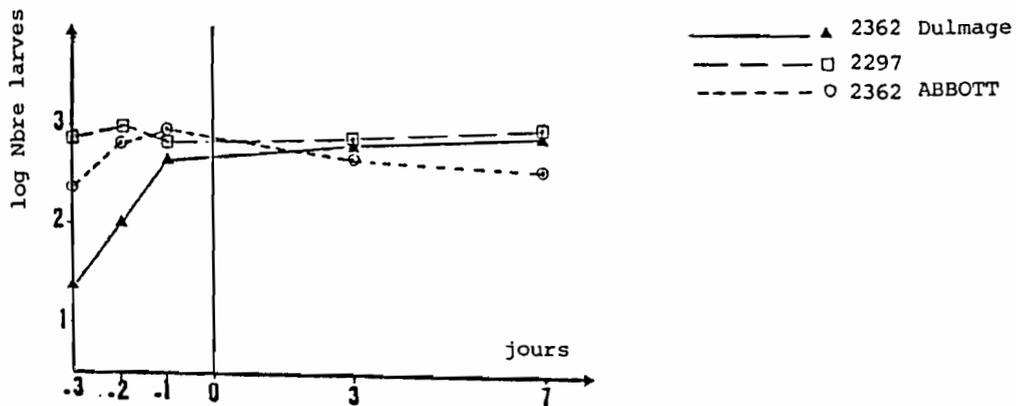


Fig. 10 : Variation des effectifs des stades L₃-L₄ dans les cuves traitées à 0,02 mg/l (10 mg/m²)

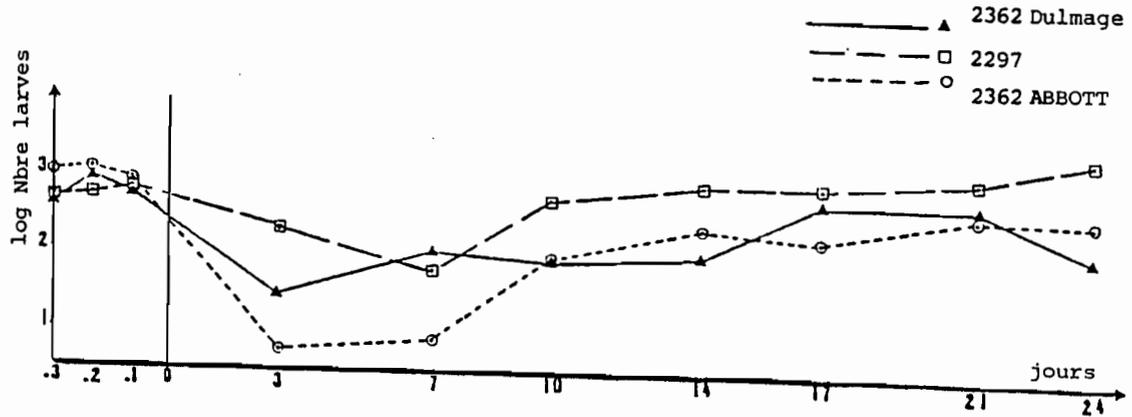
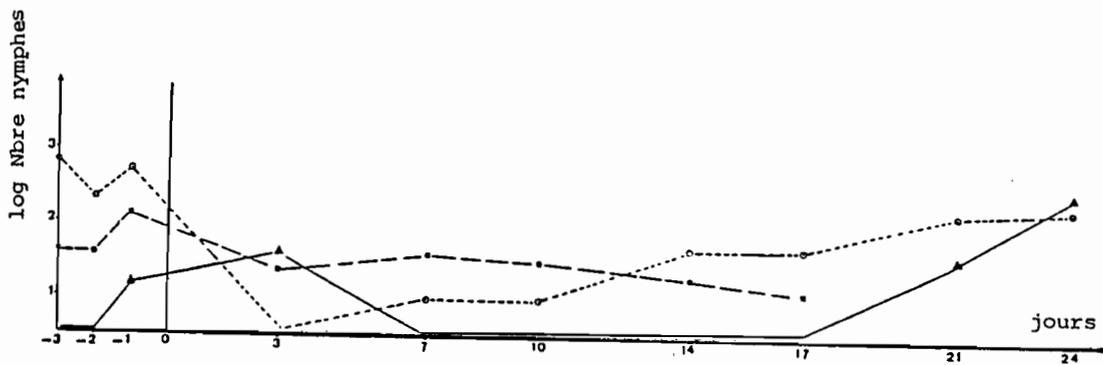


Fig. 11 : Variation du nombre de nymphes dans les cuves traitées à 0,02 mg/l (10 mg/m²)



Notons que dans le cas de la formulation Dulmage (Fig. 11), nous observons une baisse de la densité nymphale de J + 7 à J + 17. Cette chute ne peut être attribuée à la bactérie seule, puisque la population larvaire L₃-L₄ n'a pas été affectée. Cette diminution serait plus vraisemblablement due à une variation naturelle de la dynamique de la population préimaginale dans le gîte.

2.1.2. A forte dose

- A la concentration de 0,5 mg/l (250 mg/m²), nous notons à J + 3 une forte diminution de la population larvaire L₃-L₄, particulièrement pour les deux formulations de la souche 2362 (ABBOTT et Dulmage) à J + 7, ce qui révèle une activité lente, mais plus forte que les autres formulations à cette même dose. En effet, la recolonisation par les larves L₃-L₄ augmente rapidement (à J + 7) pour la formulation ABBOTT et légèrement pour la formulation Dulmage, contrairement à la souche 2297 qui a un effet toxique plus durable (jusqu'à J+ 10) que les deux autres. Toutefois, une légère activité résiduelle en fonction du temps pourrait être signalée pour la formulation Dulmage, ainsi que pour la formulation de la souche 2297 entre J + 17 et J + 24 (Fig. 12).

Concernant les nymphes, on note une chute immédiate de la densité dès J + 3 jusqu'à J + 10 pour les trois formulations, excepté une légère remontée pour la formulation 2362 ABBOTT 6184 (Fig. 13).

Quant aux larves L₁-L₂ à 0,5 mg/l, nous notons à J + 7 une reprise marquée de la recolonisation, par exemple : 952 L₁-L₂ pour la formulation Dulmage, 218 et 366 L₁-L₂ à cette même dose, respectivement pour les formulations ABBOTT et 2297.

- A 1,5 mg/l (750 mg/m²), nous observons une mortalité totale durant sept jours pour la formulation Dulmage et durant dix jours pour les deux formulations ABBOTT et 2297 qui semblent plus actives à cette dose.

A partir de J + 14, pour les trois formulations, la densité larvaire de L₃-L₄ devient très importante (Fig. 14). Par contre, à J + 17, J + 21 et J + 24, nous observons une diminution significative du nombre de larves en fonction du temps ; par exemple, pour la formulation de la souche 2297, les "dippings" à J + 24 fournissent seulement quatre larves L₃-L₄ contre 311 à J + 14. De même, neuf larves L₃-L₄ sont capturées à J + 21 dans la cuve traitée à la formulation Dulmage contre 597 à J + 10.

Fig. 12 : Variation des effectifs des stades L_3-L_4 dans les cuves traitées à la dose de $0,5 \text{ mg/l}$ (250 mg/m^2)

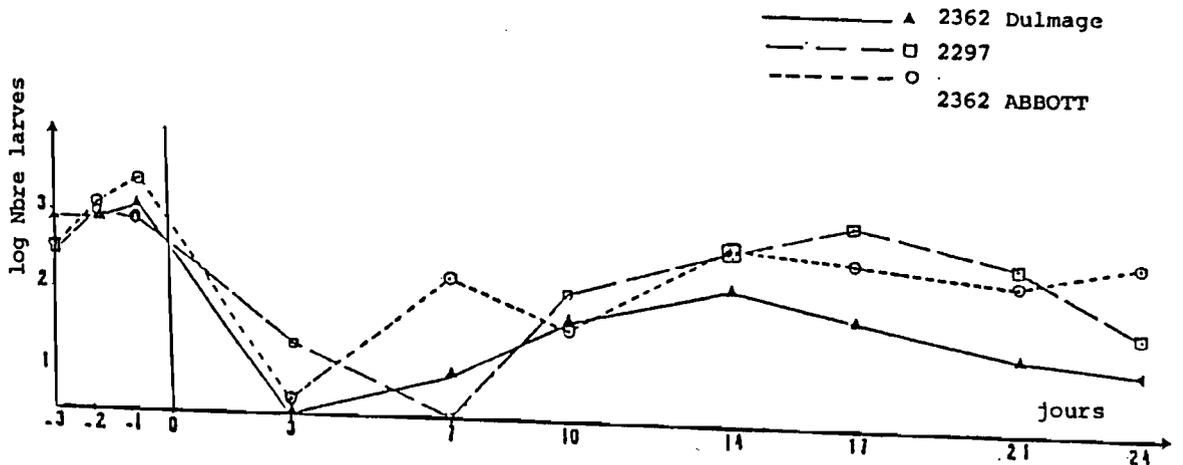
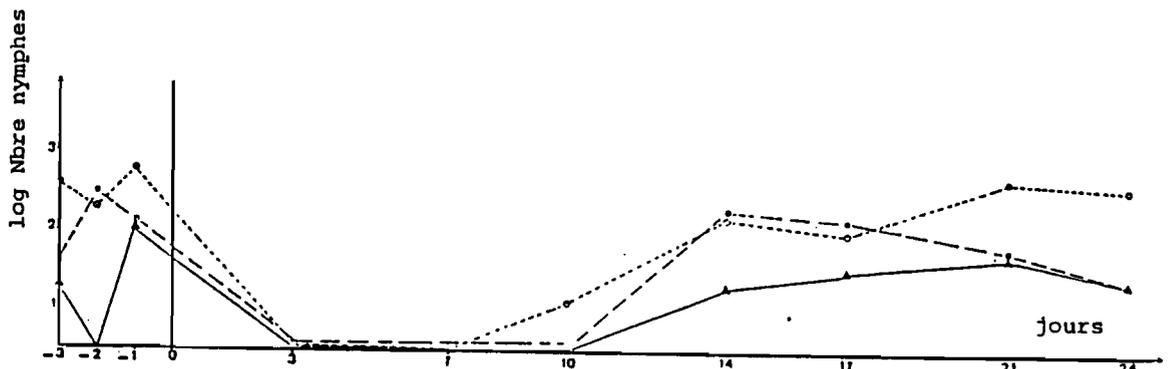


Fig. 13 : Variation de la population nymphale dans les cuves traitées à la dose de $0,5 \text{ mg/l}$ (250 mg/m^2)



Ces résultats seraient en faveur d'une certaine persistance dans le milieu, d'autant que de telles variations ne sont pas notées dans les cuves témoins.

L'effectif nymphal est quasiment nul à 750 mg/m² pour la souche 2297 et légèrement augmenté pour les deux autres formulations, ce qui confirme l'efficacité de la souche 2297 par rapport aux deux formulations de la souche 2362 (ABBOTT et Dulmage) (Fig. 15).

A J + 10 et J + 14, la recolonisation est totale, le nombre de L₁-L₂ avec cette dose est souvent supérieur à celui noté avant application.

D'une manière générale, les résultats montrent qu'aux doses les plus fortes, il existe une excellente efficacité immédiate des trois formulations utilisées, avec un léger avantage pour la formulation de la souche 2297. Ces résultats indiquent par ailleurs qu'il n'existe pas, d'un point de vue opérationnel, une efficacité résiduelle suffisante pour éviter, dans le temps, de nouvelles applications.

2.2. Analyse statistique des résultats

2.2.1. Variations des effectifs L₁-L₂ dans les cuves

Vu les résultats obtenus avant et après l'application de trois formulations de *Bacillus sphaericus* (tableaux 13, 14 et 15), nous avons réalisé une étude statistique pour une meilleure compréhension de l'évolution de cette bactérie dans la nature.

Une analyse de variance entre les cuves traitées à différentes concentrations pour une formulation donnée a permis de noter une différence significative entre les effectifs L₁-L₂ relevés d'une cuve donnée au cours de la durée de l'expérimentation (tableau 16). Par contre, la différence entre les formulations pour une même concentration n'est pas statistiquement significative (tableau 17).

2.2.2. Variations des effectifs L₃-L₄

Si la différence entre les cuves traitées avant et après application d'une concentration donnée pendant la durée de l'expérimentation est significative (tableau 18), en revanche, nous ne notons pas de différence significative entre les formulations pour une même concentration (tableau 19).

Fig. 14 : Variation des effectifs de stades L₃-L₄ dans les cuves traitées à la dose de 1,5 mg/l (750 mg/m²)

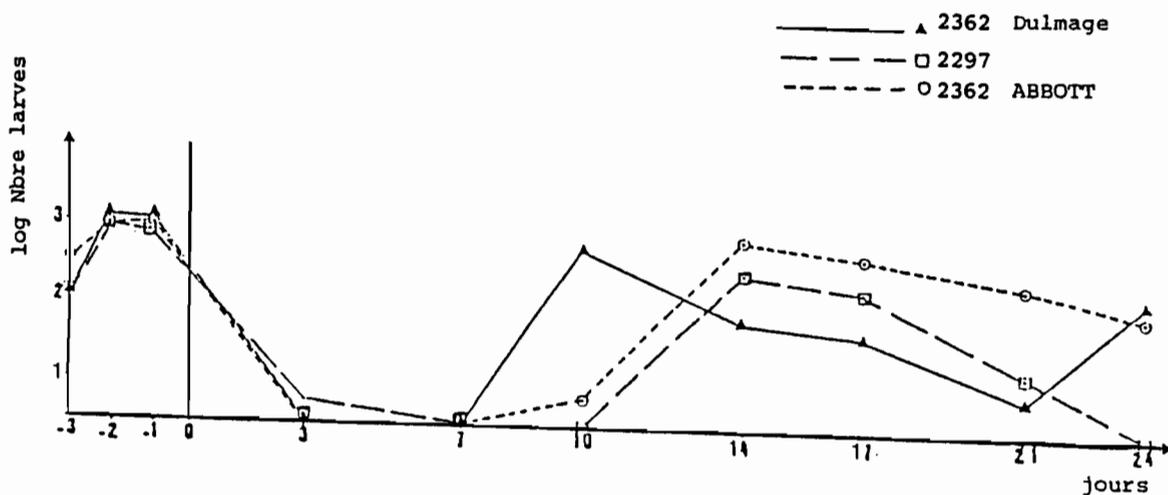
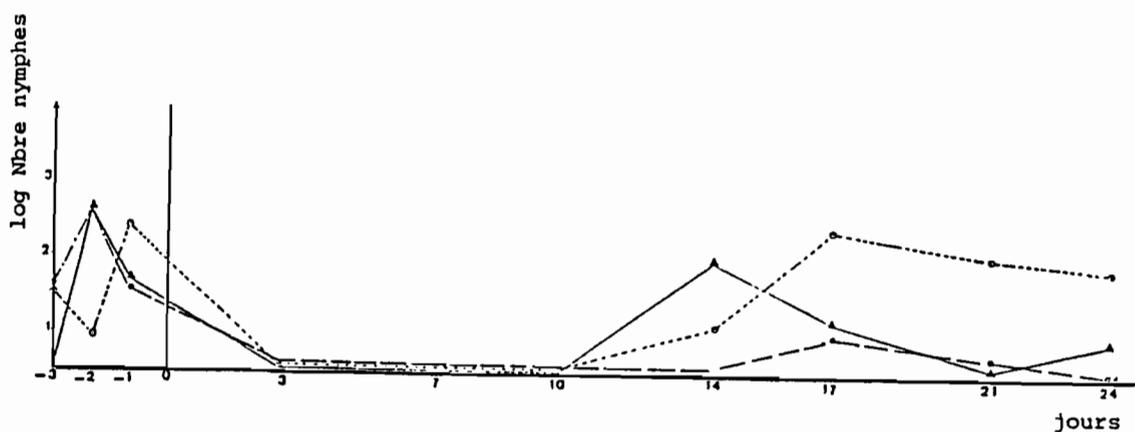


Fig. 15 : Variation de la population nymphale dans les cuves traitées à la dose de 1,5 mg/l (750 mg/m²)



Tab. 13 : Effectifs des larves L₁-L₂ de *Culex pipiens* avant et après applications de trois poudres de *Bacillus sphaericus* en cuves

SOUCHE	n° de cuve	concentration mg/l	mg/m ²	Dipping avant traitement			Dipping après traitement			
				J-3	J-2	J-1	J+3	J+7	J+10	J+14
Témoins	1	0	0	2255	1137	1414	1183	519	132	692
	2	0	0	3362	4668	3360	1087	6220	3185	3000
2362 poudre Dulmage	3	0,0006	0,3	1082	747	1434	1677	1086		
	4	0,02	10	1078	995	552	122	5	25	430
	5	0,5	250	785	2322	1255	0	952	748	873
	6	1,5	750	1448	1296	851	0	402	1325	449
2362 poudre 6184 ABBOTT	7	0,0006	0,3	1158	509	1258	1095	1274		
	8	0,02	10	2355	1748	2038	3	84	668	1595
	9	0,5	250	1650	1349	2228	82	218	863	1703
	10	1,5	750	1605	836	600	3	31	453	1204
2297	11	0,0006	0,3	1627	1632	1160	2831	1162		
	12	0,02	10	937	1387	260	205	1672	3000	2600
	13	0,5	250	2093	1209	3234	4	366	1180	940
	14	1,5	750	1313	826	3124	4	36	2064	1263

Tab. 14 : Effectifs des larves L₃-L₄ de *Culex pipiens* avant et après applications de trois poudres de *Bacillus sphaericus* en cuves

SOUCHE	n° de cuve	concentration mg/l	mg/m ²	Dipping avant traitement			Dipping après traitement							
				J-3	J-2	J-1	J+3	J+7	J+10	J+14	J+17	J+21	J+24	J+27
Témoins	1	0	0	792	1504	1484	1650	331	63	78	728	310	539	336
	2	0	0	204	593	919	884	547	738	226	434	172	485	2425
2362 poudre DuImage	3	0,0006	0,3	25	110	561	758	1021						
	4	0,02	10	185	934	868	55	0	10	2	793	526	127	283
	5	0,5	250	207	721	1534	0	10	55	162	71	27	17	352
	6	1,5	750	126	1100	1053	0	0	597	215	48	9	176	256
2362 poudre 6184 ABBOTT	7	0,0006	0,3	233	681	1026	592	444						
	8	0,02	10	356	1987	849	5	7	101	436	205	478	359	774
	9	0,5	250	321	1429	2664	5	174	51	451	357	218	383	558
	10	1,5	750	378	988	1102	0	1	8	874	559	277	124	363
2297	11	0,0006	0,3	861	1061	636	868	1130						
	12	0,02	10	392	379	1047	315	106	319	1210	1465	1562	2495	1430
	13	0,5	250	294	911	677	27	3	138	535	1253	366	42	32
	14	1,5	750	144	784	650	6	1	3	311	221	21	4	39

Tab. 15 : Effectifs des nymphes de *Culex pipiens* avant et après applications de trois poudres de *Bacillus sphaericus* en cuves

SOUCHÉ	n° de cuve	concentration mg/l	mg/m ²	Dipping avant traitement			Dipping après traitement							
				J-3	J-2	J-1	J+3	J+7	J+10	J+14	J+17	J+21	J+24	J+27
Témoins	1	0	0	4	99	16	190	40	11	18	54	64	304	145
	2	0	0	44	46	58	60	16	12	36	7	2	2	118
2362 poudre Dulmage	3	0,0006	0,3	4	2	15	124	340						
	4	0,02	10	0	0	17	40	0	0	0	0	38	381	391
	5	0,5	250	19	3	106	0	0	3	21	31	46	25	22
	6	1,5	750	0	406	15	0	0	0	100	16	4	8	37
2362 poudre 6184 ABBOTT	7	0,0006	0,3	21	12	341	613	493						
	8	0,02	10	772	219	510	1	10	10	54	50	174	261	301
	9	0,5	250	383	204	571	0	1	15	176	104	522	445	331
	10	1,5	750	35	8	263	0	1	3	13	253	110	81	63
2297	11	0,0006	0,3	123	269	96	104	122						
	12	0,02	10	47	48	124	25	36	34	21	13	23	8	210
	13	0,5	250	36	325	137	3	5	1	210	144	70	26	34
	14	1,5	750	39	362	45	1	1	3	1	11	6	3	0

Tab. 16 : Test statistique réalisé à partir des effectifs L₁-L₂ (d'après le tableau 13). Analyse de variance entre les traitements effectués sur neuf cuves et les dippings effectués avant et après traitement.

Variations	d.d.l.	SCF	CM	F	significatif ou non
Modèle	14	10 082,67	720,19	7,13	oui à 0,0001
Cuves traitées	8	1 520,59		1,88	oui à 0,08
Dipping pour chaque cuve au cours du temps	6	8 562,08		14,12	oui à 0,0001
Résiduelle	48	4 850,25		101,05	
Total	62	14,932,92			

Tab. 17 : Test statistique basé sur les effectifs de L₁-L₂ (d'après le tableau 13). Analyse de variance entre les trois formulations et les concentrations utilisées.

Variations	d.d.l.	SCF	CM	F	significatif ou non
Modèle	8	1 520,59	190,07	0,77	non < 0,63
Formulations (souches)	2	704,54		1,42	non < 0,25
Concentrations	6	816,54		0,55	non < 0,77
Résiduelle	54	13 412,33		248,38	
Total	62	14 932,92			

Tab. 18 : Test statistique réalisé à partir des effectifs de L₃-L₄ (d'après le tableau 14). Analyse de variance entre les traitements effectués sur neuf cuves et les dippings effectués avant et après traitement.

Variations	d.d.l.	SCF	CM	F	significatif ou non
Modèle	18	105 31,76	585,098	10,28	oui à 0,0001
Cuves traitées	8	2 543,49		5,58	oui à 0,0001
Dipping pour chaque cuve au cours du temps	10	7 988,26		14,03	oui à 0,0001
Résiduelle	80	4 555,05		56,93	
Total	98	15 086,80			

Tab. 19 : Test statistique basé sur les effectifs de L₃-L₄ (d'après le tableau 14). Analyse de variance entre les trois formulations et les concentrations utilisées.

Variations	d.d.l.	SCF	CM	F	significatif ou non
Modèle	8	2 543,49	317,93	2,28	oui à 0,02
Formulations (souches)	2	524,44		1,88	non < 0,16
Concentrations	6	2 019,06		2,41	oui à 0,03
Résiduelle	90	12 543,30	139,37		
Total	98	15 086,81			

2.2.3. Variations des effectifs de nymphes

Le test statistique nous montre une différence significative entre les cuves traitées et les "dippings" effectués pour une cuve donnée durant la période de l'expérimentation (tableau 20). Cependant, nous notons une différence significative également entre les formulations mais pas entre les concentrations pour une souche donnée (tableau 21).

2.2.4. Conclusion

La persistance de ces trois formulations appliquées dans les différentes cuves montre les faits suivants :

- dans les cuves traitées à 0,02 mg/l par la souche 2297 et à 0,5 mg/l par la souche 2362 (ABBOTT), la réinstallation des larves L₃-L₄ a été plus rapide que dans les autres cuves traitées avec d'autres concentrations et formulations : la persistance a été la plus grande dans la cuve traitée à 1,5 mg/l de la souche 2297 (Fig. 16).

- dans les cuves traitées par la souche 2362 (ABBOTT) à 0,02 mg/l et à 0,5 mg/l, la population préimaginale s'est relevée plus rapidement que dans les autres cuves (Fig. 17).

- enfin, nous ne notons pas de différence significative de persistance entre les formulations même pour une même concentration, dans tous les cas traités, selon l'analyse statistique basée sur les effectifs larvaires de L₁-L₂.

On ne peut interpréter correctement ces résultats sans tenir compte de la dynamique de la population de moustiques dans chacune des cuves. C'est pourquoi, il est difficile à ce niveau de l'expérimentation de déduire que la persistance est due à telle ou telle formulation.

2.3. Viabilité des spores dans les différents gîtes

La numération des spores des trois poudres a donné des résultats proches les uns des autres, à savoir : $1,4 \times 10^9$, $1,3 \times 10^9$ et $1,9 \times 10^9$ spores/mg respectivement pour les poudres 2362 Dulmage, 2362 ABBOTT et 2297 ou MR 4.

L'analyse bactériologique des échantillons prélevés après application concerne le dénombrement des spores viables trouvées uniquement au fond des gîtes traités à raison de 0,02, 0,5 et 1,5 mg/l.

Tab. 20 : Test statistique réalisé à partir des effectifs des nymphes (d'après le tableau 15). Analyse des variances entre les traitements effectués sur neuf cuves et les dippings effectués avant et après traitement.

Variations	d.d.l.	SCF	CM	F	significatif ou non
Modèle	18	2 285,90	126,99	4,59	oui à 0,0001
Cuves traitées	8	1 030,80		4,66	oui à 0,0001
Dipping pour chaque cuve au cours du temps	10	1 255,09		4,54	oui à 0,0001
Résiduelle	80	2 212,30	27,65		
Total	98	4 498,20			

Tab. 21 : Test statistique basé sur les effectifs des nymphes (d'après le tableau 15). Analyse de variance entre les trois formulations et les concentrations utilisées.

Variations	d.d.l.	SCF	CM	F	significatif ou non
Modèle	8	1 030,80	128,85	3,34	oui à 0,002
Formulations (souches)	2	670,06		8,70	oui à 0,0004
Concentrations	6	360,75		1,56	non < 0,17
Résiduelle	90	3 467,40	38,53		
Total	98	4 498,20			

Fig. 16 : Persistance de *Bacillus sphaericus* dans les cuves d'après l'analyse statistique sur les effectifs des L₃, L₄ de *Culex pipiens* pour les différentes concentrations (en mg/l) et pour une formulation donnée.

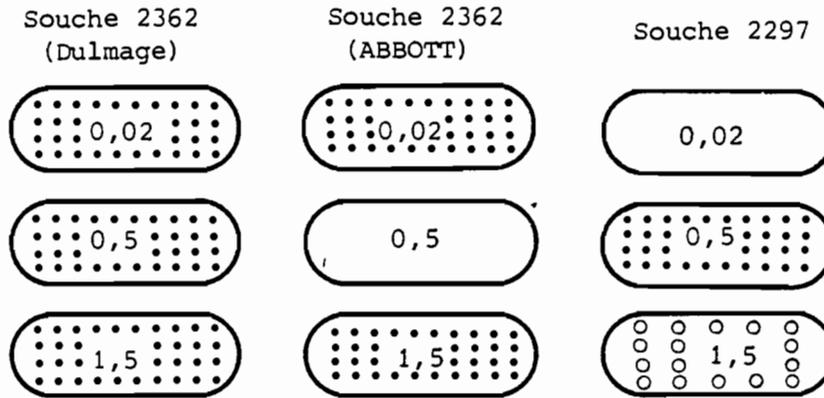
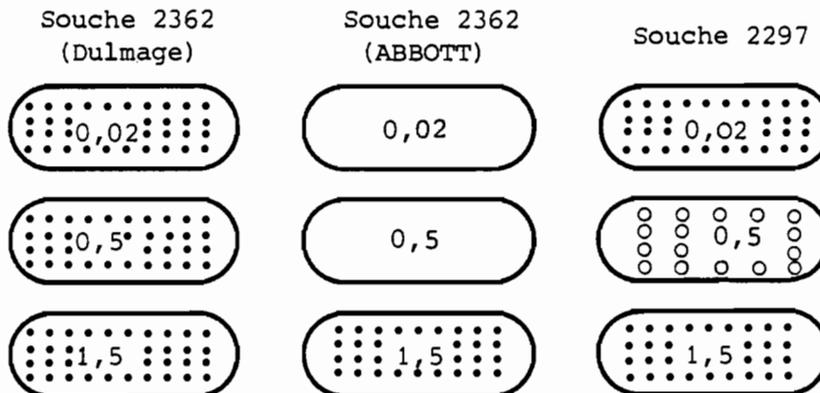
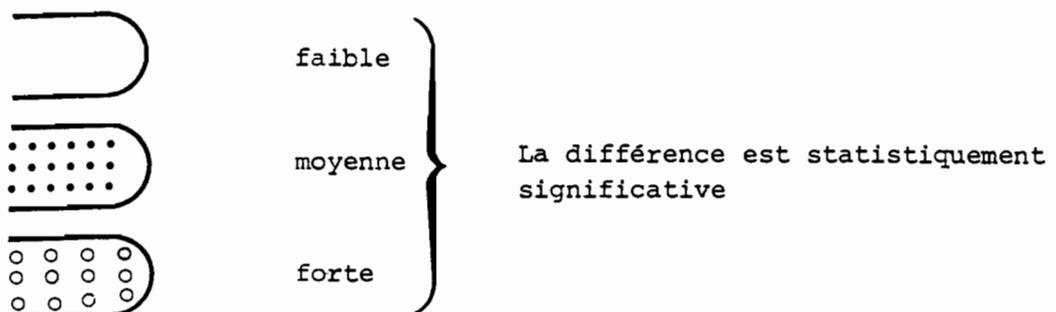


Fig. 17 : Persistance dans les mêmes cuves d'après l'analyse statistique basée sur les effectifs des nymphes de *Culex pipiens* pour les différentes concentrations (en mg/l) et pour une formulation donnée.



Différence de persistance entre les trois catégories de cuves



Les résultats sont donnés sous forme de graphique (Fig. 18) et de tableau (tableau 22). Ils montrent que, quelle que soit la poudre utilisée, le nombre de spores accumulées sur le fond est relativement semblable de J + 3 à J + 28.

2.4. Efficacité des spores récupérées dans les gîtes

Les résultats montrent qu'après deux semaines, les spores ont commencé à perdre leur toxicité vis-à-vis des larves (Fig. 18) (tableau 23).

A J + 24, les spores ont perdu la quasi-totalité de leur toxicité bien qu'elles soient viables au fond des gîtes. Ces résultats pourraient expliquer la recolonisation des cuves par les larves après J + 3 ou J + 7 selon les concentrations utilisées.

Les résultats des analyses bactériologiques et entomologiques confirment que les spores présentes sur le fond des gîtes ne sont plus efficaces, après un certain temps, quelle que soit la formulation utilisée dans cette étude. En effet, la relation viabilité-toxicité des spores est d'autant moins étroite que les spores demeurent longtemps dans le gîte dans les conditions naturelles.

