

UNIVERSITE DE PARIS XI  
CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée pour l'obtention  
du titre de DOCTEUR INGÉNIEUR

Spécialité : ENTOMOLOGIE

par

Saïd KARCH

Le sujet :

*Bacillus sphaericus*

Agent de lutte biologique contre *Culex pipiens* Linné, 1758

(*Culicidae-Diptera*) et contre d'autres moustiques

soutenue le 25 juin 1984  
devant la commission composée de :

M. BERGERARD J.	Président
M. COZ J.	Rapporteur
M. GILLON Y.	} Examineurs
Melle de BARJAC H.	
M. STREBLER G.	

## AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire d'entomologie médicale de l'ORSTOM-Bondy, en collaboration avec le laboratoire d'entomologie de l'Université de Paris XI-Orsay.

Monsieur le professeur BERGERARD m'a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude à la fois pour sa direction scientifique de cette étude, et pour ses conseils éclairés et ses encouragements. Je l'en remercie sincèrement.

Monsieur COZ, Chef du laboratoire de recherche d'entomologie médicale de l'ORSTOM-Bondy, 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 ici toute ma reconnaissance pour les conseils et les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer.

Mademoiselle de BARJAC, directrice du laboratoire de lutte biologique II (Institut Pasteur), m'a accueilli dans son laboratoire pour faire un stage et un travail de collaboration. Je l'en remercie vivement.

Monsieur le professeur GILLON, directeur du laboratoire d'entomologie à la Faculté d'Orsay, a bien voulu participer au jury ; qu'il trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le professeur STREBLER, directeur du laboratoire de zoologie à l'INA-Paris, a bien voulu faire partie du jury. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude et ma reconnaissance.

Que Mesdames BARATHE et SANNIER ainsi que Mesdames TEPPAZ, et PASTRE du laboratoire de l'ORSTOM trouvent ici l'expression de ma gratitude. Mademoiselle ROZE s'est chargée de la frappe de ce manuscrit. Je tiens à l'en remercier infiniment.

J'adresse tous mes remerciements à Messieurs GAGNEPAIN et PETAVY du laboratoire d'entomologie d'Orsay, qui m'ont aidé à réaliser la partie histologique de mon étude.

Je tiens également à remercier le personnel du laboratoire de lutte biologique II de l'Institut Pasteur, qui m'a apporté son aide pendant mon stage et notamment J.F. CHARLES.

Enfin, je tiens à exprimer ma sincère reconnaissance à tous ceux qui, de près ou de loin, ont participé à l'élaboration de ce travail.

## SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u> .....	1
A - <u>Bacillus sphaericus</u> .....	6
1 - Historique de la découverte de <u>B.sphaericus</u> et ses potentialités .....	6
2 - Inclusion toxique .....	6
B - Les moustiques .....	7
1 - Importance des moustiques, employés dans cette étude, comme vecteurs des maladies .....	7
2 - Les moustiques sensibles à <u>B.sphaericus</u> .....	7
<u>CHAPITRE 1 : ETUDE DE L'ACTIVITE LARVICIDE DE <u>BACILLUS SPHAERICUS</u></u> <u>VIS-A-VIS DE QUELQUES ESPECES DE MOUSTIQUES</u>	
I - Généralités .....	10
II - Matériel et méthodes .....	10
II.1. Matériel .....	10
II.1.1. Le bacille .....	10
II.1.2. Les larves de moustiques testées .....	10
II.2. Méthodes .....	11
II.2.1. Méthodes d'élevage des moustiques .....	11
II.2.2. Préparation des suspensions bactériennes .....	11
II.2.3. Exécution d'un test-insecticide .....	11
II.2.4. Exploitation des résultats .....	12
III - Résultats .....	13
III.1. Sensibilité comparée de 3 espèces de moustiques à <u>Bacillus sphaericus</u> .....	13
III.2. Variation du nombre de larves sur la précision du titrage biologique .....	17
III.3. Influence du nombre de larves par lot .....	19
III.4. Activité larvicide en fonction du stade larvaire .....	19
III.5. Importance du temps de contact .....	23
III.6. Action sur la faune non-cible .....	23
III.6.1. Action sur le poisson .....	26
III.6.2. Action sur les larves de <u>Toxorhynchites</u> .....	26
IV - Discussion .....	26
V - Conclusion .....	28

CHAPITRE 2 : ACCELERATION DE LA TOXICITE LARVICIDE DE B.SPHAERICUS SUR C.PIPIENS PAR L'INGESTION DES CADAVRES, BROYES, INTOXIQUES PAR CE BACILLE.

I - Généralités .....	31
II - Matériel et méthodes .....	31
II.1. Technique de l'obtention des cadavres .....	31
II.2. Ultrafiltration des broyats .....	32
II.3. Culture en milieu M.B.S. ....	32
III - Résultats .....	32
III.1. Accélération de l'activité larvicide due aux cadavres broyés .....	32
III.2. Rémanence du broyat .....	33
III.3. Ultrafiltration et pouvoir larvicide .....	33
III.4. Potentiel larvicide de la culture du broyat ....	33
III.5. Rémanence d'un pouvoir larvicide dans les cada- vres .....	33
IV - Discussion .....	40
V - Conclusion .....	42

CHAPITRE 3 : EVALUATION ET PERSISTANCE, EN GITE NATUREL, DE L'ACTIVITE LARVICIDE DE B.SPHAERICUS SUR C.PIPIENS.

I - Généralités .....	45
II - Matériel et méthodes .....	45
II.1. Traitement des mares .....	45
II.2. Formulations et doses utilisées .....	46
II.3. Contrôle des mares .....	48
II.3.1. Sensibilité comparée de <u>C.pipiens</u> des mares et de <u>C.pipiens</u> (souche Montpellier) main- tenu en élevage .....	48
II.3.2. Surveillance de la réapparition des nymphes et de l'éclosion des oeufs .....	48
II.3.3. Essais biologiques au laboratoire .....	48
III - Résultats .....	48
III.1. Contrôle de la réapparition des larves ou des nym- phes .....	49
III.2. Sensibilité au bacille de <u>C.pipiens</u> du gîte larvaire et de l'élevage .....	50

III.3. Essais au laboratoire .....	50
III.4. Evaluation de l'activité larvicide sur les jeunes larves après l'éclosion .....	55
III.5. Le deuxième traitement des gîtes larvaires ....	56
III.6. Efficacité de <u>B.sphaericus</u> sur la faune des Arthropodes des mares .....	58
IV - Discussion - conclusion .....	59
<u>CHAPITRE 4 : HISTOPATHOLOGIE DES LARVES DE <u>C.PIPIENS</u>. ACTION DE</u>	
<u>B.SPHERICUS.</u>	
I - Technique histologique .....	62
II - Anatomie du tube digestif d'une larve de <u>C.pipiens</u> ....	62
III - Action sur le mésentéron .....	64
III.1. Différents aspects de l'intoxication .....	71
III.2. Etapes des altérations cytologiques au niveau mésentérique .....	71
IV - Action sur les larves d' <u>Aedes caspius</u> .....	76
V - Discussion - conclusion .....	76
<u>CHAPITRE 5 : RECEPTIVITE A <u>PLASMODIUM YOELII YOELII</u> D'<u>ANOPHELES</u> SOUMIS</u>	
<u>A <u>B.SPHERICUS</u> ET <u>B.THURINGIENSIS</u>.</u>	
I - Généralités .....	81
II - Matériel et méthodes .....	81
II.1. La souche plasmodiale .....	81
II.2. Les anophèles .....	81
II.3. L'infection des anophèles .....	82
II.4. Cycle des plasmodium chez l'anophèle .....	82
III - Résultats .....	84
IV - Conclusion .....	84
CONCLUSION GENERALE .....	89
RESUME .....	92
SUMMARY .....	94
BIBLIOGRAPHIE .....	96

## INTRODUCTION

Depuis longtemps l'homme s'est préoccupé de désinsectisation. Il a particulièrement voulu se protéger contre l'agression des insectes hématophages. Divers moyens de lutte ont été utilisés sur lesquels il serait trop long d'épiloguer. Ce n'est qu'au début de ce siècle qu'on a commencé à connaître le rôle vecteur des insectes dans la transmission de certaines maladies : le paludisme, la filariose de Bancroft, l'onchocercose, la fièvre jaune etc .... Cette connaissance a ouvert l'ère de l'épidémiologie biologique.

Jusqu'à la fin de la Seconde Guerre mondiale, la chimiothérapie et la chimioprophyllaxie ont réussi tant bien que mal à endiguer les grandes endémies transmises par les Arthropodes en milieu tropical. En 1939, dans l'enthousiasme général, à la découverte des propriétés insecticides du DDT par Muller et la mise au point d'autres produits organochlorés, dont les plus connus sont le lindane et la dièldrine, des campagnes contre les vecteurs majeurs d'endémie virent le jour un peu partout dans le monde. Des succès importants étaient tout d'abord observés ; parmi les plus marquants, citons les résultats obtenus dans la lutte antipaludique : de 300 millions de cas annuels en 1946, on tombait à 120 millions de cas en 1976 (Brown et al., 1976).

Les premières difficultés n'allaient cependant pas tarder à être rencontrées. L'apparition de gènes de résistance aux différents groupes chimiques insecticides, en particulier dans de nombreuses populations culicidiennes vectrices du paludisme, de la filariose de Bancroft et de certaines arboviroses (Chauvet, 1978).

Selon le Comité d'experts des insecticides (OMS, 1970) chez les culicinae : 19 espèces sont devenues résistantes dont 16 au DDT, 12 à la dièldrine et 9 aux composés organophosphorés (y compris Culex pipiens et Aedes aegypti). Parmi les 38 espèces d'Anopheles devenues résistantes à un ou plusieurs insecticides, 36 le sont à la dièldrine et 15 au DDT (y compris Anopheles stephensi).

Les difficultés auxquelles se heurtent l'utilisation des produits chimiques (Hamon et al., 1972), sont dues non seulement aux phénomènes de résistance, mais aussi à leur manque de spécificité. De plus, ils peuvent modifier l'équilibre des écosystèmes, ne pas être anodins surtout s'il s'agit d'utilisation courante et intense de pesticides à effet rémanent.

A ceci s'ajoutent les difficultés liées au prix des insecticides et au comportement des vecteurs (exophilie).

Signalons d'autres méthodes de lutte anciennement utilisées, basées sur l'assèchement des marais, le débroussaillage, la surveillance des gîtes larvaires de moustiques. Il faut toutefois garder à l'esprit que toute modification de l'environnement peut entraîner d'éventuels inconvénients parfois irréversibles tels que le remplacement d'une espèce par une autre tout aussi nocive.

La lutte génétique par lâcher de mâles stériles ou des mâles portant des translocations (Mouchet, 1971 ; Coz, 1978) peut réduire le potentiel reproducteur d'espèces nocives ; la stérilisation des mâles est obtenue par des procédés physiques ou par croisements interspécifiques. Parmi d'autres moyens nous pouvons citer l'introduction de gènes délétères. Actuellement, ces méthodes rencontrent de nombreuses difficultés provenant de la complexité génétique des populations naturelles, de leur différenciation écologique et éthologique, et de l'action puissante de la sélection naturelle. Aussi, la lutte génétique est-elle loin d'être opérationnelle dans les conditions naturelles.

Les inhibiteurs de développement des insectes se classent soit dans la catégorie des analogues de la néoténine, soit dans celle des analogues de l'éclydysone. Ils agissent de la même façon que les hormones, provoquant des perturbations dans la métamorphose. Dans la première catégorie, on trouve des substances qui empêchent la transformation des larves en nymphes si elles sont appliquées dans la deuxième moitié du dernier stade larvaire. Dans la deuxième, des produits provoquent des mues supplémentaires et la formation de monstres non viables. Plusieurs inhibiteurs de croissance des insectes, comme le groupe d'inhibiteurs des dérivés de la benzoylurée, sont actuellement en cours d'expérimentation, notamment sur les larves de moustiques.

De nombreux prédateurs d'insectes d'intérêt médical sont connus, parmi les vertébrés et les invertébrés (Jenkins, 1964). En fait, seuls les poissons larvivores et les larves prédatrices des larves de moustiques ont été utilisés. Les poissons entomophages, appartenant aux genres Gambusia et Poecilia (guppy) ont été largement utilisés dans la lutte contre les moustiques. L'emploi de ces poissons est à encourager comme élément de lutte intégrée. Cependant, les poissons de ce groupe ne peuvent être utilement employés que dans les points d'eau permanents ; il faut rester conscient des limites de la méthode.

Les moustiques non hématophages, du genre Toxorhynchites dont les larves sont de bonnes prédatrices des larves de moustiques (Trpis, 1972) ont été introduits avec un certain succès pour lutter contre Aedes aegypti (Gerberg et Visser, 1978). Des recherches sont en cours pour tenter d'améliorer cette méthode de lutte biologique.

Les champignons entomopathogènes sont eux-mêmes des agents de lutte biologique. Le genre Culicinomyces semble être efficace contre plusieurs espèces de moustiques (OMS, 1980b). Les Coelomomyces et Toly-pocladium ont donné au laboratoire des résultats prometteurs. En fait, il reste encore de nombreux points à élucider avant d'envisager leur emploi sur le terrain (Ferron, 1975).

Des nématodes appartenant au genre Reesimermis (R.nielseni) ont été utilisés par Petersen et Willis (1972) sur les larves d'Anopheles. Ces parasites seront peut-être employés comme agents de lutte dans l'avenir. D'autres nématodes, Romanomermis culicivorax et Octomoyomermis muspratti ont donné sur Culex pipiens des résultats qui ne sont pas sans intérêt (Petersen, 1981).

Les microsporides sont des parasites obligatoires pour les larves de moustiques. Nosema algerae et Vavraia (= pleistophora) Culicis, sont à ce jour ceux qui ont le plus retenu l'attention des chercheurs (OMS, 1980e). Cependant, l'utilisation de ces organismes dans la lutte contre les vecteurs n'est pas encore entrée en application, malgré des approches intéressantes en laboratoire.

La réflexion actuelle sur les méthodes de lutte non chimiques s'adressant particulièrement aux formes larvaires (Chapman, 1981 ; Coz et Mouchet, 1981) tient d'une part aux limitations des produits chimiques synthétiques en santé publique (Moreau et Stiles, 1978), aux défauts des méthodes classiques, et d'autre part, au grand avantage de la lutte biologique qui n'est dangereuse ni pour l'homme, ni pour l'environnement, et on peut espérer qu'elle sera efficace à long terme (Tab.A).

En effet, 1500 micro-organismes sont identifiés comme des agents de lutte potentiels (Miller et al., 1983), parmi lesquels se trouvent plusieurs agents pathogènes pour les moustiques (Jenkes, 1964). Il semblerait que les insectes ne sont pas résistants aux micro-organismes comme aux produits chimiques synthétiques (Julian et al., 1973). Quatre groupes (Bactéries, Champignons, Protozoaires et Virus) sont proposés (OMS, 1982). Ces agents pourraient être utilisés sans réserve jusqu'à

Tableau A : Quelques micro-organismes pathogènes pour les trois espèces de moustiques (O.M.S., 1980a).

<u>Culex pipiens</u>	<u>B.thuringiensis</u> <u>B.sphaericus</u>	Bactérie
	<u>Cytoplasmic polyhedrosis virus</u>	Virus
	<u>Nosema algerae</u>	Protozoaire
	<u>Coelomomyces sp.</u>	Champignon
	<u>Romanomermis culicivorax</u>	Nematode
<u>Anopheles stephensi</u>	<u>B.thuringiensis</u> <u>B.sphaericus</u>	Bactérie
	<u>Nosema sp.</u>	Protozoaire
<u>Aedes aegypti</u>	<u>B.thuringiensis</u>	Bactérie
	<u>Entomopoxvirus aedes</u>	Virus
	<u>Nosema algerae</u>	Protozoaire
	<u>Coelomomyces stegomyiae</u>	Champignon
	<u>Romanomermis sp.</u>	Nematode

ce que leur innocuité sur la faune non-cible et l'environnement soit déterminée.

Déjà il ressort que Bacillus thuringiensis H14 et Bacillus sphaericus présentent toutes les garanties d'innocuité et l'on peut envisager leur emploi à grande échelle.

Donc, actuellement on dispose de deux agents pathogènes antilarvaires. Le premier est B.thuringiensis H 14 ; c'est un cristal protéique inclus dans le cytoplasme de la bactérie ( $\delta$  - endotoxine) qui est toxique pour les larves de moustiques. C'est la spore et ce cristal qui constituent le produit larvicide présenté sous forme de poudre mouillable ou de solution concentrée. 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 larvicide de B.thuringiensis H 14 sur Culex quinquefasciatus montre qu'il ne constitue pas un larvicide idéal pour le traitement des gîtes de ce moustique (Hougard et al., 1983). Par contre, le deuxième agent, B.sphaericus, est très prometteur pour la lutte contre les larves de Culex. Son recyclage, mentionné par Hertlein et al. (1979) et sa spécificité augmentent son intérêt et rendent les perspectives de lutte encore plus prometteuses.

Le travail présenté ici, a pour but d'étudier le spectre d'activité de B.sphaericus, souche 1593-4 sur les larves de trois espèces de Moustiques : Culex pipiens, Anopheles stephensi et Aedes aegypti. Dans un second temps, on a essayé de mettre au point une standardisation méthodologique et de contribuer à l'étude de l'innocuité de B.sphaericus pour les poissons et pour les larves prédatrices de Toxorhynchites amboinensis. On a également tenté de déterminer le rôle important des cadavres dans la persistance de l'activité. Enfin, des essais ont été effectués sur des gîtes naturels de C.pipiens afin d'évaluer l'activité larvicide de la souche 1593-4.

La partie qui suit s'intéresse à l'étude du mode d'action de la bactérie au niveau du tube digestif de la larve de C.pipiens. Enfin, on a recherché l'influence éventuelle, après soumission des larves au bacille, de la réceptivité d'Anopheles stephensi au paludisme des rongeurs (Plasmodium yoelii yoelii).

## A - Bacillus sphaericus

### 1) Historique de la découverte de B.sphaericus et ses potentialités

La première souche de B.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). Deux autres souches 2013-4 et 2013-6 récemment isolées, en Roumanie, ont la même activité larvicide que la souche 1593 (In Davidson, 1982b).

B.sphaericus est considéré par le groupe scientifique de travail sur le contrôle biologique des vecteurs (OMS, 1980d), 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.

D'après Yousten (1984) les huit souches les plus toxiques pour les larves de Culex quinquefasciatus sont : 1593, 1691, 1881, 2013-6, 2117-2, 2362, 2500 et 2501. La souche 1593-4 est connue comme étant parmi les souches les plus toxiques pour les larves de Culex et d'Anopheles (de Barjac et al., 1980). Elle a été isolée la première fois en 1974, à partir des larves de Culex.p.quinquefasciatus collectées à Rawasarie, Jakarta, en Indonésie. B.sphaericus est un parasite facultatif et saprophyte. Deux poudres primaires ( l'une fournie par la compagnie STAUFFER, l'autre par les laboratoires ABBOT) sont actuellement utilisées au laboratoire et lors des essais sur le terrain.

### 2) Inclusion toxique

La nature de la toxine de B.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 la plus grande toxicité (Myers et Yousten, 1978 et 1980). La toxine ne se présente pas comme un cristal parasporal, comme dans le cas de B. thuringiensis H 14 (Singer, 1973 et 1974 ; Myers et Yousten, 1978). On a mis en évidence une inclusion dans les spores de la souche 1593 ; elle est localisée dans la tunique "Cell wall" et, avec une moindre fréquence, dans le protoplasme (Davidson, 1981a). Toutefois, cette inclusion est indifféremment rencontrée chez les souches pathogènes et non patho-

gènes (Davidson et Myers, 1981 ). Récemment, (Yousten et Davidson, 1982 ; de Barjac et Charles, 1983), ont démontré la présence d'une inclusion parasporale toxique dans les spores de la souche 2297 ou MR4.

La toxine de B.sphaericus est stable, ce qui fait de lui un candidat pour la production industrielle (Myers et Yousten, 1980).

## B - Les moustiques

1) Importance des moustiques, employés dans cette étude, comme vecteurs des maladies

- Culex pipiens : de nombreuses maladies sont transmises par les Culex. Le complexe C.pipiens est un excellent vecteur de la filariose de Bancroft (= Wuchereria bancrofti) qui affecte des millions d'individus tant en Afrique de l'Est qu'en Asie (Hamon, 1981). Le complexe C.pipiens est également vecteur de plusieurs arboviroses, comme la fièvre hémorragique de la vallée de Rift (flavivirus), en Afrique (Gargan et al., 1983).

Les larves de Culex peuvent s'installer dans des eaux douces, très fortement polluées ou dans des eaux saumâtres. Certaines formes du complexe C.pipiens sont étroitement associées à l'homme et à ses habitats. Il bénéficie d'une très large distribution géographique.

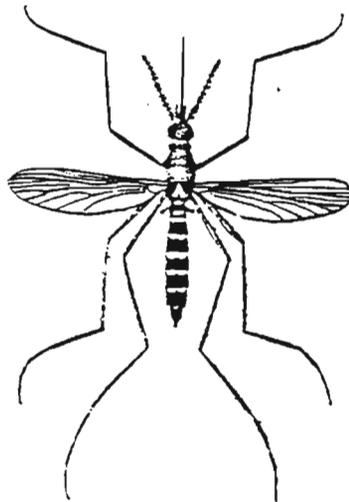
- Anopheles stephensi : le genre Anopheles est le seul responsable de la transmission du paludisme. An.stephensi est un anophèle oriental du groupe Néocellia. Son aire de répartition s'étend de l'Iran à l'Inde. C'est un vecteur naturel du paludisme humain à Plasmodium falciparum (Motabar, 1974 ; Scanlon et al., 1968). Ce moustique joue un rôle essentiel dans la transmission du paludisme dans cette région.

- Aedes aegypti : est un vecteur principal de la fièvre jaune et de la dengue, également impliqué dans la transmission de la filariose de Bancroft. Les larves sont malheureusement très peu susceptibles à B.sphaericus.

## 2) Les moustiques sensibles à B.sphaericus

Le genre Culex est de loin le plus sensible à l'activité larvicide de B.sphaericus (OMS, 1980 c); cette bactérie possède également une bonne activité sur le genre Anopheles ; cette activité est variable d'une espèce à l'autre. Le genre Aedes est très peu ou pas sensible (Pillai, 1981) à l'exception de Aedes nigromaculis qui manifeste une sensibilité correcte (OMS, 1979).