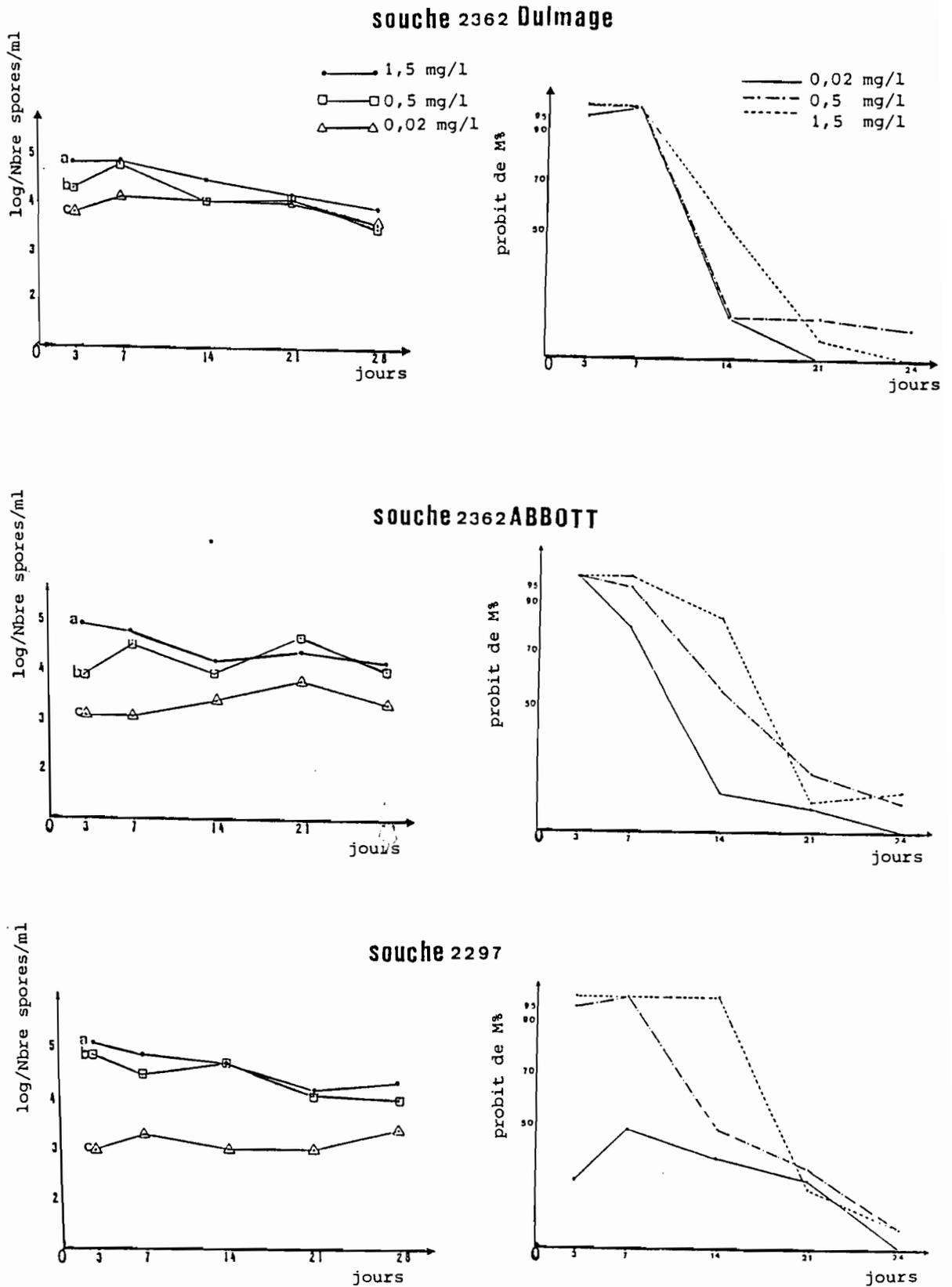
2.5. Modification morphologique au sein des spores vues par microscopie électronique à transmission

La mise en évidence d'une perte de toxicité des spores viables récupérées d'un gîte traité par *Bacillus sphaericus* nous a amené à rechercher d'éventuels changements au sein des spores.

D'après la technique utilisée par CHARLES et de BARJAC (1982), l'observation au microscope électronique de coupes ultra-fines effectuées sur la souche d'origine 2362 (formulation 2362 ABBOTT) met en évidence la présence d'inclusions visibles à côté de la spore (planche 11 c), ce qui rappelle les inclusions de la souche 2297 ou MR 4 démontrées par YOSTEN and DAVIDSON (1982) et par de BARJAC et CHARLES (1983).

Par contre, les inclusions ne sont pas présentes dans les spores récupérées après 28 jours au fond du gîte (planche 11 a et b). L'absence de ces inclusions pourrait être à l'origine de la perte de toxicité des spores qui se trouvent au fond du gîte dans différentes conditions naturelles.

Fig. 18 :



Accumulation des spores au fond des gîtes

Efficacité des spores accumulées sur les larves de *Culex pipiens* au laboratoire

Tab. 22 : Analyse bactériologique montrant le nombre de spores viables accumulées au fond des gîtes.

Souche	Série Cuves	Concentration mg/l poudre	Titration de la poudre spores/mg	Nombre de spores/ml dans l'eau traitée				
				3 J	7 J	14 J	21 J	28 J
Dulmage 2362	4	0,02	$1,4 \times 10^9$	$6,3 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$9,7 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$	$3,1 \times 10^3$
	5	0,5		$2,2 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$3,6 \times 10^3$
	6	1,5		$6,0 \times 10^4$	$6,1 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$7,9 \times 10^3$
2362 ABBOTT 6184	8	0,02	$1,3 \times 10^9$	$1,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$
	9	0,5		$7,7 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4$	$4,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
	10	1,5		$8,5 \times 10^4$	$6,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
2297 (MR4)	12	0,02	$1,9 \times 10^9$	$9,1 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$
	13	0,5		$7,6 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$4,7 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
	14	1,5		$1,3 \times 10^5$	$7,5 \times 10^4$	$3,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$

Tab. 23 : Résultats de tests biologiques effectués au laboratoire montrant l'efficacité des spores récupérées des gîtes, sur *Culex pipiens*.

Souche	N° de cuve	Traitement mg/l	% Mortalité				
			Prélèvements après traitement				
			J+3	J+7	J+14	J+21	J+28
Dulmage 2362	3	0,0006	20	0	0	0	0
	4	0,02	96	100	16	0	0
	5	0,5	100	100	16	16	12
	6	1,5	100	100	52	8	0
2362 ABBOTT (6184)	7	0,0006	18	0	0	0	0
	8	0,02	100	80	16	10	0
	9	0,5	100	96	56	24	12
	10	1,5	100	100	84	12	16
2297 (MR 4)	11	0,0006	12	0	0	0	0
	12	0,02	28	48	36	28	0
	13	0,5	96	100	48	32	8
	14	1,5	100	100	100	24	8
Témoin	1	-	0	0	0	0	0
	2	-	0	0	0	0	0

Planche 11 : Spores de *Bacillus sphaericus* vues au microscope électronique avant et après le traitement d'un gîte naturel à *Culex pipiens*.

A + B : les spores de la souche 2362 prélevées d'un gîte après 28 jours du traitement, sont dépourvues d'inclusion toxique.

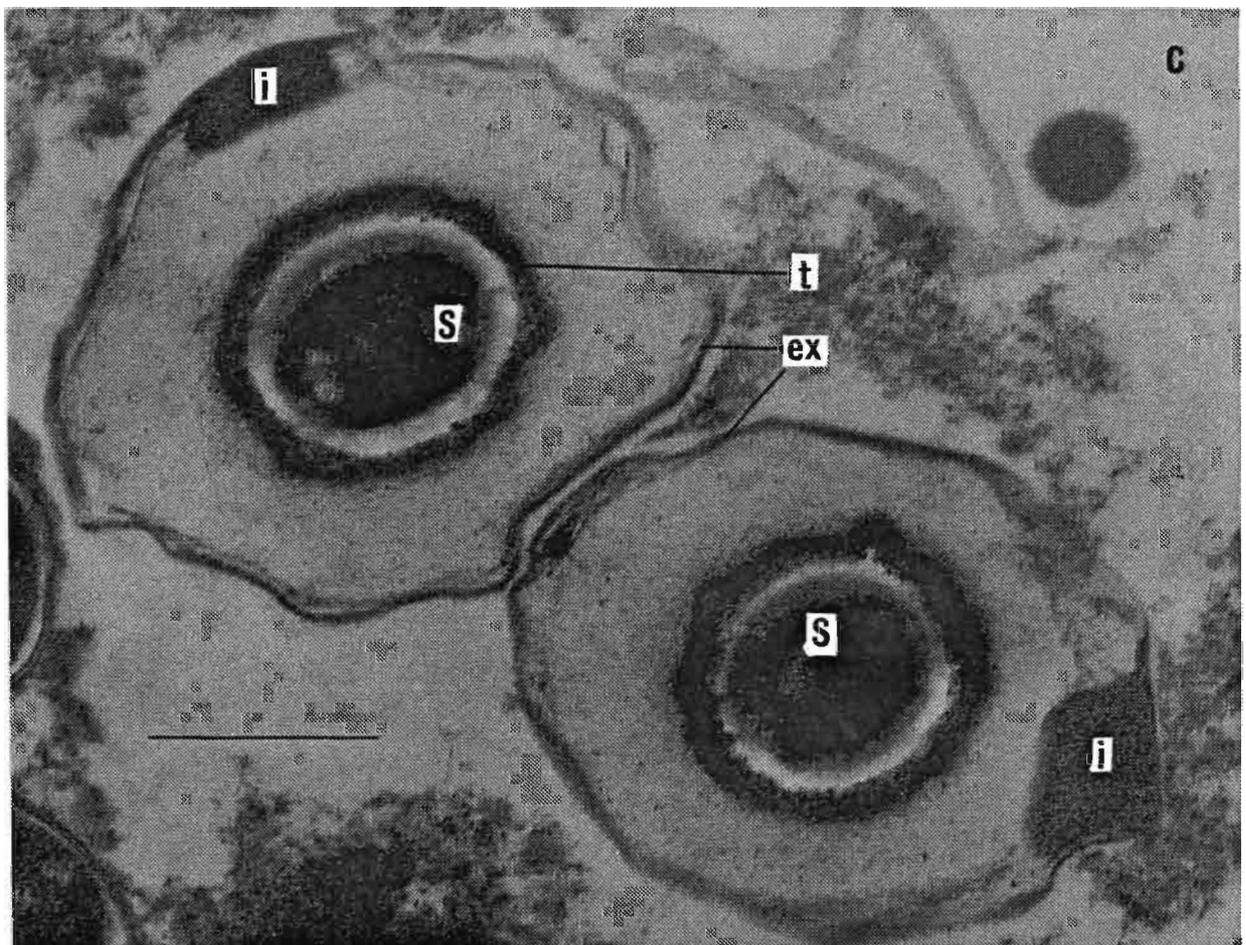
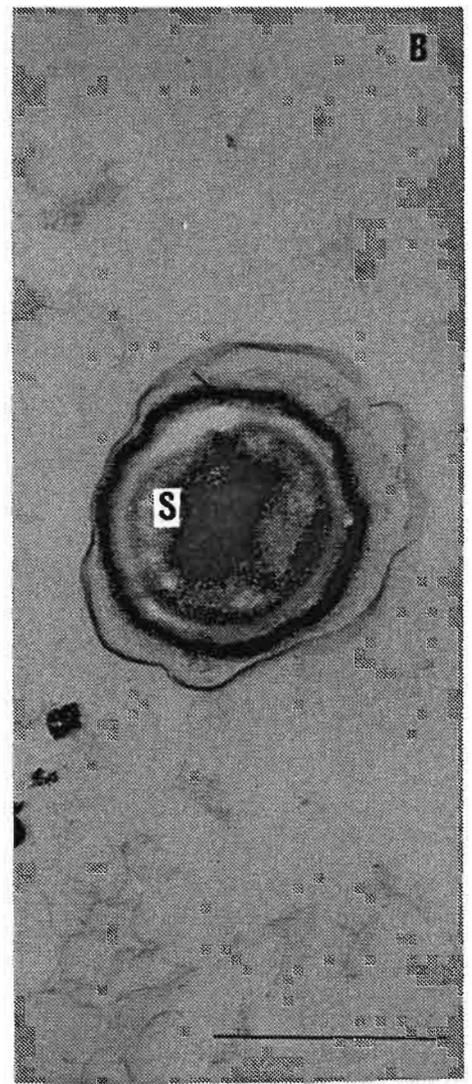
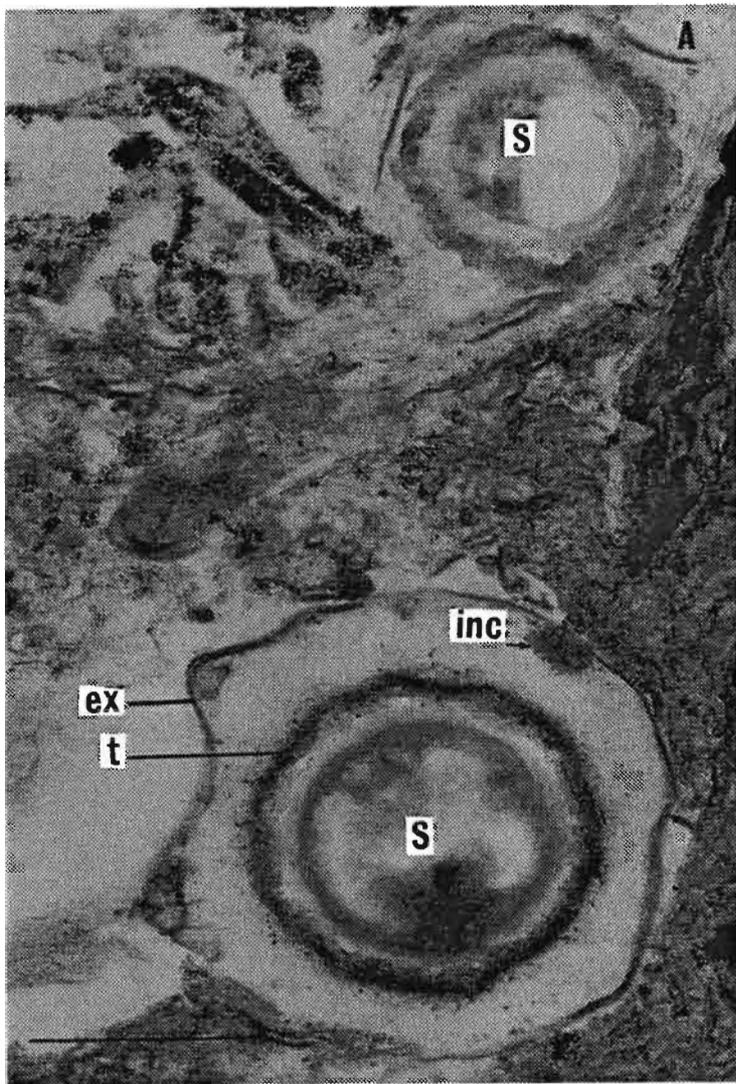
ex : exosporium ; inc* : inclusion non cristalline ;
s : spore ; t : tuniques.

C : les spores (témoin) de la souche 2362 contiennent une inclusion toxique.

ex : exosporium ; i : inclusion cristalline toxique ;
t : tuniques.

L'échelle est donnée par un trait dont la longueur représente 0,5 µm.

* Cette inclusion n'est pas cristallisée d'après KALFON *et al.* (1984).



3 - DISCUSSION SUR LA PERSISTANCE DE *Bacillus sphaericus* DANS LE MILIEU

Les populations larvaires présentes au moment de l'application meurent en totalité ou presque, quelle que soit la formulation utilisée dans cette étude. Toutefois, la recolonisation de gîtes larvaires à *Culex pipiens* traités à la souche 2362 et à la souche 2297 semble dépendre de la dose utilisée. La persistance de l'effet larvicide ne dépasse pas trois jours à 0,5 mg/l (250 mg/m²) pour la souche 2362 (deux formulations ABBOTT et Dulmage) et sept jours à la même dose pour la souche 2297, alors que cet effet atteint plus de sept jours pour la souche 2362 (les deux formulations) et dix jours pour la souche 2297 à 1,5 mg/l (750 mg/m²).

Des expérimentations menées en Côte d'Ivoire ont permis d'obtenir 5 à 6 semaines de rémanence dans des gîtes (puisards) à *Culex quinquefasciatus* traités à 10 g/m² (HOUGARD et NICOLAS, 1986). HORNBLY *et al.* (1984) obtiennent un mois de persistance dans l'eau claire et trois mois dans l'eau polluée, avec la souche 1593 à 2,5 et 7,5 X 10⁴ spores/ml. Ces résultats pourraient s'expliquer par des conditions physico-chimiques différentes de celles rencontrées lors de nos expérimentations ou, tout simplement, comme l'ont bien souligné SINEGRE *et al.* (1986) par le contexte éco-géographique du biotope traité, à savoir son potentiel de réinfestation à partir de géniteurs venant d'autres biotopes.

Les analyses bactériologiques semblent indiquer que les spores s'accumulent au fond des gîtes, quelle que soit la formulation utilisée. Le nombre des spores viables reste constant pendant toute la période de l'essai.

Le phénomène de la sédimentation et de la persistance de spores dans le milieu, a été observé par plusieurs auteurs ; il sera interprété d'après les hypothèses suivantes :

- les spores accumulées au fond s'enlisent dans le substrat et se trouvent hors de la zone de nutrition des larves (DAVIDSON *et al.*, 1984 ; LACEY *et al.*, 1984 ; MULLA *et al.*, 1984).

- la présence des cadavres aux alentours des larves contribue à une constante mortalité (DES ROCHERS and GARCIA, 1984).

- l'eau riche en matière organique réduit l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* dans les conditions naturelles et de laboratoire (MIAN and MULLA, 1983 b ; MULLA *et al.*, 1984 ; MULLIGAN *et al.*, 1980).

En fait, les spores de *Bacillus sphaericus* restent viables et toxiques sur le fond du gîte, mais après un certain temps (14 jours d'après nos résultats avec les doses utilisées), les spores perdent progressivement la quasi-totalité de leur toxicité vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*, bien qu'elles restent viables. Ceci permet de penser à un éventuel changement au sein de la spore. Notons que HORNBLY *et al.* (1984) ont indiqué que la persistance de l'activité larvicide dépend de la spore elle-même.

DAVIDSON and MYERS (1981) montrent que les spores des souches 1593, 2013-4 et 1691 sont accompagnées d'une ou plusieurs inclusions. YOSTEN and DAVIDSON (1982) ; de BARJAC et CHARLES (1983), ont mis en évidence la présence des inclusions parasporales, à structure cristalline chez la souche 2297. De même, la microscopie électronique met également en évidence ces inclusions chez la souche 2362 (planche 11 c).

Aucune inclusion n'a été trouvée chez les spores de la souche 2362 (formulation ABBOTT) récupérées 28 jours après l'application (planche 11 a et b). Cette nouvelle observation permet de supposer que la spore, après un certain temps dans les conditions naturelles, perd ses inclusions, alors qu'elle-même reste viable.

Ces résultats permettraient également d'expliquer l'absence de corrélation d'une part entre la présence de spores au fond du gîte et leur efficacité, d'autre part, entre la viabilité des spores et leur toxicité dans les conditions naturelles, en fonction du temps.

Cependant, *Bacillus sphaericus*, peut se multiplier dans les larves mortes de *Culex* (SILAPANUNTAKUL *et al.*, 1983 ; DES ROCHERS and GARCIA, 1984 ; KARCH and COZ, 1986). Ainsi, les spores recyclées sont relâchées dans le milieu environnant lors de la désintégration des cadavres. Mais ce recyclage ne suffit pas à assurer une suppression complète de la population larvaire de *Culex sittens* et *Anopheles subpictus* (HOTI and BALARAMAN, 1984).

Cette étude nous permet de mieux cerner les conditions favorables à l'utilisation de *Bacillus sphaericus* et d'envisager par la suite une recherche destinée à la sélection de souches capables de persister dans le milieu et qui pourraient enfin résister aux conditions défavorables dans la nature.

Dans les différents gîtes naturels du Littoral Méditerranéen Français, il a été intéressant de mener des expérimentations en conditions naturelles, utilisant deux formulations de *Bacillus sphaericus* contre la population larvaire de *Culex pipiens* de la région de Montpellier (chapitre suivant).

CHAPITRE VI

EVALUATION EN MILIEU NATUREL DE L'ACTIVITE LARVICIDE DE *BACILLUS SPHAERICUS* DANS DES GITES LARVAIRES A *CULEX PIPIENS* DU LITTORAL MEDITERRANEEN FRANCAIS

1 - LA LUTTE CONTRE *Culex pipiens* ET LES PROBLÈMES DE RÉSIS- TANCE DANS LE SUD DE LA FRANCE

Le complexe *Culex pipiens* est représenté sur le littoral méditerranéen français par la sous-espèce *Culex pipiens pipiens* et plusieurs biotypes (RIOUX, 1958). Les gîtes larvaires de cette espèce constituent une gamme très hétérogène : eaux douces et stagnantes, eaux claires riches en matières organiques, eaux usées (fosses d'aisance, égouts collecteurs). En effet, cette hétérogénéité est liée au comportement trophique qui varie selon le biotope larvaire (GABINAUD *et al.*, 1985).

La lutte contre *Culex pipiens* dans le Midi de la France est conduite depuis plus de vingt ans par l'Entente Interdépartementale pour la Démoustication*. La première campagne larvicide a été effectuée avec des insecticides organochlorés. La résistance à ces derniers, notamment à la dieldrine, a été constatée pour la première fois par HAMON *et al.* (1959). Depuis lors, d'autres insecticides ont été utilisés et notamment, à partir de 1964, des composés organophosphorés.

Le chlorpyrifos (Dursban R) a été couramment utilisé en démoustication urbaine. Toutefois, après trois ans d'utilisation (de 1970 à 1973), le phénomène de résistance est apparu, notamment dans une zone viticole où des traitements avec du parathion, de l'azinphos éthyl et méthyl, ont été pratiqués intensivement (SINEGRE *et al.*, 1976 et 1977), avant de s'étendre à l'ensemble de la région.

Par ailleurs, le téméphos et le fénitrothion, reconnus comme des insecticides très performants au début de leur utilisation (SINEGRE, 1967) doivent être également abandonnés avec l'apparition de phénomènes de résistance dès le début des années 1980. En 1980, SINEGRE *et al.* (1980 a) ont obtenu des résultats satisfaisants en traitant des bassins de lagunage avec deux insecticides organophosphorés : téméphos et chlorpyrifos par la méthode goutte à goutte.

* E.I.D.

Les services de l'E.I.D. ont adopté alors après essais, un pyrèthroïde, la deltaméthrine. Malheureusement, après deux ans d'utilisation de la deltaméthrine, les échecs sont devenus de plus en plus fréquents, les populations larvaires ayant acquis des niveaux de résistance considérables. En 1984, la résistance s'étendait pratiquement à l'ensemble des insecticides courants (SINEGRE, 1984) avec comme corollaire, une diminution souvent importante de l'efficacité des traitements, malgré des doses de plus en plus importantes.

Face à cette situation, nous avons trouvé utile de tenter l'utilisation des agents microbiologiques.

La découverte récente de bactéries capables de détruire efficacement et sélectivement les moustiques, et présenter une totale sécurité d'emploi (*Bacillus sphaericus* et *Bacillus thuringiensis* H-14), semble répondre à ce problème.

Bacillus thuringiensis H-14 est un insecticide d'origine biologique : l'action larvicide est due à un cristal protéique associé à la spore. Cette bactérie a déjà été expérimentée en laboratoire et sur le terrain et a donné des résultats assez prometteurs en milieu rural (SINEGRE *et al.*, 1980 c). L'évaluation en milieu urbain, en Afrique de l'Ouest, de l'activité larvicide de *Bacillus thuringiensis* H-14 sur *Culex quinquefasciatus* montre qu'il ne constitue pas un larvicide idéal pour le traitement des gîtes pollués (HOUGARD *et al.*, 1983). Par contre, *Bacillus sphaericus* est un agent de lutte antilarvaire très prometteur notamment contre *Culex*. Son recyclage, mentionné par HERTLEIN *et al.* (1979) et sa spécificité augmentent son intérêt et rendent les perspectives de lutte encore plus prometteuses.

C'est dans ce cadre que nous avons entrepris des traitements sur le terrain avec *Bacillus sphaericus* dans différents gîtes larvaires à *Culex pipiens*.

2 - CHOROLOGIE ET CADRE D'ÉTUDES

2.1. Répartition géographique

Culex pipiens est une espèce commune, répandue dans toute la France. Le biotype anthropophile, autogène est à prédominance urbaine (RAGEAU *et al.*, 1970) (Fig. 19). Ce biotype de *Culex pipiens* est considéré comme un moustique domestique principal qui pique la nuit dans les agglomérations et pose des problèmes aux services de démoustication.

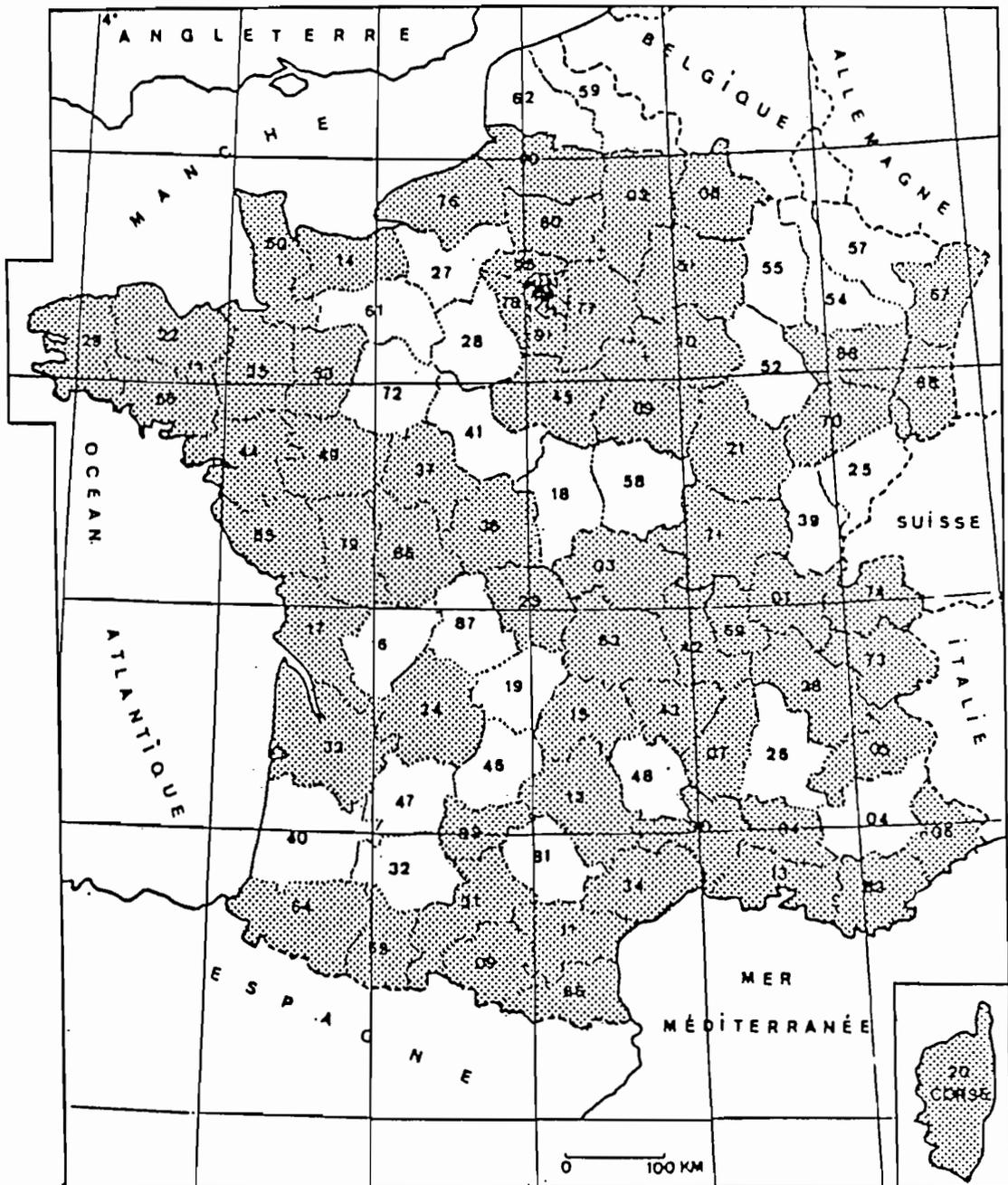


Fig. 19 : Répartition géographique de *Culex pipiens* L. en France. D'après RAGEAU *et al.* (1970).

-  Départements où l'espèce est connue.
-  Départements où l'espèce n'a pas encore été recherchée.

Dans la zone méditerranéenne française, ou "Midi méditerranéen", *Culex pipiens* colonise surtout des eaux douces riches en matières organiques et divers gîtes variés comme les fosses d'aisance ou les égouts collecteurs (RIOUX, 1958).

2.2. Zone d'études

La région de Montpellier qui appartient au climat de type méditerranéen, est caractérisée par des saisons thermiques tranchées et une pluviosité concentrée sur la partie froide de l'année (EMBERGER, 1942).

Nos zones expérimentales à *Culex pipiens* se situent dans trois régions proches de Montpellier :

- à Les Matelles, à 13 km
- à Vailhauques, à 12 km
- à Mauguio, à 10 km

2.2.1. Gîte de Les Matelles

Il s'agit d'un émissaire d'une station d'épuration qui constitue un gîte exclusif à *Culex pipiens*. Le gîte est colonisé par une végétation arbustive et herbacée : nous l'avons divisé en deux parties ; la première (en amont) considérée comme témoin et la deuxième (en aval) traitée par une formulation de *Bacillus sphaericus* (photos 8 et 9).

La partie aval a une longueur de 35 m environ et une profondeur de 10 cm en moyenne, sans substrat au fond sur sol caillouteux.

Nous observons que les larves se localisent à l'ombre de la végétation qui couvre le gîte.

Les résultats physico-chimiques de l'eau ont donné les résultats suivants :

- Matière organique acide (mg O ₂ /l)	13,2
- Matière organique alcaline (mg O ₂ /l)	13,54
- Azote ammoniacal (mg/l)	12,8
- Chlorures (mg/l)	71
- Bicarbonates (mg/l)	433,1
- pH	7,9
- Résistivité (Ω/cm ² /cm)	720
- Indice de pollution	70,6

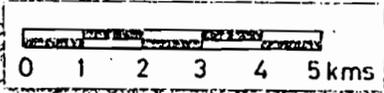
LES MATELLES

VAILHAUQUES

LANSARGUES

MAUGUIO

MONTPELLIER



GOLFE D'AIGUES-MORTES

Port Camargue

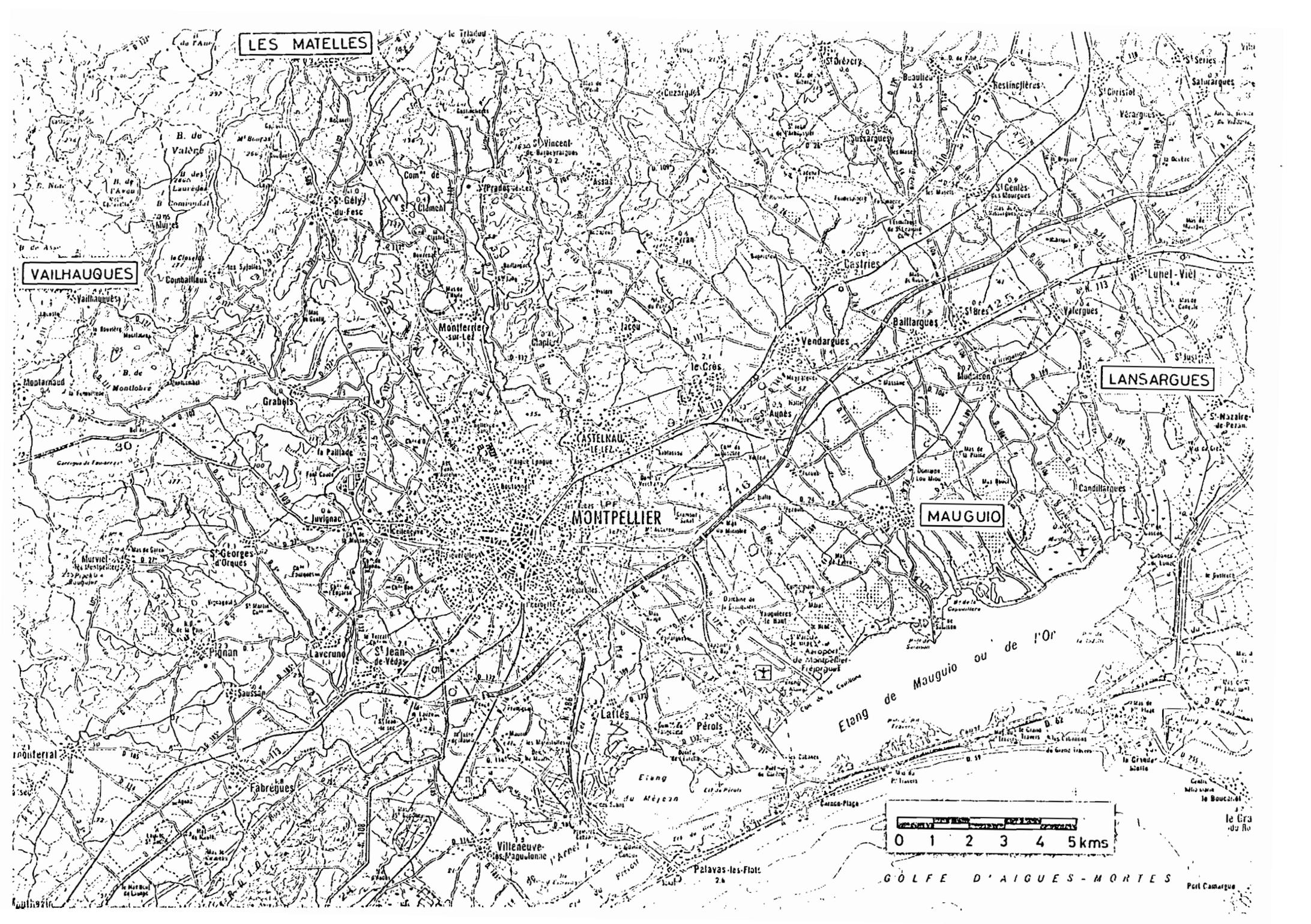


Photo 8 : Partie amont du gîte à *Culex pipiens* à Les Matelles (Témoin).



Photo 9 : Partie aval du gîte à *Culex pipiens* à Les Matelles, traitée par *Bacillus sphaericus* souche 2362.



2.2.2. Gîte de Vailhauques

C'est un fossé d'évacuation d'effluent d'une station de lagunage à eau fortement polluée et relativement stagnante, recouvert par une strate arbustive. Ce gîte, colonisé par *Culex pipiens*, a une longueur de 37 m sur 7 m environ de large ; sa profondeur d'eau est de 20 à 30 cm, soit une surface de 260 m² (photos 10 et 11). La population larvaire uniforme sur l'ensemble de la surface d'eau est extrêmement dense. Les analyses physico-chimiques de l'eau ont donné les résultats suivants :

- Matière organique acide (mg O ₂ /l)	37,4
- Matière organique alcaline (mg O ₂ /l)	29,16
- Azote ammoniacal (mg/l)	28,0
- Chlorures (mg/l)	142
- Bicarbonates	494,1
- pH	7,4
- Résistivité (Ω/cm ² /cm)	570
- Indice de pollution	158,7

2.2.3. Gîte de Mauguio

Les bassins de stabilisation de la station d'épuration de Mauguio constituent des gîtes à *Culex pipiens* extrêmement importants. Ils occupent à la périphérie de la ville des superficies de plusieurs hectares. Les gîtes ont une profondeur variant de 2 à 3 mètres selon les bassins. Nous trouvons parfois quelques lemnacées (lenticilles d'eau), dont la présence lorsqu'elle est abondante, diminue la densité des larves des culicidés.

La végétation se localise en bordure des gîtes et constitue un endroit semi-ombragé dans lequel les larves de *Culex pipiens* se trouvent généralement en densité moyenne ou faible selon le bassin (photos 12 et 13).

Les divers paramètres du climat local peuvent conditionner le déroulement du développement larvaire. La force et la direction des vents influent de façon très nette sur les déplacements des larves au cours de leur vie aquatique.

En outre, la qualité de l'eau peut jouer un rôle dans la localisation des larves au sein des bassins.

On note une forte densité larvaire de *Culex pipiens* dans les deux bassins 2 et 3 (Fig. 20), une densité moyenne dans le bassin 1

Photo 10 : Gîte de Vailhauques, ombragé à forte densité de larves de *Culex pipiens*, constitué d'un fossé d'évacuation d'effluent et de lagunage, d'une surface de 260 m².



Photo 11 : Traitement à 1 l/ha de la souche 2362 (Solvay), par un pulvérisateur à main.



Photo 12 : Traitement par *Bacillus sphaericus* souche 2362 (Solvay) dans les bassins de Manguio.



Photo 13 : Forte densité larvaire de *Culex pipiens*, sous la végétation en bordure du bassin n° 2 à Manguio.



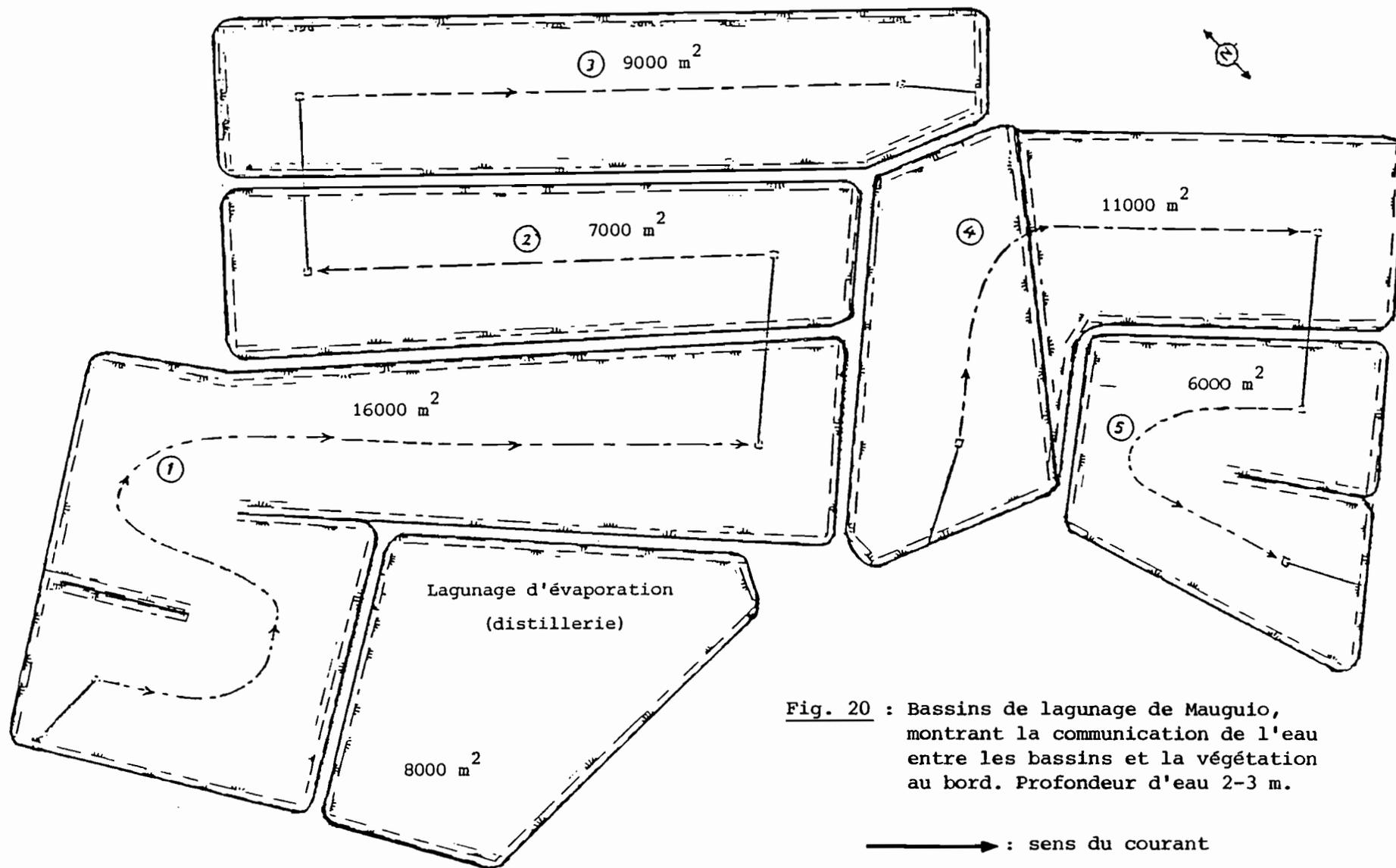


Fig. 20 : Bassins de lagunage de Manguio, montrant la communication de l'eau entre les bassins et la végétation au bord. Profondeur d'eau 2-3 m.

à eau fortement polluée et une densité faible dans les bassins 4 et 5 à eau moyennement polluée.

Les analyses physico-chimiques sont réalisées sur l'eau du bassin 2, les résultats sont les suivants :

- Matière organique acide (mg O ₂ /l)	15,4
- Matière organique alcaline (mg O ₂ /l)	11,45
- Azote ammoniacal (mg/l)	38,0
- Nitrites (mg/l)	0,30
- Chlorures (mg/l)	177,5
- Bicarbonates (mg/l)	494,1
- pH	8,2
- Résistivité ($\Omega/\text{cm}^2/\text{cm}$)	350
- Indice de pollution	197,7

3 - MÉTHODES D'ÉTUDE

3.1. Volet entomologique

Nos observations et évaluations ont été effectuées à l'aide des deux méthodes suivantes :

- épandage larvicide
- calcul du taux de survie

Le principe général est basé sur un repérage sommaire (densité approximative selon l'âge des larves, présence et quantité approximative de nymphes) avant l'application.

Après l'application, la disparition de la population larvaire nous permettra de constater l'efficacité du larvicide utilisé et sa persistance

Le larvicide utilisé à base de *Bacillus sphaericus* souche 2362 (formulation BSP1 de SOLVAY) est présenté sous forme liquide.

La formulation BSP1 préalablement diluée dans l'eau, a été épandue à l'aide d'un pulvérisateur à dos (dans le cas des gîtes de Les Matelles et Vailhauges) et à l'aide d'un véhicule de terrain équipé d'une lance de pulvérisation (dans le cas des bassins de lagunage de Manguio).

Les concentrations utilisées dans les trois gîtes sont les suivantes :

- 1) Gîte de Les Matelles : la dose utilisée est de 5 litres/hectare (soit 52 ml de la formulation BSP1 pour 105 m²).
- 2) Gîte de Vailhauques : la dose utilisée est de 1 litre/hectare (soit 26 ml de la formulation BSP1 pour une superficie de 260 m²).
- 3) Gîte des Bassins de Mauguio : deux formulations sont appliquées dans les différents bassins.

La poudre 109 (OMS) de la souche 2362 est appliquée dans le bassin n° 3, à la dose de 400 m/hectare. Une bande de trois mètres en bordure de bassin a été uniquement traitée, soit 510 m de bordure X 3 = 1 530 m² de surface traitée.

La formulation BSP1 est appliquée deux fois à quatre jours d'intervalle sur les bassins 1, 2, 4 et 5. 50 litres de la formulation, dilués dans 500 litres d'eau, sont répandus en bordure d'une bande de trois mètres dans tous les bassins, ce qui représente une surface de 6 480 m² = 2 160 m X 3 m soit une dose de 7,7 litres/hectare.

3.2. Volet bactériologique

Nous avons réalisé au cours de ces expérimentations des analyses bactériologiques d'échantillons d'eau prélevés dans différents compartiments des gîtes traités. Les échantillons ont été collectés en surface où se trouve la zone essentielle de nutrition des larves.

La technique d'analyse des échantillons utilisée est décrite dans le chapitre V. Elle permet de mettre en évidence la présence de *Bacillus sphaericus* et en même temps de compter la quantité des spores viables persistant dans ces différents gîtes. Cette technique ne permet cependant pas de différencier les souches saprophytes pouvant exister naturellement dans le gîte : pour avoir la quasi-certitude d'avoir isolé la souche 2362, il aurait fallu avoir recours à l'identification par la technique sérologique d'agglutination flagellaire qui n'était pas à notre portée.

4 - RÉSULTATS

4.1. Mortalité larvaire et persistance de *Bacillus sphaericus* dans le milieu

Un premier contrôle 48 heures après le traitement montre que la mortalité larvaire est quasi-totale dans tous les gîtes traités, même à la plus faible dose utilisée (1 litre/hectare). Les larves de *Culex pipiens* recolonisent progressivement les gîtes, mais cette réapparition est liée à différentes conditions selon les gîtes.

4.1.1. Gîte de Les Matelles

Il a été traité à 5 litres/hectare. Nous avons poursuivi l'échantillonnage de la population larvaire durant une période de 13 jours après traitement. Les résultats mentionnés dans les tableaux (24 et 25) montrent une excellente efficacité de la formulation BSP1 au cours des huit premiers jours et ce n'est qu'au huitième jour qu'on observe une réapparition des nymphes (tableau 26).

En ce qui concerne la densité larvaire des stades L₁-L₂, elle est élevée car les larves ayant moins de un jour de vie n'ont pas eu le temps de se nourrir, de plus l'action de *Bacillus sphaericus* est lente. Ces faits expliquent que nous ayons toujours trouvé des larves L₁-L₂ dans le gîte au cours de l'expérimentation.

4.1.2. Gîte de Vailhauques

La formulation BSP1 à base de la souche 2362 à 1 litre/hectare a une bonne efficacité dans ce gîte à eau polluée, sur la réduction de la densité larvaire, très forte, de *Culex pipiens*. Une mortalité de 92,5 % est observée après deux jours. Au 5ème jour, l'observation montre une absence quasi-totale de larves. Par contre, au 9ème jour la densité larvaire redevient presque la même que celle existant avant le traitement. Les résultats sont mentionnés dans le tableau (27). D'autres observations personnelles montrent que les cadavres sont trouvés flottant en surface du gîte. Ces cadavres seraient mangés par d'autres larves saines et seraient peut-être à l'origine d'un effet résiduel dans le gîte. Cependant, même si cet effet existe, il n'est pas suffisant pour assurer un contrôle des populations de moustiques.

Tab. 24 : Evolution dans le temps de la population larvaire L₃-L₄ de *Culex pipiens* après traitement par *Bacillus sphaericus* souche 2362 à 5 l/ha (gîte de Les Matelles).

Nombre de jours après traitement	Point des prélèvements			
	1	2	3	4
J0	+++	+	+++	++
J2	0	<+	0	0
J6	<+	<+	<+	0
J8	++	<+	<+	0
J13	+++	+++	++	+++

Tab. 25 : Evolution dans le temps de la population larvaire L₁-L₂ de *Culex pipiens* après traitement par *Bacillus sphaericus* souche 2362 à 5 l/ha (gîte de Les Matelles).

Nombre de jours après traitement	Point de prélèvement			
	1	2	3	4
J0	+++	+++	+++	+++
J2	+	+++	<+	0
J6	<+	++	+	0
J8	+	+	+	++
J13	++	++	++	+++

<+ : 1 à 50 larves
 + : 50 à 300 larves
 ++ : 300 à 1 000 larves
 +++ : 1 000 larves

Tab. 26 : Evolution dans le temps de la population nymphale de *Culex pipiens* après traitement par une suspension de *Bacillus sphaericus* souche 2362 à 5 l/ha (gîte de Les Matelles).

Nombre de jours après traitement	Point de prélèvement			
	1	2	3	4
J0**	++	0	0	0
J2	0	0	0	0
J6	<+	0	0	0
J8	+	0	0	0
J13	+	+	<+	+

* Population recensée juste avant le traitement.

<+ : 1 à 15 nymphes
 + : 15 à 30 nymphes
 ++ : 30 à 100 nymphes
 +++ : > 100 nymphes

Tab. 27 : Efficacité de *Bacillus sphaericus* souche 2362 (Solvay), appliquée à 1 l/ha, dans le gîte de Vailhauques. Ce fossé d'évacuation d'effluent et lagunage est fortement colonisé par des larves de *Culex pipiens*.

Prélèvement effectué dans le gîte	Poids exprimé en grammes de larves L3-L4 récoltées au filet				
	Jours avant l'application (témoins)		Jours après l'application		
	J - 2	J - 1	J + 2	J + 5*	J + 9
A	65,8	121,7	38,6	0	Forte densité larvaire de <i>Culex pipiens</i>
B	117,4	119,7	4,8	0	
C	264,1	189,6	1,5	0	
D	308,1	177,9	0,7	0	
poids moyen	188,9	152,2	11,4	0	-
% d'efficacité par rapport aux témoins	-	-	92,5 %	100 %	-

* Au 5ème jour nous observons une forte densité de larves L1-L2 avec une forte densité de pontes de *Culex pipiens*

4.1.3. Gîte des bassins de lagunage de Mauquo

Formulation poudre : elle a été appliquée dans le bassin n° 3 à 400 g/hectare. Les résultats montrent une bonne efficacité (tableau 28). La présence de quelques larves L₃-L₄ au point de prélèvement n° 4 peut être due à un défaut ponctuel de traitement du gîte car plusieurs prélèvements, effectués dans d'autres endroits du même gîte, ont révélé l'absence de larves L₃-L₄ après deux jours. Au 5ème jour, la population larvaire commence à réapparaître en faible densité pour tous les stades larvaires, ce qui nous a contraint à interrompre nos observations pour laisser place aux équipes de traitement de l'E.I.D. qui ne peuvent prendre aucun risque.

Formulation BSP1 : elle est appliquée deux fois à un intervalle de 5 jours dans les bassins n° 1, 2, 4 et 5 à 7,7 litres/hectare. Les résultats sont présentés dans le tableau (29). Dans ces gîtes à eau fortement polluée, la dose utilisée est suffisante pour détruire la quasi-totalité des larves présentes.

Au 3ème jour après la première application, nous notons une réduction totale des larves L₃-L₄ et quasi-totale du stade pré-imaginal. Au 5ème jour, la population larvaire de L₃-L₄ commence à réapparaître.

La deuxième application confirme que la dose précédemment utilisée (7,7 l/ha) est efficace pour réduire la population larvaire présente dans les gîtes après trois jours (tableau 30) ; une autre application devrait être envisagée en vue de la suppression totale de moustiques dans cette région selon le programme planifié par l'E.I.D.

4.2. Résultats des analyses bactériologiques

L'analyse bactériologique des échantillons prélevés en surface, pour les trois gîtes avant le traitement, s'est révélée négative.

La numération des spores pour la formulation BSP1 est de $1,5 \times 10^7$ spores/ μ l et pour la poudre 109 (OMS) est de $3,9 \times 10^8$ spores/mg.

Nous avons réalisé plusieurs séries de prélèvements dans tous les gîtes, notamment en surface tout de suite après l'application (J0), puis à temps variable (tableaux 31, 32 et 33).

Tab. 28 : Efficacité de la poudre 109 (OMS) de la souche 2362 sur les populations larvaires et nymphales de *Culex pipiens* dans le bassin n° 3 à Mauguio.

	Jours des prélèvements	Point de prélèvement dans le bassin n°3			
		point 1	point 2	point 3	point 4
Nymphes	J 0	+	< +	+++	+
	J 2	0	0	0	+
	J 5	0	< +	0	< +
Larves L3 L4	J 0	+++	+	++	+
	J 2	0	0	0	+
	J 5	0	< +	< +	+
Larves L1 L2	J 0	+	+	+	+
	J 2	0	0	< +	+
	J 5	+	< +	< +	+

Tab. 29 : Résultats du deuxième traitement dans le bassin n° 2 à Manguio, retraité à 7,7 l/ha avec la formulation liquide (Solvay) de la souche 2362.

	Jours des prélèvements	Point de prélèvement dans le bassin n°2			
		1	2	3	4
Nymphes	J 0	< +	< +	< +	< +
	J 3	< +	0	< +	0
Larves L3 L4	J 0	+	< +	+	< +
	J 3	< +	0	< +	0
Larves L1 L2	J 0	++	+	+	+
	J 3	< +	< +	+	< +

Tab. 30 : Efficacité de la formulation liquide (Solvay) de la souche 2362 sur la population larvaire de *Culex pipiens* dans le bassin n° 2 à Manguio. Traitement effectué à 7,7 l/ha.

	Jours des prélèvements	Point de prélèvement dans le bassin n°2			
		1	2	3	4
Nymphes	J 0	+++	+	+++	+++
	J 3	0	< +	< +	< +
	J 5	0	0	+	+
Larves L3 L4	J 0	++	+	+++	+++
	J 3	0	0	0	0
	J 5	< +	< +	< +	< +
Larves L1 L2	J 0	++	+	++	+++
	J 3	+	+	+	+
	J 5	+	+	+	+

Tab. 31 : Evolution dans le temps des spores de *Bacillus sphaericus* de la souche 2362. Prélèvements de l'eau pour analyse bactériologique effectués à la surface (gîte de Les Matelles).

Nombre de jours après traitement	Point des prélèvements (spores/ml)			
	1	2	3	4
J0*	$3,2 \times 10^4$	$1,2 \times 10^5$	$5,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$
J2	$1,2 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$	$6,2 \times 10^2$
J6	$1,3 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$4,1 \times 10^2$
J8	$2,7 \times 10^1$	$3,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$
J13	0	$5,4 \times 10^1$	1×10^1	$1,8 \times 10^1$

* Prélèvement juste après le traitement.

Tab. 32 : Comptage des spores de *Bacillus sphaericus* souche 2362 effectué au cours de l'expérimentation dans le gîte de Vailhauques. Prélèvements effectués dans trois points différents en surface du gîte.

jours après application	Point de prélèvement de l'échantillon			Moyenne spores/ml
	1	2	3	
J 0	$5,5 \times 10^3$	$1,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
J 2	$1,2 \times 10^2$	$4,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$
J 5	$2,2 \times 10^1$	$3,3 \times 10^1$	$6,7 \times 10^1$	$4,1 \times 10^1$
J 9	$2,2 \times 10^1$	0	$5,6 \times 10^1$	$2,6 \times 10^1$

Tab. 33 : Comptage des spores de la souche 2362 (formulation Solvay) dans le bassin n° 2, traité à 7,7 l/ha. Prélèvements effectués en surface.

Jours des prélèvements	Point des échantillons dans le bassin			
	point 1	point 2	point 3	point 4
J 0.	$1,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$	$2,4 \times 10^1$	$1,3 \times 10^2$
J 3	$7,9 \times 10^1$	0	$8,4 \times 10^1$	$1,7 \times 10^1$

Le parallélisme entre les observations entomologiques et bactériologiques nous conduit aux hypothèses suivantes :

- l'absence de *Bacillus sphaericus* en surface se traduit par la présence de population larvaire dans le gîte.

- la présence temporaire de *Bacillus sphaericus* est plus longue dans les gîtes ombragés (Vailhauques et Les Matelles) que dans les gîtes à ciel ouvert, exposés au soleil (Bassins de lagunage à Mauguio).

- la profondeur de l'eau dans le gîte peut être un facteur favorable à la sédimentation rapide des spores, les éloignant ainsi de la zone de nourriture des larves en surface (Bassins de Mauguio à 2-3 m de profondeur).

5 - DISCUSSION

Sur le terrain, la souche 2362 de *Bacillus sphaericus* présente une efficacité initiale satisfaisante sur les populations larvaires de *Culex pipiens* du sud de la France, ce qui confirme les résultats de DAVIDSON *et al.* (1984) et MULLA *et al.* (1984) qui ont utilisé la même souche contre l'espèce *Culex tarsalis* à India en Californie.

La réduction de la population larvaire de *Culex pipiens* a été quasiment totale deux à trois jours après l'application, dans les trois gîtes à eau polluée (Les Matelles, Vailhauques et Mauguio). Cependant, la recolonisation des gîtes par des larves L₁-L₂ après trois jours peut s'expliquer par le fait que les larves venant d'éclore n'ont pas eu le temps de se nourrir, ou que l'action de *Bacillus sphaericus* qui est lente sur les larves n'a pas eu encore le temps d'agir.

HORNBY *et al.* (1984) ont montré que la persistance de l'activité de *Bacillus sphaericus* dépend de la viabilité des spores. En effet, la présence de spores au niveau de la zone nutritionnelle des larves, qui se trouve en surface selon l'hypothèse de MULLIGAN *et al.* (1980) serait essentielle pour assurer un bon contrôle sur les larves ; les spores devront être non seulement viables mais aussi disponibles et toxiques pour les larves dans leur zone de nourriture.

Divers facteurs interviennent pour déterminer le devenir des spores : la nature du gîte (exposé au soleil ou ombragé), la qualité de l'eau, ... et enfin la formulation bactérienne. En fait, l'influence du soleil et notamment l'U.V., sur la viabilité des spores (BURKE *et al.*,

1983) joue un rôle primordial pour déterminer la durée de viabilité des spores. Comme nous l'avons déjà montré, cette influence est négligeable dans les gîtes ombragés (Les Matelles et Vailhauques) où les spores de la souche 2362 (formulation BSP1) ont présenté une activité plus durable que dans les gîtes à ciel ouvert (bassins de Mauguio).

HOUGARD *et al.* (1985 b) observent, en Afrique de l'Ouest, que la rémanence de la poudre Solvay de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* dans le milieu, varie avec la dose utilisée. Rappelons que leurs expérimentations sont effectuées dans des puisards et des fosses septiques relativement protégés du soleil. Nos résultats utilisant 1 à 5 litres/hectare d'une formulation liquide (BSP1) de Solvay à base de la souche 2362, semblent aller dans ce sens et montrent que la persistance dans le gîte traité à 1 litre/hectare a été inférieure à 9 jours alors qu'elle a duré près de 13 jours dans le gîte traité à 5 litres/hectare. Notons que les deux gîtes étaient relativement ombragés. Dans le gîte à ciel ouvert, traité à 7,7 litres/hectare, la persistance n'a été que de 5 jours.

Le problème de la sédimentation des spores pourrait intervenir également comme un facteur limitant pour la persistance. En effet, la sédimentation des spores peut se produire rapidement dans tous les types d'eau quelle que soit sa qualité (voir chapitre suivant). Les spores de la souche 2362 sédimentent très rapidement quelle que soit la formulation (poudre ou liquide) (MULLA *et al.*, 1984).

6 - CONCLUSION

La persistance de *Bacillus sphaericus*, en eaux polluées, semble dépendre de plusieurs facteurs bien que des études complémentaires restent à réaliser pour les expliciter entièrement :

- la nature du gîte : exposé au soleil ou non, car dans le gîte ombragé, les spores sont protégées de l'influence des rayons solaires.

- la profondeur de l'eau : semble jouer un rôle important, car la persistance des spores dans des profondeurs de l'ordre de 20 cm est plus longue alors que dans l'endroit où l'eau est plus profonde la persistance est plus faible, (HORNBLY *et al.*, 1984).

Cette étude devrait permettre de mieux cerner les conditions favorables à un développement optimum de *Bacillus sphaericus* dans les différents gîtes au Sud de la France et d'envisager par la suite un contrôle biologique efficace de *Culex pipiens*.

CHAPITRE VII

PERSISTANCE, EFFICACITE ET DEVENIR DES SPORES DE *BACILLUS SPHAERICUS* DANS DIFFERENTS MILIEUX EN FONCTION DE LA QUALITE DE L'EAU

1 - GÉNÉRALITÉS

Les travaux des précédents auteurs concernant l'évaluation de l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* se sont déroulés tant au laboratoire que sur le terrain. Ce n'est qu'après les travaux de HERTLEIN *et al.* (1979) montrant une possibilité de recyclage de *Bacillus sphaericus*, que plusieurs auteurs (HORNBY *et al.*, 1981 et 1984 ; HOTI and BALARAMAN, 1984) ont étudié la persistance de cette bactérie, mais sans montrer son devenir. Quant à DES ROCHERS and GARCIA (1984) ; KARCH et COZ (1984), ils ont observé une forte toxicité des spores qui se trouvent dans les larves mortes, réussissant ainsi à infecter d'autres larves saines de *Culex pipiens*.

Etant donné que la nutrition larvaire de *Culex* se fait essentiellement en surface, la sédimentation très rapide des spores est un handicap majeur (DAVIDSON *et al.*, 1984 ; LACEY *et al.*, 1984 ; MULLA *et al.*, 1984).

La présente étude consiste à suivre, d'une part l'évolution et le devenir de spores et, d'autre part, l'influence de plusieurs facteurs (rayons solaires, pollution de l'eau, substrat de terre, *etc.*) sur la rapidité de la sédimentation et l'activité larvicide vis-à-vis de *Culex pipiens*. Enfin, une analyse bactériologique est nécessaire pour démontrer la viabilité des spores.

2 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette expérience a été réalisée dans les services de l'E.I.D.-Méditerranée pendant l'été 1985. Nous avons utilisé dix aquariums en verre dont deux témoins de dimension 18 X 33 X 24 cm, placés à l'extérieur. Le but de cette expérimentation est d'une part de mettre en évidence le phénomène de la sédimentation des spores de *Bacillus sphaericus* en fonction du temps et de la qualité de l'eau et d'autre part de connaître la relation entre la disponibilité des spores et le taux de mortalité parmi les larves testées.