Le choix de C.pipiens pour cette étude a été déterminé après des tests de mortalité effectués sur différentes espèces Culicidiennes, au 3ème stade larvaire. Selon ces tests, on a pu classer C.pipiens parmi les espèces les plus sensibles à B.sphaericus.



# **CHAPITRE 1**

ETUDE DE L'ACTIVITE LARVICIDE  
DE B.SPHERICUS VIS.A.VIS DE  
QUELQUES ESPECES DE MOUSTI-  
QUES.

ETUDE DE L'ACTIVITE LARVICIDE DE BACILLUS SPHAERICUS  
VIS-A-VIS DE QUELQUES ESPECES DE MOUSTIQUES

I. Généralités

Cette étude effectuée sur la mise au point d'un titrage biologique est caractérisée par l'emploi d'un insecte-test sensible au bacille ; elle vise à obtenir des résultats comparables et d'une précision acceptable.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à étudier la sensibilité comparée de trois genres de Moustiques Culex, Anopheles et Aedes. Le travail de méthodologie est réalisé particulièrement sur Culex pipiens et Anopheles stephensi qui sont les plus sensibles au bacille. Il a pour but de contribuer, d'une part à définir une standardisation de ce titrage, et d'autre part, à étudier l'influence des effectifs sur la précision du titrage biologique. Après une description détaillée du protocole expérimental, nous avons cherché à déterminer les influences de certains facteurs comme l'influence du nombre de larves par lot, l'activité larvicide sur différents stades de développement larvaire, l'importance du temps de contact, ainsi que l'innocuité de B.sphaericus sur la faune non-cible "Poissons et larves prédatrices de Toxorhynchites".

II - Matériel et méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Le bacille

Bacillus sphaericus, souche 1593-4, appartient à l'ordre des Eubactériales et à la famille des Bacillacea. Il forme un ensemble très hétérogène de souches indifférenciables par des critères biochimiques classiques. Nous distinguons toutefois cinq groupes génétiquement définis par l'étude des homologues de l'ADN (Kryche et al, 1980). Les souches pathogènes pour les larves de moustiques appartiennent toutes au même groupe (Bourgouin, 1981).

La souche 1593-4 est présentée sous la forme d'une poudre lyophilisée de couleur marron clair, à odeur caractéristique. Elle est conditionnée en flacon de 100 mg et dénommée B.sphaericus "standard" ; elle provient de l'Institut Pasteur de Paris.

### II.1.2. les larves de moustiques testées

Elles appartiennent à deux sous-familles de la famille des Culicidae (Diptères-Nématocères)

- Sous-famille Culicinae :

- . Culex pipiens, Linné, 1758, souche "Montpellier"
- . Aedes aegypti, Linné, 1762, souche "Bora-Bora"
- . Aedes caspius, Pallas, 1771, souche "Koweit"

- Sous-famille Anophelinae :

- . Anopheles stephensi, Liston, 1901, souche "Museum"

Toutes ces souches sont maintenues en élevage continu dans notre insectarium à l'ORSTOM Bondy-France.

## II.2. Méthodes

### II.2.1. Méthode d'élevage des moustiques

Les moustiques adultes sont maintenus dans une cage recouverte de tulle blanc où un pondoir contient de l'eau ordinaire. Les oeufs pondus sont retirés après chaque ponte et déposés dans un cristalliseur où éclosent de jeunes larves. Ces larves sont nourries une fois par jour avec de la poudre de biscuit pour souris. Les nymphes sont ensuite isolées et placées dans les cages. Les imagos sont nourris au jus sucré (mâles), sur cobaye (femelles d'Anopheles et d'Aedes), et sur poulet (femelles de Culex pipiens).

La durée d'un cycle biologique complet de l'oeuf à l'oeuf est environ de 20 jours. Cette durée peut varier suivant les conditions (nourriture, température, humidité, ... etc).

### II.2.2. Préparation des suspensions bactériennes

10 mg de la poudre de B.sphaericus 1593-4 sont dilués dans une fiole jaugée de 1000 ml, ce qui correspond à une suspension de 10 ppm, à partir de laquelle les dilutions inférieures sont réalisées.

Toutes nos dilutions sont faites avec de l'eau bipermutée à PH 5,4 ± 0,1.

### II.2.3. Exécution d'un test-insecticide

La méthode employée est celle préconisée par l'OMS 1963 en appliquant un protocole expérimental proposé dans le rapport des experts participant au 5ème meeting du groupe scientifique de travail sur le contrôle biologique des vecteurs (OMS, 1981).

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 ordinaire. Selon les cas, 3 à 16 gobelets sont utilisés pour chaque concentration. Afin d'éviter la baisse de concentration de la solution 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 Bacille.

La lecture d'un test sur les larves stade 3 s'effectue après 48 et 72 h de contact. L'effet maximal bacille-larve s'observe après 48 h de contact (OMS, 1979), tandis que pour les jeunes larves des 1er et 2ème stades, la lecture peut se faire à 24 h.

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 essais ont été réalisés dans les conditions du laboratoire, à une température de 25°C ± 1°.

#### II.2.4. Exploitation des résultats

Il s'agit maintenant de savoir si les résultats obtenus peuvent s'inscrire dans le cadre d'une loi mathématique définie. La méthode employée, gausso-logarithmique, est celle généralement utilisée pour tout insecticide classique.

Lorsque le taux de mortalité chez le témoin est compris entre 5 et 20 %, celui-ci est alors corrigé par la formule d'ABBOT :

$$\% \text{ Mortalité corrigée} = \frac{\% \text{ M. observée} - \% \text{ M. chez le témoin}}{100 - \% \text{ M. chez le témoin}} \times 100$$

Si la mortalité du témoin dépasse 20 %, le test est annulé.

Afin de linéariser la courbe de régression de la mortalité corrigée en fonction de la dose, nous effectuons un changement de variable sur les réponses moyennes à chaque dose, selon la transformation probit ; ensuite nous effectuons un autre changement de variable sur la dose, en utilisant le logarithme décimal de celle-ci (concentration en ppm).

A l'aide d'un système gausso-logarithmique, la représentation graphique aboutit théoriquement à une droite de régression permettant une détermination aisée des doses létales 50 et 90 (DL 50, DL 90).

Dans le cas de la détermination de l'influence du nombre de larves

sur la précision du titrage biologique, un test a été réalisé avec 400 larves par concentration (16 lots de 25 larves), à raison de 4 concentrations pour Anopheles stephensi et 5 concentrations pour Culex pipiens.

Nous avons ensuite réalisé différents tirages au sort parmi les 16 lots de 25 larves (10 tirages de 2,4,6 et 8 gobelets par concentration) afin de déterminer les DL 50, leurs imprécisions, et les  $\chi^2$ , à l'aide d'un programme d'analyse préparé pour ordinateur.

### III. Résultats

Des essais préliminaires ont été effectués sur le 3ème stade larvaire, afin de resserrer les concentrations entraînant une mortalité (de 16 à 84 %) pour mieux cerner la DL 50.

Les concentrations retenues pour C.pipiens se situent entre 0,003 et 0,05 ppm et pour An.stephensi entre 0,01 et 0,1 ppm pour 48 et 72 h de contact, tandis que pour Ae.aegypti, il faut utiliser des fortes concentrations de 1 à 10 ppm pour 2 à 5 jours de contact.

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

#### III.1. Sensibilité comparée de 3 espèces de moustiques à B.sphaericus

Efficacité sur C.pipiens et An.stephensi : les résultats sont portés au tableau (1) et représentés sur les Fig. (1 et 2).

Les DL 50 sont les suivantes :

. C.pipiens : DL 50 = 0,0051 ppm

. An.stephensi : DL 50 = 0,064 ppm

Il est à noter que la sensibilité de C.pipiens à B.sphaericus 1593-4 est 12 fois plus forte que celle d'An.stephensi.

Efficacité sur Aedes : des tests préliminaires ont été effectués sur Ae.aegypti. Les résultats indiquent une moindre sensibilité de cette espèce, qui nous oblige à utiliser une forte concentration durant 6 jours de contact pour obtenir une mortalité comparable à celle obtenue sur C.pipiens et An.stephensi (Tab. 1 et 2).

Notons que d'autres essais ont été réalisés sur les larves stade 3 d'Aedes caspius en utilisant des fortes concentrations de 1 à 5 ppm.

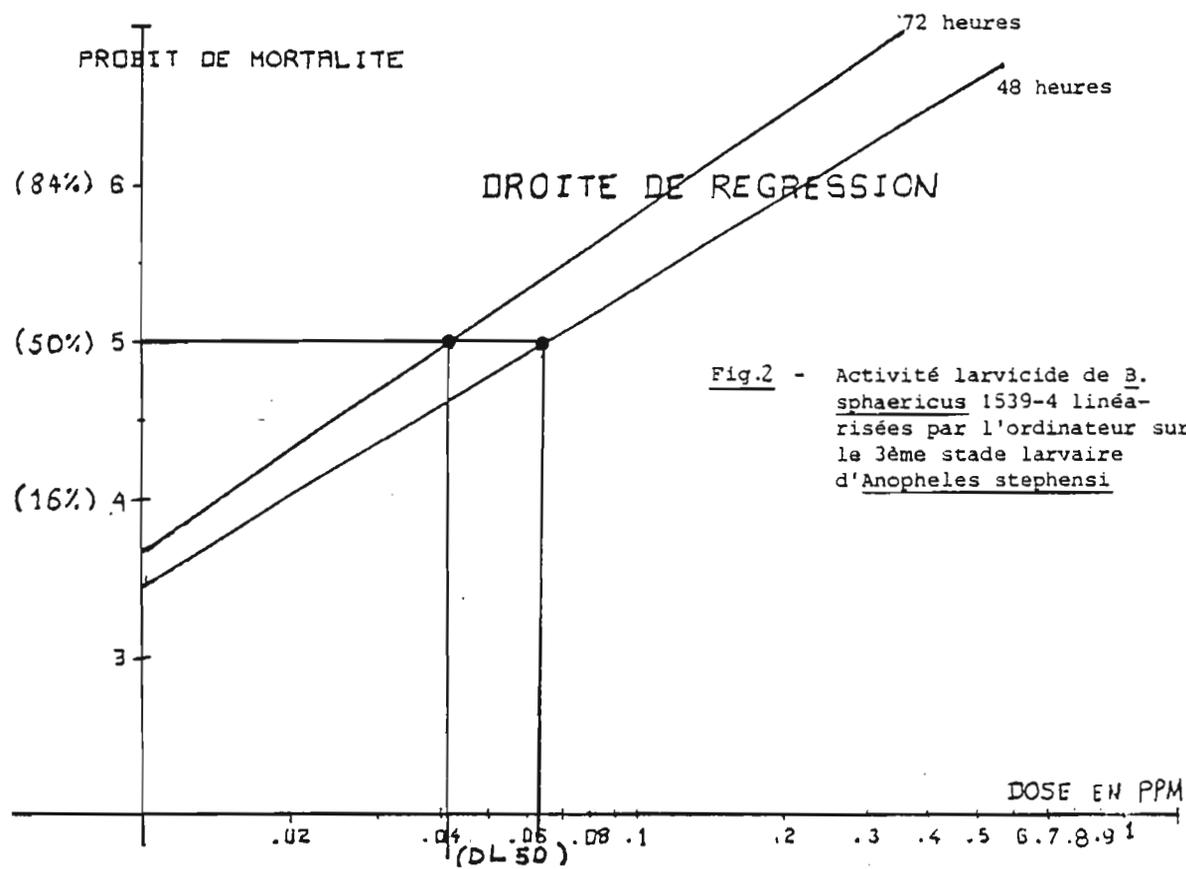
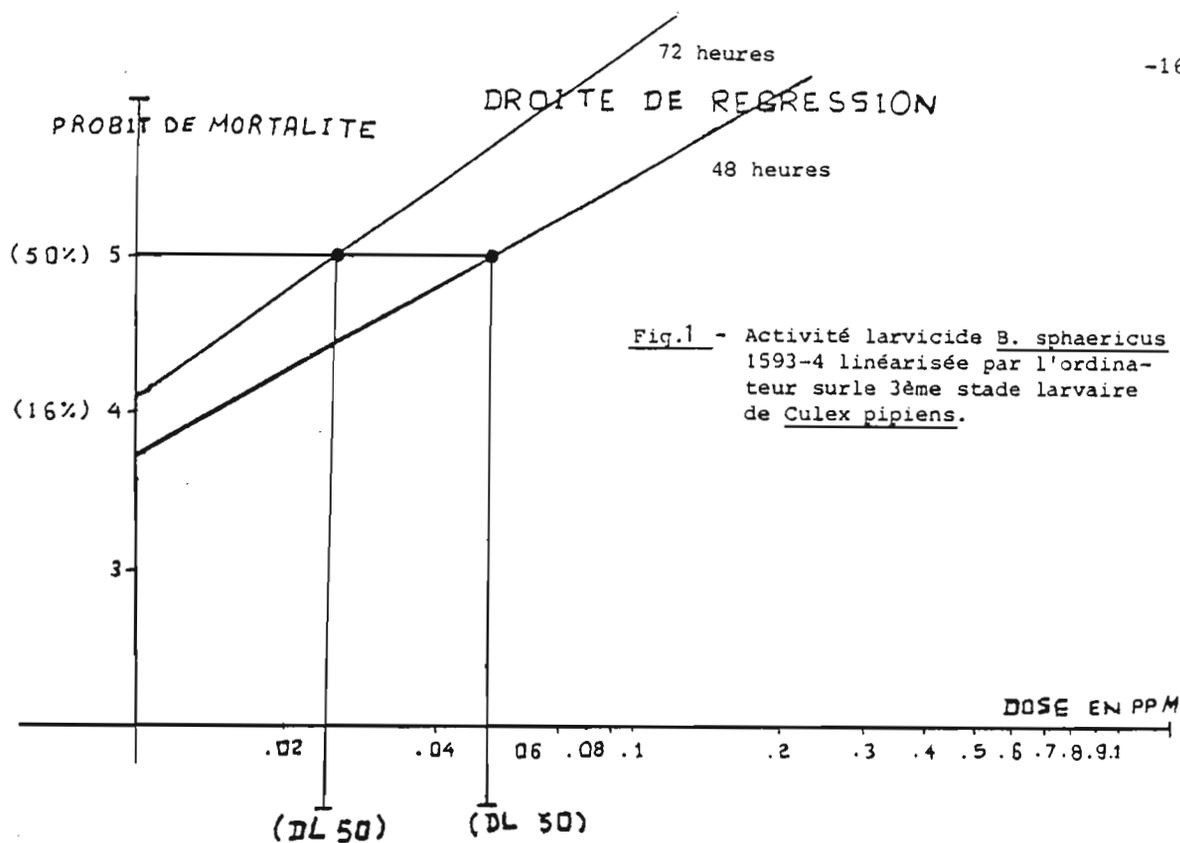
<u>Culex pipiens</u>				<u>Anopheles stephensi</u>					
Concentration (ppm)	48 h		72 h		Concentration (ppm)	48 h		72 h	
	%M	%Mc	%M	%Mc		%M	%Mc	%M	%Mc
0,05	94,5	94	99,5	99	0,1	68	65	80,3	78
0,03	93	92	99,3	99	0,07	60,8	57	78,5	76
0,01	76	73	94,3	93	0,05	42,8	37	55,5	50
0,005	61,7	56	85,7	83	0,01	15,8	7	20,2	10
0,003	36	27	57,5	49	Témoïn	9,5		11,5	
Témoïn	11,6		14,5						
DL 50	0,0051		0,0025			0,064		0,041	
DL 90	0,0265		0,0092			0,296		0,164	
$\chi^2$	23,727 S		34,907 S			7,226 S		18,799 S	
imprécision de DL 50	23 %		33 %			15 %		21 %	

Tableau (1) : Activité du B. sphaericus 1593-4 sur les larves stade 3 de Culex pipiens et Anopheles stephensi.  
A noter que, nous avons utilisé 400 larves pour chaque concentration (2000 larves de C. pipiens, 1600 larves d'An.stephensi, non compris le témoin 400 larves).

% M: Mortalité  
% Mc: Mortalité corrigée  
S. : Significatif

Espèces	Concentration (ppm)	Mortalité %			
		24h	48h	5 jours	6 jours
<u>Aedes</u> <u>aegypti</u>	10	10	68	92,8	94
	5	12	48	86,7	91,8
	1	6,6	33	81	87,7
	0,1	0	2	10	11
	Témoin	0	0	1	1
<u>Anopheles</u> <u>stephensi</u>	2	24	96		
	1	10	92		
	0,5	13	88		
	0,1	8	78		
	Témoin	1	3		
<u>Culex</u> <u>pipiens</u>	4	98			
	2	95			
	1	90			
	0,5	80			
	Témoin	0			

Tableau (2) : Comparaison de l'activité du B.sphaericus 1593-4 en utilisant des fortes concentrations sur les larves stade 3 de trois espèces de moustiques.



Nous n'avons obtenu aucune mortalité après 4 jours de contact, mais à 10 ppm une petite mortalité (6 %) parmi les larves laissées 4 jours dans la suspension de B.sphaericus 1593-4.

Tous ces résultats montrent la forte sensibilité de C.pipiens, la moyenne sensibilité d'An.stephensi et la moindre sensibilité d'Ae.aegypti. Ces variations de sensibilité nous paraissent liées aux genres de Moustiques. En effet, des travaux (Bourgouin, 1981 ; Pillai, 1981 ; Dagnogo et Coz, 1982) ont constaté ces mêmes variations, notamment la forte sensibilité de Culex à un grand nombre de souches pathogènes de B.sphaericus. C'est pour cette raison que nous avons orienté l'étude de l'activité larvicide de ce bacille particulièrement sur C.pipiens et sur An.stephensi.

### III.2. Variation du nombre de larves sur la précision du titrage biologique

Cette étude est réalisée sur C.pipiens et An.stephensi à partir de l'observation de la mortalité après 48 h de contact avec le bacille, étant donné que le plus souvent, il n'y a pas de différence notable avec celle observée après 72 h de contact.

Nous avons essayé d'approcher le problème en procédant à 10 tirages au sort de 2,4,6 et 8 lots, grâce au test groupant le maximum de larves (2000 larves de C.pipiens, 1600 larves d'An.stephensi, non compris le témoin de 400 larves).

Au sein de chaque tirage, nous avons calculé les DL 50, leurs imprécisions et les  $\chi^2$  à l'aide d'une analyse probit programmée qui, nous l'espérons, contribuera à la standardisation de ce titrage.

- Culex pipiens : après 48 h de contact, la DL 50 est de 0,0051 ppm et son imprécision est de 23 %. Ces résultats obtenus par un test utilisant 2000 larves de 3ème stade, sont considérés comme les meilleures approximations des valeurs réelles (Tab. 1, Fig. 1). La comparaison entre ces résultats et ceux de chaque tirage au sort (250,500,750 et 1000 larves) ne montre pas de différence notable, car la dispersion des points de DL 50 en fonction du nombre de larves est restreinte autour de la meilleure approximation de DL 50 encadrant son intervalle de confiance (0,0039 - 0,0066 ppm) (Tab. 3,4,5 et 6, Fig. 3).

Tableaux (3,4,5 et 6) - Variation de la DL 50, l'imprécision et  $\chi^2$  calculées sur 10 échantillons de 250, 500, 750 et 1 000 larves, stade 3 de Culex pipiens ( 50,100,150 et 200 larves x 5 concentrations)

Tirage n°	N.L.	DL 50	I	$\chi^2$
1	250	0,003	70	14,027S
2	252	0,0047	57	37,93S
3	252	0,0033	35	4,785NS
4	252	0,0055	35	9,274S
5	253	0,0035	24	4,94NS
6	253	0,0044	27	1,594NS
7	251	0,0065	18	7,468NS
8	250	0,0058	31	7,994S
9	254	0,0035	32	3,657NS
10	250	0,0063	36	10,201S

(Tableau 3)

Tirage n°	N.L.	DL 50	I	$\chi^2$
1	502	0,0047	36	14,77S
2	506	0,005	16	6,482S
3	502	0,0043	65	50,709S
4	502	0,0051	47	29,818S
5	503	0,005	18	2,331NS
6	505	0,0049	18	3,4NS
7	502	0,0059	40	27,757S
8	504	0,0052	14	5,252NS
9	507	0,0037	23	7,081NS
10	502	0,0063	36	24,44S

(Tableau 4)

Tirage n°	N.L.	DL 50	I	$\chi^2$
1	758	0,005	25	11,236S
2	753	0,0053	13	3,578NS
3	755	0,0046	27	11,041S
4	756	0,0057	13	4,14NS
5	756	0,0051	35	30,419S
6	754	0,0065	33	28,812S
7	752	0,0042	38	16,136S
8	760	0,0062	28	16,661S
9	753	0,0043	31	11,165S
10	755	0,0068	30	27,911S

(Tableau 5)

Tirage n°	N.L.	DL 50	I	$\chi^2$
1	1005	0,004	32	16,319S
2	1006	0,0048	26	15,337S
3	1008	0,0068	22	14,407S
4	1005	0,0056	34	29,034S
5	1007	0,005	35	43,643S
6	1007	0,0059	26	17,547S
7	1006	0,0036	41	24,893S
8	1004	0,0052	32	25,795S
9	1004	0,0041	36	26,284S
10	1004	0,0056	27	21,639S

(Tableau 6)

N.L. : Nombre de larves

I : Imprécision de DL 50 calculée

S : Significatif

-Anopheles stephensi : le test réalisé avec 1600 larves de 3ème stade a donné une DL 50 = 0,064 ppm avec une imprécision de 15 %, après 48 h de contact (Tab. 1, Fig. 2). Cette DL 50 est considérée comme la meilleure approximation de la valeur réelle. La comparaison entre ces résultats et ceux de chaque tirage au sort (200,400,600 et 800 larves) indique que la dispersion des DL 50 diminue en fonction de l'augmentation du nombre de larves se rapprochant de l'espace de l'intervalle de confiance (0,054 - 0,074 ppm) de la DL 50 (Tab. 7, 8,9 et 10 ; Fig. 4).

### III.3. Influence du nombre de larves par lots

Nous avons cherché à déterminer les variations d'activité de la souche 1593-4, en fonction du nombre de larves par lots. Dans cinq séries de lots (gobelets) avec successivement 5, 10, 15, 20 et 25 larves de 3ème stade de chaque espèce de C.pipiens et An.stephensi placées dans des suspensions bactériennes, la mortalité est chiffrée après 48 h et 72 h de contact.

Les résultats obtenus après 48 h de contact sont les suivants :

- C.pipiens : - DL 50 < 0,003 ppm pour les lots de 5 et 10 larves  
- DL 50 = 0,0041 ppm pour les lots de 15 larves  
- DL 50 = 0,0067 ppm pour les lots de 20 larves  
- DL 50 = 0,011 ppm pour les lots de 25 larves

Les DL 50 augmentent en fonction de la densité larvaire au cours de deux lectures effectuées après 48 et 72 h de contact (Tab. 11).

- An.stephensi : - DL 50 = 0,037 ppm pour les lots de 5 larves  
- DL 50 = 0,06 ppm pour les lots de 10 larves  
- DL 50 = 0,052 ppm pour les lots de 15 larves  
- DL 50 = 0,051 ppm pour les lots de 20 larves  
- DL 50 = 0,05 ppm pour les lots de 25 larves

Ces résultats ne montrent pas de différence significative, étant donné que les DL 50 sont presque du même ordre, à l'exception toutefois de la série de 5 larves (Tab. 12).

### III.4. Activité larvicide en fonction du stade larvaire

Deux séries d'études ont été réalisées dans les mêmes conditions expérimentales, une série sur les quatre stades larvaires de C.pipiens et une autre sur les trois derniers stades d'An. stephensi.

Les résultats observés, après 24 et 48 h de contact, confirment

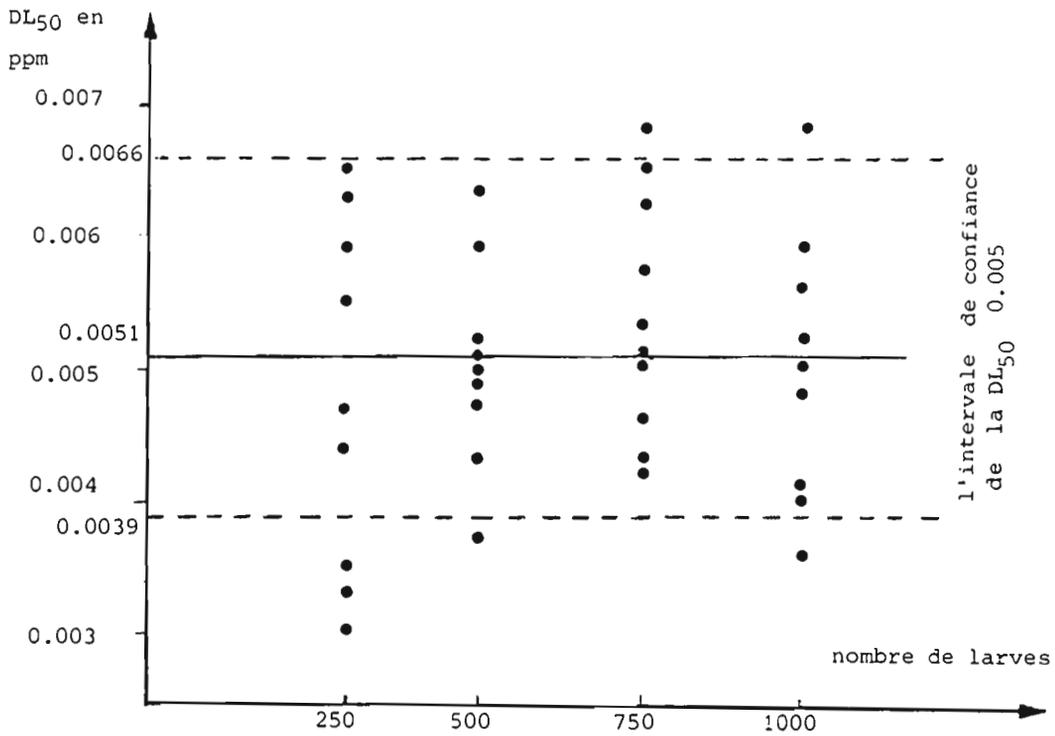


Fig. 3 - Variation de la DL<sub>50</sub> au sein de chaque tirage au sort sur le 3ème stade larvaire de Culex pipiens (5 concentrations X 50,100,150 et 200 larves).

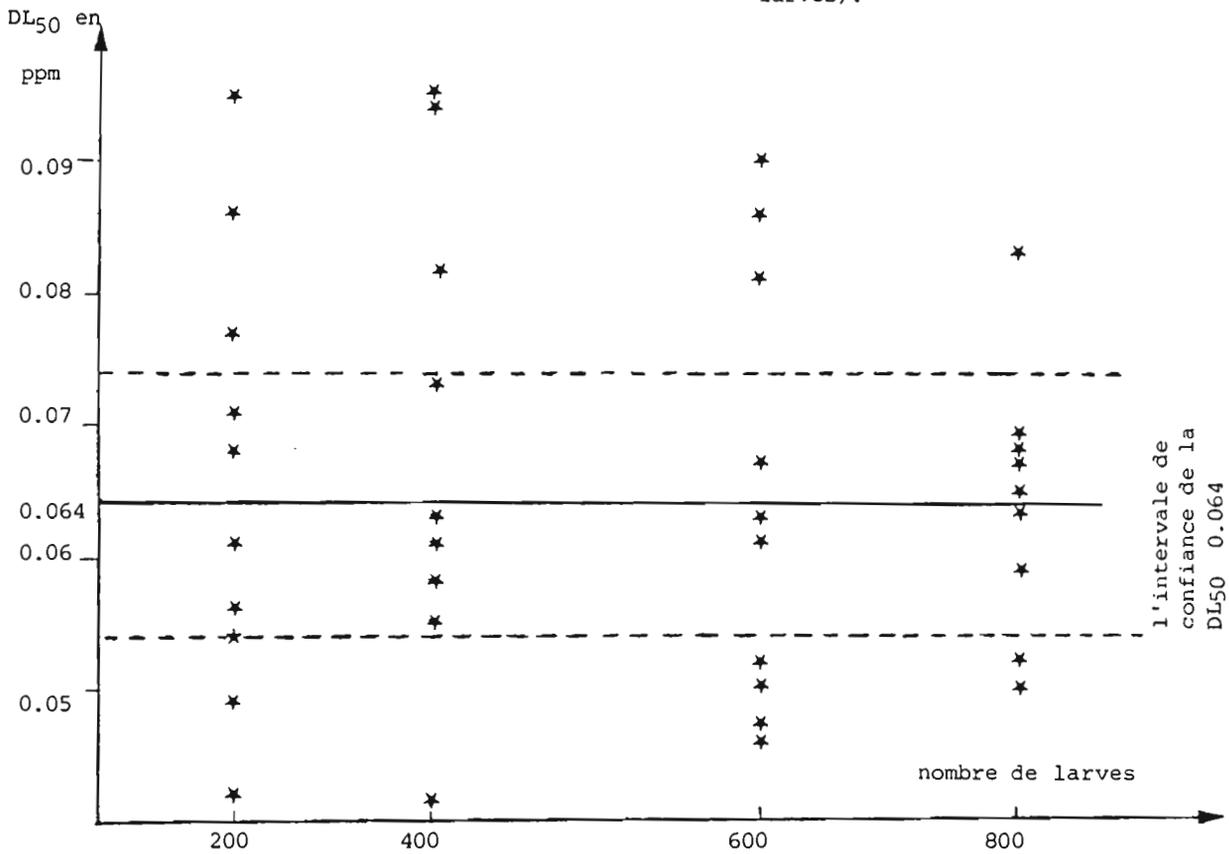


Fig. 4 - Variation de la DL<sub>50</sub> au sein de chaque tirage au sort sur le 3ème stade larvaire d'Anopheles stephensi (4 concentrations X 50,100, 150 et 200 larves).

Tableaux (7,8,9 et 10) : Variation de la DL 50, l'imprécision et  $\chi^2$  calculées sur 10 échantillons de 200, 400, 600 et 800 larves de stade 3 d'Anopheles stephensi (50,100,150 et 200 larves x 4 concentrations)

Tirage n°	N.L	DL 50	I	$\chi^2$
1	200	0,071	45	9,684S
2	202	0,042	17	4,58NS
3	200	0,046	44	13,644S
4	203	0,086	37	4,504NS
5	202	0,061	14	5,257NS
6	200	0,077	90	47,611S
7	200	0,054	48	25,384S
8	200	0,095	23	1,076NS
9	200	0,068	30	1,524NS
10	201	0,056	48	15,127S

(Tableau 7)

Tirage n°	N.L	DL 50	I	$\chi^2$
1	403	0,058	32	6,575S
2	400	0,041	59	21,915S
3	402	0,063	13	3,117NS
4	400	0,061	54	37,208S
5	403	0,095	22	2,94S
6	404	0,063	52	47,313S
7	400	0,073	49	37,675S
8	401	0,055	28	6,669S
9	402	0,094	62	33,731S
10	401	0,061	41	32,637S

(Tableau 8)

Tirage n°	N.L	DL 50	I	$\chi^2$
1	604	0,061	47	0,139S
2	603	0,063	12	0,725NS
3	602	0,05	20	6,298S
4	604	0,052	33	13,322S
5	602	0,047	35	35,707S
6	605	0,081	30	14,945S
7	604	0,09	51	61,718S
8	603	0,067	62	69,234S
9	603	0,086	26	10,023S
10	603	0,046	45	38,518S

(Tableau 9)

Tirage n°	N.L	DL 50	I	$\chi^2$
1	806	0,063	20	8,883S
2	805	0,068	28	15,838S
3	802	0,067	32	20,561S
4	805	0,079	32	13,49S
5	805	0,05	10	3,393NS
6	806	0,052	26	14,67S
7	804	0,052	10	0,092NS
8	802	0,059	11	2,962NS
9	801	0,065	25	18,412S
10	807	0,083	30	13,312S

(Tableau 10)

N.L. : Nombre de larves

I. : Imprécision de DL 50 calculée

S. : Significatif

Tableau 11 : Influence de nombre de larves par lots sur Culex pipiens stade 3 avec une suspension de B.sphaericus.

Concentration (ppm)	Mortalité corrigée %									
	48 h					72 h				
	5L	10L	15L	20L	25L	5L	10L	15L	20L	25L
0,05	99	93	98	94	97	99	99	99	99	99
0,03	99	98	97	92	84	99	99	99	99	99
0,01	95	78	71	72	46	99	95	97	90	79
0,005	80	70	71	39	21	95	89	97	60	24
0,003	80	35	32	19	6	95	66	53	45	12
Témoin	0	0	2	1	2	1	2	2	1	2
DL 50	0,003	0,003	0,0041	0,0067	0,011	0,003	0,003	0,003	0,0035	0,0069
$\chi^2$			8,466 S.	4,251 N.S	2,125 N.S				3,336 N.S	8,447 S.
Imprécision de DL 50			33 %	15 %	12 %				18 %	15 %

Tableau 12 : Influence du nombre de larves par lots sur Anopheles stephensi stade 3 avec une suspension de B.sphaericus

Concentration (ppm)	Mortalité Corrigée %									
	48 h					72 h				
	5L	10L	15L	20L	25L	5L	10L	15L	20L	25L
0,1	80	67	78	66	69	74	87	89	83	73
0,07	50	46	67	58	82	53	72	84	74	84
0,05	65	56	50	44	51	63	69	70	56	61
0,03	45	26	21	41	22	32	34	30	49	29
Témoin	0	1	2	1	3	0	2	3	3	4
DL 50	0,037	0,06	0,052	0,051	0,05	0,047	0,0041	0,039	0,034	0,042
$\chi^2$	3,022 N.S.	3,702 N.S.	0,601 N.S.	1,281 N.S.	21,059 S.	1,94 N.S.	1,608 N.S.	2,531 N.S.	1,974 N.S.	18,143 S.
Imprécision de DL 50	47 %	23 %	12 %	23 %	31 %	32 %	18 %	13 %	22 %	34 %

L : Nombre de larves par lots

S : Significatif

N.S. : Non significatif

que les stades 1 et 2 sont beaucoup plus sensibles que les 3 et 4. Cependant, nous avons constaté une forte mortalité parmi les larves stades 1 et 2 après 24 h de contact, ce qui oblige à faire la lecture après 24 h (Tab. 13 et 14).

### III.5. Importance du temps de contact

Nous avons entrepris avec le 3ème stade larvaire de C.pipiens et d'An.stephensi de faire varier le temps de contact des larves avec le bacille. Les larves sont laissées dans les suspensions pendant un temps donné, puis elles sont retirées et placées après lavage dans l'eau permutée. La mortalité est chiffrée 48 et 72 h après le début du test.

-C.pipiens : Contrairement aux observations de Faye (1981) qui a noté que les taux de mortalité après une heure de contact sont analogues à ceux observés après 72 h de contact permanent, nos résultats pour 30 minutes, 1, 2 et 4 h de contact ne sont pas équivalents à ceux correspondant à 48 et 72 h de contact permanent. Les taux de mortalité s'accroissent rapidement, devenant dès la 4ème heure presque identiques à ceux de 48 et 72 h de contact permanent (Tab. 15).

-An. stephensi : les résultats obtenus, en réalisant des séries de 30 minutes, 2, 4 et 6 h de contact, ne sont pas analogues à ceux de 48 et 72 h de contact permanent. Les taux de mortalité augmentent légèrement en fonction du temps de contact, à l'exception de celui de 6 h, qui correspond aux résultats de 48 et 72 h de contact permanent (Tab. 16).

### III.6. Action sur la faune non-cible

A l'heure actuelle, la recherche s'oriente vers la découverte d'un larvicide de remplacement qui soit actif et sélectif, et en même temps offrant une grande marge de sécurité et d'innocuité pour l'homme, les mammifères, les oiseaux, ..., les autres formes de vie et l'environnement.

C'est dans ce cadre que nous avons effectué deux tests de sensibilité sur le poisson Limia melanogaster, et sur les larves de Toxorhynchites amboinensis qui sont des bonnes prédatrices des larves de moustiques (Robert et al, 1983).

Tableau 13 : Variation de mortalité au sein de chaque stade larvaire de Culex pipiens en contact avec B. sphaericus

Concentration (ppm)	Mortalité Corrigée %							
	24 h				48 h			
	st.1	st.2	st.3	st.4	st.1	st.2	st.3	st.4
0,05	99		99	97	99		99	99
0,03	99	99	99	99	99	99	99	99
0,01	97	99	72	17	99	99	98	81
0,005	93	98	19	9	99	99	73	42
0,003	83		5	6	99		27	21
Témoin	0	6	5	0	0	6	7	3
DL 50	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	> 0,05	0,0038	0,0056

Tableau 14 : Variation de mortalité au sein de chaque stade larvaire d'Anopheles stephensi en contact avec B. sphaericus.

Concentration (ppm)	Mortalité Corrigée %					
	24 h			48 h		
	st.2	st.3	st.4	st.2	st.3	st.4
0,1	84	3	1	98	63	45
0,07	77	1	5	98	32	45
0,05	72	1	3	98	28	26
0,01	14	3	3	44	5	8
Témoin	2	1	1	3	2	1
DL 50	0,031			<0,01	0,092	0,1
$\chi^2$	1,553	>0,1	>0,1		8,873	3,185
	N.S.				S.	S.
Imprécision de DL 50	15 %				35 %	28 %

st. : stade larvaire

S. : Significatif

N.S. : Non significatif

Tableau 15 : Culex pipiens, stade 3 larvaire, soumis à un contact de temps variable avec une suspension de B.sphaericus, et placé ensuite dans de l'eau permutée.  
L'observation est réalisée après 48 et 72 heures.

Concentration ( ppm)	Mortalité Corrigée %									
	48 h					72 h				
	1/2h	1 h	2 h	4 h	P.	1/2h	1 h	2 h	4 h	P.
0,05	36	54	91	96	99	56	88	91	98	99
0,01	22	43	79	91	97	30	71	81	96	99
0,005	25	22	35	58	82	42	36	38	68	97
0,003	9	11	16	17	27	14	13	18	37	62
Témoin	5					7				
DL 50	>0,05	0,0297	0,007	0,0048	0,0036	0,03	0,0086	0,0066	0,0035	0,001
$\chi^2$		8,607 S.	19,219 S.	28,786 S.	26,103 S.	16,1 S.	16,27 S.	19,642 S.	13,86 S.	24,439 S.
Imprécision de DL 50		59 %	39 %	40 %	36 %	80 %	38 %	40 %	35 %	68 %

Tableau 16 : Anopheles stephensi, stade 3 larvaire, soumis à un contact de temps variable avec une suspension de B. sphaericus, et placé ensuite dans l'eau permutée. L'observation est réalisée après 48 et 72 heures.

Concentration (ppm)	Mortalité Corrigée %									
	48 h					72 h				
	1/2h	2 h	4 h	6 h	P.	1/2h	2 h	4 h	6 h'	P.
0,1	7	10	28	37	88	15	32	35	49	90
0,07	8	9	28	43	35	15	27	35	44	38
0,05	2	10	12	31	14	8	10	19	32	32
0,02	2	5	16	13	12	7	16	15	22	11
Témoin	3					4				
DL 50	> 0,1	> 0,1	> 0,1	0,1	0,71	> 0,1	> 0,1	> 0,1	0,1	0,63
$\chi^2$				4,765 N.S.	53,162 S.				0,796 N.S.	32,627 S.
Imprécision de DL 50				35 %	42 %				33 %	34 %

P. : Permanent  
S. : Significatif

### III.6.1. Action sur le poisson

Après 12 jours de contact avec L.melanogaster à 100 ppm (100mg/l) de la poudre de B.sphaericus 1593-4, nous n'avons obtenu aucune mortalité.

### III.6.2. Action sur les larves de Toxorhynchites

Le test de sensibilité des larves de T.amboinensis a été effectué avec 26 larves de stade 2 et 3 placées individuellement dans 26 gobelets. Quatre larves ont ainsi été placées dans 4 gobelets-témoins.

Des larves de 3ème et 4ème stade de C.pipiens ont été soumises à une suspension (DL 90 = 0,02 ppm) de B.sphaericus 1593-4. Après 48 h de contact, deux à trois larves, parmi lesquelles se trouvent des moribondes, sont fournies chaque jour à chaque larve de T.amboinensis.

Après 45 jours, nous n'avons obtenu aucune mortalité parmi les larves de T.amboinensis qui ont ensuite atteint le stade nymphal, et sont devenues adultes. Cette longue durée (45 jours) est expliquée par la petite quantité de proies qui ont été données à chaque larve de T.amboinensis.

Ces résultats confirment une fois de plus l'innocuité de B.sphaericus sur la faune non-cible et sa grande spécificité.

## IV - Discussion

Des travaux (Sinègre et al, 1980 ; Ramoska et Hopkins, 1981 ; Bourgoïn, 1981 ; Dagnogo et Coz, 1982) ont démontré la forte sensibilité de Culex, la moyenne sensibilité d'Anopheles et la moindre sensibilité d'Aedes à B.sphaericus. C'est dans le même sens que nous confirmons cette différence de sensibilité dans l'ordre suivant : C.pipiens, An.stephensi et Ae.aegypti tandis qu'Ae.caspius n'est pratiquement sensible au bacille.

Généralement, l'activité des produits classiques suit une loi gaussio-logarithmique ; cela signifie que le probit de mortalité est une fonction linéaire du logarithme de la dose pour un temps donné.

Dans ce travail, tous nos résultats ont été analysés d'après cette loi gaussio-logarithmique. En effet, la complexité de l'interprétation est peut-être due à la double localisation de la toxine (paroi et cytoplasme cellulaire) (Myers et Yousten, 1980). Elle pose le problème de l'importance relative de ces localisations. Cette intoxication ne serait pas rapide, mais elle provoquerait peut-être une lésion des organes vitaux entraînant la mortalité dans un deuxième temps (Kellen et al., 1965 ; Davidson, 1979).

L'ordinateur nous a le plus souvent donné des  $\chi^2$  significatifs ; ceux-ci pour les droites de régression, semblent indiquer que la relation mortalité-dose est difficilement ajustable à une sigmoïde. Faute de meilleur modèle à proposer, nous avons toutefois exploité tous nos résultats suivant cette méthode. Elle nous permet de déterminer, au moins approximativement, les DL 50 et leurs intervalles de confiance.

Il s'agit, rappelons-le, d'un produit standard théoriquement destiné à être comparé à des produits de titre inconnu. La complexité de son activité, qui se produit par exemple par cette mortalité observée uniquement après 48 heures, semble indiquer qu'il s'agit d'une sorte d'intoxication chronique ou de dégénérescence de certains organes vitaux pour les larves.

Dans les essais sur C.pipiens, il ne nous a pas paru possible de mettre nettement en évidence une relation entre le nombre des larves testées et la précision des DL 50 obtenues par rapport au test considéré comme le meilleur (400 larves par concentration, pour 5 concentrations). Ainsi, il apparaît que, pour les quatre protocoles effectués, la dispersion des DL 50 sur effectifs restreints (50, 100, 150 et 200 larves par concentration, Fig. 3) est sensiblement du même ordre.

Contrairement au cas précédent, la représentation graphique d'An.stephensi (Fig. 4) montre que, plus le nombre de larves augmente, plus les DL 50 observées se resserent autour de la DL 50 supposée la meilleure (400 larves par concentration).

Les résultats obtenus, sur la sensibilité des quatre stades larvaires de C.pipiens et sur les trois derniers stades d'An.stephensi, nous indiquent que les stades 1 et 2 sont beaucoup plus susceptibles que les stades 3 et 4, ce qui correspond aux résultats de Pillai (1981), Ramoska et al. (1977). A notre avis, il est préférable d'utiliser le 3ème stade larvaire pour ces deux espèces au cours des expériences, car l'action de B.sphaericus est lente et nécessite de poursuivre les expériences jusqu'à 72 h, la mort n'apparaissant qu'après un long temps d'observation, tandis que l'utilisation du stade 4 entraînerait une nymphe importante. Or, il est indispensable de décompter les nymphes lorsqu'on évalue l'activité d'un insecticide actif par ingestion, car les nymphes ne se nourrissent pas.

L'analyse de l'influence du temps de contact de C.pipiens sur la

mortalité nous amène à la réflexion suivante : après 4 h de contact et 44 h de mise en survie dans l'eau pure, nous observons une mortalité de même ordre que celle obtenue avec un contact continu de 48 h . Cette observation, bien que légèrement différente, va dans le même sens que celle de Faye (1981). Cet auteur notait que les mortalités après une heure de contact différaient peu de la mortalité au bout de 48 h. Les différences observées sont peut-être dues à des présentations différentes de B.sphaericus lui-même : poudre "Stauffer" dans les travaux de Faye, poudre lyophilisée (Institut Pasteur) dans nos expériences.