2.1. Préparation de l'eau à différents degrés de pollution et du substrat

Une série de quatre aquariums reçoit de la terre puis huit litres d'eau plus ou moins polluée par des effluents primaires d'une station d'épuration. Une autre série de quatre aquariums ne reçoit pas de terre (sans substrat), l'autre série de deux aquariums ne reçoit que de l'eau du réseau.

Les dix aquariums, qui ont reçu un volume aqueux identique (huit litres), sont placés sur une table à l'extérieur du laboratoire (photos 14 et 15), remplis d'eau selon le tableau suivant :

	numéro de l'aquarium	% d'effluent primaire ajouté	Qualité de l'eau
sans substrat	A ₁	0	8 litres d'eau du réseau
	A ₂	10	0,8 litre d'effluent primaire + 7,2 litres d'eau du réseau
	A ₃	50	4 litres d'effluent primaire + 4 litres d'eau du réseau
	A ₄	100	8 litres d'effluent primaire
avec substrat sur 2 cm d'épaisseur	A ₅	0	8 litres d'eau du réseau
	A ₆	10	0,8 litre d'effluent primaire + 7,2 litres d'eau du réseau
	A ₇	50	4 litres d'effluent primaire + 7,2 litres d'eau du réseau
	A ₈	100	8 litres d'effluent primaire
Témoins	A ₉	0	8 litres d'eau du réseau
	A ₁₀	0	8 litres d'eau du réseau

Photo 14 : Aquariums sans substrat de terre, placés à l'extérieur du laboratoire : A₁, A₂, A₃ et A₄.

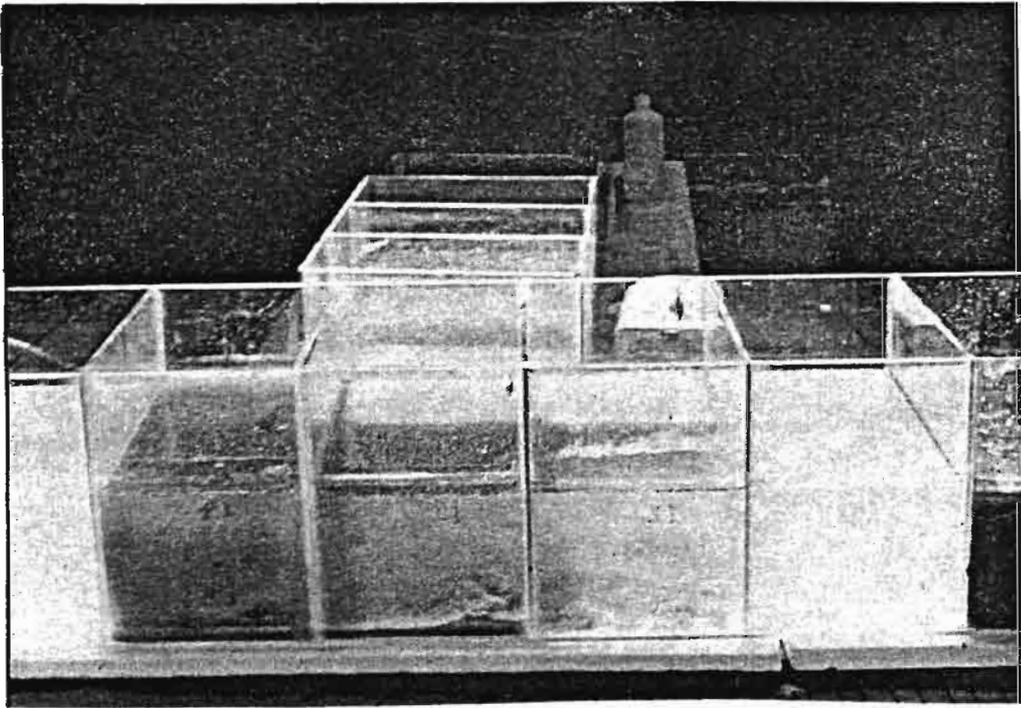
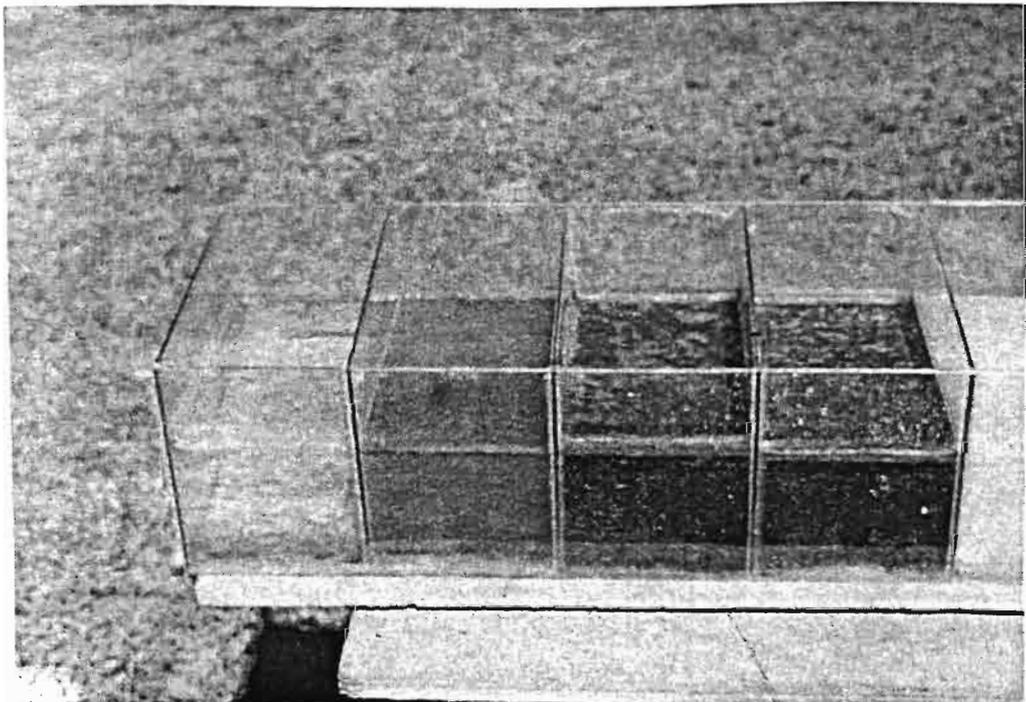


Photo 15 : Aquariums avec substrat de terre, placés également à l'extérieur du laboratoire : A₆, A₇, A₈ et A₉.



2.2. Analyse physico-chimique de l'eau

. Le pH : la mesure du pH est effectuée pour tous les aquariums à 8 h et à 16 h 30 aux jours de prélèvements pour analyse bactériologique soit à 7, 14, 21, 28 et 40 jours. Une éventuelle variation de l'indice d'alcalinisation ou d'acidification de l'eau pourrait en effet influencer l'activité larvicide des spores de *Bacillus sphaericus*.

. Analyse chimique de l'eau : cette analyse réalisée au cours de l'expérimentation porte sur les dosages de matières organiques d'origine animale ou végétale, de l'azote ammoniacal, des nitrites, des chlorures, des carbonates et bicarbonates et de la résistivité (tableau 34).

A partir de ces analyses, nous pouvons calculer l'indice de pollution de l'eau selon la relation suivante :

$$\text{Indice de pollution} = \frac{(\text{mg/l azote ammoniacal} \times 10) + \text{mg O}_2/\text{l de matière organique d'origine animale}}{2}$$

2.3. Formulation et concentration utilisées

La formulation Dulmage à base de *Bacillus sphaericus* souche 2362 est présentée sous forme de poudre lyophilisée, provenant de l'OMS, reçue le 22 avril 1985. La concentration utilisée, pour tous les aquariums de A₁ à A₈, a été de 0,02 mg/l. La solution mère a été de 16 mg dans un litre d'eau distillée à partir de laquelle 80 ml sont ajoutés dans chaque aquarium pour arriver à la concentration de 0,16 mg/8 litres d'eau soit 0,02 mg/l.

2.4. Analyse bactériologique

Pour mettre en évidence le phénomène de la sédimentation des spores de *Bacillus sphaericus*, nous réalisons deux prélèvements différents, l'un en surface de l'eau, l'autre au fond de l'aquarium (dans le cas des aquariums à substrat, les prélèvements s'effectuent à l'interface entre le substrat et l'eau). Chaque jour, 2 ml sont prélevés avec une pipette, mis ensuite dans un tube à hémolyse, chauffés à 80° C pendant 12 minutes au bain-marie. 100 µl de chaque prélèvement sont ensemencés sur le milieu de M.B.S. dans une boîte de Pétri (voir technique, chapitre V). Après ensemencement, les boîtes sont placées dans une étuve à 35° C ; après 48 h d'incubation, la lecture est effectuée après identification des spores au microscope à contraste de phase.

Tab. 34 : Analyse physico-chimique de l'eau dans les différents aquariums sans et avec substrat de terre. A noter que dans le A1 et le A5, l'eau est ordinaire.

	Aquariums sans substrat				Aquariums avec substrat			
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8
Matières organiques acides mg O2/l	1,52	11,76	29,40	47,00	2,11	28,20	129,40	141,20
Matières organiques alcalines mg O2/l	1,26	6,89	25,8	37,35	1,95	9,19	80,45	83,33
Azote ammoniacal mg/l	0,08	9,0	21,0	24,0	0,48	3,0	8,5	20
Nitrites mg/l	0	0,15	0,25	0,30	0	0,15	0,40	0,40
Chlorures mg/l	35,5	88,75	106,5	124,25	53,25	88,75	71	106,5
Carbonates mg/l	320,25	353,8	445,3	472,5	329,4	341,6	384,3	420,9
pH	7,2	7,3	7,4	7,4	7,6	7,4	7,2	7,3
Résistivité $\Omega/\text{cm}^2/\text{cm}$	1250	1050	790	650	1220	1100	900	800
Indice de pollution	1,2	51	119,7	143,5	3,5	29,1	107,2	170,6

. Tous mes remerciements vont à Monsieur VIGO de l'E.I.D. qui a assuré les dosages chimiques.

2.5. Protocole de test larvicide

L'évaluation de l'activité larvicide de la souche 2362 a été suivie parallèlement à l'analyse bactériologique. Il s'agit de mettre en contact dans chaque aquarium 50 larves stade 3 jeune de *Culex pipiens* aux temps 0, 7, 14, 21, 28 et 40 jours après le traitement. La lecture est réalisée 72 heures après la mise en contact.

3 - RÉSULTATS

3.1. Viabilité des spores et Influence des rayons solaires

L'action du soleil a provoqué une diminution notable de la viabilité des spores quatre heures après traitement dans l'aquarium (A₁) où il y avait l'eau claire. A la seconde observation, après 24 heures, les spores ne sont plus viables dans l'aquarium A₁. En effet, après quatre heures de traitement, 60 spores/ml sont retrouvées à la surface et 120 spores/ml au fond. La disparition totale de la viabilité des spores doit se produire bien avant 24 heures. Ces résultats sont en accord avec ceux de MULLIGAN *et al.* (1980) qui ont constaté une baisse importante d'activité sous l'action des rayons solaires.

En ce qui concerne la mortalité obtenue en A₁, elle a été proche de 82 % après 72 heures de contact. Toutefois, le taux de mortalité parmi les larves mises en contact (4 heures) avec la souche 1593-4 et ensuite lavées et mises en eau permutée, a été le même qu'après la mise en contact continu (72 h) (KARCH, 1984), ce qui établit que cette mortalité (82 %) a été provoquée par des spores ingérées pendant les premières heures du traitement.

3.2. Numération et évolution de la séquence de la sédimentation des spores

Les résultats montrent que les spores de *Bacillus sphaericus* souche 2362 se sont très rapidement réparties de manière homogène. Après quatre heures de traitement, nous avons trouvé qu'un nombre de spores à la surface est pratiquement identique à celui au fond, dans tous les aquariums (sauf A₁) (tableau 35 ; Fig. 21 et 22).

Tab. 35 : Numération des spores viables de *Bacillus sphaericus* souche 2362 après un traitement de 0,02 mg/l dans tous les aquariums (de A₁ à A₈) ; Prélèvements pour l'analyse bactériologique effectués en surface et au fond au cours du temps.

	lieu de prélèvement	Nombre de spores/ml - temps après traitement								
		4 h	24 h	48 h	72 h	7 J	14 J	21 J	28 J	40 J
A1	surface	6×10^1	0	0	0	0	0	0	0	0
	fond	$1,2 \times 10^2$	0	0	0	0	0	0	0	0
A2	surface	$1,3 \times 10^3$	$9,3 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$	$5,5 \times 10^1$	$4,4 \times 10^1$	0	0	0	0
	fond	$1,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$7,7 \times 10^2$	$8,1 \times 10^2$	$5,4 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$1,8 \times 10^1$	0
A3	surface	2×10^3	$1,4 \times 10^3$	$5,8 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	0	0	0
	fond	$2,6 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^2$
A4	surface	$1,9 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$5,1 \times 10^2$	4×10^2	$1,3 \times 10^1$	0	0	0
	fond	$2,4 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
A5	surface	$1,1 \times 10^3$	$6,6 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	2×10^2	0	0	0
	fond	$8,9 \times 10^2$	$7,4 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$	8×10^2	$2,4 \times 10^2$	0
A6	surface	$1,4 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$6,9 \times 10^2$	$6,6 \times 10^1$	0	0	0	0	0
	fond	$1,2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	5×10^2	$2,2 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$2,7 \times 10^2$
A7	surface	$1,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	1×10^3	$6,2 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$6,6 \times 10^1$	0	0	0
	fond	$8,5 \times 10^2$	$1,7 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$	$2,9 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$	$4,6 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
A8	surface	$1,8 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	8×10^2	$6,9 \times 10^2$	$7,4 \times 10^2$	$3,1 \times 10^1$	0	0	0
	fond	$1,9 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	$4,9 \times 10^3$	$5,8 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$

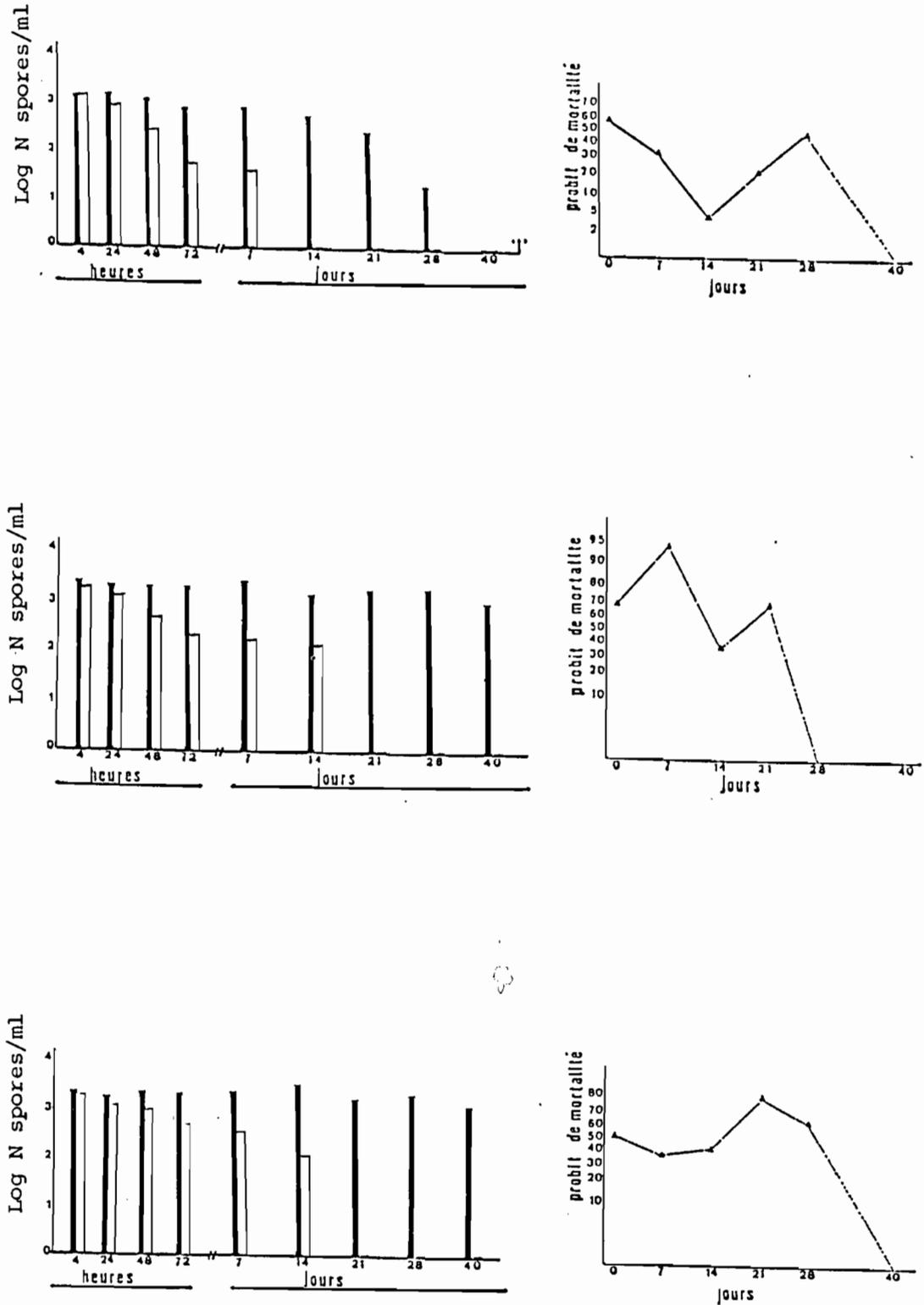


Fig. 21 : Séquence de la sédimentation des spores de *Bacillus sphearicus* souche 2362 et activité larvicide sur *Culex pipiens* stades L₂, L₃, dans l'aquarium 2 à eau peu polluée et dans les aquariums 3 et 4 à eau polluée, sans substrat de terre.

n° de spores
 au fond

 n° de spores
 en surface

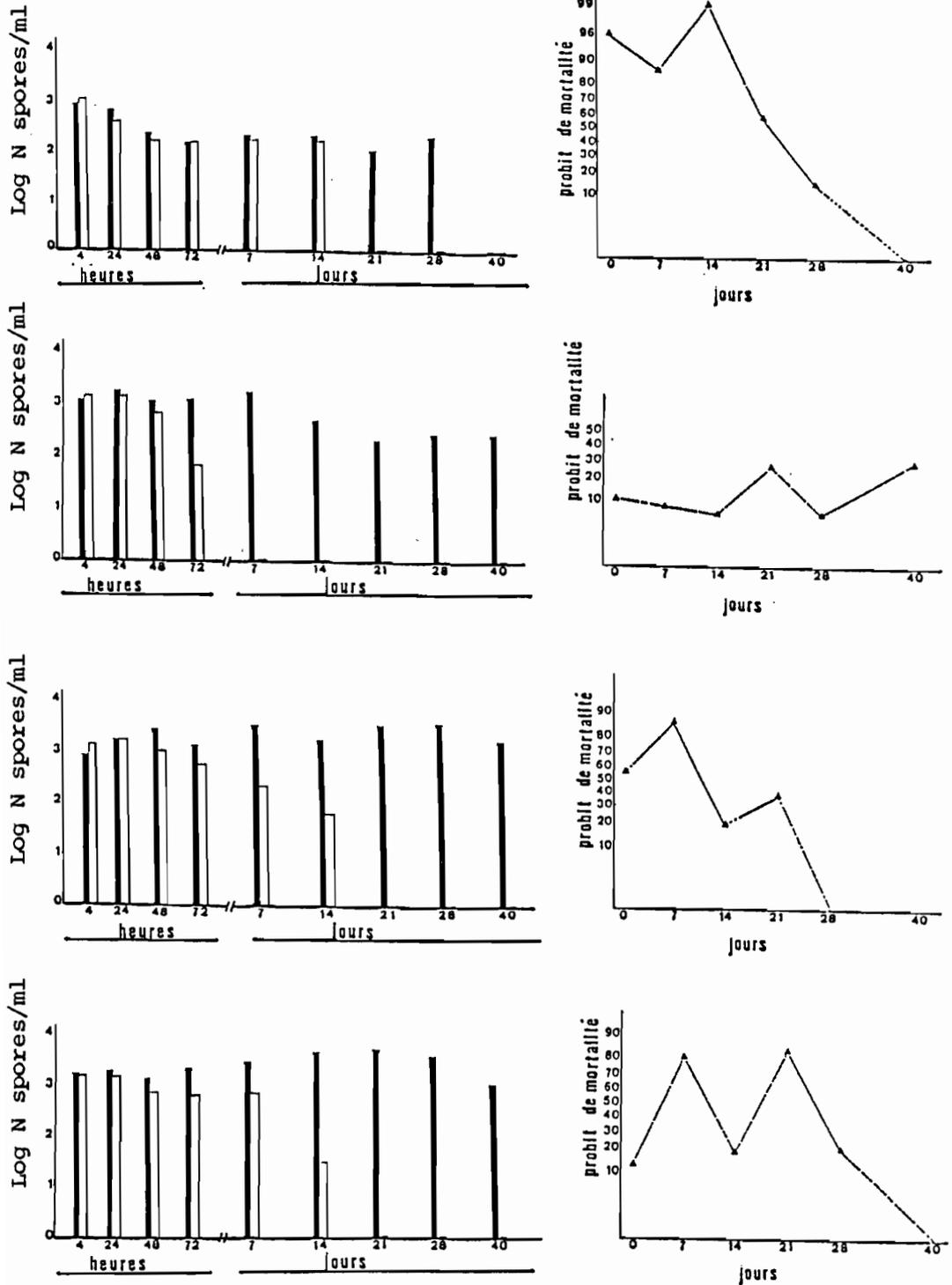


Fig. 22 : Séquence de la sédimentation des spores de *Bacillus sphaericus* souche 2362 et activité larvicide sur *Culex pipiens* stades L₂, L₃ dans les aquariums A₅ à eau claire, A₆ à eau peu polluée et A₇, A₈ à eau polluée, avec substrat de terre.

 n° de spores
au fond
 n° de spores
en surface

La disparition des spores de la surface pourrait être due à la fois à l'inactivation par les rayons solaires et à la sédimentation au fond de l'aquarium.

3.3. Persistance des spores en fonction de la qualité de l'eau

3.3.1. Dans les aquariums sans substrat

La qualité de l'eau paraît jouer un rôle essentiel sur la maintenance des spores de *Bacillus sphaericus*, dans les aquariums déposés à l'extérieur dans les conditions naturelles (rayonnement solaire, température, humidité ...). Comme nous venons de le noter, les résultats obtenus dans l'aquarium A₁ montrent l'influence des rayons solaires sur la viabilité des spores. Dans l'aquarium A₂, nous n'avons trouvé aucune spore à la surface de l'eau après 14 jours, par contre les spores se sont maintenues à la surface des aquariums A₃-A₄ jusqu'au 14^{ème} jour. Le nombre de spores viables diminue progressivement au fond de l'aquarium A₅ atteignant 0 au 40^{ème} jour. Cette disparition des spores pourrait être due, d'une part à l'absence de substrat et, d'autre part, au faible degré de pollution de l'eau. Rappelons que l'indice de pollution était de 51 dans le A₂. Par contre, dans les aquariums A₃-A₄ où l'indice de pollution était respectivement de 119,2 et 143,3, les spores se sont maintenues au fond au cours de la période de l'expérience (40 jours).

3.3.2. Dans les aquariums à substrat

L'existence de substrat (2 cm d'épaisseur) semble être un facteur favorisant la maintenance de la viabilité des spores notamment dans le cas où l'eau est claire (A₅). Rappelons que nous n'avons trouvé aucune spore après 24 heures dans l'aquarium A₁ où l'eau était claire et sans substrat.

Les spores dans les aquariums A₆, A₇ et A₈ se sont maintenues d'une manière comparable à celles des aquariums sans substrat.

3.4. Influence du pH et de la température

La variation du pH a été étudiée au cours de la journée à 8 h et à 16 h 30 le jour-même du prélèvement pour l'analyse bactériologique (tableaux 36 et 37). La fluctuation de la variation du pH semble être plus marquée dans les aquariums sans substrat A₂, A₃ et A₄ que dans les

	pH											
	0 J		7 J		14 J		21 J		28 J		40 J	
	8 h	16h30	8 h	16h30	8 h	16h30	8 h	16h30	8 h	16h30	8 h	16h30
A1	7,9	8,2	7,9	8,4	8,6	9,0	8,2	8,6	7,9	8,2	8,3	8,4
A2	9,4	10,1	9,0	9,5	8,3	8,9	8,6	9,8	8,6	10,4	9,0	10,0
A3	8,8	10,2	8,6	9,7	8,6	10,7	8,9	10,7	8,1	9,2	8,4	9,1
A4	8	9,0	7,8	9,0	8,3	9,4	8,6	9,9	8,0	10,2	8,1	8,6
A5	8,2	8,8	8,0	8,4	8,1	8,3	8,2	8,2	7,8	8,6	8,4	8,6
A6	8,4	9,2	7,8	8,4	8,1	9,0	8,5	9,4	8,2	9,0	8,4	8,8
A7	9,1	10,6	7,8	9,4	8,3	9,5	8,1	8,7	8,1	9,2	8,6	9,8
A8	8,4	9,6	8,1	9,2	8,4	9,8	7,9	8,4	7,9	9,3	8,3	9,1
T1	8,2	8,3	8,2	8,8	8,7	9,2	8,2	8,3	8,1	8,4	8,4	8,8
T2	9,8	10,0	8,6	9,0	8,4	8,4	8,2	8,3	8,0	8,3	8,3	8,5

Tab. 36 : Enregistrement du pH au cours de temps de l'expérimentation et au moment des prélèvements pour l'analyse bactériologique.

	Δ pH					
	0J	7J	14J	21J	28J	40J
A1	0,3	0,5	0,4	0,4	0,3	0,1
A2	0,7	0,5	0,6	1,2	1,8	1,0
A3	1,4	1,1	2,1	1,8	1,1	0,7
A4	1,0	1,2	1,1	1,3	2,2	0,5
A5	0,6	0,4	0,2	0	0,8	0,2
A6	0,8	0,6	0,9	0,9	0,8	0,4
A7	1,5	1,6	1,2	0,4	1,1	1,2
A8	1,2	1,1	1,4	0,5	1,4	0,8
T1	0,1	0,6	0,5	0,1	0,3	0,4
T2	0,2	0,4	0	0,1	0,3	0,2

Tab. 37 : Fluctuation du pH au cours de la journée exprimée en Δ pH = pH max. - pH min.

Notons que le pH à la fin de la journée (16 h 30) a toujours été supérieur à celui obtenu le matin (8 h).

aquariums à substrat A₅, A₆, A₇ et A₈ (Fig. 23). Toutefois, il faut noter que dans la plupart des aquariums nous avons observé l'existence d'algues à la surface.

Le pH ne semble pas influencer sur la rémanence de *Bacillus sphaericus* ni sur son activité vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*.

La température a été également enregistrée au cours de l'expérience avec un "thermo-enregistreur" ; l'électrode a été immergée dans l'aquarium témoin. La moyenne de la variation de la température entre la journée et la nuit est de 7,8° C pour toute la période ; les températures minimales et maximales sont représentées dans le tableau (38).

La persistance des spores ne semble pas être influencée par les variations de température.

3.5. Potentiel larvicide des spores en fonction de l'existence ou non des substrats

- Aquariums à eau du réseau ; A₁ (sans substrat) et A₅ (à substrat) : dans le A₁, le résultat montre une efficacité de *Bacillus sphaericus* immédiate sur les larves de *Culex pipiens* (83 % de mortalité après 72 h de contact), par contre aucune mortalité supplémentaire n'a été obtenue après ce temps, ce qui s'explique alors par la disparition des spores dans cet aquarium. Dans A₅ où l'eau est claire également mais avec substrat au fond, le taux de mortalité a été entre 85 % et 99 % pendant 14 jours, il a progressivement diminué atteignant 0 % au 40ème jour ce qui correspond d'ailleurs à l'absence de spores.

- Aquariums à 10 % d'eau d'effluent primaire et 90 % d'eau du réseau ; A₂ (sans substrat) et A₆ (à substrat) : le taux de mortalité obtenu est variable dans les deux aquariums, notamment dans le A₆ où la mortalité ne dépasse pas 30 % (dans le A₂, 54 %). Les spores s'y sont cependant maintenues mais elles ne sont plus disponibles, pour les larves, du fait du substrat.

- Aquariums à 50 % d'eau d'effluent primaire et 50 % d'eau du réseau ; A₃ (sans substrat), A₇ (à substrat) et aquariums à 100 % d'eau d'effluent primaire A₄ (sans substrat) et A₈ (à substrat) : dans ces quatre aquariums, le taux de mortalité et le nombre de spores viables sont sensiblement comparables. Donc, quand l'indice de pollution

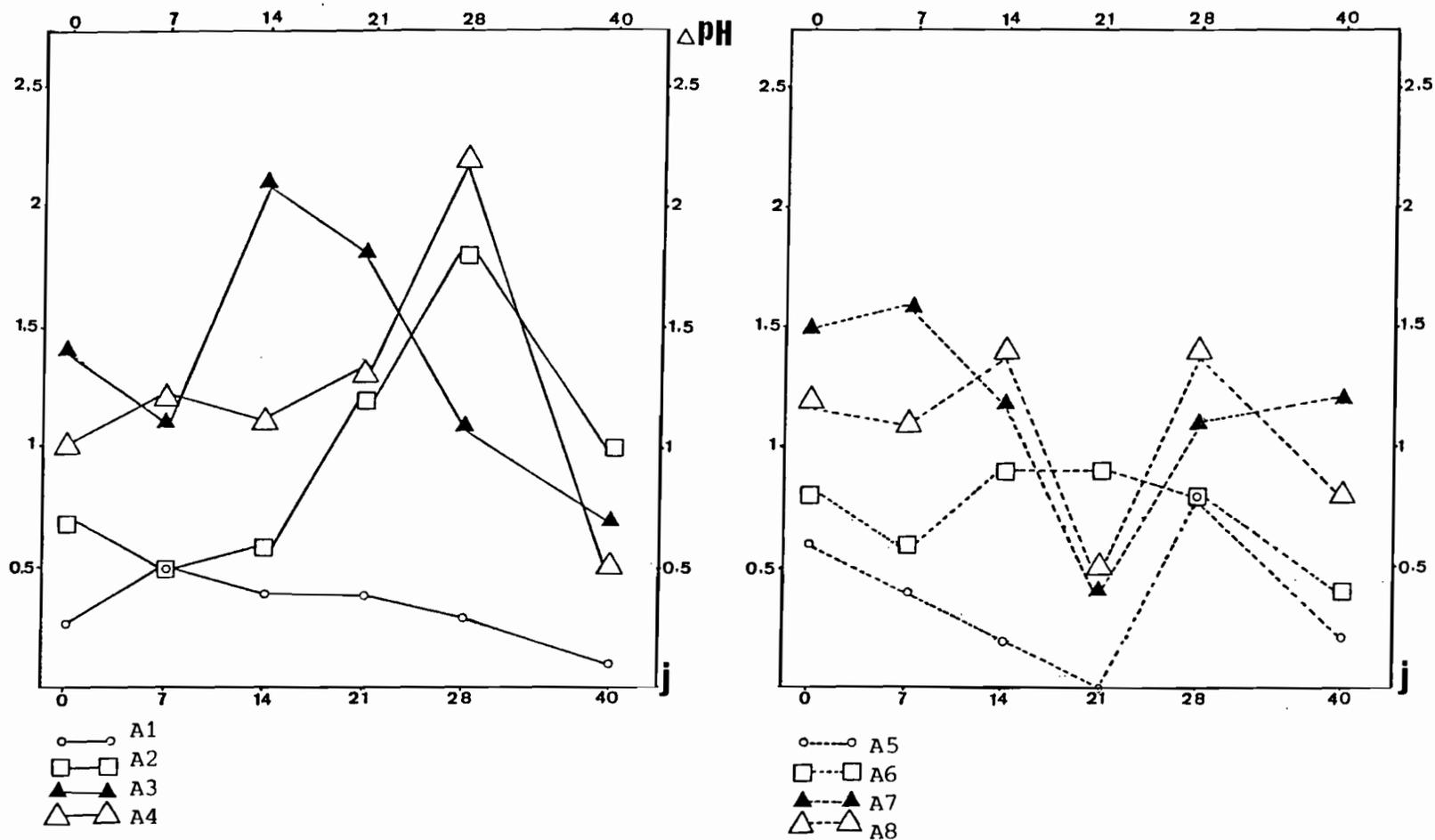


Fig. 23 : Variation du pH au cours de la journée, entre 8 h et 16 h 30, dans les différents aquariums.

" TEMPERATURE DANS L'AQUARIUM TEMOIN "°C

Jours	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Temp. max.	25	25	29	31	30	27	26	24	27	29	26	25	26	29	30	31	28	25	27	26	23	25	25	29	31	30	25	26	24	24	27	25	24	24	25	27	27	26	27	28
Temp. mini.	20	18	21	22	21	16	15	19	20	22	22	21	21	22	25	23	21	20	16	15	19	20	18	21	22	20	18	14	14	16	18	18	16	15	15	19	18	16	19	20
Différence max-mini	5	7	8	9	9	11	11	6	7	7	4	4	5	7	5	8	7	5	11	11	4	5	7	8	9	10	7	12	10	8	9	7	8	9	10	8	9	10	8	8

Tab. 38 : Enregistrement de la température de l'eau, au cours de l'expérimentation dans l'aquarium témoin à eau non polluée.

est élevé, l'existence ou non du substrat ne semble pas jouer un rôle sur l'activité larvicide des spores. Par contre, le substrat peut favoriser la maintenance des spores.

4 - DISCUSSION

La poudre Dulmage à base de la souche 2362 de *Bacillus sphaericus* est active sur les larves de *Culex pipiens*, mais un phénomène identique à celui rencontré chez *Bacillus thuringiensis* H-14 apparaît, à savoir la sédimentation de la matière active après traitement telle que démontrée par SINEGRE *et al.* (1981) et par HOUGARD *et al.* (1983). Cette sédimentation semble être en relation d'une part avec la qualité de l'eau et d'autre part avec l'existence ou non du substrat de terre au fond des lieux du traitement.

Dans l'eau claire (dans le cas de l'aquarium A₁), les spores sont rapidement dégradées devenant non viables et inactives. Cette dégradation est apparemment due à l'action des rayons solaires, ce qui confirme les résultats de MULLIGAN *et al.* (1980) et DAVIDSON (1984). Par contre, le substrat de terre favorise nettement le maintien des spores dans l'eau claire (jusqu'au 28ème jour dans le cas de l'aquarium A₅). Il semble également que le maintien des spores soit aussi lié à la qualité de l'eau.

Quatre heures après traitement, le nombre de spores accumulées au fond est approximativement comparable à celui de la surface dans tous les aquariums quelque soit le degré de pollution de l'eau. Les spores accumulées au fond persistent longtemps dans l'eau polluée avec et sans substrat, sans modification significative ; par contre, dans une eau claire ou peu polluée, les spores (cas des aquariums A₂ et A₅) ne persistent que jusqu'au 28ème jour.

Alors que l'on observe une absence totale des spores suite à l'action des rayons solaires quelques heures après le traitement (moins de 24 h) dans l'eau claire (aquarium A₁), le taux de mortalité obtenu est déjà de 83 % ; il apparaît ainsi que la quantité de spores ingérées par les larves de *Culex pipiens* durant les quelques heures après traitement (une heure selon MIAN and MULLA (1983a), et quatre heures selon KARCH (1984) est suffisante pour provoquer une mortalité comparable à celle obtenue après 72 heures de contact).

HORNBY *et al.* (1981 et 1984) ont également noté que la persistance de *Bacillus sphaericus* dépend non seulement de la dose utilisée mais également de la qualité de l'eau. Cependant, nos résultats, utilisant une seule dose (0,02 mg/l) dans les différents types d'eau, permettent d'indiquer que l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* est liée au degré de pollution de l'eau, notamment les premiers jours du traitement où la bactérie est plus active dans l'eau peu polluée que dans l'eau assez polluée. Cela pourrait être dû à la compétition entre, d'une part, les particules qui sont abondantes dans l'eau assez polluée et, d'autre part, la bactérie elle-même. MULLIGAN *et al.* (1980) supposent que les larves de *Culex tarsalis* se nourrissent plutôt à la surface qu'au fond de l'eau, ce qui implique que les spores de *Bacillus sphaericus* malgré leur existence au fond, ne sont plus disponibles pour les larves. En fait, d'après nos résultats, la mortalité dans différents types d'eau est nulle ou presque après 40 jours, bien que les spores soient viables au fond du lieu de traitement.

5 - CONCLUSION

De ces travaux sur la persistance de la souche 2362 dans différents types d'eau, nous retiendrons principalement que :

- . La sédimentation de *Bacillus sphaericus* s'effectue très rapidement au bout de quatre heures quelle que soit la qualité de l'eau.

- . Le nombre de spores accumulées au fond après quatre heures de traitement est identique à celui en surface.

- . Aucune relation entre le taux de mortalité parmi les larves rajoutées et la quantité des spores accumulées au fond n'a été remarquée.

- . Les spores de *Bacillus sphaericus* sous l'action des rayons solaires dans l'eau claire sans substrat perdent leur viabilité et leur toxicité quelques heures après traitement.

- . La bactérie est protégée des rayons solaires dans l'eau polluée et non pas dans l'eau claire. Notons que le substrat de terre peut aussi jouer un rôle de maintien de la viabilité des spores notamment dans l'eau claire.

- . L'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* est au début plus importante dans l'eau claire que dans l'eau polluée, mais cela varie avec le temps.

CHAPITRE VIII

STABILITE DE *BACILLUS SPHAERICUS* ET DE *BACILLUS THURINGIENSIS* A DIFFERENTES TEMPERATURES

ETUDE COMPARATIVE EN MILIEU AQUEUX DU DEVENIR DES SPORES ET DE LA MATIERE ACTIVE DE CES DEUX BACTERIES

1 - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Conditions du stockage

La stabilité de *Bacillus sphaericus* souches 2297 et 1593-4, et celle de *Bacillus thuringiensis* H-14 ont été déterminées en testant d'une part, leur activité larvicide, d'autre part, la viabilité de leurs spores. Les deux bactéries sont présentées sous forme de poudre conditionnée en flacon, provenant de l'Institut Pasteur, ayant subi un stockage à différentes températures.

- A température élevée (+ 50° C) : placées dans une étuve les poudres sont enlevées après un temps donné et stockées dans un réfrigérateur à + 4° C.

- A température basse (- 40° C) : après un stockage dans un congélateur, les poudres sont comme précédemment placées après un temps donné dans le réfrigérateur jusqu'à l'exécution des tests.

Parallèlement, des flacons des mêmes poudres sont également placés dans le réfrigérateur (+ 4° C) tout au long de la durée du stockage.

1.2. Titration biologique et numération des spores

La stabilité de la matière active a été déterminée selon deux paramètres.

A - Efficacité larvicide vis-à-vis des moustiques

Des essais biologiques sont réalisés afin de déterminer les DL 50 et 90 de chacune des poudres. Ces essais ont pour but de mettre en évidence une éventuelle baisse de toxicité de la bactérie en fonction du temps de stockage à une température donnée. L'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* est testée sur stade 4 jeune de *Culex pipiens* et celle de *Bacillus thuringiensis*

H-14 sur des larves au même stade d'*Aedes aegypti*, espèce la plus sensible à cette bactérie (MAGNI, 1985).

B - Viabilité des spores

Le nombre de spores viables dans les poudres a été déterminé d'après la technique suivante :

Une série de dilutions s'étendant de 10^{-1} à 10^{-10} , selon le cas, est réalisée à partir d'une suspension à 10 mg/ml de poudre primaire. Après un bain-marie à 80° C pendant 12 minutes, 0,1 ml des dilutions est étalé dans des boîtes de Pétri, contenant un milieu de culture MBS, dans le cas de *Bacillus sphaericus*, et un milieu de gélose nutritif dans le cas de *Bacillus thuringiensis* H-14.

Au bout de 48 h, les colonies issues des spores viables se sont développées ; elles sont ensuite dénombrées. A partir du nombre de colonies évalué pour une dilution donnée, nous pouvons déterminer la quantité de spores contenues dans la suspension et enfin dans la poudre. Le résultat final des dilutions produit 30 à 300 colonies.

1.3. Techniques concernant la sédimentation de la matière active de deux formulations de *Bacillus sphaericus* 2362 et de *Bacillus thuringiensis* H-14

Les deux formulations utilisées dans cette étude sont des suspensions concentrées de *Bacillus thuringiensis* H-14 (Teknar) et de *Bacillus sphaericus* souche 2362 (BSP1).

Nous avons déterminé tout d'abord par titrage biologique les DL 90 de chacun des deux produits conformément à la méthode préconisée par l'OMS (OMS, 1985). L'efficacité larvicide de *Bacillus thuringiensis* H-14 est testée sur des stades 4 jeune d'*Aedes aegypti* souche "Bora Bora" et celle de *Bacillus sphaericus* sur des larves au même stade de *Culex pipiens* souche "Montpellier".

Nous avons dans un deuxième temps, rempli une éprouvette graduée d'un litre d'eau permutée, à la surface de laquelle on répand 10 ml d'une suspension concentrée de *Bacillus sphaericus* préalablement diluée dans l'eau. On procède de la même manière avec une suspension concentrée de *Bacillus thuringiensis* H-14.

Des prélèvements d'eau sont pratiqués à différents moments après le traitement, en surface, au milieu et au fond des éprouvettes.

Les échantillons font ensuite l'objet d'un dosage biologique ainsi que d'un comptage des spores viables selon la technique de mise en culture décrite précédemment.

2 - RÉSULTATS

2.1. Influence de la température sur la viabilité des spores en fonction du temps du stockage

Les spores de la poudre lyophilisée de la souche 2297 de *Bacillus sphaericus* sont les plus sensibles à température élevée (+ 50° C). Par contre, à la même température, les spores de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* et celles de *Bacillus thuringiensis* H-14 ne sont guère sensibles. En fait, les spores de la souche 2297 ont perdu leur viabilité très rapidement, par exemple : le nombre de spores viables par mg après un mois de stockage à + 50° C était de l'ordre de 10^7 ; il tombe à 10^2 après six mois de stockage. Cette perte de viabilité n'a pas été observée chez la souche 1593-4 ni chez la souche H-14 de *Bacillus thuringiensis*, néanmoins il y avait une légère baisse de viabilité au début de l'expérience (Fig. 24, 25 et 26 ; tableau 39).

En ce qui concerne le stockage de deux poudres des souches 2297 et 1593-4 à une température basse (- 40° C), nous n'avons noté aucune variation notable de la viabilité des spores (tableau 40), pendant les trois mois de stockage.

Il semble donc que les spores de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* et celles de *Bacillus thuringiensis* H-14 soient plus résistantes à la chaleur que celles de la souche 2297 de *Bacillus sphaericus*.

2.2. Influence de la température sur la toxicité vis-à-vis de larves de moustiques

Une chute d'activité larvicide de la souche 2297 de *Bacillus sphaericus* a été observée ; par exemple, après un mois de stockage à + 50° C la DL 50 était de l'ordre de 0,02 mg/l, après 12 mois, elle s'élève à 0,55 mg/l (tableau 41). En revanche, l'activité larvicide de la matière active de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* (spores) et

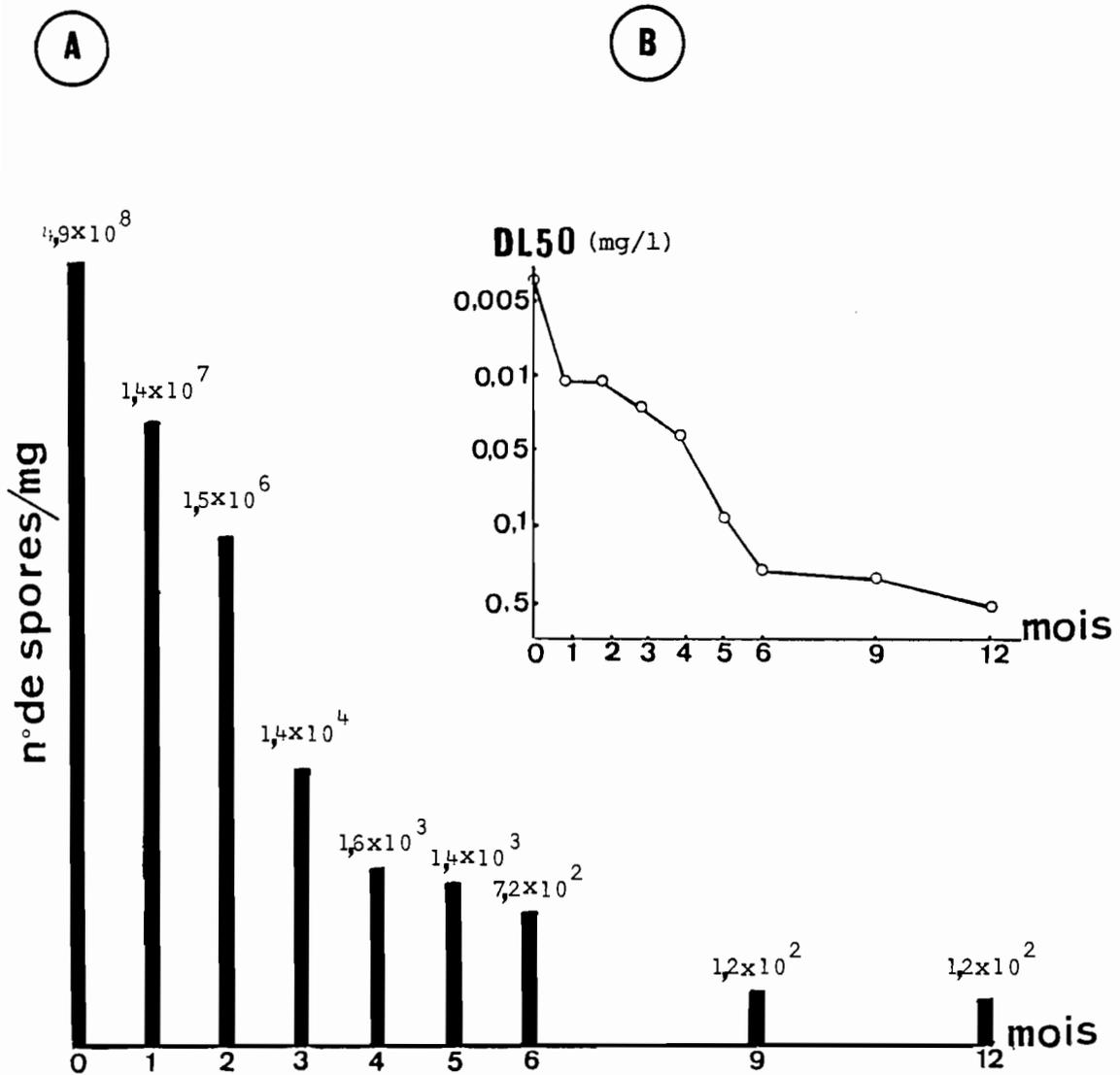


Fig. 24 : A - Perte de viabilité des spores de la souche 2297 de *Bacillus sphaericus* après traitement à une température de + 50° C.

B - Perte de toxicité de cette même souche vis-à-vis des larves de *Culex pipiens*.

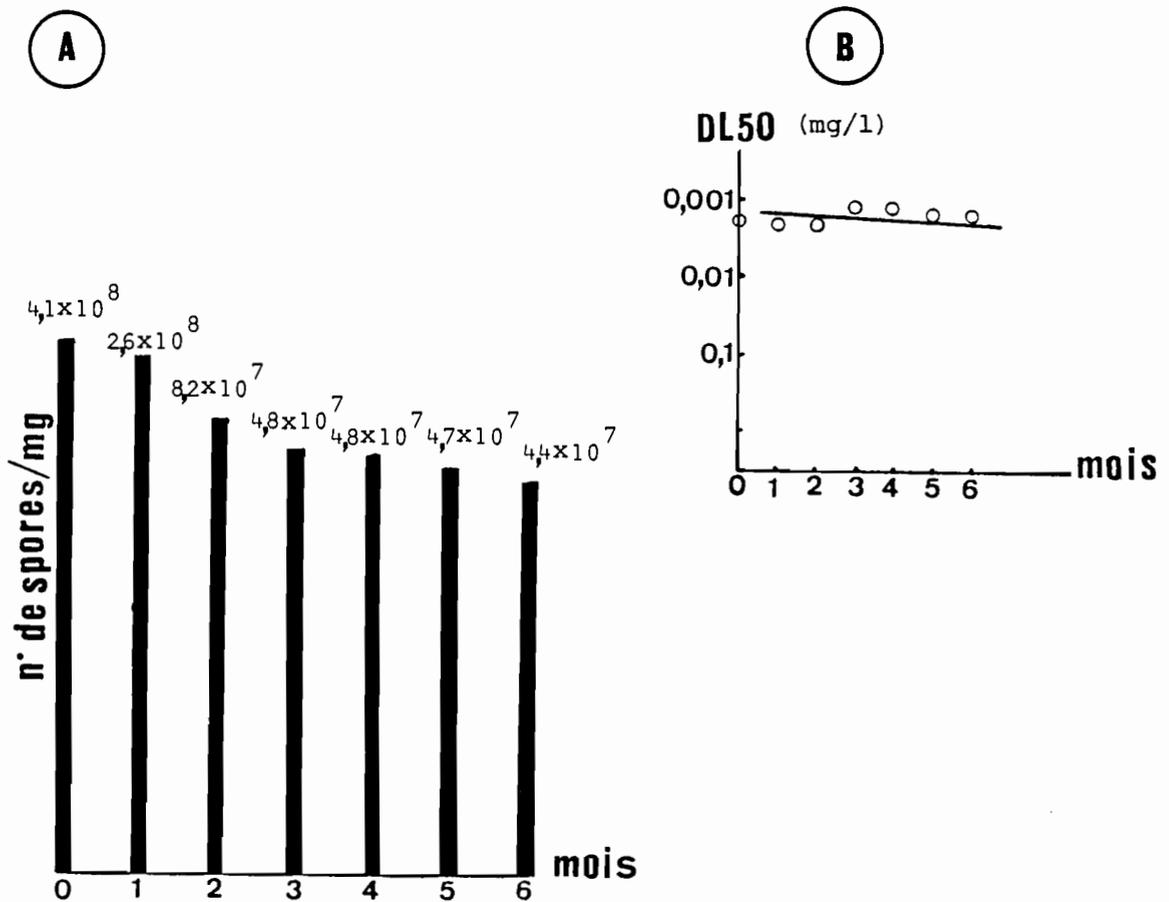


Fig. 25 : A - Viabilité des spores de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* après traitement à une température de + 50° C.

B - Stabilité de l'activité larvicide de cette même souche vis-à-vis de *Culex pipiens*.

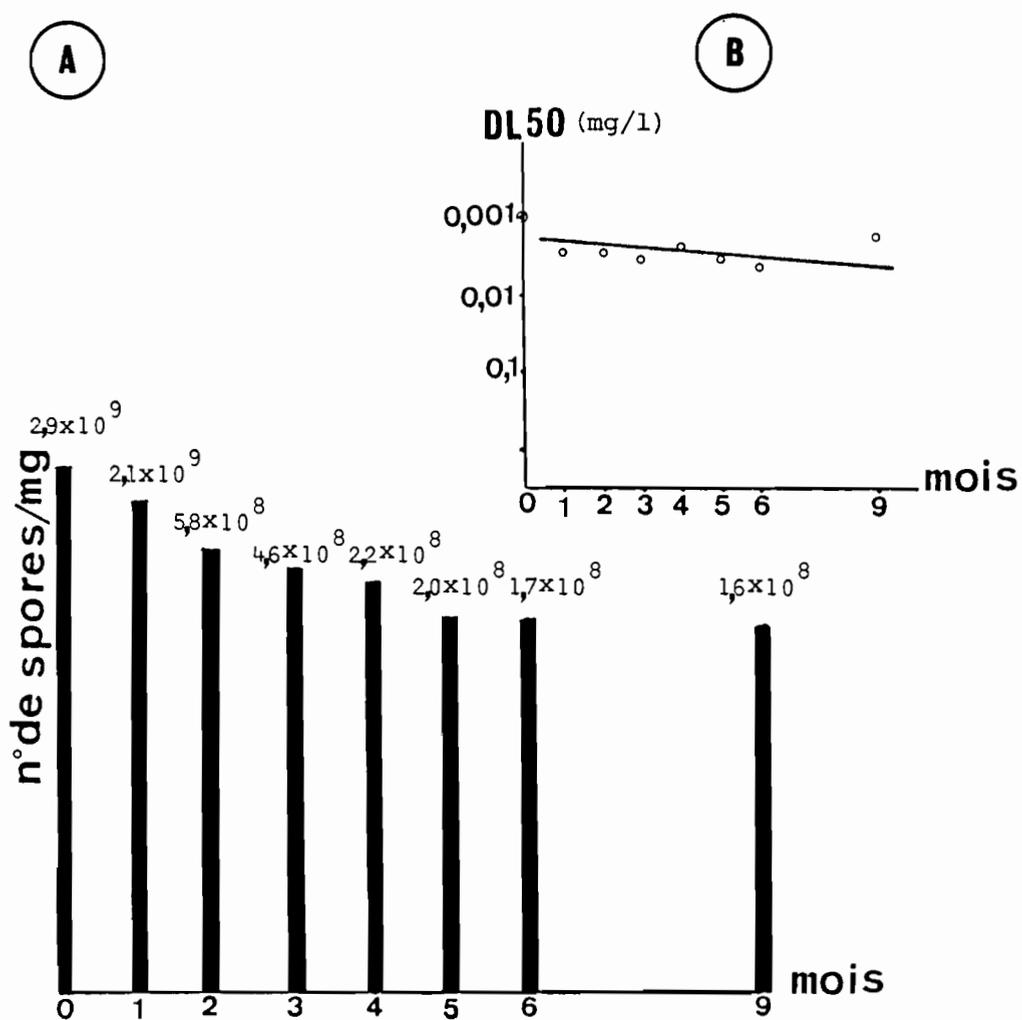


Fig. 26 : A - Viabilité des spores de la souche H-14 de *Bacillus thuringiensis* après traitement à une température de + 50° C.

B - Stabilité de la matière active de cette même souche vis-à-vis de *Aedes aegypti*.

Tab. 39 : Viabilité des spores de deux poudres de *Bacillus sphaericus* souche 2297 et 1593-4 et d'une poudre de *Bacillus thuringiensis* H-14 soumises à la chaleur (+ 50° C).

	Moyenne du nombre de spores /mg		
	<i>B.s.</i> souche 2297	<i>B.s.</i> souche 1593-4	<i>B.t.</i> H-14 (IPS 82)
0	$4,9 \times 10^8$	$4,1 \times 10^8$	$2,9 \times 10^9$
1 mois	$1,4 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$	$2,1 \times 10^9$
2 mois	$1,5 \times 10^6$	$8,2 \times 10^7$	$5,8 \times 10^8$
3 mois	$1,4 \times 10^4$	$4,8 \times 10^7$	$4,6 \times 10^8$
4 mois	$1,6 \times 10^3$	$4,8 \times 10^7$	$2,2 \times 10^8$
5 mois	$1,4 \times 10^3$	$4,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$
6 mois	$7,1 \times 10^2$	$4,4 \times 10^7$	$1,7 \times 10^8$
9 mois	$1,2 \times 10^2$	-	$1,6 \times 10^8$
12 mois	$1,2 \times 10^2$	-	-

Tab. 40 : Viabilité des spores de deux poudres de *Bacillus sphaericus* souche 2297 et 1593-4 soumises au froid (- 40° C).

	Moyenne du nombre de spores/mg	
	<i>B.s.</i> souche 2297	<i>B.s.</i> souche 1593-4
0	$4,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^8$
1 mois	$3,2 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$
2 mois	$2,3 \times 10^8$	-
3 mois	$4,3 \times 10^8$	$2,6 \times 10^8$

Tab. 41 : Résultats de l'efficacité larvicide de la poudre de *Bacillus sphaericus* souche 2297, sur *Culex pipiens*, en fonction du temps de stockage à 50° C.

	1er essai		2ème essai		3ème essai		Moyenne	
	DL 50	DL 90	DL 50	DL 90	DL 50	DL 90	DL 50	DL 90
0	0,003	0,029	0,007	0,014	0,002	0,008	0,004	0,017
1 mois	0,035	0,466	0,019	0,31	0,005	0,032	0,02	0,026
2 mois	0,023	0,284	0,01	0,21	0,006	0,093	0,015	0,188
3 mois	0,031	3,529	0,061	0,781	0,006	0,099	0,03	1,47
4 mois	0,034	0,384	0,06	1,329	0,051	0,78	0,047	0,86
5 mois	0,044	2,301	0,191	2,597	0,14	2,38	0,12	2,45
6 mois	0,077	2,666	0,105	3,591	0,8	1,65	0,33	2,6
9 mois	0,461	26,561	0,264	3,746	0,333	2,15	0,35	10,82
12 mois	0,549	5,103	0,78	7,41	0,32	2,79	0,55	5,103

DL 50 et DL 90 en mg/l

celle de *Bacillus thuringiensis* H-14 (spores et cristaux) ont été quasiment stables tout au long de la durée du stockage à + 50° C (tableaux 42 et 43).

De même, l'activité toxique de deux poudres de souches 2297 et 1593-4 est restée stable après traitement à une température basse (- 40° C) durant trois mois (tableaux 44 et 45).

2.3. Comportement et sédimentation du complexe spore-toxine de *Bacillus sphaericus* et de *Bacillus thuringiensis* H-14

2.3.1. Volet entomologique

Les deux formulations de *Bacillus sphaericus* 2362 et de *Bacillus thuringiensis* H-14 possèdent chacune une très bonne efficacité larvicide respectivement sur *Culex pipiens* et *Aedes aegypti*. La DL 90 pour le BSP1 est de l'ordre de 0,14 mg/l après 48 h de contact et de 0,23 mg/l pour le Teknar après 24 h de contact.

En terme de perte de toxicité, la sédimentation de la matière active des deux formulations semble s'opérer de façon tout à fait différente.

La matière active du Teknar sédimente très rapidement par rapport au BSP1 : après 12 heures, une partie de la matière active de Teknar a déjà sédimenté et la quasi-totalité au bout de 24 heures. En revanche, aucune sédimentation n'est décelée pour la formulation BSP1 de *Bacillus sphaericus*, même après sept jours d'expérimentation (Fig. 27).

2.3.2. Volet bactériologique

La sédimentation des spores de *Bacillus sphaericus* 2362 et de *Bacillus thuringiensis* H-14 semble se dérouler de façon identique. Cependant, bien qu'une légère baisse du nombre de spores soit observée après 48 heures, dans les deux cas, leur répartition dans l'eau reste homogène pendant toute la durée de l'étude (tableau 46).