Reste à connaître l'innocuité de B.sphaericus pour l'homme et la faune non-cible, puisque nous cherchons toujours à trouver un produit non toxique pour ces derniers. En fait, de nombreux travaux (Mulligan et al., 1978 ; de Barjac et al., 1979 ; O.M.S., 1979) ont prouvé qu'aucun symptôme pathologique ni aucune mortalité ne se produisait, et toutes les recherches de toxicité aiguë ont été négatives, quelque soit la voie utilisée.

La souche expérimentée correspond à B.sphaericus 1593-4 ; elle n'a provoqué ni signe pathologique, ni mortalité sur le poisson Limia melanogaster et sur les larves prédatrices de Toxorhynchites amboinensis, ce qui tend à indiquer pour B.sphaericus une grande spécificité larvicide dans la lutte antivectorielle.

#### V - Conclusion

De ces travaux sur B.sphaericus, souche 1593-4, nous déduirons principalement :

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

- Le titrage biologique de ce bacille en formulations expérimentales va se heurter à de sérieuses difficultés d'interprétations, si nous analysons les résultats d'après la loi gaussienne-logarithmique normalisée pour les insecticides classiques. Nos essais ne suivent pas cette loi ; il sera indispensable de normaliser le plus possible tous les paramètres intervenant dans l'expérimentation.

- Etant donné la plus forte sensibilité des stades 1 et 2, nous estimons qu'il est préférable d'utiliser le 3ème stade larvaire au cours de l'expérience.

- Son innocuité sur les poissons et les larves prédatrices de Toxorhynchites, offre une fois de plus le choix dans le cadre d'une lutte à grande échelle contre plusieurs espèces de vecteurs. Cependant, la possibilité de recyclage de cette bactérie (Hertlein et al., 1979) et la première isolation d'un processus toxique de B.sphaericus (Tinelli et Bourgouin, 1982) augmentent considérablement son intérêt.

L'expérimentation doit encore être poursuivie, notamment les expériences sur le terrain pour évaluer avec plus de précision son efficacité et contrôler le recyclage naturel.

## **CHAPITRE 2**

ACCELERATION DE LA TOXICITE  
LARVICIDE DE B.SPHERICUS SUR  
C.PIPIENS PAR L'INGESTION DES  
CADAVRES, BROYES, INTOXIQUES  
PAR CE BACILLE

ACCELERATION DE LA TOXICITE LARVICIDE DE B.SPHERICUS  
SUR C.PIPIENS PAR L'INGESTION DES CADAVRES BROYES,  
INTOXIQUES PAR CE BACILLE

I - Généralités

La toxicité de B.sphaericus n'est pas due à la digestion d'un cristal parasporal (Singer, 1973 et 1974 ; Myers et Yousten, 1978 et 1980) mais est en relation avec des phénomènes digestifs plus complexes dans l'intestin de la larve qui libèrent la ou les toxines à partir des différents constituants du bacille "paroi cellulaire, spores" (Myers et al., 1979 ; Singer, 1980 ; Davidson, 1981b). Cette toxine n'est pas libérée ou sécrétée en milieu de culture par le bacille (Davidson et Sweeney, 1983).

Les larves tuées par les constituants de B.sphaericus possèdent donc une certaine quantité de toxine libérée dans leur tube digestif et peut-être une seconde génération des spores, très toxiques pour d'autres larves (Davidson et al., 1975).

Il nous a paru intéressant de voir si cette toxine libérée, ou cette seconde génération, étaient directement actives sur des larves saines de C. pipiens, et dans l'affirmative, d'en mesurer la toxicité. C'est dans ce but que nous avons étudié l'activité larvicide de cadavres de larves stade 3 de C.pipiens tuées par B.sphaericus, souche 1593-4.

II - Matériel et méthodes

Tous les tests ont été réalisés sur les larves du 3ème stade de C.pipiens, placées à 25 ± 1°C dans des gobelets contenant, selon le cas, 75 ou 150 ml d'eau permutée.

II.1. Technique de l'obtention des cadavres

Les cadavres ont été obtenus après soumission de larves saines à une concentration de 0,02 à 0,03 ppm d'une poudre de B.sphaericus 1593-4, ce qui correspond à une DL 90 et DL 100 après 48 h de contact.

Les cadavres ont ensuite été laissés 2 à 3 jours dans l'eau permutée ; ils ont enfin été lavés et broyés à l'aide d'une baguette de verre, dans une salière, où se trouvait une petite quantité d'eau. Ce broyat a été ajouté à l'eau permutée des gobelets dans lesquels se trouvaient des larves saines.

Nous avons cherché à préciser l'importance du rôle de ces cadavres dans la persistance de l'activité de B.sphaericus par plusieurs essais qui sont schématisés dans les figures (5 et 6).

Par ailleurs, des cadavres, après lavage à l'eau, ont été laissés dans des cristallisoirs (200 larves mortes dans chacun contenant 3 litres d'eau permutée) ; le niveau de l'eau a été maintenu constamment au cours de l'expérience. Des séries de tests ont ensuite été effectués au cours des jours suivants : 24h, 48h, 72h, 5j, 8j, 12j, 17j, 20j, 1 mois, 1 1/2 mois, 2 mois, 2 1/2 mois et 3 mois. Nous utilisons des lots de 20 larves saines qui ont été mises en contact avec 20 cadavres broyés (100 larves saines réparties dans 5 gobelets à chaque test) .

#### II.2. Ultrafiltration des broyats

Des larves tuées par le bacille, de la même manière que précédemment, ont été lavées et broyées avec une petite quantité d'eau permutée ; les broyats ont ensuite été ultrafiltrés à l'aide d'un filtre stérile Scheider et Schüll à pores de 0,45 µm.

#### II.3. Culture en milieu M.B.S.

Le broyat des larves, tuées par B.sphaericus et maintenues 48 h dans l'eau permutée, a été cultivé en milieu dit M.B.S., utilisé par Kalfon et al. (1983). Cette culture est incubée pendant 48 h à 30°C, avec agitation.

De la même manière que précédemment, des broyats de cadavres maintenus trois mois dans l'eau permutée ont été aussi mis en culture.

### III - Résultats

#### III.1. Accélération de l'activité larvicide due aux cadavres broyés

Une certaine mortalité est observée après 8 et 10 heures parmi les larves saines en contact avec le broyat des cadavres ; elle atteint 90 % et 99 % après respectivement 20 et 24 heures. Ce niveau de mortalité

ne peut être obtenu qu'après 48 heures avec l'emploi de la poudre de B.sphaericus 1593-4 à la concentration de 0,02 mg/l (Tab.17).

La figure (7) montre que le pouvoir larvicide de ce broyat est beaucoup plus rapide que celui de la poudre du bacille. Toutefois, les cadavres restant un certain temps dans l'eau, cette toxicité plus rapide pourrait être due à une multiplication du bacille à l'intérieur des cadavres.

### III.2. Rémanence du broyat

L'activité du broyat des larves tuées par B.sphaericus persiste nettement dans l'eau pendant 10 jours (Tab.18), tandis que la répétition du broyage des larves mortes à chaque lecture (24 ou 48 h) a donné un résultat moins favorable, étant donné que la durée pendant laquelle se manifeste la baisse de toxicité est d'une semaine (Tab.19).

### III.3. Ultrafiltration et pouvoir larvicide

Après ultrafiltration d'un broyat de cadavres, le filtrat a été mis en contact avec des larves saines. Aucune mortalité parmi ces larves n'a été obtenue. Par contre, une mortalité importante, provoquée par le résidu du broyat après l'ultrafiltration (Tab. 20) a été observée.

### III.4. Potentiel larvicide de la culture du broyat

La culture des broyats de cadavres (maintenus de 48 h à 3 mois dans l'eau permutée) en milieu M.B.S., a donné approximativement 50 % de cellules végétatives et 50 % de spores de B.sphaericus.

La DL 50 de cette culture, en contact avec des larves du 3ème stade de C.pipiens pendant 48 heures, est de l'ordre de  $0,5 \cdot 10^{-5}$  et de  $0,44 \cdot 10^{-5}$  respectivement pour les cadavres maintenus 48 h et trois mois. Ces résultats confirment que ce bacille à l'intérieur des cadavres, non seulement reste viable pendant 3 mois, mais également garde sa potentialité larvicide ( Tab. 21 ).

### III.5. Rémanence d'un pouvoir larvicide dans les cadavres

Des essais préliminaires, avec des broyats de larves tuées par B.sphaericus (0,02 ppm) maintenues dans l'eau, ont été effectués au bout de quelques jours. Une certaine mortalité a été observée parmi

Tableau 17 : Evolution et comparaison de la mortalité des larves stade 3 de C.pipiens après exposition aux broyats des cadavres de larves et à des concentrations de 0,006 et 0,002 ppm de la poudre de B.sphaericus 1593-4 pendant un temps donné.

L.M. : Nombre de cadavres de larves broyées par gobelet

L.S. : Nombre de larves saines par gobelet

h. : temps de contact "heure"

temps "h" Nature des lots	Effectif total des larves testées	Mortalité %				
		3h	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 ppm	120	-	-	3	10	45
DL 90 = 0,02 ppm	120	-	-	26	41	95
Témoin	100	0	0	0	0	1

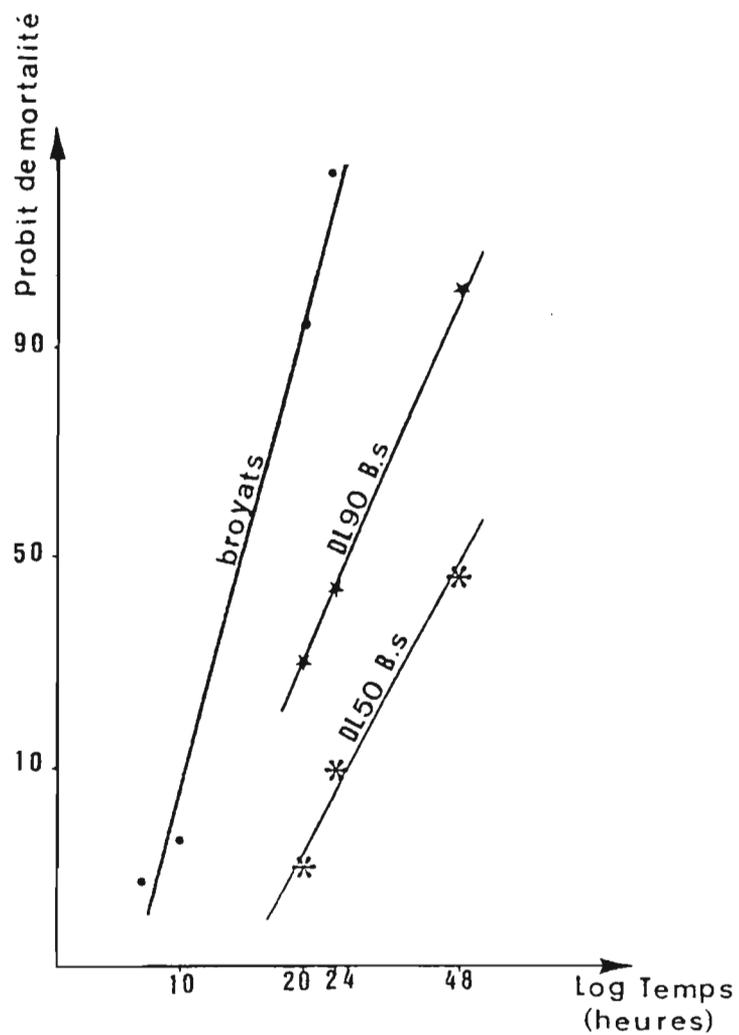


Fig 7 : Sensibilité des larves de C.pipiens stade 3 soumises aux broyats de cadavres et à la poudre de B.sphaericus 1593-4.  
(DL 50 = 0,006 ppm ; DL 90 = 0,02 ppm)





Tableau 20 : Comparaison de la mortalité provoquée par un filtrat et un broyat non filtré sur le 3ème stade larvaire de C.pipiens.

Nature des lots Temps "h"	Effectif total des larves testées	Mortalité %				
		16h	24h	72h	4j	5j
Filtrat de 10 cadavres broyés + 20 larves saines	120	0	0	0	0	0
Filtrat de 20 cadavres broyés + 20 larves saines	120	0	0	0	0	0
Broyat non filtré de 10 cadavres + 20 larves saines	160	83,3	100	-	-	-
Broyat non filtré de 20 cadavres + 20 larves saines	160	92,5	99	-	-	-
Témoin	100	0	0	0	0	0

Tableau 21 : Taux de mortalité des larves stade 3 de C.pipiens en contact avec une suspension de la culture du bacille du broyat des cadavres maintenus 48h et 3 mois dans l'eau permutée.

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			$0,5 \cdot 10^{-5}$			$0,44 \cdot 10^{-5}$	
$\chi^2$			1,24 N.S			23,75 S	
Imprécision de DL 50			6 %			71 %	

les larves testées pendant cette durée. Il nous a paru intéressant de savoir si le maintien des cadavres dans l'eau, pendant longtemps, donne le même résultat.

Les essais utilisant le broyat de 20 cadavres en contact avec 20 larves saines de C.pipiens (l'effectif total des larves testées est de 100 larves saines réparties dans 5 gobelets) ont duré pendant 3 mois. Les résultats sont les suivants :

-	Taux de mortalité avec des cadavres dès le départ	.....	6 %		
-	"	"	après 24 h	.....	75 %
-	"	"	après 48 h	.....	99,4 %
-	"	"	après 72 h	.....	99,4 %
-	"	"	après 5 j	.....	99,4 %
-	"	"	après 12 j	.....	99,4 %
-	"	"	après 17 j	.....	83 %
-	"	"	après 20 j	.....	80 %
-	"	"	après 1 mois	.....	90 %
-	"	"	après 1 1/2 mois	...	99,3 %
-	"	"	après 2 mois	.....	95 %
-	"	"	après 2 1/2 mois	...	93 %
-	"	"	après 3 mois	.....	85 %

La figure (8) représente l'évolution de la toxicité du bacille qui se trouve à l'intérieur des cadavres en fonction du temps. Cette toxicité a toujours provoqué une mortalité importante parmi les larves testées. Malgré la petite diminution de la toxicité entre 12 jours et un mois, le pouvoir larvicide reste maintenu puisque après 1,5 mois les taux de mortalité observés sont comparables à ceux obtenus entre 24 h et 12 jours.

#### IV - Discussion

L'activité larvicide du bacille dans le broyat des cadavres est beaucoup plus rapide que celle de la poudre du bacille même. La multiplication du bacille chez les larves mortes engendrant une seconde génération (Davidson et al., 1975 ; Davidson, 1982b) pourrait être à l'origine de cette toxicité.

La multiplication du bacille, après ingestion par la larve, n'est pas nécessaire à la pathologie (Davidson et al., 1975). La toxicité est occasionnée par une libération de toxine (Myers et al., 1979 ;

PROBIT DE MORTALITE

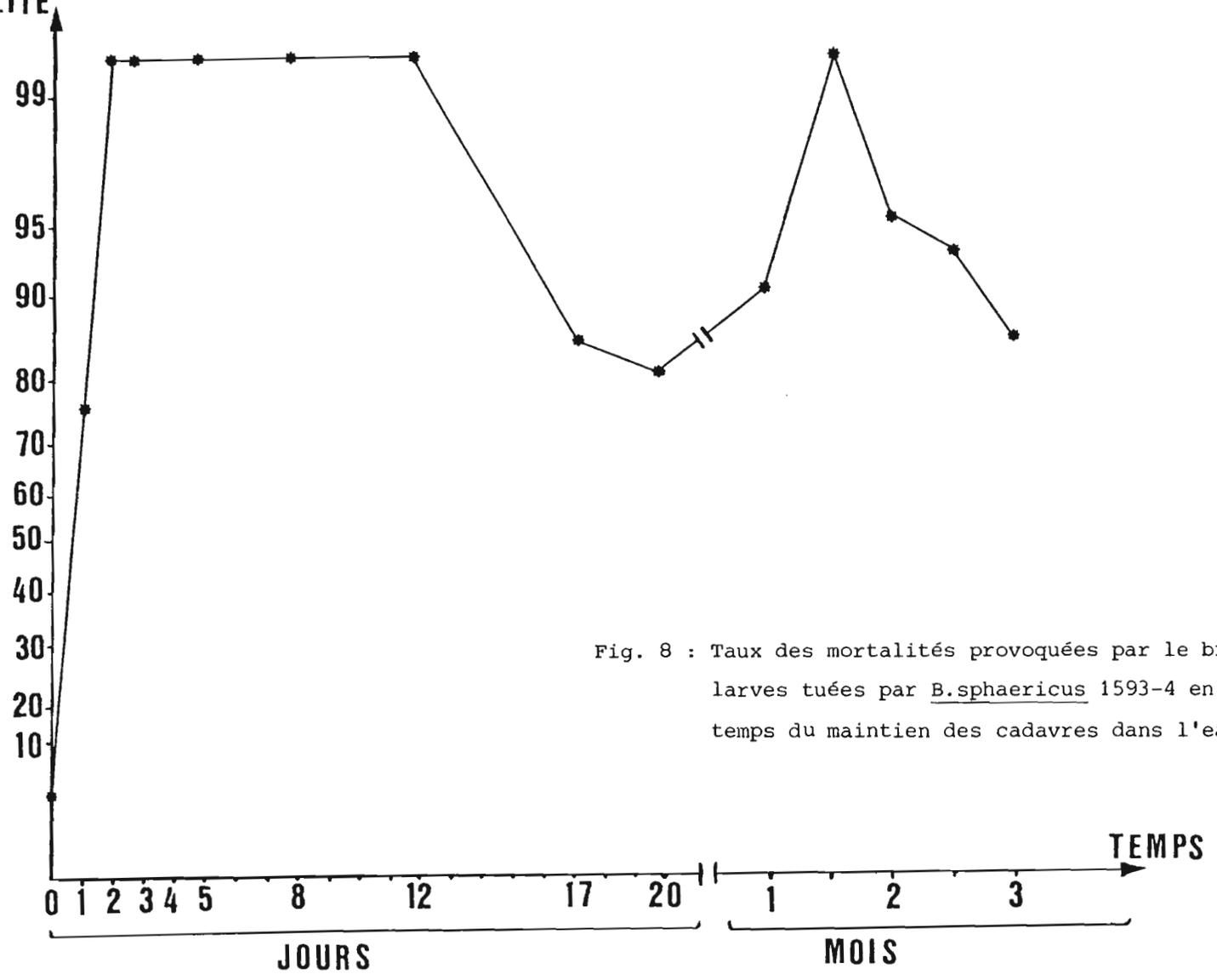


Fig. 8 : Taux des mortalités provoquées par le broyat des 20 larves tuées par B.sphaericus 1593-4 en fonction du temps du maintien des cadavres dans l'eau permutée

Singer, 1980 ; Davidson, 1981b). Cette toxicité plus importante observée lors de l'emploi de cadavres serait due à la présence de toxine libérée lors de la première utilisation du bacille sans que nous puissions toutefois éviter l'hypothèse de la seconde génération associée avec la toxine. Cette toxine n'est pas sécrétée dans le milieu de culture (Davidson et Sweeney, 1983).

Nos essais d'ultrafiltration font apparaître d'une part, que le produit toxique n'est pas soluble dans l'eau, les extraits des spores moins toxiques que les spores mêmes contenant une toxine soluble fractionnable par le sulfate d'ammonium, (son poids moléculaire est de 100000 dalton) (Davidson, 1982a), et d'autre part, que les particules toxiques sont trop importantes pour passer le filtre millipore. Les poids moléculaires de la toxine extraite par Na OH de la souche 1593 sont voisins de 35 000 et 54 000 dalton (Davidson, 1983).

Les spores de B.sphaericus sont restés viables pendant 9 mois dans le lieu du traitement (Hertlein et al., 1979 ; Singer, 1980). Ils ne sont visiblement pas dégradés dans le tube digestif des larves, et une germination a été observée (Davidson, 1981b). Cependant, la toxine pourrait être libérée par l'action des protéases dans le tube digestif (Myers et al., 1979). En effet, B.sphaericus 1593-4 est resté viable à l'intérieur des cadavres pendant trois mois lors de leur séjour dans l'eau permutée sous les conditions du laboratoire. Son activité larvicide reste également importante, même pour les cultures des broyats, dès le début et au bout de trois mois; leur DL 50 sont comparables et présentent un pouvoir larvicide important.

Les résultats observés viennent peut-être étayer l'hypothèse du recyclage de B.sphaericus. Il pourrait se produire dans une décomposition progressive des cadavres ou par le phénomène de nérophagie, libérant une ou plusieurs nouvelles générations du bacille, qui s'y sont déjà multipliées.

## V - Conclusion

Le caractère le plus remarquable est la rapidité obtenue avec le broyat des cadavres (mortalité 99 % après 24 h de contact avec des larves saines), deux fois plus importante que celle observée avec la poudre du bacille (mortalité 95 % à 0,02 ppm, après 48 h de contact). Cette toxicité du broyat garde son pouvoir larvicide pendant trois mois

lors du maintien des cadavres dans l'eau.

Le bacille, à l'intérieur des cadavres, restant viable et actif pendant trois mois, serait responsable directement ou indirectement de cette toxicité accélérée.

Le rôle de la décomposition progressive doit être pris en compte dans le phénomène du recyclage. En d'autres termes, la libération échelonnée du bacille par les larves tuées, dans un gîte larvaire traité, pourrait expliquer ce phénomène de réinfestation de larves saines.

Le recyclage pourrait donc dépendre non seulement de la dose du bacille utilisée au départ, mais également du pourcentage de mortalité, c'est-à-dire du nombre de larves tuées par le bacille.

Ces hypothèses ne contribuent que très partiellement à la connaissance du maintien ou du recyclage de B.sphaericus dans les conditions naturelles ; de nombreuses études sont indispensables avant d'amener à une compréhension satisfaisante des phénomènes que nous avons observés.