Tab. 42 : Résultat du test biologique avec la poudre de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* soumise à un stockage à la température de 50° C.

	poudre non stockée	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois	6 mois
DL 50 (mg/l)	0,007	0,007	0,007	0,009	0,009	0,008	0,008
DL 90 (mg/l)	0,015	0,021	0,018	0,037	0,088	0,027	0,014

Tab. 43 : Résultat du test biologique avec la poudre de *Bacillus thuringiensis* H-14 soumise à un stockage à la température de 50° C.

	poudre non stockée	1 mois	2 mois	3 mois	4 mois	5 mois	6 mois	9 mois
DL 50 (mg/l)	0,001	0,004	0,004	0,005	0,003	0,004	0,006	0,002
DL 90 (mg/l)	0,040	0,027	0,046	0,036	0,023	0,028	0,031	0,028

Tab. 44 : Résultats du test biologique avec la poudre 2297 de *Bacillus sphaericus* soumise à un stockage à la température basse (- 40° C).

	poudre témoin stockée à + 4° C	1 mois	3 mois	6 mois
DL 50 (mg/l)	0,002	0,004	0,003	0,002
DL 90 (mg/l)	0,008	0,026	0,008	0,005

Tab. 45 : Résultats du test biologique avec la poudre de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* soumise à un stockage à la température basse (- 40° C).

	poudre témoin stockée à + 4° C	1 mois	3 mois
DL 50 (mg/l)	0,003	0,002	0,002
DL 50 (mg/l)	0,008	0,007	0,006

(A)

-166-

(B)

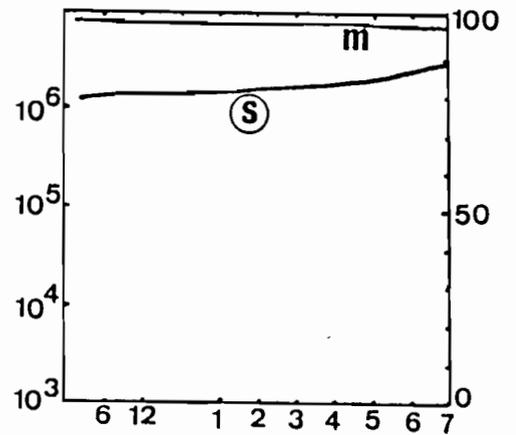
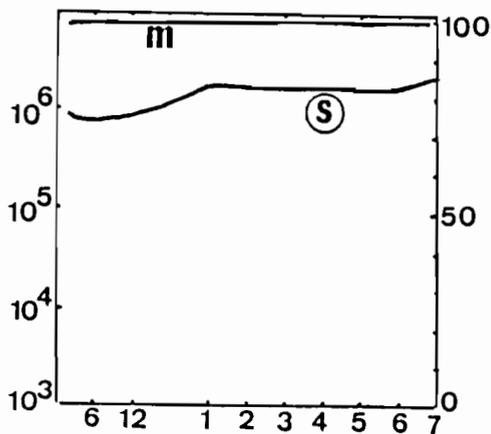
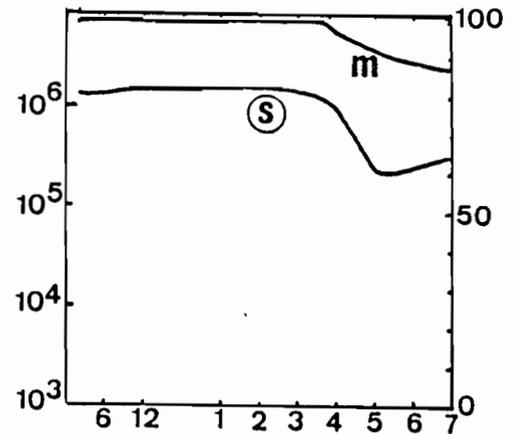
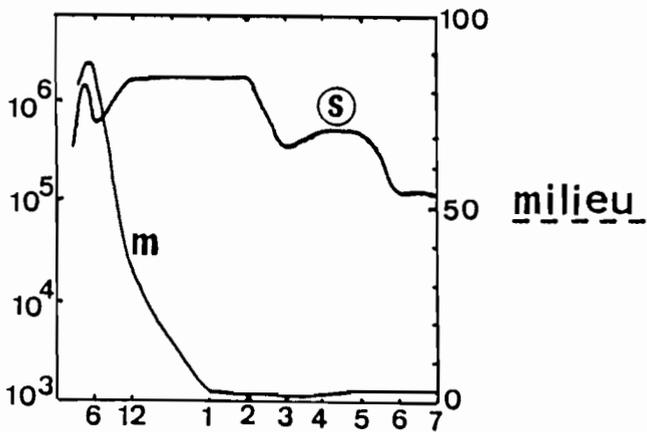
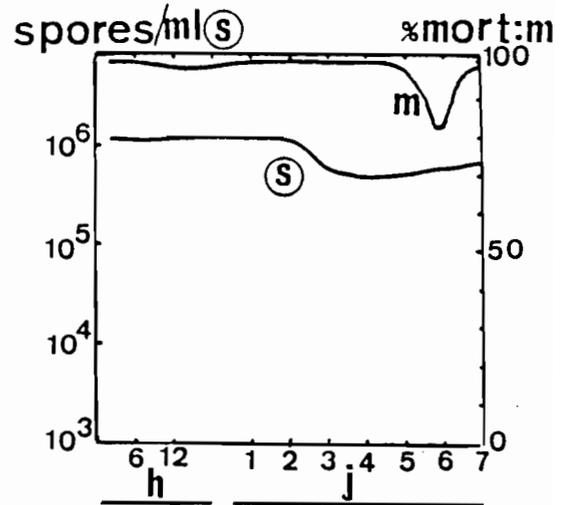
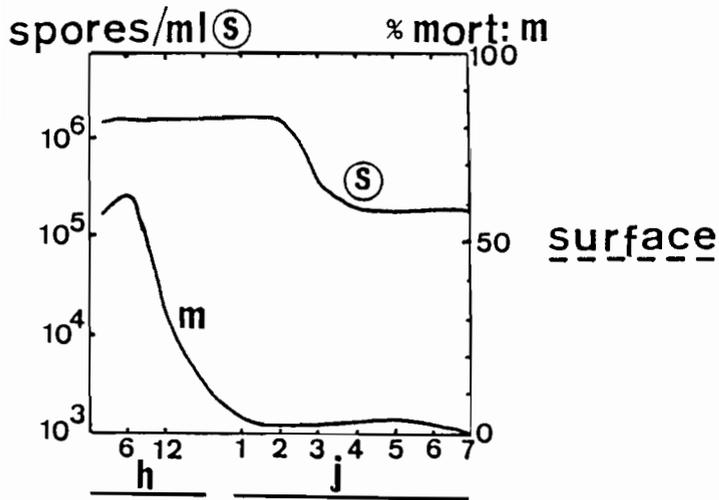
B. thuringiensis H14B. sphaericus

Fig. 27 : Sédimentation dans l'eau des spores (S) et de la matière active (m) de deux suspensions concentrées de *Bacillus thuringiensis* H-14 (A) et de *Bacillus sphaericus* (B).

Tab. 46 : Sédimentation de la matière active en fonction du temps. Numération des spores et efficacité de la matière active de deux bactéries : *Bacillus thuringiensis* H14 et *Bacillus sphaericus*.

	2 h		4 h		6 h		12 h		24 h		2 j		3 j		4 j		5 j		6 j		7 j		
	Nombre de spores	M %																					
<i>Bacillus thuringiensis</i> H14	Surface	1,1 x 10 ⁶	58	1,4 x 10 ⁶	61	1,2 x 10 ⁶	59	1,2 x 10 ⁶	29	1,4 x 10 ⁶	4	1,1 x 10 ⁶	0	5,7 x 10 ⁵	0	2,3 x 10 ⁵	0	2,4 x 10 ⁵	3	1,9 x 10 ⁵	2	1,9 x 10 ⁵	0
	Milieu	6,5 x 10 ⁵	68	1,1 x 10 ⁶	87	7,2 x 10 ⁵	-	1,2 x 10 ⁶	36	1,5 x 10 ⁶	3	1,4 x 10 ⁶	0	5,9 x 10 ⁵	0	7,7 x 10 ⁵	0	6,3 x 10 ⁵	2	1,6 x 10 ⁵	4	2,5 x 10 ⁵	3
	Fond	9,1 x 10 ⁵	100	8,1 x 10 ⁵	100	8,6 x 10 ⁵	100	8,9 x 10 ⁵	-	2,1 x 10 ⁶	100	2,1 x 10 ⁶	100	2,2 x 10 ⁶	100	1,3 x 10 ⁶	98	1,7 x 10 ⁶	100	1,2 x 10 ⁶	100	3,3 x 10 ⁶	100
<i>Bacillus sphaericus</i>	Surface	1,6 x 10 ⁶	100	1,3 x 10 ⁶	100	1,3 x 10 ⁶	98	1,2 x 10 ⁶	98	1,3 x 10 ⁶	100	1,1 x 10 ⁶	100	8,6 x 10 ⁵	100	8,4 x 10 ⁵	100	8,3 x 10 ⁵	98	8,5 x 10 ⁵	82	7,1 x 10 ⁵	98
	Milieu	1,5 x 10 ⁶	100	1,6 x 10 ⁶	100	1,4 x 10 ⁶	100	1,9 x 10 ⁶	100	1,9 x 10 ⁶	100	1,7 x 10 ⁶	100	1,5 x 10 ⁶	100	9,6 x 10 ⁵	96	4,2 x 10 ⁵	92	5,1 x 10 ⁵	-	7,1 x 10 ⁵	88
	Fond	1,2 x 10 ⁶	100	1,5 x 10 ⁶	100	1,6 x 10 ⁶	100	1,8 x 10 ⁶	100	2,1 x 10 ⁶	100	2,2 x 10 ⁶	100	2,3 x 10 ⁶	100	2,4 x 10 ⁶	100	2,6 x 10 ⁶	100	2,7 x 10 ⁶	100	3,1 x 10 ⁶	100

3 - DISCUSSION

3.1. Action de la température sur la stabilité du pouvoir larvicide et sur la viabilité des spores

La résistance du pouvoir larvicide à l'action de la chaleur est différente d'une souche à une autre pour *Bacillus sphaericus*. Dans le cas de la souche 2297, l'action de la chaleur a provoqué une diminution de toxicité notable. Par contre, la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* et le sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis* étaient bien résistants à l'action de la chaleur (+ 50° C).

BALARAMAN and HOTI (1984) ont constaté également une diminution sur l'activité larvicide de la souche H-5 a et b de *Bacillus sphaericus* après un stockage à - 40, + 8 et + 30° C pendant 30 semaines et pas sur celle de *Bacillus thuringiensis* H-14 dans les mêmes conditions. Nos résultats vont dans le sens des travaux de BOURGOUIN *et al.* (1984) qui ont montré que l'efficacité d'une poudre de la souche 1593 diminue légèrement après un stockage à 5° C pendant deux ans et à 50° C pendant quatre semaines.

Dans le cas de la souche 2297 de *Bacillus sphaericus*, il semble qu'il y ait un lien étroit entre l'efficacité larvicide et la viabilité des spores, car nous avons remarqué que sous l'action de la chaleur plus le nombre de spores baisse plus l'efficacité larvicide diminue.

Comme les composants cristallins sont les composants les plus toxiques des souches de *Bacillus sphaericus* (PAYNE and DAVIDSON, 1984), il semblerait que l'action de la chaleur ne modifie pas les composants toxiques mais détruit une certaine proportion de spores.

Les basses températures n'entraînent aucune diminution ou perte de toxicité, ce qui va dans le sens des travaux de DAGNOGO et COZ (1982 b).

3.2. Sédimentation et devenir de la matière active

Si les résultats des analyses bactériologiques mettent en évidence une réapparition homogène des spores de *Bacillus sphaericus* et de *Bacillus thuringiensis* H-14, il n'en est pas de même pour la matière active dont le comportement est tout à fait différent suivant la bactérie considérée : avec la formulation Teknar, la matière active sédimente au bout de quelques heures, ce qui confirme les résultats de GUILLET *et al.* (1980), alors qu'elle persiste beaucoup plus longtemps dans le milieu avec la formulation BSP 1 (KARCH et HOUGARD, 1986).

Cette différence de persistance entre ces deux bactéries semble liée essentiellement aux rapports existant entre la toxine et la spore : dans le cas de *Bacillus thuringiensis* H-14, les cristaux ne sont pas liés aux spores (planche 12, A) et sédimentent plus rapidement que ces dernières, alors que dans le cas de *Bacillus sphaericus*, les inclusions toxiques sont étroitement associées (planche 12, B) à la spore qui ferait en quelque sorte office de "flotteur".

4 - CONCLUSION

La résistance des spores de *Bacillus sphaericus* à l'action de la chaleur est différente d'une souche à une autre. Les spores de la souche 1593-4 sont beaucoup plus résistantes à la chaleur que celles de la souche 2297. Il semblerait qu'il y ait un lien entre la viabilité des spores et la toxicité, car plus la viabilité des spores baisse plus la toxicité diminue. Par contre, aucune variation ni de viabilité ni de toxicité de spores des deux souches n'a été observée après un stockage à basse température, contrairement à ce qui est démontré par BALARAMAN and HOTI (1984).

Quant à *Bacillus thuringiensis* H-14, la matière active a été quasiment stable pendant la période du stockage à température élevée.

L'expérimentation concernant la sédimentation de la matière active de deux bactéries *Bacillus sphaericus* et *Bacillus thuringiensis* H-14, a permis de mettre en évidence une différence de sédimentation des facteurs toxiques de deux bactéries, liée semble-t-il à la nature des relations existant entre les spores et les cristaux de chacune des bactéries.

Les résultats confirment par conséquent ceux obtenus sur le terrain en Afrique de l'Ouest par HOUGARD *et al.* (1983). Ces auteurs ont montré que la rémanence d'une suspension concentrée de *Bacillus thuringiensis* H-14 (Teknar) n'excède pas cinq jours alors qu'elle atteint cinq à six semaines avec une formulation similaire de *Bacillus sphaericus* 2362 (NICOLAS *et al.*, 1986) dans les mêmes conditions d'expérimentation et à la même concentration.

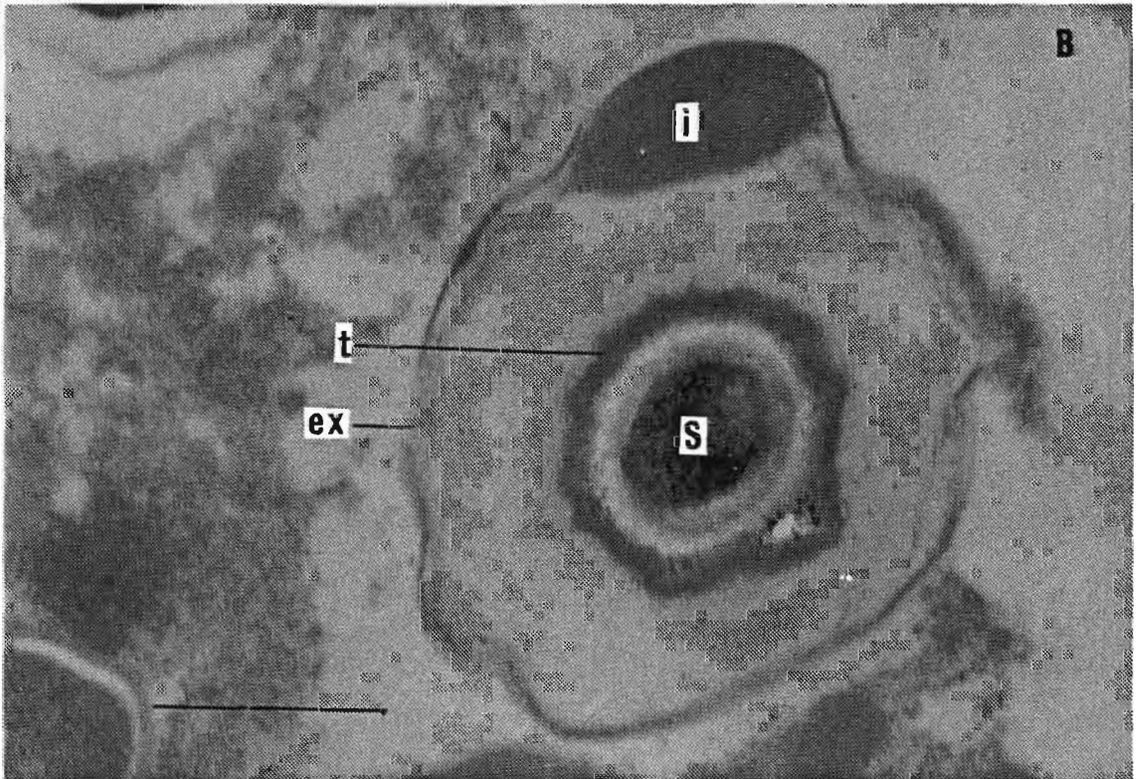
Dans le cas de *Bacillus thuringiensis* H-14, la réapparition de la population préimaginale dans le gîte serait liée essentiellement à une sédimentation de la matière active (cristaux) en dehors de la zone de nutrition des larves et non à une perte de toxicité de l'endotoxine bactérienne.

Planche 12 :

A : spores (s) et cristaux libres (c) de *Bacillus thuringiensis* H-14 après lyse du sporange (microscopie électronique à transmission-cliché J-F CHARLES (Institut Pasteur, Paris)).

B : spores (s) de *Bacillus sphaericus* souche 2362, montrant l'inclusion cristalline toxique (i) entre les tuniques sporales (t) et l'exosporium (ex).

L'échelle est donnée par un trait dont la longueur représente 0,5 μm .



Dans le cas de *Bacillus sphaericus*, les résultats obtenus révèlent l'importance du maintien de la matière active (spores) dans la zone de nutrition des larves, à condition toutefois que le complexe spore-toxine ne soit pas dégradé par les diverses conditions physico-chimiques régnant dans les gîtes larvaires (KARCH *et al.*, 1986).

Ce phénomène de "flottabilité" de la matière active devrait être pris en considération par l'industrie afin qu'elle oriente ses recherches vers des formulations mieux adaptées à ce type de biotope.

CHAPITRE IX

RECYCLAGE DE *BACILLUS SPHAERICUS* DANS LES LARVES MORTES ACTIVITE LARVICIDE DES SPORES ISSUES DES CADAVRES

1 - GÉNÉRALITÉS SUR LA SPORULATION DE LA BACTÉRIE

Le développement bactérien s'effectue normalement en trois étapes : la première est l'étape de la germination de spores qui se transforment en cellules végétatives ; la deuxième est l'étape de la croissance des cellules végétatives qui se divisent activement. Enfin, la troisième est l'étape de l'entrée en sporulation des cellules végétatives par suite de différents facteurs (température, humidité, éléments nutritifs ...).

Bacillus sphaericus est un agent pathogène qui tue les larves de moustiques par une toxine associée aux spores et qui n'est pas secrétée dans le milieu (DAVIDSON and SWEENEY, 1983). Cette toxine de *Bacillus sphaericus* est accumulée rapidement durant la sporulation (MYERS *et al.*, 1979 ; YOSTEN and DAVIDSON, 1982 ; KALFON *et al.*, 1983). Ce sont donc des spores qui déterminent essentiellement l'activité de *Bacillus sphaericus*. Ces spores doivent être viables ; les spores non viables de *Bacillus sphaericus* ne participent pas à l'activité larvicide (DAVIDSON, 1984).

Les spores ingérées ne sont visiblement pas dégradées dans le tube digestif des larves (DAVIDSON, 1981 b) mais une germination et une multiplication des cellules végétatives ont été observées (MENON *et al.*, 1982 ; DAVIDSON, 1984).

La toxicité de *Bacillus sphaericus* n'est pas due à un cristal parasporal (SINGER, 1980) mais elle est en relation avec des phénomènes digestifs dans l'intestin de la larve, qui libèrent la ou les toxines à partir des différents constituants de la bactérie (paroi cellulaire, spore) (MYERS *et al.*, 1979 ; DAVIDSON, 1981 a).

Les larves tuées par *Bacillus sphaericus* possèdent donc une certaine quantité de spores ou de cellules végétatives. Il nous a paru intéressant d'étudier le recyclage de cette bactérie chez les larves dès le temps 0 de l'ingestion en suivant l'évolution de la germination, de la multiplication et de la sporulation avant et après la mort de la lar-

ve jusqu'à 90 jours et d'en mesurer la toxicité larvicide sur des larves saines de *Culex pipiens*.

2 - TECHNIQUES ET MATÉRIEL

2.1. Méthodes de l'exposition des larves à des doses létales de la souche 1593-4

La souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* utilisée est présentée sous forme de poudre lyophilisée. Tous les tests sont réalisés dans les conditions du laboratoire ($25^{\circ} \text{C} \pm 2$). Des larves stades 3 ou 4 jeune de *Culex pipiens* sont placées dans des gobelets contenant, selon le cas, 75 ou 150 ml de la suspension bactérienne ou dans l'eau distillée dans le cas du témoin.

Les concentrations utilisées, 0,02 à 0,03 mg/l, correspondent à la DL 90 et la DL 100 respectivement ; elles permettent après 48 heures de contact d'obtenir des cadavres et de tester la toxicité larvicide des spores qui s'y accumulent en fonction du temps. Tout de suite après leur mort, les larves tuées sont lavées à l'eau distillée, puis remises dans des cristallisoirs contenant deux litres d'eau distillée.

2.2. Technique de culture

La numération des spores et des "CFU" (ou cellules végétatives et spores), a été réalisée sur des larves au cours de l'ingestion de la bactérie, pendant l'exposition à la bactérie et sur des larves intoxiquées, après la mort, maintenues dans l'eau distillée jusqu'à 90 jours afin de rechercher une éventuelle germination ou multiplication dans le tube digestif des larves.

Trois répliques sont effectuées pour chacune des spores et des CFU. A chaque réplique, cinq larves sont lavées et broyées dans un tube à hémolyse contenant 1 ml d'eau distillée stérile, le volume est ensuite complété à 5 ml. Une série de dilutions s'étendant, selon le cas, de 10^{-1} à 10^{-9} , est réalisée à partir du broyat des larves. 100 μl des dilutions sont ensemencés dans des boîtes de Pétri dans lesquelles se trouve le milieu dit M.B.S., de formule suivante :

Bacto-tryptose	10 g
Yeast extract	2 g
KH_2PO_4	6,8 g

MgSO₄.7H₂O 0,3 g
 CaCl₂.H₂O 0,2 g
 Solution mère* 10 ml
 pH ajusté à 7,2
 Eau distillée 1 litre

* Solution mère : - Mn SO₄. 1H₂O 2 g
 - Fe₂ (SO₄)₃ 2 g
 - Zn SO₄. 7H₂O 2 g
 Eau distillée 1 litre
 Solution conservée à 4°C

. Milieu M.B.S. solide : 15 g de Bacto-agar/1 litre

Ce milieu a été adopté pour obtenir des cultures sporulées de *Bacillus sphaericus* par KALFON *et al.* (1983).

Après stérilisation à 115° C pendant 30 minutes, un antibiotique, la Streptomycine, a été ajouté à raison de 100 mg/l ; à cette dose, seul *Bacillus sphaericus* est résistant (YOUSTEN *et al.*, 1982). Lorsque la gélose est solidifiée, les boîtes sont placées dans un réfrigérateur à 4° C jusqu'au moment de l'utilisation.

2.3. Numération des spores et des "CFU"

Cette expérimentation a pour but de mettre en évidence les éventuelles étapes de la germination et de la sporulation de la bactérie qui se déroulent dans le tube digestif de la larve. Nous pouvons en effet suivre ces étapes par un simple comptage des spores et des cellules végétatives qui se trouvent dans le tube digestif, à partir du temps 0 et à différents moments durant l'ingestion de la bactérie.

Pour évaluer le nombre de spores viables, les dilutions, à partir de broyat de larves intoxiquées, sont chauffées dans un bain-marie à 80° C pendant 12 minutes. Par contre, pour la numération des cellules végétatives et les spores ou "CFU", nous étalons les dilutions directement sur les boîtes de Pétri sans les chauffer.

La lecture des boîtes est effectuée après 48 heures d'incubation dans une étuve à 35° C ; les colonies sont dénombrées après identification en microscopie en contraste de phase. Seules les boîtes de 30 à 300 colonies sont examinées. A partir du nombre de colonies évalué pour une

dilution donnée, nous pouvons déterminer la quantité des cellules et spores contenues dans la suspension.

Exemple de calcul :

250 colonies sur la boîte à 10^{-5}

30 colonies sur la boîte à 10^{-6}

soit un certain nombre de colonies par 0,1 ml de chaque dilution. Le résultat sera le suivant :

250 colonies dans 0,1 ml 10^{-5} = 2 500 colonies par ml

30 colonies dans 0,1 ml 10^{-6} = 300 colonies par ml

dans 1 ml de 10^{-6} soit 3 000 colonies dans 1 ml de 10^{-5}

La moyenne sera :

$\frac{2\ 500 + 3\ 000}{2} = 2\ 750$ germes dans 1 ml de 10^{-5}

2

soit : $2,75 \times 10^8$ spores/ml de la suspension.

2.4. Principe d'un test insecticide à partir des spores ingérées par les larves

Afin d'évaluer la toxicité des spores ingérées par les larves traitées, 5, 10, 15 ou 20 larves mortes ou non sont retirées, lavées et broyées à l'aide d'une baguette en verre dans une salière contenant quelques ml d'eau distillée, ensuite rajoutées dans un gobelet dans lequel se trouvent 5, 10, 15 ou 20 larves saines stades 3 ou 4 jeune de *Culex pipiens*.

D'autres séries de tests sont réalisées pour évaluer le potentiel larvicide de la bactérie qui se trouve dans les cadavres en fonction du temps, jusqu'à trois mois. Pour cette expérimentation, des cadavres sont maintenus dans l'eau ; nous retirons à chaque fois 100 cadavres soit cinq fois 20 cadavres broyés plus 20 larves saines stade 3 ou 4 jeune dans 150 ml d'eau distillée. Les tests sont effectués les jours suivants : 0, 1, 2, 3, 5, 12, 17, 20, 30, 45, 60, 75 et 90 jours après la mort des larves.

3 - RÉSULTATS

3.1. Accélération du pouvoir larvicide due aux spores accumulées dans des larves intoxiquées

Pour prouver la toxicité des spores accumulées dans les larves tuées par *Bacillus sphaericus* 1593-4, ces larves sont retirées, lavées à l'eau, ensuite laissées deux à trois jours dans l'eau distillée. Puis, le broyat des ces larves mortes est ajouté dans des gobelets contenant 150 ml d'eau distillée et 5, 10, 15 ou 20 larves saines de stade 3 de *Culex pipiens*. Les résultats sont représentés dans le tableau (47).

Avec le broyat de larves mortes dans lequel se trouve la bactérie accumulée, on note une certaine mortalité après huit et dix heures d'observation. Ce niveau de mortalité ne peut être obtenu qu'après 48 heures avec la poudre 1593-4 employée à la dose de 0,02 mg/l (Fig. 28). L'activité larvicide du broyat est donc beaucoup plus rapide que celle de la poudre. Les cadavres restant un certain temps dans l'eau (deux à trois jours), on observe une accélération de l'activité larvicide qui est due principalement à l'accumulation des spores dans les larves intoxiquées.

3.2. Persistance de l'activité larvicide des spores accumulées dans les larves au cours de 90 jours

Des essais préliminaires, avec des larves mortes suite à une dose de 0,02 mg/l de la souche 1593-4, ont été effectués dès les premiers jours de maintenance de ces larves mortes dans l'eau distillée.

Les cadavres ont été maintenus dans l'eau pendant 90 jours pendant lesquels, à différentes époques, des tests ont été réalisés. Les tests sont effectués selon la technique suivante : 100 cadavres sont retirés, lavés, broyés et ensuite mis en contact avec des larves saines de stade 3 de *Culex pipiens* (20 cadavres broyés + 20 larves saines) dans un gobelet contenant 150 ml d'eau distillée x 5.

L'étude de la toxicité des spores, qui se trouvent dans les cadavres, est représentée dans le tableau suivant :

<u>Tests effectués</u> <u>après la mort des larves</u>	<u>% de mortalité</u> <u>après 48 heures d'observation</u>
J 0	6
J 1	75
J 2	99,4
J 3	99,4
J 5	99,4
J 12	99,4
J 17	83
J 20	80
J 30	90
J 45	99,3
J 60	95
J 75	93
J 90	85

La figure (29) montre d'une part que l'activité larvicide de la bactérie à partir des larves prélevées juste après la mort à J 0, est faible (6 %) et, d'autre part, que cette activité s'élève rapidement si le prélèvement est effectué plus tard. En effet, le pouvoir larvicide, après le premier jour, reste élevé et provoque une mortalité importante parmi les larves testées (80-99,4 %) au cours de 90 jours. Ces résultats nous indiquent que la bactérie (spores et cellules végétatives) reste toujours toxique pour des larves saines et manifeste approximativement la même activité larvicide pendant les 90 jours.

3.3. Recyclage de *Bacillus sphaericus* dans les larves

La numération bactériologique a permis de constater que le nombre de spores ingérées par la larve est à peu près du même ordre après 1/2 et 2 heures d'exposition à une poudre lyophilisée de la souche 1593-4 à 0,03 mg/l, qui ne contient pratiquement que des spores. La chute du nombre de spores dans le tube digestif a commencé après les deux heures qui suivent l'ingestion. Cette diminution du nombre de spores a été accompagnée d'une accumulation d'un nombre de cellules végétatives relativement comparable au nombre de spores considérées germées.

Tab. 47 : Comparaison de la mortalité des larves des stades 3 et 4 jeune de *Culex pipiens*, après exposition aux broyats des cadavres et à des concentrations (DL 50 et DL 90) de la poudre de *Bacillus sphaericus* 1593-4.

temps "h" Nature des lots	Effectif total des larves testées	Mortalité %				
		8h	10h	20h	24h	48h
20 LM + 5 LS	80	4	8	88	99	
20 LM + 10 LS	160	0	4	90	100	
20 LM + 15 LS	240	2,5	5,3	98	100	
20 LM + 20 LS	320	5	5	98	100	
15 LM + 20 LS	320	1	2	100		
10 LM + 20 LS	320	2	3	84	98	
DL 50* 0,006	120	-	-	3	10	45
DL 90* 0,02	120	-	-	26	41	95
Témoin	100	0	0	0	0	1

* mg/l

Fig. 28 : Toxicité comparée entre les spores présentées dans les cadavres (broyats) et la poudre de 1593-4 (DL 50 = 0,006 mg/l ; DL 90 = 0,02 mg/l).