## **CHAPITRE 3**

EVALUATION ET PERSISTANCE, EN  
GITE NATUREL, DE L'ACTIVITE  
LARVICIDE DE B.SPHERICUS SUR  
C.PIPIENS

EVALUATION ET PERSISTANCE, EN GITE NATUREL,  
DE L'ACTIVITE LARVICIDE DE B.SPHAERICUS SUR C.PIPIENS

I - Généralités

A l'heure actuelle, l'importance de B.sphaericus vient du fait que ce bacille a, d'une part une activité résiduelle sans doute occasionnée par un recyclage mentionné par les travaux de (Hertlein et al., 1979 ; Singer, 1980), et d'autre part la mise au point de plusieurs préparations à base de B.sphaericus susceptibles de détruire efficacement et sélectivement les larves de Moustiques (Singer, 1980).

Cependant, la persistance dans les gîtes larvaires devrait pouvoir être améliorée par la mise au point de nouveaux produits plus performants (Lacey, 1982).

Des poudres ont été élaborées, tout d'abord au laboratoire puis au niveau industriel, comme par exemple la poudre "Stauffer".

B.sphaericus répond peut-être mieux au problème de nuisance urbaine due au Culex pipiens quinquefasciatus, en Afrique de l'Ouest, tandis que B.thuringiensis H 14 ne constitue pas un larvicide idéal pour le traitement des gîtes larvaires de ce moustique dans cette zone (Hougard et al., 1983).

II - Matériel et méthodes

II.1. Traitement des mares

Les traitements des gîtes larvaires à Culex pipiens ont eu lieu aux mois de juillet-août et début septembre 1983. Ces gîtes sont constitués par des mares artificielles situées dans la région de Bondy (France).

Nous avons utilisé une seule dose de 160 mg par mètre carré d'une poudre de B.sphaericus 1593-4, pour tous nos traitements.

Les critères des mares sont les suivants :

Mare 1 : - Faune : Culex pipiens à tous les stades larvaires

- Densité de population : forte
- Température de l'eau : 21°C
- Qualité de l'eau : Polluée ; forte teneur en matière organique
- Profondeur : 20 à 50 cm
- Couvert végétal : Important ; constitué d'arbres
- Surface : 7 m<sup>2</sup>

Deux traitements ont été effectués, les 19 juillet et 16 août 1983.

Des Arthropodes ont été trouvés et déterminés dans ce gîte :

Crustacés	}	- Daphnies .....	forte densité	
		- Cyclops .....	moyenne densité	
Diptera	}	Chironomidae	- Chironomes .....	faible densité
		Culicidae	- <u>Aedes vexans</u> .....	très faible densité
	- <u>Culiseta annulata</u> ....		forte densité (= <u>Theobaldia annulata</u> )	

Mare 2 : - Faune : Culex pipiens, à tous les stades larvaires

- Densité de population : moyenne
- Température de l'eau : 20°C
- Qualité de l'eau : teneur moyenne en matière végétale
- Profondeur : 15 à 50 cm
- Semi-sombre : pommiers sur un seul côté
- Surface : 5 m<sup>2</sup>

Deux traitements ont été effectués, les 10 et 22 août 1983.

Les Arthropodes trouvés dans ce gîte sont déterminés comme suit :

Crustacés	}	- Daphnies .....	moyenne densité	
		- Cyclops .....	faible densité	
Diptera	}	Chironomidae	- Chironomes.....	faible densité
		Culicidae	- <u>Anopheles maculipennis</u> .	faible densité
	- <u>Culiseta annulata</u> .....		moyenne densité	

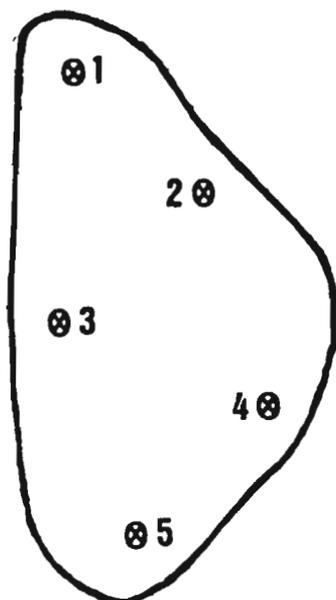
Mare 3 : - Faune : Culex pipiens

- Densité de population : faible
- Température de l'eau : 18°C
- Qualité de l'eau : douce
- Profondeur : 30 à 55 cm
- Surface : 3 m<sup>2</sup>

Un seul traitement a eu lieu : le 29 août 1983.

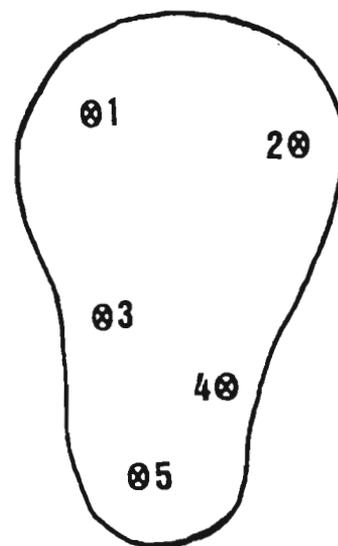
## II.2. Formulation et doses utilisées

Une seule dose de 160 mg/m<sup>2</sup> d'une poudre de B.sphaericus, souche 1593-4, a été utilisée, pour tous nos essais, soit environ 10 fois plus que la DL 50 observée au laboratoire sur le 3ème stade larvaire de C.pipiens.



Forte teneur en  
matière organique

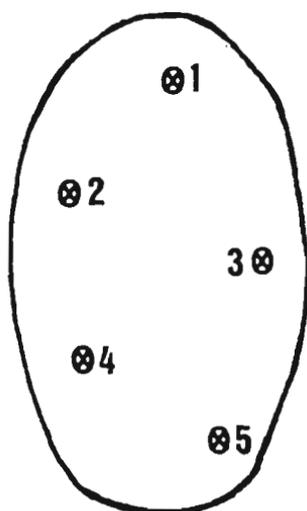
mare.1. - (S = 7m<sup>2</sup>)



Teneur moyenne en  
matière végétale

mare.2. - (S = 5m<sup>2</sup>)

Eau douce



mare.3. - (S = 3m<sup>2</sup>)

⊗: prélèvement effectué

### II.3. Contrôle des mares

Des essais ont été réalisés au laboratoire afin de poursuivre l'évaluation de l'activité résiduelle du bacille dans les gîtes.

#### II.3.1. Sensibilité comparée de C.pipiens des mares et de C.pipiens (souche Montpellier) maintenu en élevage

Le but de cette comparaison avant traitement est de connaître la sensibilité au bacille des larves des gîtes naturels et de celles d'élevage, dans les conditions du laboratoire. Cela permettrait d'utiliser les larves d'élevage dans des tests avec l'eau des gîtes, après traitement avec B.sphaericus, pour évaluer l'activité résiduelle du bacille.

Les tests sont réalisés selon la méthode décrite dans le chapitre 1.

#### II.3.2. Surveillance de la réapparition des nymphes et de l'éclosion des oeufs

Au cours du contrôle des gîtes larvaires traités, nous effectuons chaque jour, des prélèvements pour préciser la première réapparition de larves puis de nymphes ; nous agitions l'eau des gîtes après chaque prélèvement. Des oeufs sous forme de barquettes étaient prélevés à la surface de la mare, avec de l'eau. Ils étaient ensuite déposés dans des gobelets placés dans les conditions du laboratoire. En parallèle, des oeufs (barquettes) d'élevage étaient utilisés comme témoins.

#### II.3.3. Essais biologiques au laboratoire

Après le traitement, des prélèvements d'eau des gîtes larvaires étaient ramenés au laboratoire. Cette eau était testée avec des larves stades 3 et 4 jeune de C.pipiens provenant de notre élevage. Ensuite, après la lecture de mortalité (48h), chaque test a été prolongé jusqu'à l'observation, soit de la première nymphe, soit de la mortalité totale des larves.

Cette étude a été faite pour évaluer l'éventuelle activité résiduelle du bacille dans les gîtes larvaires naturels.

### III - Résultats

Une mortalité totale (100 %) des larves de C.pipiens a été observée pendant les trois jours qui suivent le début du traitement des 3 mares.

Nous avons poursuivi l'étude des mares jusqu'à la réapparition des premières nymphes, ceci afin de rechercher un éventuel recyclage de la bactérie.

### III.1. Contrôle de la réapparition des larves ou des nymphes

Des jeunes larves de C.pipiens stades 1 et 2 ont commencé à réapparaître après une semaine dans la mare 1 à l'eau polluée, tandis que cette réapparition a eu lieu après cinq jours dans la mare 2, et 3 jours dans la mare 3.

Mare 1 : Les prélèvements réalisés chaque jour montrent que, les jeunes larves se trouvent en faible densité et ce n'est qu'après 20 jours, que les nymphes réapparaissent mais en très faible nombre.

Les observations suivantes indiquent une importante mortalité parmi les jeunes larves réinstallées au bout d'une semaine ; c'est sans doute la raison pour laquelle nous n'avons trouvé que très peu de larves pendant les 20 jours qui ont suivi le traitement. Cependant, la densité larvaire de C.pipiens est redevenue quasi normale après trois semaines.

Mare 2 : Les jeunes larves s'installent après cinq jours, en densité moyenne ; la réapparition des nymphes commence à partir du douzième jour qui suit le traitement. Une faible mortalité parmi les jeunes larves a été observée pendant les 12 jours.

Mare 3 : Dans cette mare d'eau claire, la réinstallation des jeunes larves a commencé tôt (après trois jours), avec une faible densité comparable à ce qu'il y a eu avant le traitement. Parmi ces jeunes larves nous observons une faible mortalité ; les larves survivantes continuent normalement leur vie.

Ces résultats montrent, d'une part, l'importance de la qualité de l'eau (mare 1 à l'eau polluée, mare 2 à l'eau moyennement polluée, mare 3 à l'eau claire), et d'autre part, la grande mortalité des larves de C.pipiens dans la mare 1 ; ces larves mortes tombées au fond du gîte contribueraient à une certaine mortalité parmi les larves nouvellement écloses ; les larves tuées par B.sphaericus possèdent une seconde génération de spores très toxiques pour d'autres larves (Davidson et al., 1975).

### III.2. Sensibilité au bacille de C.pipiens du gîte larvaire et de l'élevage

La sensibilité à B.sphaericus 1593-4 des larves stades 3 et 4 jeune de C.pipiens provenant de la mare ou de l'élevage, est relativement comparable, notamment pour celles provenant de la mare 1 à l'eau polluée (Tab.22, Fig.9). Cette sensibilité est également identique en testant les larves de la mare 2 et celles de l'élevage dans l'eau permu-tée ou dans l'eau de mare ( Tab.23).

Ces données nous ont permis d'utiliser les larves stades 3 et 4 jeune provenant de notre élevage lors de nos essais de contrôle au labora-toire.

### III.3. Essais au laboratoire

Ces expérimentations se sont déroulées pendant la surveillance des gîtes larvaires traités en pleine nature. En fait, nous consacrons aus-si cette étude à la recherche d'une méthode qui, nous l'espérons, con-tribuera à améliorer les techniques de contrôle des gîtes larvaires.

C'est dans ce but que nous avons réalisé des tests dans les condi-tions de laboratoire, avec des larves d'élevage et de l'eau des mares traitées. Cela nous permet de plus d'évaluer l'activité résiduelle lar-vice de B.sphaericus dans les gîtes.

Dans la première série d'essais (un test à chaque jour de prélève-ment) sur la mare 1, nous constatons une mortalité importante dès les pre-miers jours qui suivent le traitement. Cette mortalité diminue progres-sivement dans les tests suivants ; l'activité résiduelle du bacille dans l'eau de la mare se poursuit pendant deux semaines, selon les tests ef-fectués (Fig.10).Cependant, toutes les larves trouvées survivantes après la lecture sont laissées jusqu'au stade nymphal (ou mortalité totale). Les nymphes ont commencé à apparaître parmi les larves testées (Tab.24) 10 jours après le traitement.

Une certaine mortalité a été observée parmi les larves testées a-vec l'eau de la mare 2, mais le résultat du test effectué 6 jours après le traitement a été nul, ainsi que celui du septième jour (Tab. 25).

Ces résultats ne confirment pas la réussite totale de ces es-sais biologiques dans le contrôle des gîtes larvaires traités. Toute-fois, les stades 3 et 4 jeune de C.pipiens utilisés dans cette expéri-mentation pourraient être moins sensibles à l'action du bacille que les

Tableau 22 : La sensibilité à B. sphaericus comparée après 48 heures de contact entre les larves stades 3 et 4 jeune de C. pipiens de la Mare 1 et celles provenant de notre élevage.

	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
$\chi^2$	11,754 S.	2,356 N.S.	7,379 N.S.	8,488 S.
Imprécision de DL 50	35 %	14 %	19 %	20 %

Tableau 23 : La sensibilité à B.sphaericus, comparée après 48 heures de contact entre les larves stades 3 et 4 jeunes de C. pipiens de Mare 2 et celles provenant de notre élevage

	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
$\chi^2$	1,133 N.S.	7,229 N.S.	2,136 N.S.	8,488 S.
Imprécision de DL 50	76 %	36 %	97 %	20 %

S : Significatif

N.S : Non significatif

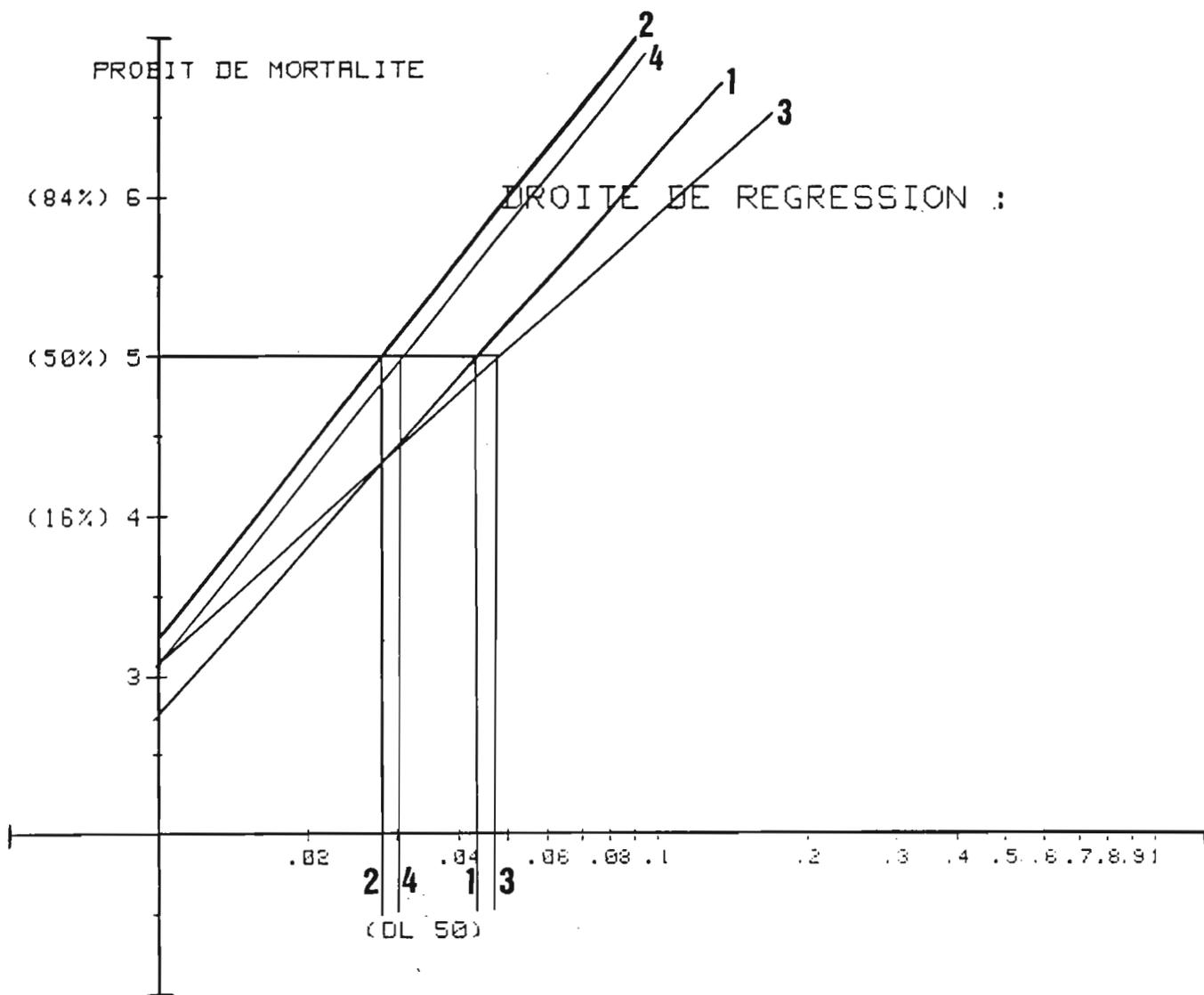


Fig. 9 : Sensibilité à *B.sphaericus*, comparée entre les larves stades 3 et 4 jeune du gîte larvaire (mare 1) et celles d'élevage, après 48 h de contact.

- 1 : Larves d'élevage testées dans l'eau permutée
- 2 : Larves de mare testées dans l'eau permutée
- 3 : Larves d'élevage testées dans l'eau de la mare
- 4 : Larves de mare testées dans l'eau de la mare

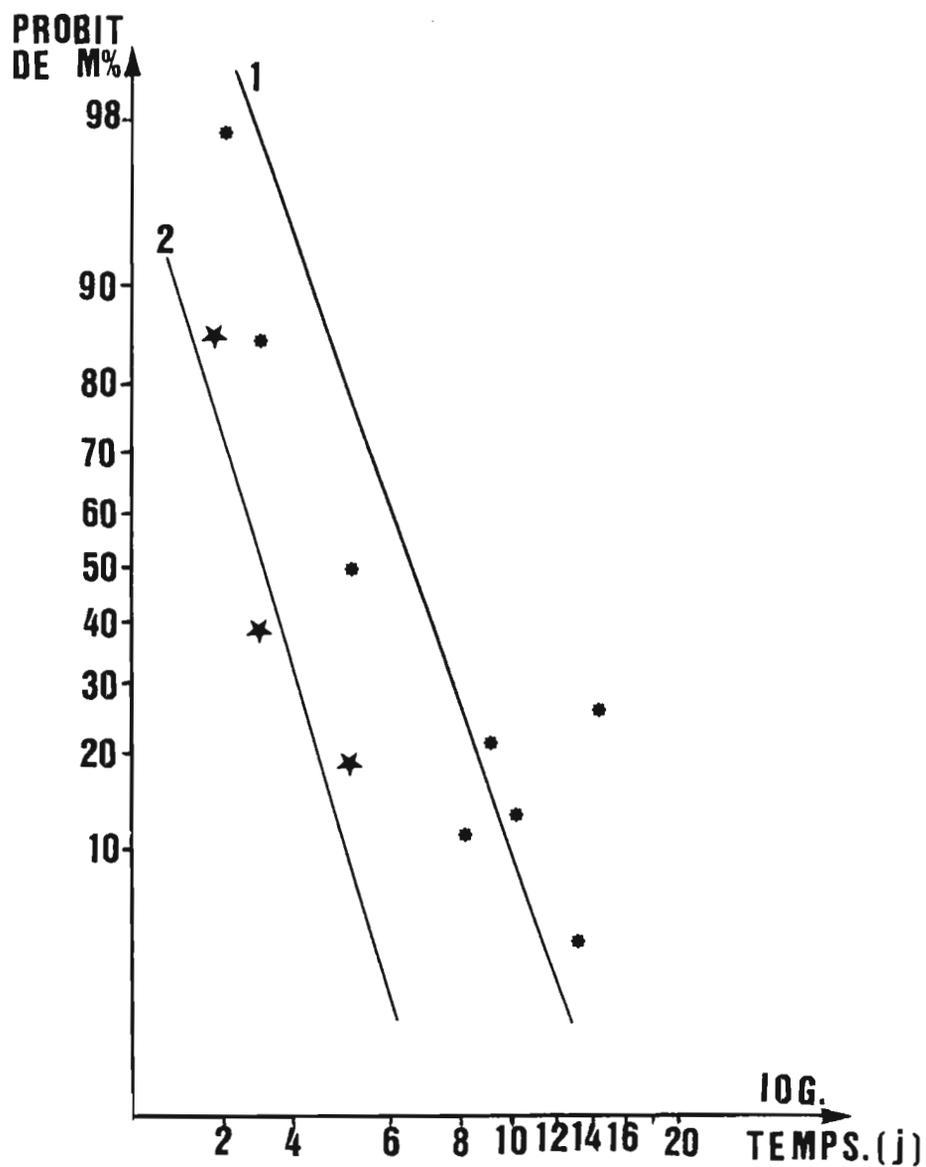


Fig. 10 : Activité résiduelle de *B.sphaericus*, en fonction du temps dans la mare 1 et 2, testée avec des larves stades 3 et 4 jeune de *C.pipiens* du laboratoire. Résultats des tests effectués après le premier traitement.

Chaque point représente une lecture après 72 h de contact à chaque test.

1 : mare (1)

2 : mare (2)

Tableau 24 : Résultats des tests effectués avec l'eau du gîte larvaire (mare 1) après le traitement du 19 juillet, avec des larves stades 3 et 4 jeune de C. pipiens du laboratoire

Dates des tests effectués après traitement	Mortalité %				
	24 h	48 h	72 h	4 j	5 j
2ème jour- 21/07	51,2	82,9	97,6		51,6
3ème jour- 22/07	48	82,3	84,3	94,1	
5ème jour- 24/07	14,3	38,8	49,2	74,6	
8ème jour- 24/07	1,3	4,1	11		
9ème jour- 28/07	7,8	10,2	21	31,7	
10ème jour- 29/07		3,4	12,6	34,4	
13ème jour- 01/08			4,1	15,1	
14ème jour- 02/08	6,5	9	26,5		
16ème jour-04/08	0	0	0	0	

Tableau 25 : Résultats des tests effectués avec l'eau du gîte larvaire (mare 2) après le traitement du 10 août, avec des larves stades 3 et 4 jeune de C. pipiens du Laboratoire

Dates des tests effectués après traitement	Mortalité %		
	24 h	48 h	72 h
2ème jour- 12/08	44,5	79,3	85
3ème jour- 13/08	21,3	34,6	38,4
5ème jour- 15/08	4	16,3	19,2
6ème jour- 16/08	0	0	0
7ème jour- 17/08	0	0	0

stades 1 et 2, trouvés dans les gîtes. Notons que, nous avons observé une plus forte sensibilité des stades 1 et 2 (chapitre 1). Il aurait été souhaitable d'utiliser les stades 1 et 2 plutôt que les stades 3 et 4 jeune dans ces essais ; cela aurait sans doute permis de faire des observations comparables à celles obtenues en pleine nature.

#### III.4. Evaluation de l'activité larvicide sur les jeunes larves après l'éclosion

Une autre méthode a été envisagée au laboratoire : observer la mortalité chez les jeunes larves (stades 1 et 2) après l'éclosion des oeufs (barquettes) de C.pipiens. Ils sont prélevés chaque jour de la surface du gîte, déposés dans des gobelets contenant de l'eau de gîte traité, et ensuite placés sous les conditions de l'insectarium.

Toutes les jeunes larves issues des oeufs provenant de la mare 1 sont tuées dans les séries effectuées pendant 10 jours après le traitement. La réapparition des larves survivantes commence dès le test du 11ème jour (5 %) et continue d'augmenter dans les tests suivants. Cependant, les oeufs prélevés après 20 jours ont donné 50 % de mortalité parmi les jeunes larves ; les larves survivantes continuent une vie normale.

Dans la mare 2, les oeufs prélevés avec l'eau (après le traitement) donnent jusqu'au 4ème jour des jeunes larves mortes au fond des gobelets. A partir du prélèvement du 5ème jour, une certaine survie est observée, le taux des survivantes augmente (50 %) dans le prélèvement du 7ème jour, celles-ci continuant normalement leur développement.

L'activité larvicide de B.sphaericus 1593-4 persiste pendant un certain temps dans l'eau, mais diminue cependant plus rapidement dans la mare 2 que dans la mare 1.

En ce qui concerne la troisième mare, les oeufs prélevés après 3 jours de traitement ont donné des jeunes larves qui évoluent à peu près normalement sans effet résiduel du bacille, à l'exception toutefois de quelques unes (20 %). Cela indique que l'activité larvicide a baissé beaucoup plus rapidement que dans les deux autres mares ; cela pourrait être dû, entre autres raisons, à la qualité de l'eau.

### III.5. Le deuxième traitement des gîtes larvaires

Les mares 1 et 2 ont été retraitées respectivement les 16 et 22 août 1983 avec la poudre de B.sphaericus 1593-4 et à la même dose de 160 mg/m<sup>2</sup>.

Aucune réapparition des larves n'a été observée pendant une semaine dans la mare 1 et quatre jours dans la mare 2.

Mare 1 : C'est seulement après une semaine du traitement que des larves stade 1 et 2 de C.pipiens ont été trouvées mais en très faible densité. Celle-ci augmente progressivement, mais ce n'est qu'à la fin de la deuxième semaine que nous avons observé une certaine densité de tous les stades larvaires, avec quelques nymphes. Quant aux tests réalisés au laboratoire, ils ont donné des résultats moins satisfaisants que ceux obtenus au cours du premier traitement. Les taux de mortalité ont baissé rapidement la première semaine.

Ces observations montrent que l'activité résiduelle du bacille persiste un certain temps, et donne une certaine mortalité parmi les nouvelles jeunes larves réinstallées dans la mare, ainsi que parmi les larves stades 3 et 4 jeune d'élevage au cours des tests effectués au laboratoire (Tab.26).

Les oeufs prélevés dans la mare sont placés dans des gobelets. Les jeunes larves sont toutes trouvées mortes au fond des gobelets jusqu'au 10ème jour. En effet, dans les tests effectués les dix premiers jours, l'activité résiduelle du bacille existant dans l'eau utilisée est importante, puisque après l'éclosion, une mortalité élevée est constatée parmi les larves stade 1 ; quelques unes d'entre elles se développent jusqu'au stade 2, mais meurent à leur tour.

A partir du 11ème jour, nous constatons que les taux de mortalité diminuent parmi les jeunes larves ; ils atteignent 50 % dans les tests du 17ème jour suivant le traitement ; cela serait dû à une baisse de l'activité résiduelle de la bactérie.

Mare 2 : La mortalité des larves de C.pipiens a été respectivement de 90 puis de 100 % les 2ème et 3ème jours qui suivent le traitement. Dès le 4ème jour, une faible quantité de larves stade 1 commence à réapparaître ; ces larves redeviennent abondantes à tous les stades, après 9 jours (le 1er septembre). Les nymphes réapparaissent après 13 jours.

Les jeunes larves, qui proviennent des oeufs prélevés avec de l'eau de mare, meurent au cours des tests effectués cinq jours après le traitement (dans les conditions du laboratoire).

Tableau 26 : Résultats des tests effectués avec l'eau du gîte larvaire (mare 1) après le deuxième traitement, le 16 août, avec des larves stades 3 et 4 jeune de Culex pipiens du laboratoire.

Date des tests effectués	Mortalité %			
	24 h	48 h	72 h	4 j
2ème jour- 17/08	91	98		
3ème jour- 18/08	2,5	76		
4ème jour- 19/08			28,75	73,75
7ème jour- 22/08	4	12		
8ème jour- 23/08	1,3	1,3	8,75	
9ème jour 24/08	0	0	0	
10ème jour- 25/08	0	0	0	
11ème jour- 26/08	0	0	0	
14ème jour- 29/08	0	20	35,9	53,8
16ème jour- 31/08	0	0	0	0

A partir du prélèvement du 6ème jour, nous observons un léger abaissement de la mortalité (80 %) parmi les jeunes larves. Ce taux diminue progressivement, et atteint 0 % le 5 septembre (après deux semaines de traitement).

Ces résultats montrent que l'activité résiduelle de B.sphaericus 1593-4, pendant le deuxième traitement, persiste moins longtemps dans la mare 2 que dans la mare 1, ce qui correspond aux résultats du 1er traitement.

### III.6. Efficacité de B.sphaericus sur la faune des Arthropodes des mares

Des Arthropodes se trouvant dans les trois différents gîtes larvaires ont été déterminés :

	Crustacés	{	- Daphnies
			- Cyclops
Diptera	Chironomidae	{	- Chironomes
	Culicidae	{	- <u>Aedes vexans</u>
			- <u>Culiseta annulata</u> = <u>Theobaldia annulata</u>

Nous n'avons observé aucune toxicité de B.sphaericus 1593-4 sur ces Arthropodes.

La densité larvaire de Culiseta annulata a été forte dans la mare 1 à l'eau polluée, moyenne dans la deuxième et faible dans la troisième. Le gîte à l'eau polluée est semble-t-il beaucoup plus favorable aux larves de Culiseta annulata que le gîte à l'eau claire. Cette densité a été très forte au cours de l'expérimentation et serait peut-être due à l'absence des larves de C.pipiens.

L'activité larvicide de B.sphaericus 1593-4 a été nulle sur les larves stades 3 et 4 de Culiseta annulata sous les conditions du laboratoire, même avec une forte concentration 10 ppm.

En ce qui concerne les larves de Chironomes , Aedes vexans et Anopheles maculipennis, leur densité a toujours été faible, mais constante dans les mares, même les premiers jours après le traitement.

#### IV - Discussion - Conclusion

Cette étude, utilisant 160 mg/m<sup>2</sup> dans des gîtes larvaires à C.pi-piens, permet de contrôler l'activité larvicide de B.sphaericus 1593-4 pendant plusieurs semaines, particulièrement dans des gîtes à l'eau polluée, ce qui correspond aux résultats de Hornby et al. (1981) et Singer (1981). Ces auteurs précisent que cette activité est en relation avec la qualité de l'eau et la dose utilisée au départ, et aussi que le contrôle pourrait être poursuivi jusqu'à trois mois. En fait, la persistance de B.sphaericus dans l'eau polluée a duré plus longtemps que dans l'eau douce, ce qui infirme les résultats de Mulligan et al. (1980) et confirme les travaux de Hornby et al. (1981).

Les spores restent quelques jours en dessous de la zone de nourriture des larves, mais elles gardent leur toxicité pendant un certain temps (Ramoska et al., 1978 ; Hertlein et al., 1979 ; Mulligan et al., 1980). Ces spores sont viables pendant 9 mois (Singer, 1980 ; Horby et al., 1981 ; Silapanantakul et al., 1982).

Hertlein et al. (1979) et OMS (1980c) ont mentionné le recyclage de B.sphaericus, mais sans préciser, ni comment, ni où, ce bacille se recycle exactement.

Silapanantakul et al. (1983) ont démontré que B.thuringiensis H 14 ne se multiplie pas dans les larves de Moustiques, notamment Aedes aegypti, tandis que B.sphaericus se multiplie dans le tissu des larves mortes, chez lesquelles une seconde génération du bacille, toxique pour les larves saines, a été observée (Davidson et al., 1975).

Les cadavres possèdent donc une seconde génération du bacille, beaucoup plus toxique que la poudre de bacille utilisée au départ. Cet effet toxique (toxine ou spore) peut persister à l'intérieur des cadavres pendant plusieurs mois, dans les conditions du laboratoire (voir chapitre 2).

La présence des cadavres de larves tuées par B.sphaericus 1593-4 dans le gîte larvaire pourrait être à l'origine de cette toxicité résiduelle. Notons que l'eau des trois gîtes a été remuée à chaque prélèvement, donc que ces cadavres ont été progressivement décomposés, libérant une ou plusieurs générations du bacille, toxiques pour d'autres larves saines venant à se développer dans le gîte.

Les matières organiques et les micro-organismes, notamment dans l'eau usée, pourraient influencer l'activité résiduelle de B.sphaericus (Leonard et al., 1977 ; Lacey, 1982).

Sur le terrain, la vérification n'a jamais été satisfaisante lorsqu'il y avait possibilité de réinfestation par des Culex provenant de gîtes voisins non traités. Donc, dans un tel type d'expérience, il est impératif de traiter tous les gîtes pour avoir un bon contrôle.

Seul le phénomène de recyclage permettrait d'envisager un avenir prometteur à cette bactérie.

# **CHAPITRE 4**

HISTOPATHOLOGIE DES LARVES  
DE C.PIPIENS. ACTION DE B.  
SPHAERICUS

HISTOPATHOLOGIE DES LARVES DE C.PIPIENS  
ACTION DE B.SPHAERICUS

I - Technique histologique

Les larves du 3ème stade de C.pipiens sont mises en contact avec une suspension de B.sphaericus 1593-4 (0,01 ppm) dans un gobelet de 150 ml ; des prélèvements de larves sont systématiquement effectués à des temps donnés. Elles sont ensuite fixées, après section de la tête et du syphon respiratoire, dans les liquides de Bouin ou de Carnoy. Parallèlement, des témoins placés dans l'eau permutée sont prélevés et fixés.

Les pièces, après déshydratation dans des alcools de concentration croissante, et passage pendant deux semaines au moins dans le mélange de benzoate de méthyle et celloïdine, 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 colorant acide rouge, 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.

II - Anatomie du tube digestif d'une larve de C.pipiens

Cette étude histologique a été inspirée des travaux de de Boissezon, (1930) ; Wigglesworth, (1942) ; Clements, (1963) ; confirmée par les observations sur le 3ème stade larvaire, considéré comme le meilleur stade pour une étude histologique (Richins, 1945).

Le tube digestif, précédé de la cavité préorale, est constitué de trois parties : le stomodeum ou l'intestin antérieur, le mésentéron ou l'intestin moyen et le proctodeum ou l'intestin postérieur (Fig.11).

- Le stomodeum, recouvert d'une intima cuticulaire, comprend deux parties : le pharynx et l'oesophage, entre lesquels 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.

- Le mésentéron, entouré des muscles circulaires internes et des muscles longitudinaux externes, comprend quatre parties : le cardia,

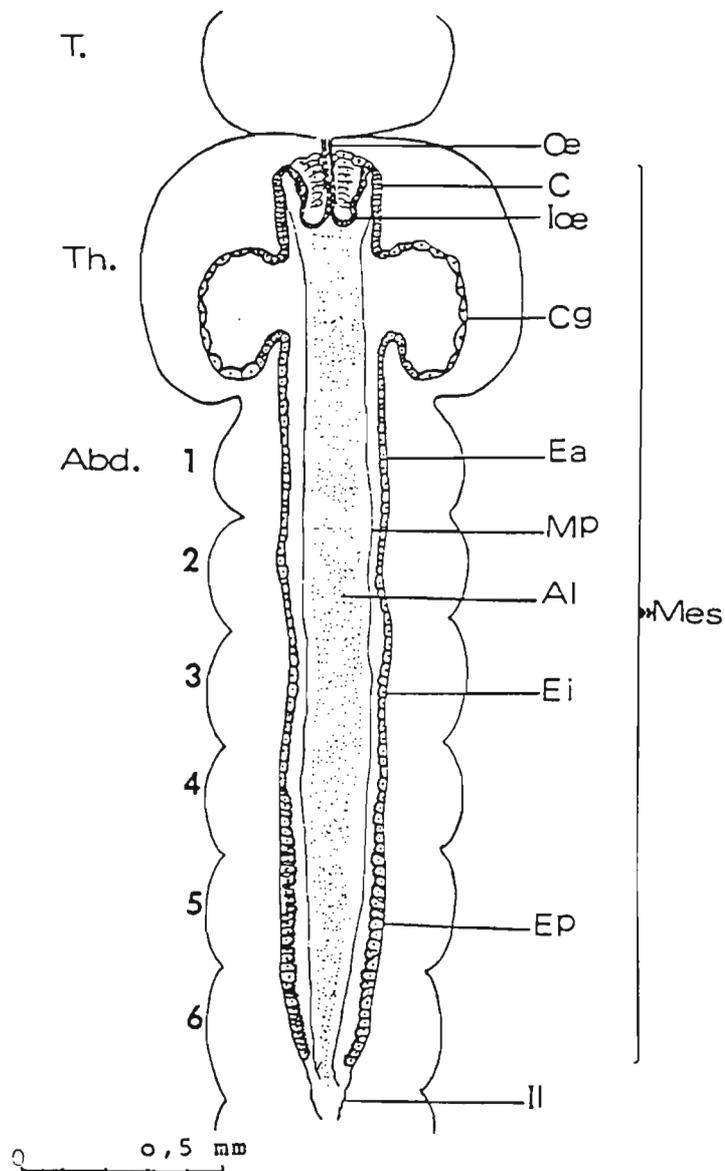


Fig 11 : Tube digestif d'une larve au stade 3 de Culex pipiens  
Organisation générale.

C : Cardia, Cg : Caeca gastriques, Ea : Estomac antérieur,  
Ei : Estomac intermédiaire, Ep : Estomac postérieur, Il : Iléon,  
Ioe : Invagination oesophagienne, Mes : Mésenteron, MP : membrane  
péritrophique, Oe : Oesophage, T : Tête, Th : Thorax, Abd :  
Abdomen.

les caeca gastriques, l'estomac antérieur et l'estomac postérieur. (Fig.12).

a) Le cardia : une partie courte présente le même type cellulaire que l'intestin moyen, à microvillosités réduites (Fig.13A), responsable de la sécrétion de la membrane péritrophique qui emballe la nourriture pendant son passage le long du mésentéron, assurant la protection de l'épithélium intestinal.

b) 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 (Fig.13B), jouant un rôle important dans le phénomène d'absorption et les échanges entre les cavités des caeca et l'hémolymphe.

c) L'estomac antérieur : les cellules sont aplaties, à microvillosités courtes par rapport à celles de l'estomac postérieur (Fig.13C).

d) 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 (Fig.13D).

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

Le pH du mésentéron selon Dadd (1975) est compris entre 7 et 10 et peut atteindre 10,5 dans la région mésentérique, correspondant aux 1er, 2ème et parfois 3ème segments abdominaux.

La présence d'enzymes protéolytiques actives à ce PH alcalin serait nécessaire pour déclencher l'activité toxique de B.sphaericus.

- 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.

### III - Action sur le mésentéron

La concentration utilisée (0,01 ppm) de B.sphaericus 1593-4 représente approximativement la DL 80 après 48 heures de contact avec des larves du 3ème stade de C.pipiens. Elle permet d'étudier les modifications histopathologiques au niveau des cellules mésentériques lors des différentes étapes du processus réactionnel. En fait, seul l'intestin moyen subit un profond changement (Davidson, 1979).

Les différentes modifications cytologiques au niveau de l'estomac postérieur sont schématisées dans la Fig (14).

Fig. 12 : Schéma des différents types cellulaires du mésentéron

A : cardia

B : caeca gastriques

C : estomac antérieur

D : estomac postérieur

al : aliments ; cr : cellules de remplacement ; cut ; cuticule de l'épithélium oesophagien ; e oe : épithélium oesophagien ; fc ; fluide colorable ; l : lumière du mésentéron ; lb : lame basale ; mp : membrane péritrophique ; mv : microvillosités apicales ; n : noyau

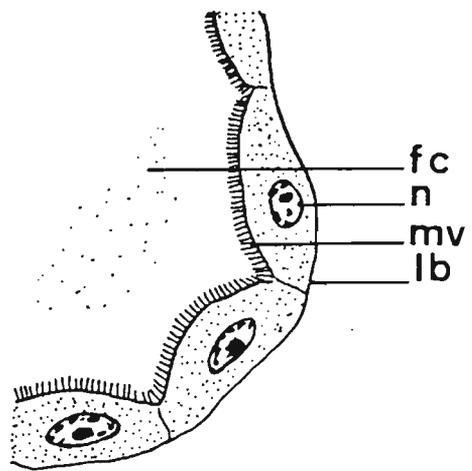
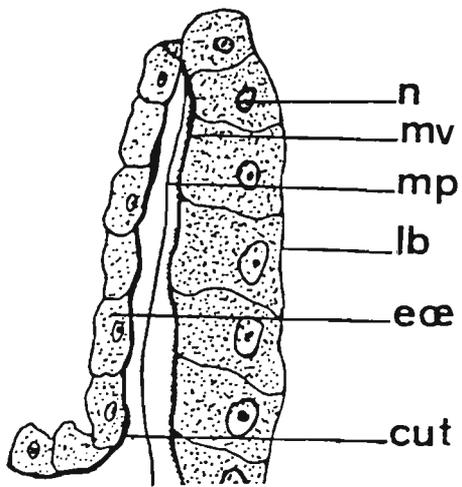
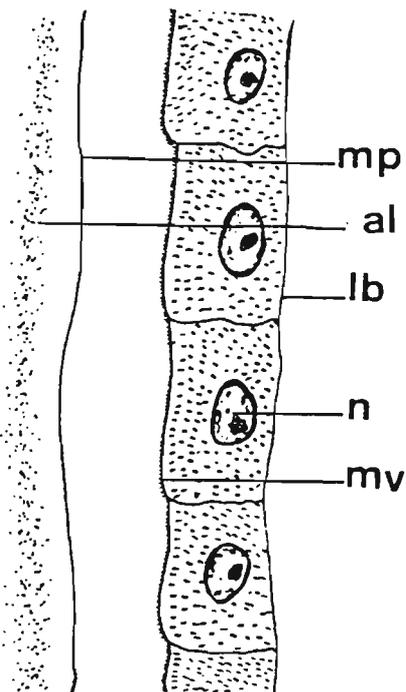


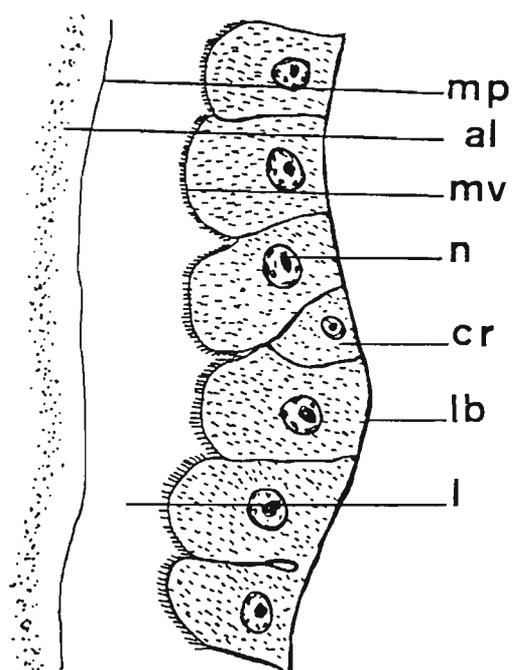
Fig. 12

A

B



C



D

Fig.13 : Histologie des différentes parties du mésentéron, d'une larve du 3ème stade de C.pipiens (Témoin)

- A : Cardia
- B : Caeca gastriques
- C : Estomac antérieur
- D : Estomac postérieur

L'avant de la larve est situé vers le haut de chaque photo.

Echelle : le trait représente 100 µm.

al : aliments ; c : cellules du cardia ; ccg et cg : cellules des caeca gastriques ; ea : cellules de l'estomac antérieur ; ep : cellules de l'estomac postérieur ; mp : membrane péri-trophique ; oe : épithélium oesophagien invaginé ; sb : séparation à la base des cellules.