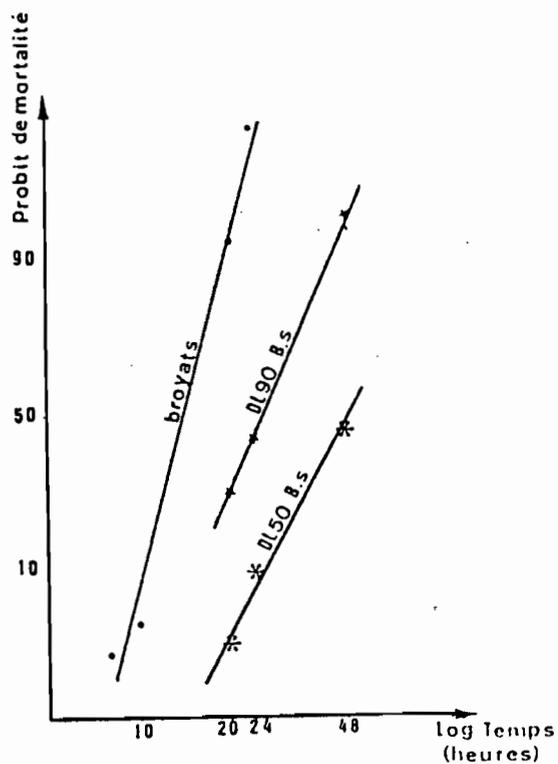
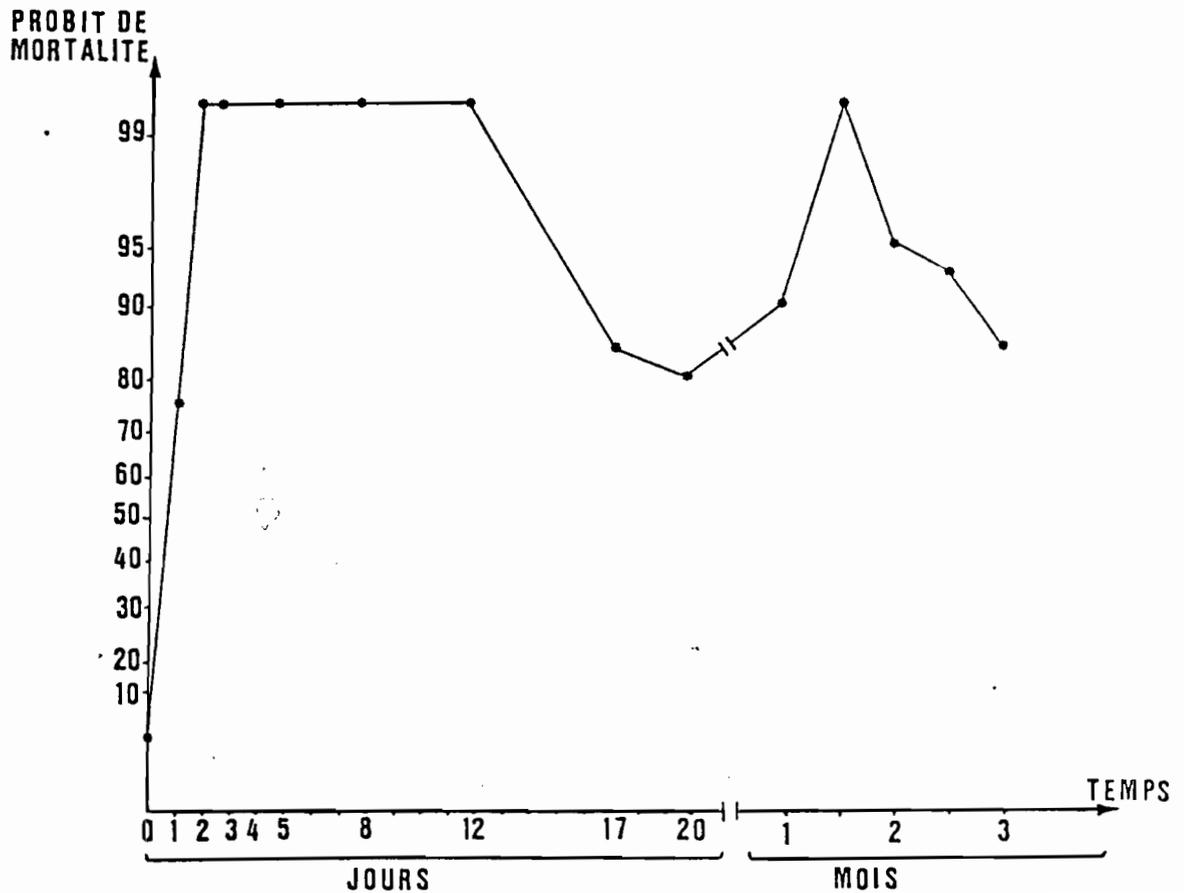


Fig. 29 : Taux des mortalités provoquées par le broyat des 20 larves tuées par *Bacillus sphaericus* 153-4, conservées dans l'eau permutée durant trois mois. A chaque test, 100 larves saines sont réparties dans cinq gobelets contenant chacun 150 ml d'eau permutée et 20 cadavres broyés.



La figure (30) montre l'évolution du nombre de cellules végétatives et des spores ou "CFU", et la courbe du nombre de spores. En fait, étant donné que le nombre de spores est inclus dans le nombre des "CFU", la différence entre le nombre des "CFU" et le nombre de spores représente le nombre des cellules végétatives qui ont germé. Cependant, la germination des spores continue en même temps que le nombre de spores diminue jusqu'à la mort de la larve à 24 heures.

Après la mort de la larve, le nombre de spores augmente à nouveau s'approchant du nombre des "CFU". Autrement dit, les cellules végétatives commencent à sporuler juste après la mort de la larve (après 24 heures de contact). Cette sporulation continue et ce n'est qu'après 72 heures que nous remarquons que le nombre des "CFU" et celui des spores sont sensiblement du même ordre. Cela signifie que toutes les cellules végétatives sont pratiquement transformées en spores pendant les 72 heures qui suivent la mort de la larve.

L'observation, de quatre jours après la mort de la larve jusqu'à 90 jours, montre que le nombre des "CFU" et le nombre de spores sont en augmentation lente (Fig. 31) ; cette augmentation pourrait être due à une nouvelle germination de quelques spores en fonction du temps. En fait, le nombre de spores et le nombre des "CFU" sont relativement du même ordre au cours de cette période, au 90ème jour le nombre de spores atteignant $2,8 \times 10^8$ spores/larve et les "CFU" $3,1 \times 10^8$ CFU/larve (tableau 48).

Les résultats nous amènent à constater deux phénomènes importants : le premier est la germination des spores qui commence deux heures après l'ingestion et dure pendant les premières 24 heures, le deuxième est le phénomène de la sporulation qui s'effectue essentiellement pendant les 72 heures après la mort de la larve et qui continue au cours des 90 jours suivants.

3.4. Potentiel de la culture des spores provenant des cadavres

La culture en milieu M.B.S. liquide des spores à partir d'un broyat de cadavres maintenus d'une part deux jours, et d'autre part 90 jours dans l'eau, a été testée sur les larves stade 3 de *Culex pipiens*. La DL 50, après 48 heures de contact a été respectivement de l'ordre de $0,5 \times 10^{-5}$ et de $0,44 \times 10^{-5}$ (tableau 49). Ces résultats confirment que les spores de *Bacillus sphaericus* restent toujours viables à l'intérieur

Fig. 30 : Spores et CFU de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* présentes dans les larves durant le traitement 1/2, 2, 4, 6 et 24 h (ou 0 h) et après la mort des larves.

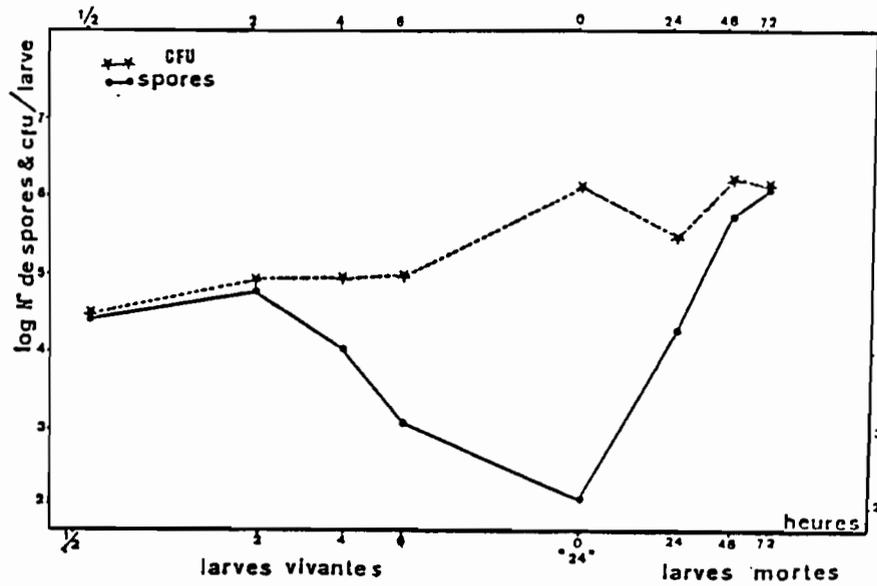
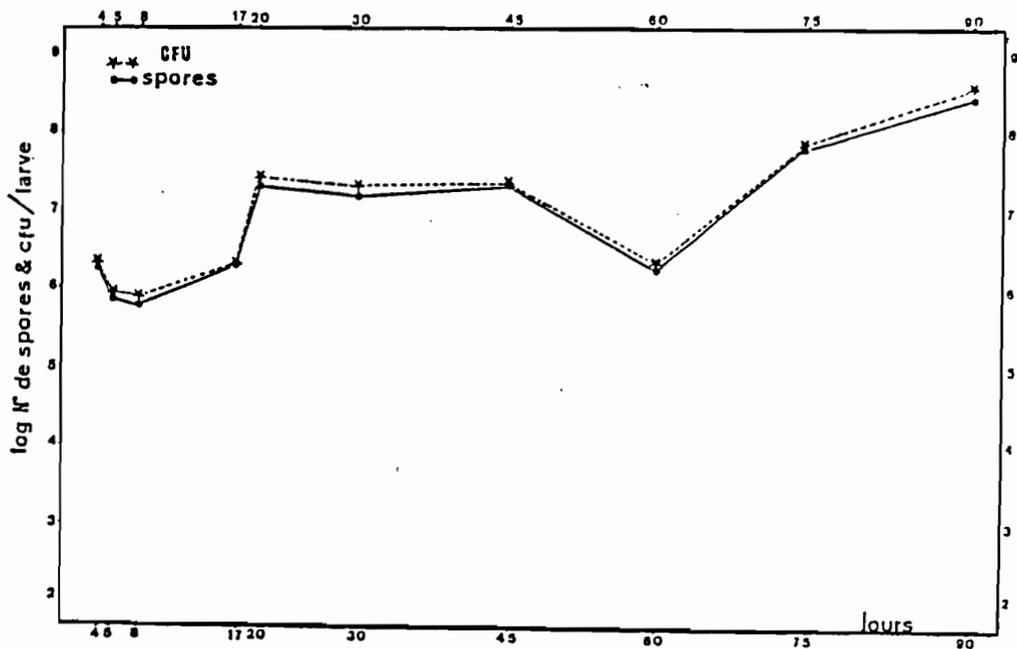


Fig. 31 : Spores et CFU de la souche 1593-4 de *Bacillus sphaericus* présentes dans les cadavres durant 90 jours.



Tab. 48 : Numération des CFU (cellules végétatives et spores) et des spores résistantes à la chaleur, présentes dans les larves de stades 3 et 4 de *Culex pipiens*, traitées au départ à 0,02 mg/l.

"N°" "t"	CFU/larve				spores/larve			
	1er essai	2ème essai	3ème essai	Moyenne	1er essai	2ème essai	3ème essai	Moyenne
1/2 h	$2,6 \times 10^4$	$5,7 \times 10^4$	$3,7 \times 10^3$	$2,9 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$
2 h	$1,2 \times 10^4$	$9,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$	$7,1 \times 10^4$	$8,6 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$	$1,5 \times 10^3$	$5,6 \times 10^4$
4 h	$1,2 \times 10^5$	$9,4 \times 10^4$	$8,2 \times 10^3$	$7,4 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$1,2 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
6 h	$7,3 \times 10^4$	$8,2 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$	$2,2 \times 10^3$	$3,2 \times 10^2$	$1,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$
0 J ⁺	$1,5 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$1,4 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$
1 J	$4,9 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$4,1 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$	$1,7 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$
2 J	$2,5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$8,8 \times 10^5$	$9,2 \times 10^5$	$8,9 \times 10^5$	$9,1 \times 10^5$
3 J	$1,9 \times 10^6$	$2,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$2,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$
4 J	$1,9 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$
5 J	$8,2 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5$	$8,1 \times 10^5$	$7,5 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5$	$8,3 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$
7 J	$4,9 \times 10^5$	$9,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$6,5 \times 10^5$	$9,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$6,7 \times 10^5$	$6,3 \times 10^5$
8 J	$4,8 \times 10^5$	$8,6 \times 10^5$	$7,2 \times 10^5$	$6,8 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$4,5 \times 10^5$
12 J	$2,7 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$2,6 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$
17 J	$9,5 \times 10^6$	$9,7 \times 10^6$	$9,8 \times 10^6$	$9,6 \times 10^6$	$10,3 \times 10^6$	$8,3 \times 10^6$	$9,6 \times 10^6$	$9,4 \times 10^6$
20 J	$2,5 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$
30 J	$2,7 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$2,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$
45 J	$2,0 \times 10^7$	$2,3 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$
60 J	$3,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
75 J	$4,7 \times 10^7$	$7,1 \times 10^7$	$7,4 \times 10^7$	$6,4 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$	$6,3 \times 10^7$
90 J	$3,5 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$	$2,9 \times 10^8$	$2,7 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$

+ : 0J correspond à 24 h après traitement ; c'est à partir de 0J que nous avons conservé les cadavres dans l'eau pour l'analyse bactériologique durant 90 jours.

de la larve morte pendant 90 jours, utilisant cette larve comme un milieu de protection.

Tableau 49 : Toxicité de la culture bactérienne à partir des broyats des cadavres maintenus 48 h et trois mois dans l'eau.

Concentrations	Effectif total des larves utilisées	Mortalité %					
		Culture de bactérie du broyat après 48 h			Culture de bactérie du broyat après 3 mois		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
10^{-4}	100	73,3	100		88,3	99	
10^{-5}	100	13,3	63	83,3	22	52	86,6
10^{-6}	100	0	17	40	4	23,2	30,3
10^{-7}	100	0	7	16,6	1	10,8	13,9
Témoin	100	0	0	0	0	0	0
DL 50			$0,5 \cdot 10^{-5}$			$0,44 \cdot 10^{-5}$	
χ^2			1,24 N.S			23,75 S	
Imprécision de DL 50			6 %			71 %	

4 - DISCUSSION

Les travaux de DAVIDSON (1982), DAVIDSON *et al.* (1984) et DES ROCHERS and GARCIA (1984) ont mentionné la germination et la multiplication de *Bacillus sphaericus* chez les larves, mais ils n'ont pas démontré l'évolution de la multiplication et de la sporulation en fonction du temps et enfin la toxicité larvicide de la nouvelle génération de la bactérie qui s'est multipliée à l'intérieur de l'hôte. Cette nouvelle génération de *Bacillus sphaericus* présente de nouvelles spores viables qui sont très toxiques pour d'autres larves saines de *Culex pipiens*.

Le déroulement du recyclage de *Bacillus sphaericus* souche 1593-4 chez les larves intoxiquées de *Culex pipiens* peut être expliqué suivant différentes étapes. La première étape est celle de la germination qui

commence deux heures après l'ingestion des spores, cette germination est consécutive à l'abaissement du nombre de spores en même temps que l'accumulation des cellules végétatives (Fig. 30). Cette observation va dans le même sens que celle de ALY (1985) qui a démontré la germination de *Bacillus thuringiensis* H-14 dans les tubes digestifs d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes vexans*. La deuxième étape est celle de la sporulation qui commence essentiellement après la mort de la larve (24 heures) ; cette étape continue deux à trois jours pour atteindre pratiquement le même nombre des "CFU" (Fig. 31), ce qui explique l'absence quasi-totale des cellules végétatives qui ont sporulé pendant ce temps.

Enfin, une légère multiplication et une lente sporulation pourraient être la cause de la légère augmentation du nombre des "CFU" et de spores au cours des 90 jours. RAMOSKA and HOPKINS (1981) ont montré que la quantité de *Bacillus sphaericus* souche 1593-4 ingérée par les larves de *Culex quinquefasciatus* (espèce sensible) et d'*Aedes aegypti* (espèce très peu sensible) a été la même malgré la sensibilité différente de ces deux espèces à la bactérie. De leur côté, DAVIDSON *et al.* (1975) ont démontré que la multiplication de *Bacillus sphaericus* souche SS II.1 dans le tube digestif d'une larve de *Culex quinquefasciatus* n'est pas nécessaire pour provoquer l'intoxication.

Par ailleurs, la toxicité de *Bacillus sphaericus* pourrait être occasionnée par une libération de toxine associée à une seconde génération dans les cadavres (MYERS *et al.*, 1979 ; DAVIDSON, 1981 b).

Notre protocole expérimental (20 cadavres broyés + 20 larves saines dans 150 ml d'eau distillée) a permis d'évaluer la toxicité qui serait due essentiellement aux spores de la nouvelle génération de *Bacillus sphaericus* dans les cadavres. En effet, l'accélération du pouvoir larvicide à partir de larves mortes intoxiquées, a été démontrée par KARCH et COZ (1984) ; cette accélération peut être expliquée par l'augmentation du nombre de spores viables au cours des deux à trois premiers jours. Pendant ce temps les cadavres sont dans l'eau. Les spores seront maintenues viables dans les cadavres et demeurent très toxiques au cours des 90 jours qui suivent durant lesquels l'activité larvicide de ces spores est de l'ordre de 80 à 99,4 %.

5 - CONCLUSION

Le recyclage de *Bacillus sphaericus* souche 1593-4 peut se produire dans les larves de *Culex pipiens* en deux principales étapes :

- étape de la germination : deux heures après l'ingestion, les spores commencent à germer et continuent jusqu'à la mort de la larve (24 h).

- étape de la sporulation : elle commence essentiellement après la mort de la larve, cette étape s'effectue rapidement pendant les deux à trois jours qui suivent la mort de la larve.

La germination et la sporulation se produisent sans doute à un faible niveau au cours des 90 jours suivants, dans les cadavres.

Bacillus sphaericus pourrait donc utiliser les cadavres comme milieu pour son développement et sa croissance.

L'accélération du pouvoir larvicide des spores issues des cadavres serait due à l'accumulation des spores dans ces cadavres au cours du temps.

L'importance de l'étude du recyclage de *Bacillus sphaericus* chez les larves intoxiquées de *Culex pipiens* réside d'une part dans la possibilité de fournir de nouvelles spores dans le milieu traité qui contribuent à réinfecter d'autres larves saines et, d'autre part, à bien comprendre les problèmes de la variation des résultats des bioessais pour définir une standardisation. Les bactéries qui se trouvent dans les larves intoxiquées, sont peut-être à l'origine d'une mortalité supplémentaire parmi les larves saines : celles-ci pouvant se nourrir de celles-là (nécrophagie). Ce phénomène est très fréquent chez *Anopheles stephensi* et un peu moins chez *Culex pipiens*.

Dans la nature, les cadavres de larves intoxiquées par *Bacillus sphaericus* sont vraisemblablement progressivement décomposés, libérant une ou plusieurs nouvelles générations de bactéries.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

De cette étude, nous pouvons dégager les points suivants :

1 - TOXICITÉ DIFFÉRENTE LIÉE AUX CONDITIONS DE PRÉPARATION

La toxicité des poudres d'une même souche de *Bacillus sphaericus* diffère selon leur provenance. Cette différence serait due sans doute à la manière selon laquelle la poudre est préparée dans les différents laboratoires. En effet, il est possible que la variabilité de toxicité entre des poudres d'une même souche soit due au fait que les poudres sont peu suspensibles et douées de propriété d'auto-agrégation ; ceci confère aux suspensions une certaine hétérogénéité, quelle que soit l'intensité de l'agitation. Citons par exemple la poudre *B.s.* 48 (OMS) de la souche 2362 qui est environ 10 000 fois plus toxique que celle de India (OMS) de la même souche.

2 - STABILITÉ DES POUDRES AUX CONDITIONS DU STOCKAGE

La stabilité des poudres de *Bacillus sphaericus* à la température élevée (+ 50° C) varie d'une souche à une autre. Notons que la poudre de la souche 1593-4 est beaucoup plus stable à la chaleur que celle de la souche 2297. La toxicité et la viabilité des spores de cette dernière diminuent progressivement sous l'action de la chaleur ; par contre, il semble que les deux poudres soient stables à basse température (- 40° C).

Dans l'éventualité d'une utilisation opérationnelle de cette bactérie, le stockage de ces produits devra donc être pris en considération notamment dans les pays tropicaux où la température peut atteindre ou même dépasser dans certains cas le seuil des 50° C. Cependant, il est possible que la variation des résultats du titrage biologique d'un test à l'autre soit due non seulement aux diverses conditions régnant dans le laboratoire lors de la réalisation du test (contamination, température, % humidité relative ...), mais également aux conditions de conservation des produits.

3 - MODE D'ACTION

Le mode d'action exact de *Bacillus sphaericus* n'est pas encore connu. Toutefois, nous savons déjà que le mésentéron est la cible de l'intoxication, notamment l'estomac postérieur, car la réaction des cellules mésentériques varie d'une région à une autre. Les cellules épithéliales d'une espèce sensible, *Culex pipiens*, réagissent par des signes précis : ballonnement, vacuolisation, lyse cellulaire et ensuite éclatement. Par contre, celles des espèces non sensibles comme *Aedes aegypti* et *Aedes caspius*, ne sont pratiquement pas touchées par la toxine.

La pathologie des cellules mésentériques semble liée à la digestion de la bactérie par la larve-hôte et le mécanisme pourrait s'expliquer par la libération d'un produit toxique (DAVIDSON, 1979). En fait, la libération d'un ou de plusieurs éléments toxiques dépendrait non seulement des équipements enzymatiques chez la larve, mais aussi de la physiologie de la larve elle-même, car l'activité enzymatique est différente d'une espèce à l'autre ; chez l'espèce très peu sensible, *Aedes aegypti*, l'activité enzymatique est beaucoup plus forte que chez l'espèce sensible, *Culex quinquefasciatus*, (MIAN and MULLA, 1983a). En outre, le nombre des spores accumulées dans le tube digestif des larves à sensibilité différente, *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles albimanus* et *Aedes aegypti*, est relativement le même après deux heures d'ingestion.

Le mécanisme de la libération de la toxine dépend donc des conditions liées à l'espèce même. D'autre part, il est possible que l'accessibilité de la toxine par la membrane péritrophique soit l'un des éléments clé, car il n'y a pas passage de spores par cette membrane (DAVIDSON, 1982). La membrane péritrophique pourrait donc avoir une perméabilité différente, liée à l'espèce, permettant ou non la pénétration d'un ou des éléments toxiques jusqu'aux cellules de l'épithélium.

4 - EVALUATION SUR LE TERRAIN

La persistance de *Bacillus sphaericus* dans le milieu varie selon la concentration utilisée. Cependant, compte-tenu de la diversité des gîtes larvaires, ainsi que des souches et des formulations de *Bacillus sphaericus*, il est difficile de comparer la persistance sans tenir compte de la nature du gîte et du devenir de la matière active dans le milieu.

Les résultats que nous avons obtenus avec la souche 2362 sembleraient indiquer que dans des gîtes ombragés à profondeur d'eau d'environ 20 cm, la persistance dure plus longtemps que dans ceux à ciel ouvert et à profondeur d'eau de 2 à 3 m. Ces observations pourraient s'expliquer par les résultats obtenus dans les essais complémentaires lors de l'expérimentation sur le terrain :

- Action des rayons solaires : les spores de la souche 2362 perdent rapidement leur viabilité et leur toxicité sous l'action du soleil, particulièrement dans l'eau claire.

- Sédimentation de la matière active : les spores sédimentent rapidement et deviennent homogènes dans le milieu quelques heures après le traitement. Ensuite, les spores sédimentent progressivement au fond et se retrouvent ainsi en dehors de la zone de nutrition des larves.

- Qualités physico-chimiques de l'eau : les analyses physico-chimiques de l'eau des gîtes confirment que la persistance de *Bacillus sphaericus* dure beaucoup plus longtemps dans l'eau polluée que dans l'eau claire. Il est cependant à noter que les spores dans les gîtes à eau polluée pourraient être mieux protégées des rayons solaires que dans ceux à eau claire.

5 - DEVENIR DES SPORES DANS DES GÎTES NATURELS

Après la sédimentation progressive des spores dans les gîtes, le nombre de spores accumulées au fond reste relativement constant, alors que la population larvaire augmente. Il y a donc une corrélation négative entre la sédimentation des spores et l'évolution de la population larvaire, bien que les spores accumulées soient viables tout au long de la durée de l'expérimentation.

Un point important ressort de cette étude : les spores de *Bacillus sphaericus* accumulées au fond des gîtes perdent leur toxicité progressivement, bien qu'elles restent viables tout au long de la durée de l'expérimentation. Cette observation pourrait s'expliquer par la disparition de l'inclusion toxique, constatée au microscope électronique chez les spores de la souche 2362 récupérées à partir d'un gîte 28 jours après traitement.

6 - RECYCLAGE DE *Bacillus sphaericus*

Dans les larves de *Culex pipiens*, le recyclage peut se produire en deux principales étapes :

- la germination ; les spores commencent à germer quelques heures après l'ingestion donnant ainsi des cellules végétatives qui se multiplient.

- la sporulation, étape dans laquelle ces cellules se transforment en spores viables et toxiques.

Dans le milieu, les larves représentent non seulement un milieu de culture favorable à la germination et à la sporulation mais aussi un milieu de protection des spores contre les conditions défavorables citées précédemment. Ces spores seront libérées lors de la désintégration des larves mortes dans le gîte. Toutefois, bien que les spores issues des larves mortes soient toxiques, ce recyclage ne suffit pas à assurer un bon contrôle des moustiques. Cependant, il est probable que les larves mortes sédimentent au fond des gîtes entraînant ainsi les spores recyclées, hors de la zone de nutrition des larves saines vivantes.

Il serait cependant intéressant de savoir si la bactérie pouvait se recycler dans d'autres espèces d'Arthropodes même non sensibles, existant dans le milieu traité.

7 - RECOMMANDATIONS

Compte-tenu des travaux de plusieurs auteurs et de nos résultats concernant la sensibilité différente des moustiques à *Bacillus sphaericus*, à savoir *Culex pipiens*, espèce la plus sensible, *Anopheles stephensi*, à sensibilité moyenne et *Aedes aegypti*, espèce très peu sensible, les souches entomopathogènes de *Bacillus sphaericus* devraient être employées, particulièrement contre *Culex*, et en second lieu contre *Anopheles*.

Dans le cadre de la lutte contre *Culex*, vecteur de nombreuses encéphalites et de la filariose de Bancroft, il est à souligner que cet agent de lutte, *Bacillus sphaericus*, peut être un espoir pour la lutte contre ce moustique, après apparition des phénomènes de résistance aux insecticides chimiques.

Une connaissance suffisante de l'écologie des espèces visées sera indispensable pour l'utilisation de *Bacillus sphaericus* de façon très efficace comme larvicide. Son application en lutte antivectorielle

peut être envisagée d'une part en lutte intégrée avec des imagocides chimiques ou avec des prédateurs et d'autre part en lutte microbiologique remplaçant ainsi les larvicides chimiques.

Une amélioration des formulations peut contribuer à obtenir de meilleurs résultats en résolvant le problème de la sédimentation rapide de cette bactérie.

De nouvelles souches pathogènes plus toxiques et résistantes aux conditions naturelles défavorables pourront également contribuer dans un avenir proche à une grande diminution des populations vectrices de maladies tropicales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALY, C., 1985.

Germination of *Bacillus thuringiensis* H 14 spores in the gut of *Aedes* larvae (Diptera : Culicidae).

J. Inverteb. Pathol. 45, 1-8.

BALARAMAN, K. and HOTI, S.L., 1984.

Impact of storage period and temperature on the larvicidal activity of toxicity to mosquito larvae.

Indian J. Med. Res. 80, 71-73

de BARJAC, H. et CHARLES, J.F., 1983.

Une nouvelle toxine active sur les moustiques, présente dans des inclusions cristallines produites par *Bacillus sphaericus*.

C. R. Acad. Sc. Paris, 296, 3, 905-910.

de BARJAC, H., LARGET-THIERY, I., COSMAO DUMANOIR, V. and RIPOUTEAU, H., 1985.

Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains on the basis of toxicity to mosquito larvae.

Appl. Microbiol. Biotechnol. 21, 85-90.

BITSINDOU, P., 1983.

Impact des traitements insecticides sur la transmission du paludisme et sa morbidité dans un village des environs de Brazzaville.

Mém. Thèse de 3ème cycle. Univers. Paris-Sud Orsay.

de BOISSEZON, P., 1930.

Contribution à l'étude de la biologie et l'histophysiologie de *Culex pipiens*.

L. Arch. Zool. Expériment. Gén. 70, 281-431.

BOURGOUIN, C., 1981.

Bacillus sphaericus : Etude de l'activité larvicide vis-à-vis d'*Anopheles stephensi*. Essai d'isolement et de caractérisation d'un facteur toxique.

Mém. Thèse de 3ème cycle. Univers. Paris-Sud Orsay.

- BOURGOUIN, C. et de BARJAC, H., 1980.
Evaluation du potentiel de *Bacillus sphaericus* comme larvicide anti-moustiques.
WHO/VBC/80.,792.
- BOURGOUIN, C., LARGET-THIERY, I. and de BARJAC, H., 1984.
Efficacy of dry powders from *Bacillus sphaericus* : RB 80, a potent reference preparation for biological titration.
J. Inverteb. Pathol. 44, 146-150.
- BROWN, A.W.A., HAWORTH, J. and ZAHAR, A.R., 1976.
Malaria eradication and control from a global stand point.
J. Med. Ent. 13, 1-25.
- BURKE, W.E., Mc DONALD, K.O. and DAVIDSON, E.W., 1983.
Effect of UV light on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593.
Appl. Environ. Microbiol. 46, 954-956.
- CHARLES, J.F. et de BARJAC, H., 1982.
Sporeulation et cristallogenèse de *Bacillus thuringiensis* H-14 en microscopie électronique.
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur). 133 A, 425-442.
- CHARLES, J.F., BOURGOUIN, C., LARGET-THIERY, I. and de BARJAC, H., 1984.
Cytopathological events in mosquito larvae fed with *Bacillus sphaericus* 2297.
In : Abstract SIP XVII Annual meeting Davis. 1984. 22-23.
- CHAUVET, G., 1978.
Lutte biologique contre les vecteurs d'affections humaines et tropicale. Moyens actuels et perspectives.
Méd. Trop. 38, 6, 651-657.
- CHRISTOPHER, S.R., 1960.
Aedes aegypti, the yellow fever mosquito : its life history, bionomics and structure.
Cambridge University Press. 739 pp.

CLEMENTS, A.N., 1963.

The physiology of mosquitoes.
Pergamon press, N.Y., 393 pp.

COZ, J., 1978.

Utilisation de la génétique dans le contrôle des espèces
d'insectes vecteurs de maladies humaines.
Méd. Trop. 38, 6, 659-665.

DADD, R.H., 1975.

Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alka-
line-active digestive enzymes.
J. Insect. Physiol. 21, 1847-1853.

DAGNOGO, M. et COZ, J., 1982 (a).

Un insecticide biologique : *Bacillus sphaericus*.
1 - Activité larvicide de *Bacillus sphaericus* sur quelques
espèces et souches de moustiques.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. 20, 2, 133-138.

DAGNOGO, M. et COZ, J., 1982 (b).

Un insecticide biologique : *Bacillus sphaericus*.
2 - Influence de la température et du temps de contact sur
l'activité de *B. sphaericus*.
Cah. ORSTOM. sér. Ent. méd. et Parasitol. 20, 2, 139-144.

DAVIDSON, E.W., 1979.

Ultrastructure of midgut events in the pathogenesis of *B.*
sphaericus strain SS II-1 infections of *Culex pipiens quin-*
quefasciatus larvae.
Can. J. Microbiol. 25, 178-184.

DAVIDSON, E.W., 1981 (a).

Site, production and chemistry of the *Bacillus sphaericus*
toxin.
TDR/BVC/SWG. 81/WP.22.

DAVIDSON, E.W., 1981 (b).

A review of pathology of bacilli infecting mosquitoes, including an ultrastructural study of larvae fed *Bacillus sphaericus* 1593 spores.

Devel. Industr. Microbiol. 22, 69-81.