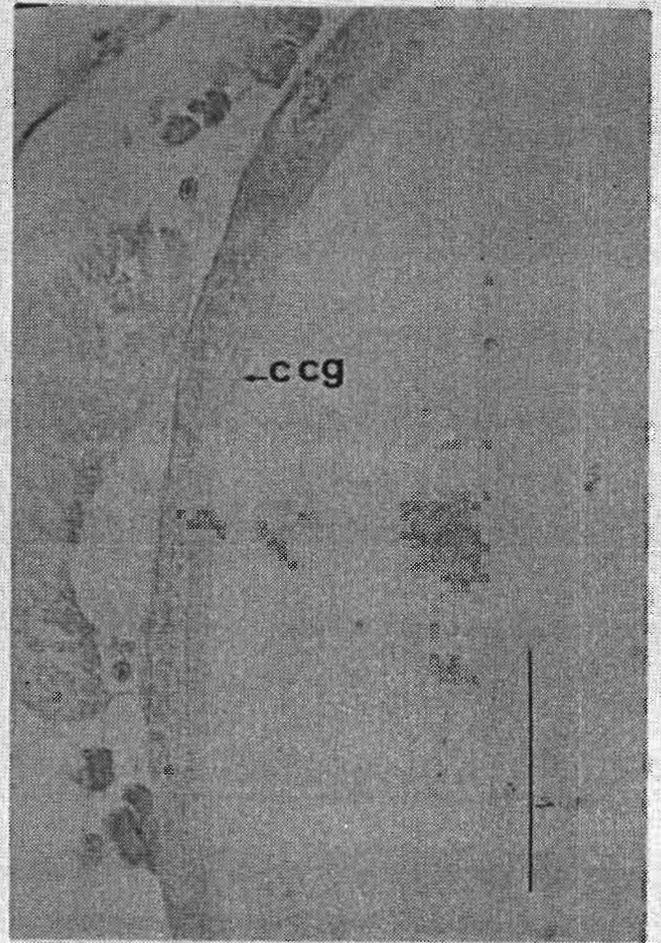
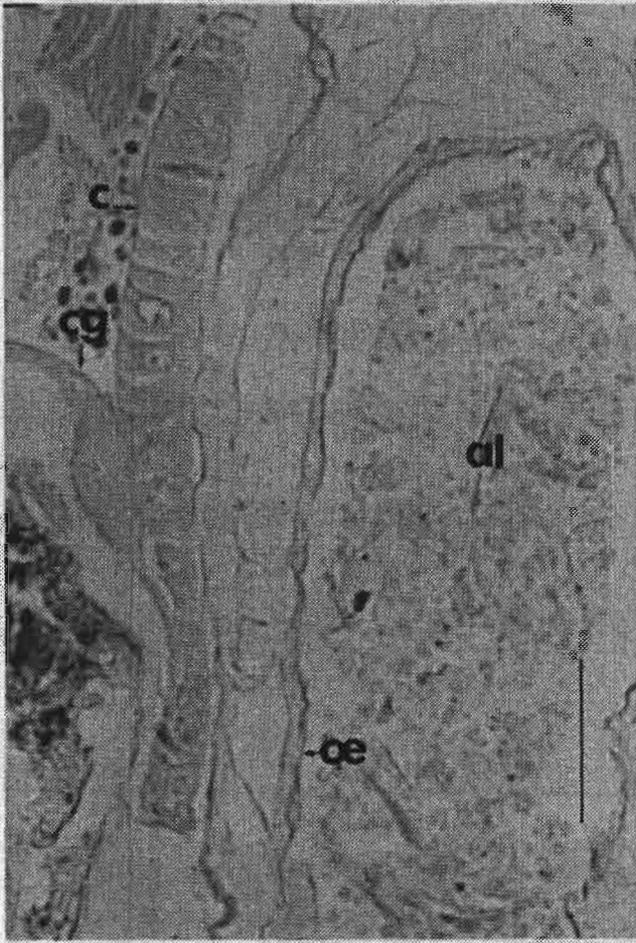
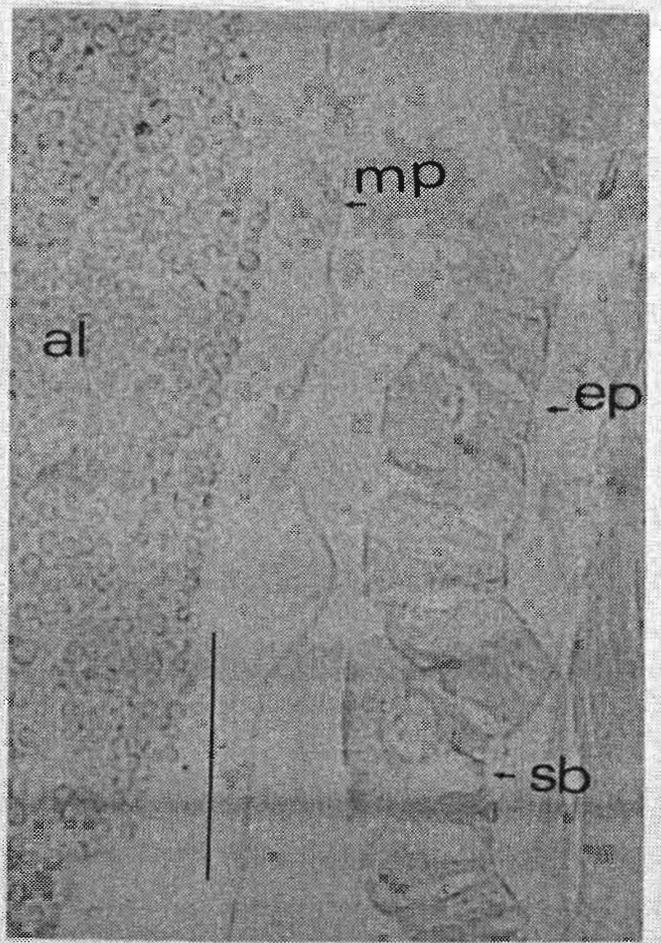
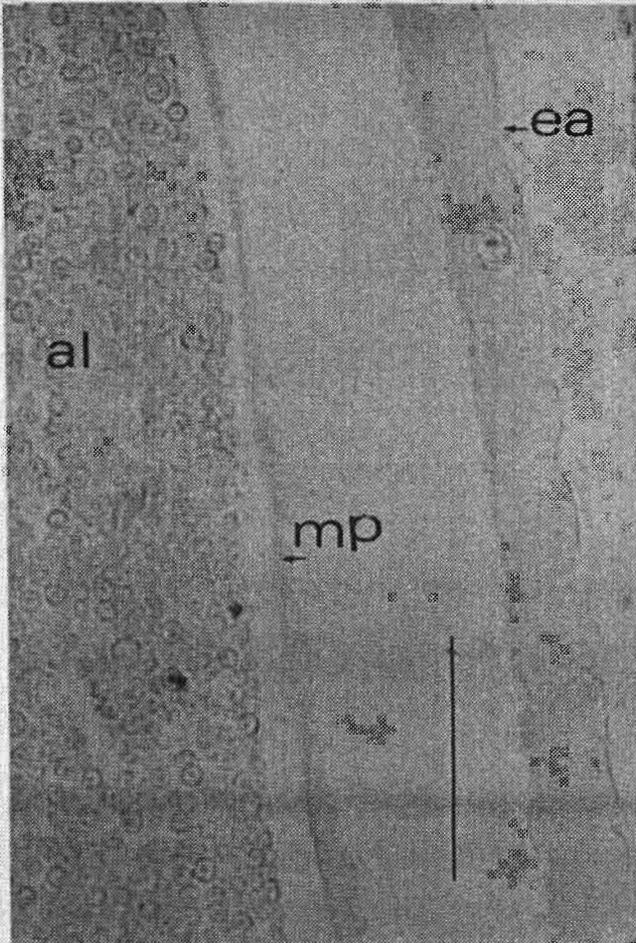


Fig.13

A

B



C

D

Fig. 14 : Schéma des modifications cytologiques au niveau de l'estomac postérieur, à divers temps de contact avec B.sphaericus (3ème stade larvaire de C.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.

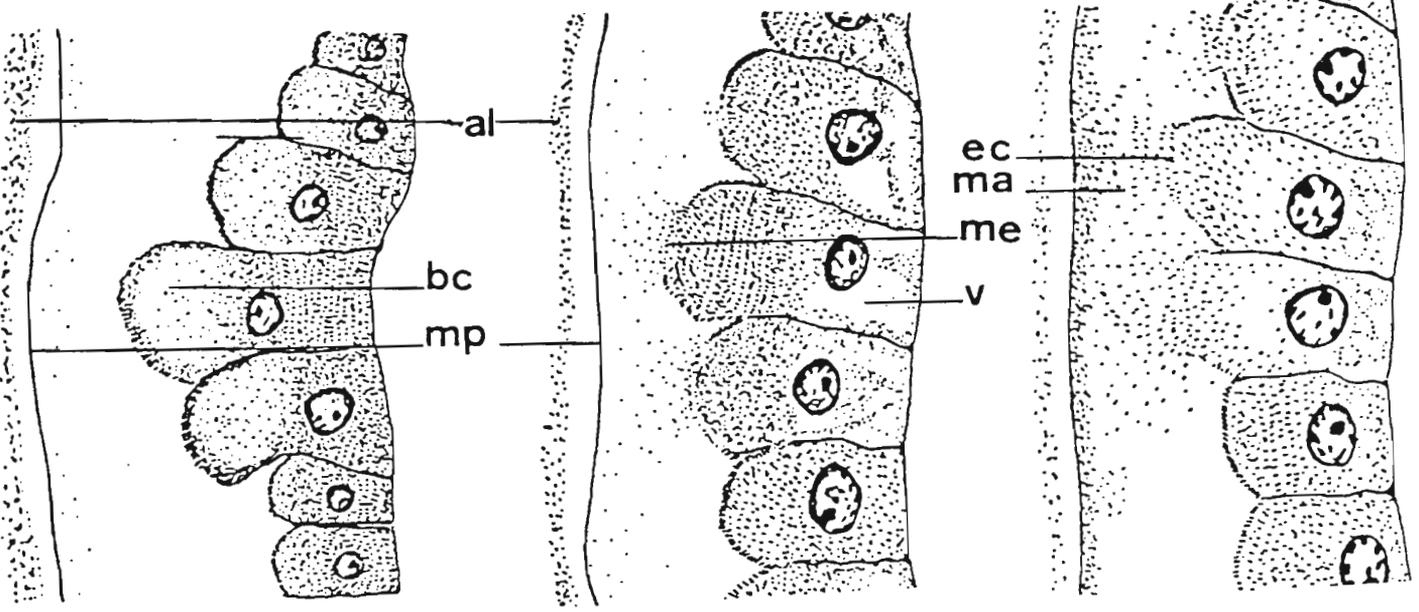
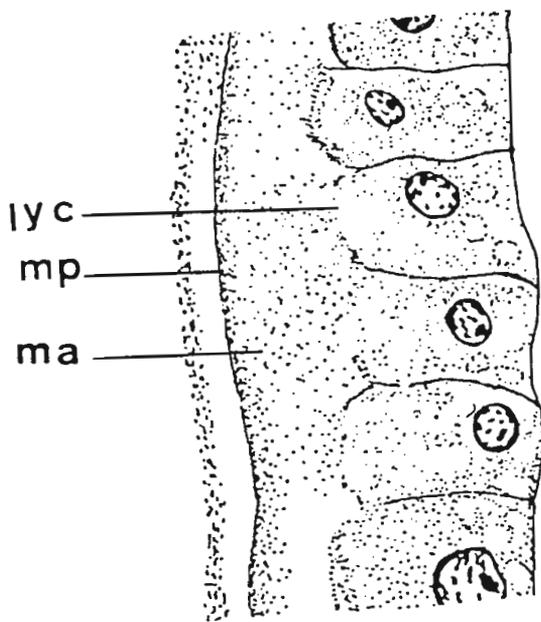


Fig.14

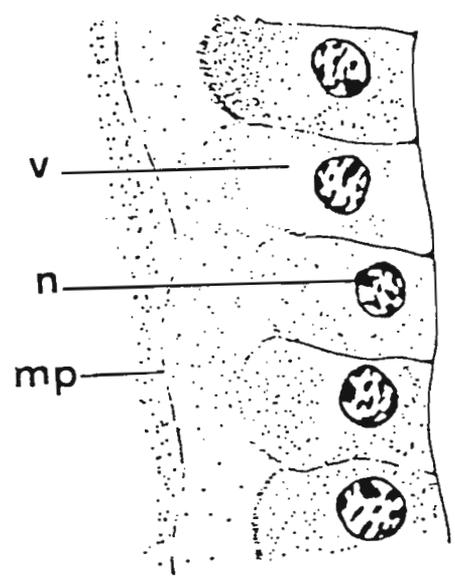
A

B

C



D



E

### III.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, des estomacs antérieur et postérieur. Seul ce dernier subit des modifications importantes.

### III.2. Etapes des altérations cytologiques au niveau mésentérique

Le premier signe de la maladie consiste en une perturbation du flux alimentaire, suivie par une hypertrophie ou un ballonnement des cellules, qui réagissent différemment selon le temps de contact et selon le type cellulaire.

a) 30 minutes : certaines cellules mésentériques de l'estomac postérieur apparaissent hypertrophiées et ballonnées (Fig. 15A). Ce phénomène est visible à un moindre degré dans les cellules à la limite de l'estomac antérieur et de l'estomac postérieur (estomac intermédiaire).

b) 4 heures : une vacuolisation apparaît dans la zone basale des cellules de l'estomac postérieur, tandis que la partie apicale de quelques cellules commence à se lyser. L'épithélium apparaît nettement dilaté (Fig. 15B).

c) 6 heures : les cellules épithéliales de l'estomac postérieur commencent à éclater. Il se produit alors un rejet du matériel cytoplasmique qui s'accumule dans la lumière du mésentéron, entre la membrane péritrophique et l'épithélium intestinal (Fig. 15C).

d) 24 heures : les cellules de l'estomac postérieur continuent de dégénérer et d'éclater (Fig. 15D), tandis que l'observation de celles des caeca gastriques montre un éclatement de quelques cellules et un rejet de débris cytoplasmiques dans la cavité des caeca (Fig. 16A). Les cellules de l'estomac antérieur, d'une manière analogue à celles de l'estomac postérieur après 30 minutes, se ballonnent (Fig. 16B).

e) 48 heures : à ce stade, correspondant à la mort des larves, qui se produit dans nos observations, après 48 h de contact, les cellules des caeca et de l'estomac antérieur apparaissent dégénérées (Fig. 16C).

La dégénérescence des cellules de l'estomac postérieur se poursuit ;

Fig.15: Modifications histologiques au niveau de l'estomac postérieur (coupes longitudinales) d'une larve du 3ème stade de C.pipiens après un temps donné de contact avec B.sphaericus.

A : après 30 minutes de contact

B : après 4 heures de contact

C : après 6 heures de contact

D : après 24 heures de contact

Echelle : le trait représente 100 µm.

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

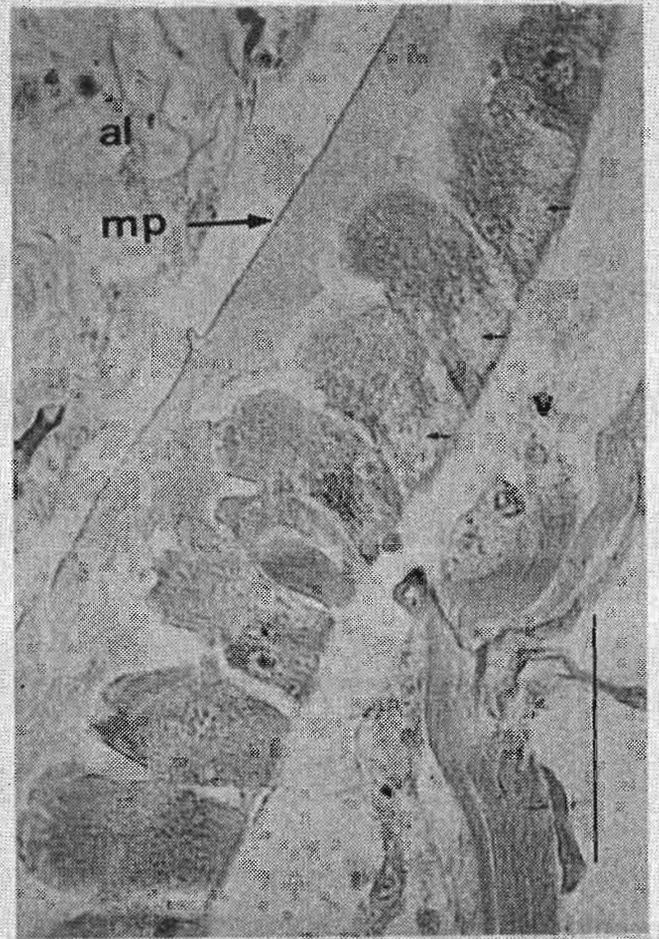
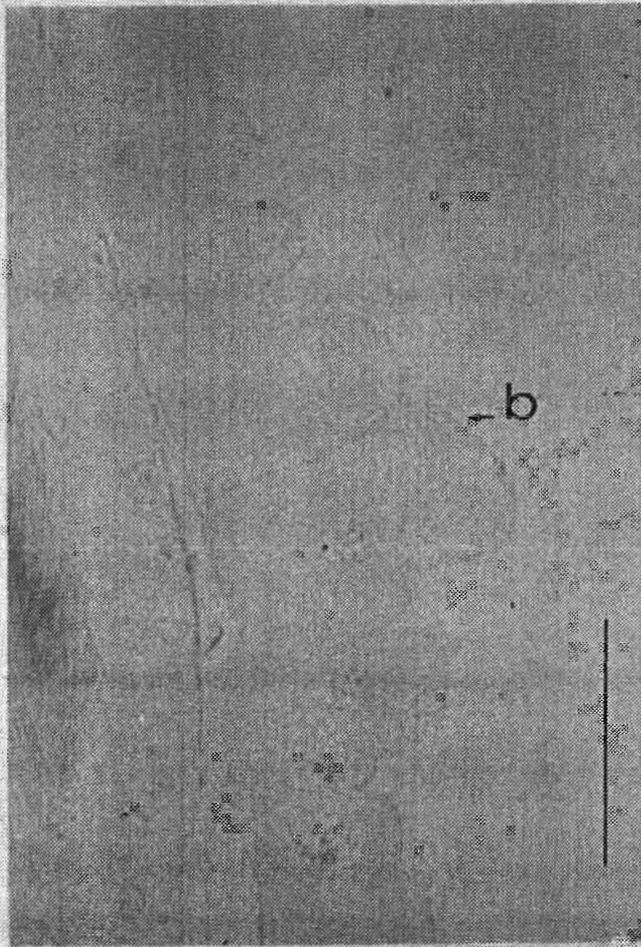
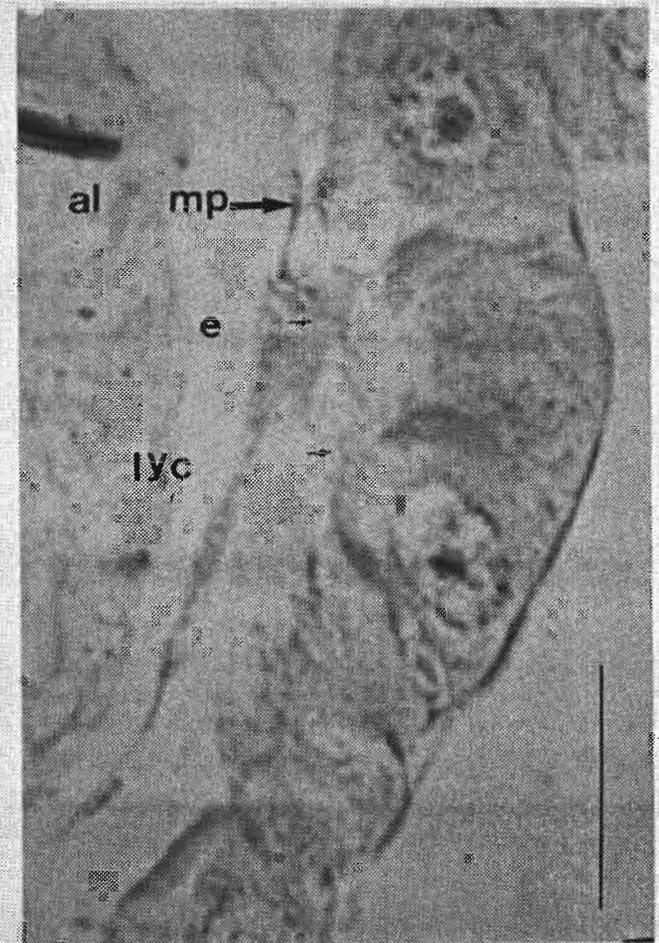
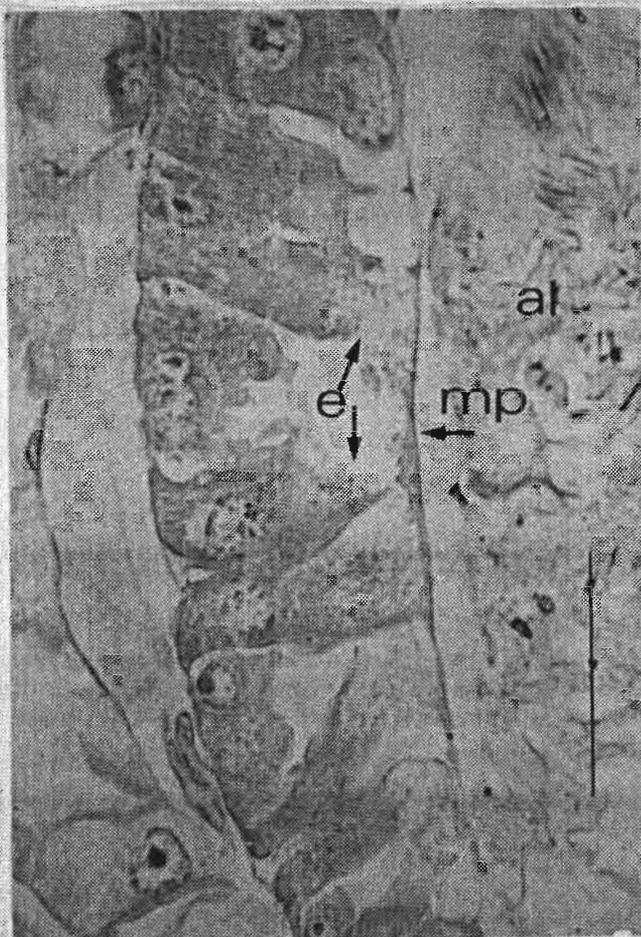


FIG.15

A

B



C

D

Fig.16 : Modifications histologiques, chez la larve du 3ème stade de C.pipiens, après un temps donné de contact avec B.sphaericus.

A : Caeca gastriques et une partie de l'estomac antérieur (coupe longitudinale) après 24 heures de contact.

B : Estomac antérieur (coupe transversale) après 24 heures de contact.

C : Caeca gastriques et estomac antérieur (coupe longitudinale) après 48 heures de contact.

al : aliments ; b: ballonnement ; ce : cellule éclatée ;  
cg : caecum gastrique ; d : débris cellulaires ; ea : estomac antérieur ; lyc : lyse cellulaire ; mp : membrane péritrophique

Echelle : Le trait représente 100 µm.