DAVIDSON, E.W., 1982.

Insecticidal factors from *Bacillus sphaericus* and production of biocides from this organism.

Working paper. WHO, Geneva, April 1982, 11 pp.

DAVIDSON, E.W., 1984.

Microbiology, pathology and genetics of *Bacillus sphaericus* : biological aspects which are important to field use. Mosq. News. 44, 2, 147-152.

DAVIDSON, E.W., 1986.

Effects of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spore/crystal toxin on cultured mosquito cells.

J. Inverteb. Pathol. 47, 21-31.

DAVIDSON, E.W. and MYERS, P., 1981.

Parasporal inclusions in *Bacillus sphaericus*.

F.E.M.S. Microbiol. Lett. 10, 261-265.

DAVIDSON, E.W., SINGER, S. and BRIGGS, J.D., 1975.

Pathogenesis of *Bacillus sphaericus* strain SS II-1 infections in *Culex pipiens quinquefasciatus* (= *C. pipiens fatigans*) larvae.

J. Inverteb. Pathol. 25, 179-184.

DAVIDSON, E.W., and SWEENEY, A.W., 1983.

Microbial control of vectors : A decade of progress.

J. Med. Entomol. 20, 3, 235-247.

- DAVIDSON, E.W., URBINA, M., PAYNE, J., MULLA, M.S., BARWASZEH, H., DULMAGE, H. and CORREA, J.A., 1984.
Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment.
Appl. Environ. Micro. 47, 125-129.
- DES ROCHERS, B. and GARCIA, R., 1984.
Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*.
Mosq. News. 44, 2, 160-165.
- ELISSA, N., SANNIER, Ch. et RICHARD, A., 1986.
La réceptivité à *Plasmodium yoelii yoelii* d'*Anopheles* soumis à des doses sublétales de deltaméthrine.
IVE Congrès sur la protection de la santé humaine et des cultures en Milieu tropical. Marseille 2-3-4 Juillet 1986.
- EMBERGER, L., 1942.
Un projet de classification des climats du point de vue phytogéographique.
Extr. Bull. Soc. Hist. nat. 77, 97-124.
- FAST, P.G., 1982.
Chemistry and biochemistry of biocides. In Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases.
Doc. Mimeo. OMS, UNDP/WB/WHO. Genève, 3, 21-27.
- GABINAUD, A., VIGO, G., COUSSERANS, J., ROUX, M., PASTEUR, N. et CROSET H., 1985.
La mammophilie des populations de *Culex pipiens* L., 1758 dans le Sud de la France ; variation de ce caractère en fonction de la nature des biotopes de développement larvaire, des caractéristiques physico-chimiques de leurs eaux et des saisons. Conséquences pratiques et théoriques.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol. 23, 2, 123-132.

GUILLET, P., DEMPAN, J. et COZ, J., 1980.

Evaluation de *Bacillus thuringiensis* sérotype H-14 de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* S.L.

III. Données préliminaires sur la sédimentation de l'endotoxine dans l'eau et sur sa stabilité en zone tropicale. WHO/VBC/80.756.

HAMON, J., 1981.

Science and appropriate technology for vector control. P.O.S.T. (Kenya). 6, 1, 24-32.

HAMON, J., GRJEBINE, A., COZ, J., KLEIN, J.M. et MICHEL, R., 1959.

Observations sur le niveau de sensibilité aux insecticides de quelques moustiques du littoral méditerranéen. Présence d'une souche de *Culex pipiens* L. résistante à la dieldrine. Bull. Soc. Path. exot. 52, 2, 199-208.

HAMON, J., MOUCHET, J., COZ, J., CHALLIER, A., SUBRA, R. et ADAM, J.P., 1972.

Résistance aux insecticides et contrôle des vecteurs de maladies en Afrique occidentale et centrale. Doc. Tech. OCCGE. 5, 517.

HECKER, H., 1977.

Structure and function of midgut epithelial cells in Culicidae mosquitoes (Insecta, Diptera). Cell Tiss. Res. 184, 321-341.

HERTLEIN, B.C., LEVY, R. and MILLER, T.W.Jr., 1979.

Recycling potential and selective retrieval of *B. sphaericus* from soil in a mosquito habitat. J. Inverteb. Pathol. 33, 217-221.

HORNBY, J.A., HERTLEIN, B.C., LEVY, R. and MILLER, T.W.Jr., 1981.

Persistent activity of mosquito larvicidal *Bacillus sphaericus* 1593 in fresh water and sewage. WHO. Mimeo. Doc. WHO/VBC/81,830.

HORNBY, J.A., HERTLEIN, B.C. and MILLER, T.W.Jr., 1984.

Persistent spores and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593 in well water and sewage.
J. Georgia Ent. Soc. 19, 2, 165-167.

HOTI, S.L. and BALARAMAN, K., 1984.

Recycling potential of *Bacillus sphaericus* in natural mosquito breeding habitats.
Indian J. Med. Res., 80, 90-94.

HOUGARD, J.M. et NICOLAS, L., 1986.

Evaluation de *Bacillus sphaericus* dans les gîtes larvaires à *Culex quinquefasciatus* en Afrique tropicale.
Ive Congrès sur la protection de la santé humaine et des cultures. 2-4 Juillet 1986. Marseille. 6pp.

HOUGARD, J.M., DARRIET, F. et BAKAYOKO, S., 1983.

Evaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de *Bacillus thuringiensis* sérotype H-14 sur *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 et *Anopheles gambiae* GILES, 1902 S.L. (Diptera : Culucidae) en Afrique de l'Ouest.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. 21, 2, 111-117.

HOUGARD, J.M., DUVAL, J. et ESCAFFRE, H., 1985 (a).

Evaluation en milieu naturel de l'activité larvicide d'une formulation de *Bacillus thuringiensis* H-14 sur *Aedes aegypti* (Linné) dans un foyer épidémique de fièvre jaune en Côte d'Ivoire.
Cah. ORSTOM. sér. Ent. méd. et Parasitol. 23, 4, 235-240.

HOUGARD, J.M., KOHOUN, G., GUILLET, P., DOANNIO, J., DUVAL, J. et ESCAFFRE, H., 1985 (b).

Evaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 souche 1593-4 dans des gîtes larvaires à *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 en Afrique de l'Ouest.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. 23, 1, 35-44.

JADIN, J., 1967.

Du rôle des bactéries dans le tube digestif des insectes vecteurs des plasmodidae et des trypanosomidae.
Ann. Sc. Belge Med. Trop. 47, 4, 331-242.

JENKINS, D.W., 1964.

Pathogens, Parasites and predators of medically important Arthropods.
Bull. WHO. Suppl. to vol 30.

JONES, J., 1960.

The anatomy and rhythmical activities of the alimentary canal of anopheles larvae.
Ann. Ent. Soc. Am. 53, 459-474.

JULIAN, ST. G., BULLA, L.A.Jr., SHARP, E.S. and ADAMS, G.L., 1973.

Bacteria, spirochets and rickettsia as insecticides.
Annals of the New York Academy of Sciences. 217, 65-75.

KALFON, A., CHARLES, J.F., BOURGOUIN, C. and de BARJAC, H., 1984.

Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297 : an electron microscope study of crystal-like inclusion biogenesis and toxicity to mosquito larvae.
J. Gen. Microbiol. 130, 893-900.

KALFON, A., LARGET-THIERY, I., CHARLES, J.F. and de BARJAC, H., 1983.

Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*.
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 18, 168-173.

KARCH, S., 1984.

Bacillus sphaericus agent de lutte biologique contre *Culex pipiens* Linné, 1758 (Culicidae-Diptera) et contre d'autres moustiques.
Mém. Thèse Doc. Ing. Univers. Paris-Sud-Orsay.

KARCH, S. et COZ, J., 1983.

Histopathologie de *Culex pipiens* Linné (Diptera, Culicidae) soumis à l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* 1593-4. Cah. ORSTOM. sér. Ent. méd. et Parasitol. 21, 4, 225-230.

KARCH, S. et COZ, J., 1984.

Accélération de l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* sur *Culex pipiens* par l'ingestion de cadavres de larves de moustiques intoxiqués par ce bacille.

Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. 22, 3, 175-177.

KARCH, S. and COZ, J., 1986.

Recycling of *Bacillus sphaericus* in dead larvae of *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae).

Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. 24, 1, 41-43.

KARCH, S., COZ, J., JULLIEN, J.L., VIGO, G. et SINEGRE, G., 1986.

Viabilité et persistance des spores de *Bacillus sphaericus* dans divers milieux aquatiques.

IVe Congrès sur la protection de la Santé humaine et des cultures en milieu tropical. Marseille. 2-4 Juillet 1986.

KARCH, S. et HOUGARD, J.M., 1986.

Etude comparative au laboratoire du devenir de la matière active et des spores de *Bacillus sphaericus* 2362 et de *Bacillus thuringiensis* H-14 en milieu aqueux.

Cah. ORSTOM. sér. Ent. méd. et Parasitol. sous presse.

KELLEN, W.R., CLARCK, T.B., LINDEGREN, J.E., HO, C.B., ROGOFF, M.H. and SINGER, S., 1965.

Bacillus sphaericus Neide as a pathogen of mosquitoes.

J. Inverteb. Pathol. 7, 4, 442-448.

KIRSCHBAUM, J.B., 1985.

Potential implication of genetic engineering and other biotechnologies to insect control.

Ann. Rev. Entomol. 30, 51-70.

LACEY, L.A., 1982.

The efficacy, Persistence and cycling potential of *Bacillus sphaericus*.

Proc. 3rd. Int. Coll. Invert. Pathol. Univ. Sussex. Brighton. UK. 490-493.

LACEY, L.A. and UNDEEN, A.H., 1986.

Microbial Control of black flies and mosquitoes.

Ann. Rev. Entomol. 31, 265-296.

LACEY, L.A., URBINA, M.J. and HERITZMAN, C.M., 1984.

Sustained release formulations of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14 for control of container-breeding *Culex quinquefasciatus*.

Mosq. News. 44, 1, 26-32.

LEONARD, J., GOLDBERG, I., FORD, A.M., TANABE and WATKINS, H.M.S., 1977.

Effectiveness of *Bacillus sphaericus* var. *fusiformis* (SS II-1) as a potential mosquito larval control agent : the role of variations in natural microbial flora in the larval environment.

Mosq. News, 37, 3, 465-470.

MAGNI, S., 1985.

Bacillus thuringiensis sérotype H-14, larvicide biologique contre les moustiques : *Aedes aegypti*, *Culex pipiens* et *Anopheles stephensi*.

Mém. Thèse de 3ème Cycle. Univers. Paris VI.

MARTOJA, R. et MARTOJA, M., 1967.

Initiation aux techniques de l'histologie animale.

Masson et Cie, éd. Paris, 345 pp.

MENON, K.K.R., RAO, A.S. et AMONKAR, S.V., 1982.

Toxic activity and histopathological effects of *Bacillus sphaericus* (ISPC-5) on mosquito larvae.

Indian J. Experiment. Biol. 20, 768-772.

MIAN, L.S. and MULLA, M.S., 1983 (a).

Effect of proteolytic enzymes on the activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera : Culicidae).

Bull. Soc. Vector Ecol. 8, 2, 122-127.

MIAN, L.S. and MULLA, M.S., 1983 (b).

Factors influencing activity of the microbial agent *Bacillus sphaericus* against mosquito larvae.

Bull. Soc. Vector Ecol. 8, 2, 128-134.

MILLER, L.K., LINGG, A.J. and BULLA, L.A.Jr., 1983.

Bacterial, Viral and Fungal insecticides.

Science. 219, 715-721.

MOTABAR, M., 1974.

Malaria and the nomadic tribes of Southern Iran.

Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. 12, 3, 175-178.

MOUCHET, J., 1971.

La stérilisation par les moyens physiques et chimiques et son utilisation dans la lutte contre les insectes vecteurs.

Ann. Parasitol. Hum. Comp. 46, 67-83.

MOUCHET, J., COZ, J., RAGEAU, J., RICKENBACH, A. et TAUFFLIEB, R., 1978.

Insectes et arachnides en santé publique.

Encycl. Méd. Chir. (Paris), Maladies Infectieuses, Fasc.

8120 A 10. pp 14.

MULLA, M.S., DRAWAZEH, H.A., DAVIDSON, E.W. and DULMAGE, H.T., 1984.

Efficacy and persistence of the microbial agent *Bacillus sphaericus* against mosquito larvae in organically enriched habitats.

Mosq. News. 44, 2, 166-173.

MULLIGAN, F.S., III, SCHAEFER, C.H. and WILDER, W.H., 1980.

Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* H-14 against mosquitoes under laboratory and field conditions.

J. Eco. Entomol. 73, 684-688.

MYERS, P. and YOUSTEN, A.A., 1978.

Toxic activity of *Bacillus sphaericus*, SS II-1 for mosquito larvae.

Infect. Immun. 19, 3, 1047-1053.

MYERS, P. and YOUSTEN, A.A., 1980.

Localization of mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus* 1593.

Appl. Environ. Microbiol. 39, 6, 1205-1211.

MYERS, P., YOUSTEN, A.A. and DAVIDSON, E.W., 1979.

Comparative studies of mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus* SS II-1 and 1593.

Can. J. Microbiol. 25, 11, 1227-1231.

NICOLAS, L., DOSSOU-YOVO, J. and HOUGARD, J.M., 1986.

Persistence and recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 spores in *Culex quinquefasciatus* breeding sites in West Africa.

Appl. Microbiol. Biotechnol. A parasite.

NOIREAU, F. et KARCH, S., 1983.

Réceptivité à *Plasmodium yoelii yoelii* d'anophèles soumis à *Bacillus thuringiensis* sérotype H-14 et *Bacillus sphaericus*.

Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. 21, 4, 221-224.

O.M.S., 1963.

Insecticide resistance and vector control. Thirteenth report of the WHO expert committee on insecticides.

Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn. 265, 51-61.

O.M.S., 1979.

Biological control agent data sheet, *Bacillus sphaericus*, strain 1593-4.

WHO/VBC/BC DS/79.09, DRAFT.

O.M.S., 1980.

Fourth meeting of the scientific working groups on biological control of insect vectors of disease.

TDR/BCV-SWG. 4/80,3.

O.M.S., 1982.

Sécurité pour les mammifères des agents microbiens utilisés dans la lutte antivectorielle.

Mémo, OMS. Bull. 60, 1, 61-68.

O.M.S., 1985.

Informed consultation on development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva, 7-11 october, 1985.

PAYNE, J.M. and DAVIDSON, E.W., 1984.

Insecticidal activity of the crystalline parasporal inclusions and other components of the *Bacillus sphaericus* 1593 spore complex.

J. Inverteb. Pathol. 43, 383-388.

PETERS, W., 1976.

The investigation on the peritrophic membranes of Diptera
In : the insect intergutment.

Ed. by H.R. HEPBURN, (Elsevier scientific publishing Company). 515-543.

PILLAI, J.S., 1981.

Range of hosts against which *Bacillus thuringiensis* H-14 *Bacillus sphaericus* 1593 should be tested.

Rapp. TDR/BCV/SWG. 81/W.P. 18.

- PRASAD, S.S.S. and SHETHNA, Y.I., 1976.
Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*.
J. Scient. Ind. Res. 35, 626-632.
- PRASITTISUK, C. and CURTIS, C.F., 1982.
Absence of effects of insecticides on susceptibility of anophelines to *Plasmodium yoelii*.
S. East As. J. Trop. Med. Pub. Hlth. 13, 1, 127-132.
- RAGEAU, J., MOUCHET, J. et ABONNENC, E., 1970.
Répartition géographique des moustiques (Diptera : Culicidae) en France.
Cah. ORSTOM. sér. Ent. méd. et Parasitol. 8, 3, 289-318.
- RAMAKRISHNAN, S.P., SATYA PRAKASH, K.A.K. and MOHAN, B.N., 1953.
Studies of *Plasmodium berghei* Vincke et Lips, 1948. A critical analyses of experimental mosquito transmission.
Ind. J. Malariol. 7, 57-81.
- RAMOSKA, W.A., and HOPKINS, T.L., 1981.
Effects of mosquito larval feeding behavior on *Bacillus sphaericus* efficacy.
J. Inverteb. Pathol. 37, 269-272.
- RICHINS, C.A., 1945.
The development of the midgut in the larvae of *Aedes dorsalis* Meigen.
Ann. Ent. Soc. Amer. 38, 314-320.
- RIOUX, J.A., 1958.
Les culicides du "Midi" méditerranéen. Etude systématique et écologie.
Lechevalier. Paris. 304 pp.
- SCANLON, J.E., REID, J.A. and CHEONY, W.H., 1968.
Ecology of anophelines vectors of malaria in the oriental region.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. 6, 3/4, 237-246.

SILAPANANTAKUL, S., PANTUWATANA, S., BHUMIRATANA, A. and CHAROENSIRI, K., 1983.

The comparative persistence of toxicity of *Bacillus sphaericus* strain 1593 and *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae in different kinds of environments. J. Invert. Pathol. 42, 387-392.

SINEGRE, G., 1967.

Toxicité comparée de quatre insecticides organophosphorés sur quelques espèces de culicidés et sur la faune des gîtes larvaires. Document E.I.D. n° 8.

SINEGRE, G., 1984.

La résistance des Diptères Culicides en France. In Colloque sur la réduction d'efficacité des traitements insecticides et acaricides et problèmes de résistance. Paris, 20 mars. 47-57.

SINEGRE, G., COUSSERANS, J., MESTRES, R. et CHEVALLIER, C., 1980 (a).

Traitements larvicides par "goutte à goutte" contre les moustiques colonisant les drains d'eau polluée, les bassins de lagunage et les rizières. In Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical, Marseille, Chambre de Commerce et d'Industrie. 1257-1266.

SINEGRE, G., GAVEN, B. et JULLIEN, J.L., 1977.

Activité comparée de 31 insecticides sur des larves de *Culex pipiens* (L.) sensibles et résistantes au Chlorpyrifos dans le Midi de la France. Parasitologia. 19, 1-2, 63-72.

SINEGRE, G., GAVEN, B. et JULLIEN, J.L., 1981.

Contribution à la normalisation des épreuves de laboratoire concernant des formulations expérimentales et commerciales du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*, III-Influence séparée ou conjointe de la densité larvaire, du volume ou profondeur de l'eau et de la présence de terre sur l'efficacité et l'action larvicide résiduelle d'une poudre primaire.

Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. 19, 3, 157-163.

SINEGRE, G., GAVEN, B., JULLIEN, J.L., VIGO, G. et KARCH, S., 1986.

Activité initiale et résiduelle de *Bacillus sphaericus* dans les gîtes larvaires à *Culex pipiens* du Sud de la France. IV Congrès sur la protection de la santé humaine et des cultures en milieu tropical. Marseille, 2-4 Juillet 1986.

SINEGRE, G., GAVEN, B. et VIGO, G., 1980 (b).

Evaluation préliminaire de l'activité larvicide de la souche 1593 de *Bacillus sphaericus* vis-à-vis de quatre espèces de moustiques du littoral méditerranéen français. WHO/VBC/80. 762.

SINEGRE, G., JULLIEN, J.L. et CRESPO, O., 1976.

Résistance de certaines populations de *Culex pipiens* (L.) au chlorpyrifos (Durban^R) en Languedoc-Roussillon (France).

Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. 14, 1, 49-59.

SINEGRE, G., VIGO, G., GAVEN, B. et JULLIEN, J.L., 1980 (c).

Activité larvicide immédiate et action rémamente de l'endotoxine du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis* dans deux biotopes à moustiques du littoral méditerranéen français.

Parasitologia, 22, 1-2, 213-221.

SINGER, S., 1973.

Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae.

Nature (London). 244, 110-111.

SINGER, S., 1974.

Entomogenous bacilli against mosquito larvae.

Devel. Ind. Microbiol. 15, 187-194.

SINGER, S., 1980.

Bacillus sphaericus for the control mosquitoes.
Biotechnol. and Bioengineer, 22, 1335-1355.

VINCKE, I.H. et LIPS, M., 1948.

Un nouveau plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo : *Plasmodium berghei*.
Ann. Soc. belge. Méd. trop. 28-97.

WATANABE, T., TSUTSU, R., TWAHANA, H. and ABE, K., 1967.

Chemistry of the toxic crystals produced by *Bacillus thuringiensis*.
Proceed Joint.
USA-Japan Semin. Microbial. Control of Insect Pests. April
21-23, 71-78.

WIGGLESWORTH, V.B., 1942.

The storage of protein, fat, glycogen and uric acid in the
fat body and other tissues of mosquito larvae.
Brit. J. Exp. Biol. 19, 56-77.

YOELI, M. and WALL, W., 1951.

Complete sporogonic development of *Plasmodium berghei* in
experimental by infected anopheles.
Nature. 168.

YOUSTEN, A.A., de BARJAC, H., HEDRICK, J., COSMAO, D.V. and MYERS, P.,
1980.

Comparison between bacteriophage typing and serotyping for
the differentiation of *Bacillus sphaericus* strains.
Ann. Microbiol. (Inst. Past.). 131 B, 297-308.

YOUSTEN, A.A., and DAVIDSON, E.W., 1982.

Ultrastructural analysis of spores and parasporal crystals
formed by *Bacillus sphaericus* 2297.
Appl. Environ. Microbiol. 44, 6, 1449-1455.

YOUSTEN, A., JONES, M.E. and BENOIT, R.E., 1982.

Development of selective differential bacteriological media for the enumeration of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 and *Bacillus sphaericus*.

WHO/VBC/82. 844.

RESUME

Cette étude a pour thème général la lutte contre les moustiques par l'agent entomopathogène *Bacillus sphaericus*. L'objectif est de contribuer à une meilleure connaissance des problèmes rencontrés au laboratoire et sur le terrain pour l'utilisation de cet agent, particulièrement contre *Culex pipiens*. L'essentiel des recherches a porté sur les points suivants : la sensibilité des moustiques aux différentes souches, la stabilité de la bactérie aux conditions de stockage, le mode d'action, la persistance dans le milieu, la sédimentation, l'évaluation de la bactérie dans des gîtes naturels et le recyclage.

La sensibilité des moustiques à *Bacillus sphaericus* est différente d'une espèce à une autre ; *Culex pipiens* est l'espèce la plus sensible, *Anopheles stephensi*, une espèce moyennement sensible, *Aedes aegypti* est très peu sensible et *Aedes caspius* est non sensible.

Bien que l'activité larvicide d'une même souche soit différente d'une formulation à une autre, l'étude du pouvoir pathogène des différentes souches que nous avons testées met en évidence une nette supériorité des souches 2362, 1593-3 et 2297.

Une perte de viabilité des spores et de toxicité de la poudre à base de la souche 2297 est observée après un stockage à une température élevée (50° C) ; par contre, la poudre de la souche 1593-4 reste relativement stable dans les mêmes conditions de stockage. En revanche, les poudres des souches 2297 et 1593-4, stockées à basse température (- 40° C), conservent leur efficacité et les spores gardent leur viabilité.

En ce qui concerne le mode d'action, les cellules du mésentéron chez les espèces de moustiques sensibles, notamment celles de l'estomac postérieur, semblent être les cibles de *Bacillus sphaericus*. Les cellules atteintes réagissent par un ballonnement, une vacuolisation, une lyse cellulaire et ensuite un éclatement. Par contre, chez les espèces non sensibles, aucune altération cytologique du mésentéron n'a été observée ; les cellules épithéliales ne semblent pas être atteintes par l'action de cette bactérie.

Dans des gîtes naturels, la persistance de *Bacillus sphaericus* semble dépendre non seulement de la concentration appliquée mais aussi

de plusieurs facteurs ayant une influence défavorable sur la viabilité et la toxicité des spores. La qualité de l'eau et l'effet des rayons solaires sur les spores sont deux facteurs importants pour les raisons suivantes :

- les spores perdent leur viabilité et leur toxicité sous l'action des rayons solaires. Ces spores seraient donc mieux protégées dans les gîtes ombragés que dans ceux à ciel ouvert,

- la persistance dure beaucoup plus longtemps dans des gîtes à eau polluée que dans ceux à eau claire.

La sédimentation de la bactérie est telle que quelques heures après application, la répartition des spores est homogène dans le milieu quelle que soit la qualité de l'eau. Au cours des 28 jours d'expérimentation, le nombre de spores accumulées au fond des gîtes est resté relativement constant dans l'eau polluée aussi bien sur le terrain qu'en laboratoire.

Une diminution importante de la toxicité des spores des souches 2362 et 2297 accumulées au fond des gîtes naturels est observée après deux semaines d'application. Après 28 jours, les spores perdent la quasi-totalité de leur toxicité larvicide, bien que leur viabilité soit toujours maintenue tout au long de la durée de notre étude.

Suite à nos observations au microscope électronique, la perte de toxicité des spores serait due à la disparition de l'inclusion toxique qui se trouve dans l'exosporium.

Le recyclage de *Bacillus sphaericus* peut se produire chez les larves en deux étapes :

- la première est la phase de la germination : les spores de la souche 1593-4 commencent à germer dans le tube digestif des larves de *Culex pipiens* deux heures après l'ingestion.

- la seconde phase est la sporulation qui commence 24 heures après l'ingestion.

Les spores recyclées peuvent demeurer dans la larve morte durant plus de trois mois. Ces spores sont viables et toxiques pour d'autres larves saines de *Culex pipiens*.

SUMMARY

The general theme of this study is the control of mosquitoes through the *Bacillus sphaericus* entomopathogenic agent. It aims at reaching a better knowledge of the problems raised in the laboratory and in the field by the use of this agent, particularly against *Culex pipiens*. Most of the researches were conducted on the following points : the mosquito sensitivity to the different strains, the stability of the bacterium to the storing conditions, the mode of action, the persistence in the environment, sedimentation, the evaluation of the bacterium in the breeding sites and recycling.

The mosquito sensitivity to *Bacillus sphaericus* is different from one species to the other ; *Culex pipiens* is the most sensitive species, *Anopheles stephensi* is moderately sensitive, *Aedes aegypti* is not very sensitive and *Aedes caspius* is not sensitive.

Although the larvicidal activity of the same strain is different from one formulation to the other, the study of the pathogenicity of the different strains tested shows that the strains 2362, 1593-4 and 2297 are highly superior.

A loss of viability in the spores and of toxicity in the powder made from the strain 2297 is observed after having been stored at a high temperature (+ 50° C) ; on the contrary, the powder of the strain 1593-4 remains stable under the same storing conditions. The powders of the strains 2297 and 1593-4 stored at a low temperature (- 40° C) remain effective and the spores retain their viability.

As far as the mode of action is concerned, the cells of the mesenteron in the species of sensitive mosquitoes, mainly those of the posterior stomach seem to be affected by *Bacillus sphaericus*. The affected cells swell, vacuolate, lyse and split. On the contrary, in the non sensitive species, no cytological alteration of the mesenteron has been observed ; the epithelial cells do not seem to be affected by this bacterium.

In the breeding sites, the persistence of *Bacillus sphaericus* seems to depend not only on the concentration used but also on several factors which have an unfavourable influence on the viability and toxi-

city of the spores. The water quality and the effect of the solar rays on the spores are two significant factors for the following reasons :

- The spores lose their viability and toxicity under the influence of the solar rays. These spores would therefore be better protected in the shaded breeding sites than in those situated in the open air.

- The persistence lasts over a longer period of time in the breeding sites with polluted water than in those with limpid water.

The sedimentation of the bacterium is such that a few hours after having been applied, the distribution of the spores is homogeneous in the environment whatever the water quality may be. During the 28 days experiment, the number of spores deposited in the bottom of the breeding sites remained rather constant in the polluted water in the field as well as in the laboratory.

A considerable decrease in the toxicity of the spores in the strains 2362 and 2297 deposited in the bottom of the breeding sites is observed after a two weeks treatment. 28 days later, the spores lose almost all their larvicidal toxicity, although their viability is always preserved throughout our study.

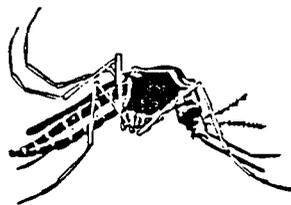
The observations made through the electron microscope showed that the loss of toxicity of the spores would be due to the disappearance of the toxic embedding which is observed in the exosporium.

The recycling of *Bacillus sphaericus* can be observed in the larvae and is divided into two phases :

- first, germination : the spores of the strain 1593-4 begin to germinate in the digestive tract of the *Culex pipiens* larvae two hours after ingestion.

- secondly, sporulation begins 24 hours after ingestion.

The recycled spores can remain in the dead larva during more than three months. These spores are viable and toxic for other *Culex pipiens* healthy larvae.



RÉSUMÉ:

La sensibilité des moustiques à *Bacillus sphaericus* est différente d'une espèce à une autre, bien que l'activité larvicide d'une souche soit différente selon la formulation.

Une perte de viabilité des spores et de toxicité de la poudre à base de la souche 2297 est observée après un stockage à une température élevée (50°C); par contre, la poudre 1593-4 reste relativement stable dans les mêmes conditions.

Chez les espèces sensibles, les cellules du mésentéron semblent être les cibles de l'action de *Bacillus sphaericus*, notamment celles de l'estomac postérieur. Par contre, aucune altération cytologique du mésentéron n'a été observée chez les espèces de moustiques non sensibles.

Le recyclage de *Bacillus sphaericus* peut se produire chez les larves de *Culex pipiens* en deux étapes: la première est la phase de la germination qui commence deux heures après l'ingestion et la seconde est la phase de la sporulation qui commence 24 heures après l'ingestion. Les spores recyclées sont viables et toxiques pour d'autres larves saines.

Dans les gîtes naturels, la persistance de *Bacillus sphaericus* semble dépendre non seulement de la concentration appliquée mais aussi de plusieurs facteurs ayant une influence défavorable notamment la qualité d'eau et le rayonnement solaire. La persistance est beaucoup plus longue dans des gîtes ombragés à eau polluée que dans ceux à eau claire.

La sédimentation de la bactérie est telle que quelques heures après application, la répartition des spores est homogène dans le milieu. Au cours des 28 jours, le nombre de spores accumulées au fond des gîtes est resté relativement constant aussi bien sur le terrain qu'en laboratoire. Une diminution importante de la toxicité des spores des souches 2362 et 2297 accumulées au fond des gîtes naturels est observée après deux semaines. Après 28 jours, les spores perdent la quasi-totalité de leur toxicité larvicide, bien que leur viabilité soit maintenue. L'observation au microscope électronique montre que cette perte de toxicité serait due à la disparition de l'inclusion toxique qui se trouve dans l'exosporium.

MOTS-CLÉS: Moustiques-lutte biologique-*Bacillus sphaericus*-conditions expérimentales et naturelles.

KEY WORDS: Mosquitoes-biological control-*Bacillus sphaericus*-laboratory and field conditions.