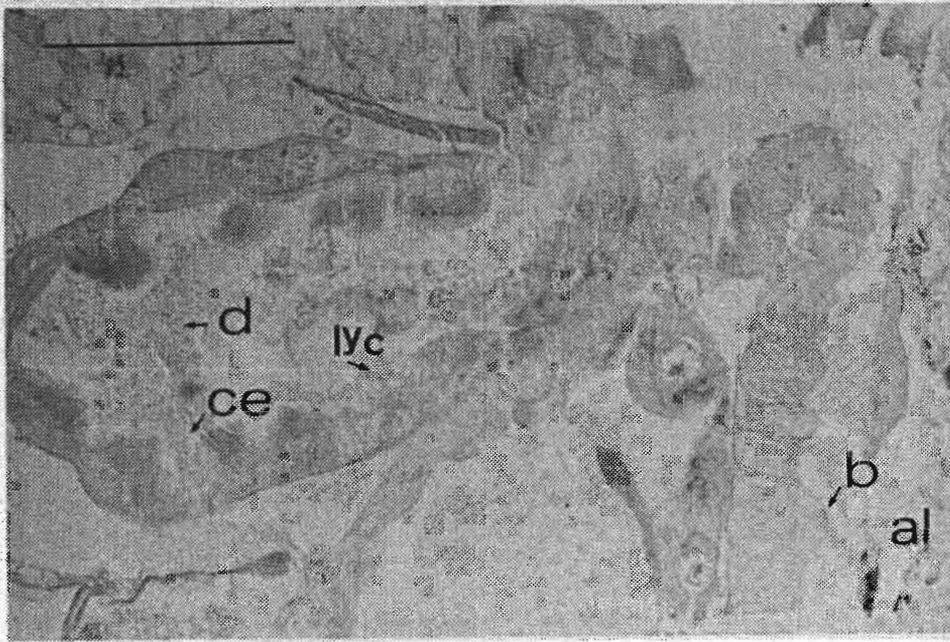
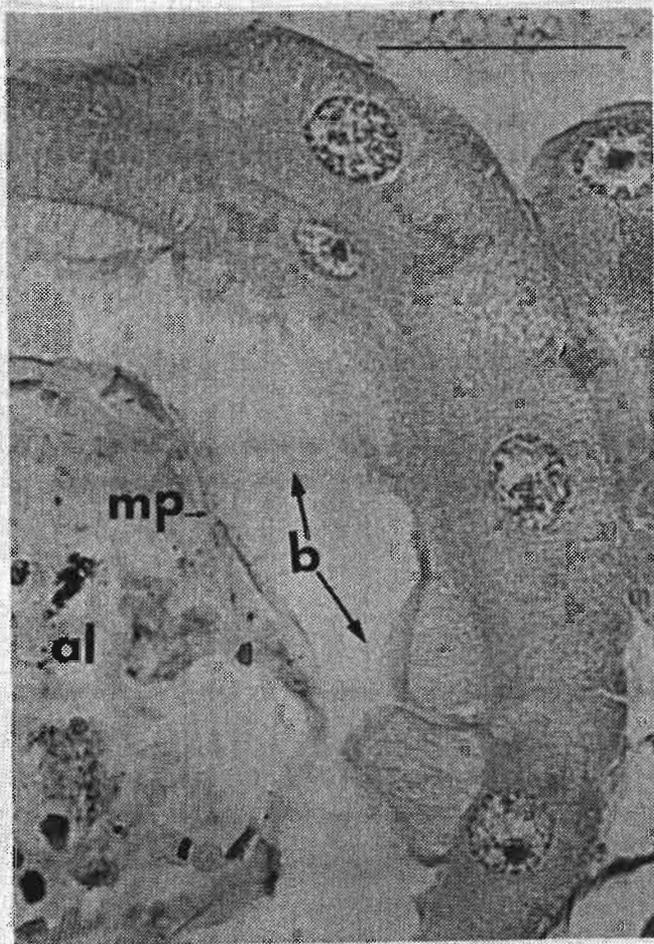
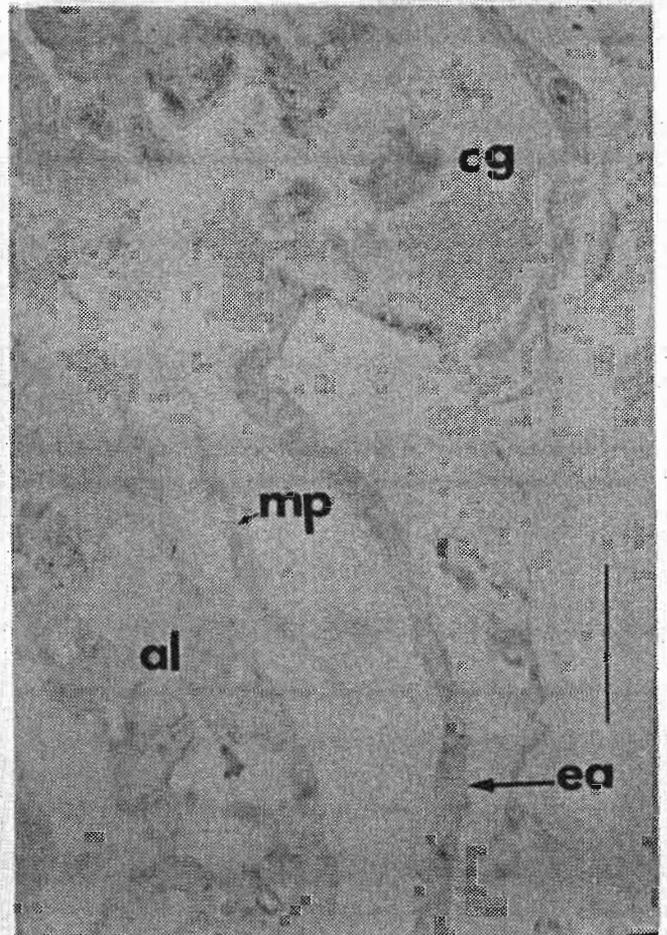


FIG.16

A



B



C

certaines d'entre elles apparaissent vides, d'autres détruites, gardant toutefois leur noyau (Fig.17A).

#### IV - Action sur les larves d'Aedes caspius

Placées dans une suspension de B.sphaericus 1593-4 à 5 ppm, les larves du 3ème stade d'Aedes caspius n'apparaissent pas touchées au niveau de l'épithélium intestinal du mésentéron (sauf quelques vacuoles au niveau de l'estomac postérieur (Fig.17B)) et ceci, même après 72 heures de contact, par rapport au témoin (Fig.17C). En effet, les larves d'Aedes caspius ne sont pas sensibles au bacille à cette dose.

#### V - Discussion - Conclusion

La réaction des cellules mésentériques varie d'une région à l'autre ; certaines cellules de l'estomac postérieur paraissent touchées par le bacille, après 30 minutes un gonflement cellulaire apparaît tandis que celles de l'estomac antérieur ne réagissent qu'après 24 heures. Les altérations concernant les cellules des caeca gastriques semblent se manifester avant 24 heures, certaines cellules paraissant alors éclatées.

Au niveau des noyaux, nos observations ne montrent pas de modifications notables. Les travaux de Davidson (1979 et 1981b) signalent que les cellules mésentériques 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 ; il ne paraît donc pas devoir être lié à l'activité du bacille.

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

La pathologie des cellules mésentériques semblent liée à la digestion du bacille par la larve-hôte. Le mécanisme pourrait s'expliquer par une libération d'un produit toxique par B.sphaericus (Davidson , 1979), car il n'y a passage de bactéries à travers la membrane péritro-

- Fig.17 : A : Modifications histologiques au niveau de l'estomac postérieur chez la larve du 3ème stade de C.pipiens après 48 heures de contact avec B.sphaericus (coupe transversale)
- B : Histologie de l'estomac postérieur chez la larve du 3ème stade d'Aedes caspius (coupe longitudinale)
- C : Aspect histologique au niveau de l'estomac postérieur chez la larve du 3ème stade d'Aedes caspius après 72 heures de contact avec B.sphaericus (coupe longitudinale)

Echelle : le trait représente 100 µm.

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

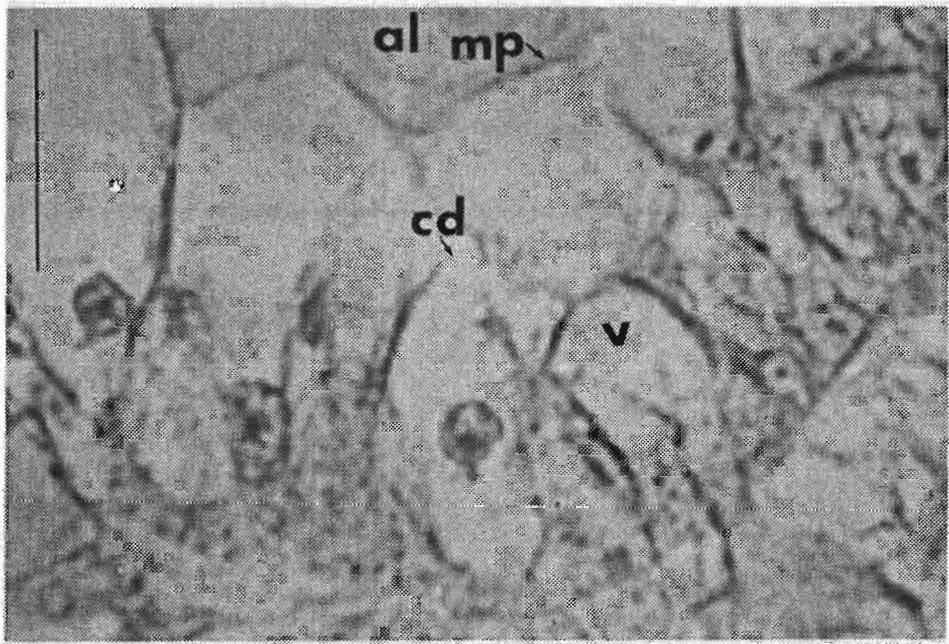
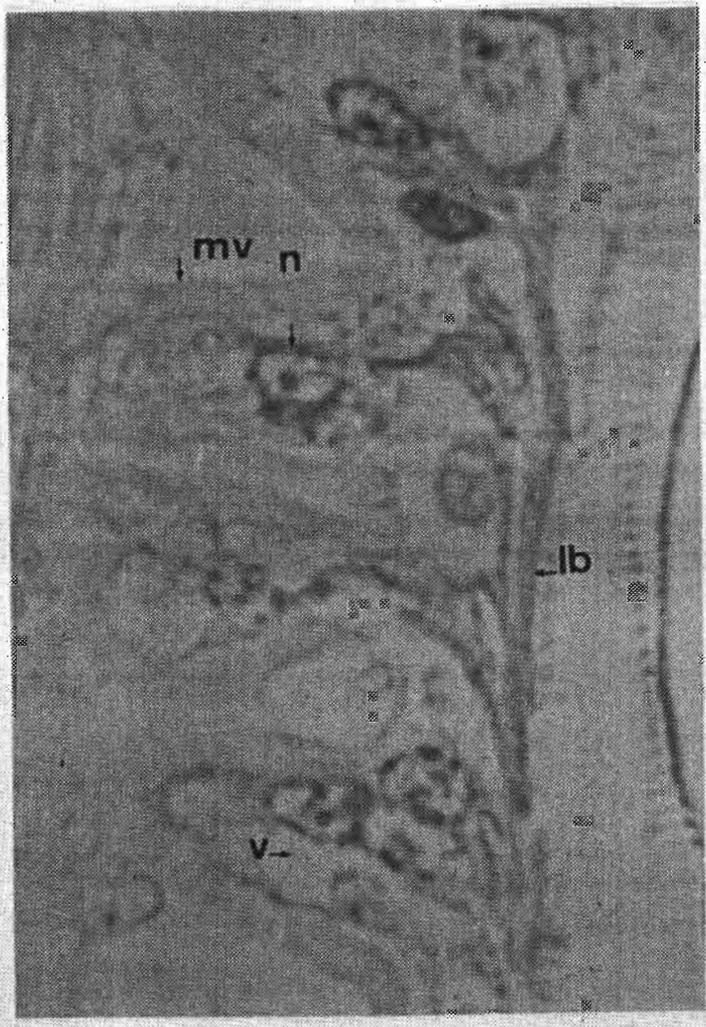
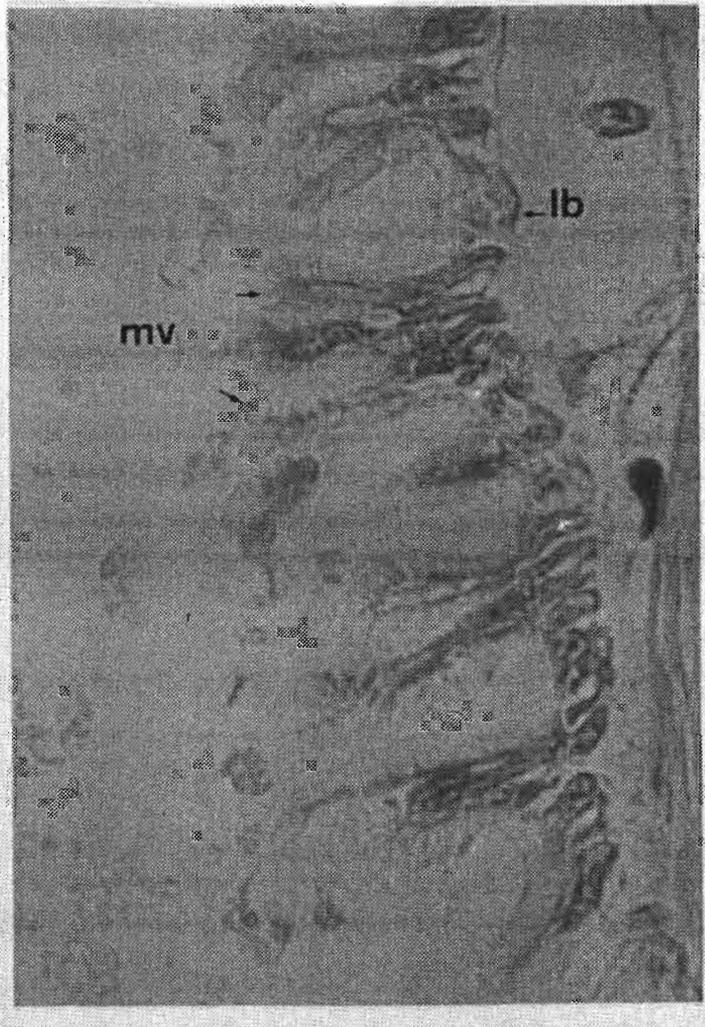


Fig.17

A



B



C

phique pour envahir les cellules intestinales qu'après la mort de la larve (Kellen et al., 1965 ; Davidson, 1982b).

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, 1981b). Les modifications histopathologiques de l'intestin moyen de C.pipiens sont comparables à celles observées par Kellen et al., (1965) sur C.tarsalis, notamment la dégénérescence cellulaire de l'estomac postérieur et la vacuolisation qui envahit les cellules pendant toutes les étapes de l'intoxication des Culex. Nos observations vont dans le sens de celles de Menon et al. (1982), qui indiquent que le bacille provoque non seulement une dégénérescence cellulaire, mais aussi qu'il se multiplie dans les larves mortes.

L'aspect du ballonnement, puis de l'éclatement de l'épithélium intestinal, semblerait lié aux fonctions physiologiques différentes des divers types cellulaires, ou à des conditions enzymatiques, suivant la région du tube digestif. 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 exact du B.sphaericus sur Culex sp..

## **CHAPITRE 5**

RECEPTIVITE A PLASMODIUM YOELLII  
YOELLII D'ANOPHELE SOUMIS A  
B.SPHERICUS ET B.THURINGINSIS

RECEPTIVITE A PLASMODIUM YOELII YOELII D'ANOPHELES  
SOU MIS A B.SPHAERICUS ET B.THURINGIENSIS H 14

I - Généralités

La lutte chimique antivectorielle, largement utilisée contre les anophèles vecteurs de paludisme, réduit les densités de population de moustiques. Ces produits chimiques n'ont, semble-il, aucun effet sur le cycle sporogonique du plasmodium (Prasittisuk et Curtis, 1982).

La découverte récente de bactéries à activité insecticide les place au premier rang dans les recommandations pour le contrôle biologique des vecteurs (O.M.S., 1980d). Ainsi, Bacillus sphaericus et Bacillus thuringiensis H 14 ont un effet toxique sur les larves, entraînant en particulier des lésions histologiques importantes du mésentéron, notamment sur sa partie postérieure (Davidson, 1981b; Federici, 1982).

Le présent travail se propose d'étudier l'incidence éventuelle de ces insecticides biologiques sur les étapes du cycle plasmodial chez les anophèles.

II - Matériel et méthodes

II.1. La souche plasmodiale

Plasmodium yoelii yoelii 17 X est un plasmodium du groupe vivax, parasite des rongeurs ; il provient du Museum d'Histoire Naturelle (I. Landau). Cette souche est entretenue par passages répétés sur souris blanches.

Cinq jours après leur inoculation par des sporozoïtes, nous contrôlons sur frottis la parasitémie des souris. Cette période correspond au maximum d'infectivité des gamétocytes (Landau et al., 1979).

II.2. Les anophèles

Ils proviennent de notre insectarium. Nous utilisons une seule espèce, Anopheles stephensi souche "Museum", bonne vectrice de l'espèce plasmodiale choisie (Jadin, 1967).

Trois lots de larves de stade 2 et 3 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 24 heures dans une suspension de 0,009 ppm de B.thuringiensis H 14 (IPS 82) (concentration correspondant à la DL 70). Le dernier lot est laissé 48 heures dans une suspension contenant 0,08 ppm de B.sphaericus 1593-4. Cette concentration correspond approximativement à la DL 70.

Les survivants des différents lots sont soumis 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.

### II.3. L'infection des anophèles

Six 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 ou deux cages traitées (B.thuringiensis H 14 et/ou B.sphaericus 1593-4).

Les femelles gorgées sont disséquées huit jours plus tard. Nous cherchons la présence d'oocystes sur la paroi externe de l'estomac (Fig.18). L'infection est quantifiée de la manière suivante :

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

### II.4. Cycle des 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 gaméto-cyte mâle s'exflagelle et libère huit microgamètes qui vont féconder des gamètes femelles.

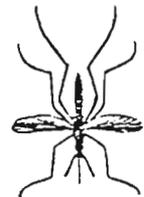
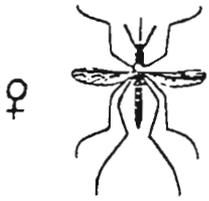
L'oeuf mobile, ou ookinète, traverse la paroi de l'estomac de l'anophèle et se fixe au niveau de sa face externe formant l'oocyste dans lequel s'individualisent des milliers de sporozoïtes. Libérés par l'éclatement de l'oocyste, ces derniers gagnent les glandes salivaires où ils subissent une dernière maturation avant d'être pleinement infectants. Au cours de la piqûre, le moustique infecté injecte dans le sang avec sa salive des milliers de parasites, sous forme de sporozoïtes.

Fig.18

souris infectée par  
le Plasmodium



engorgement

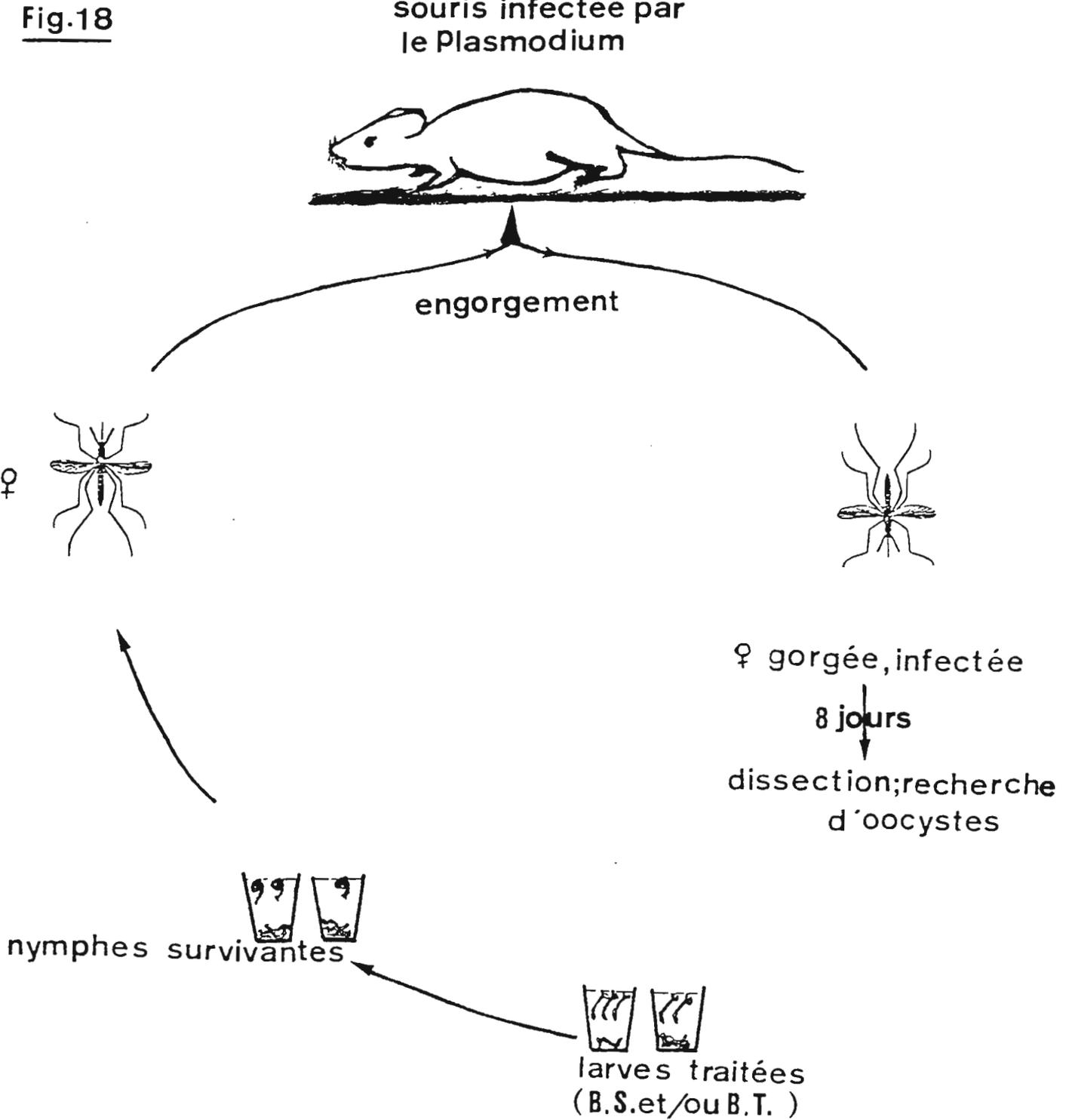


♀ gorgée, infectée  
8 jours  
↓  
dissection; recherche  
d'oocystes

nymphes survivantes

Two small rectangular petri dishes, each containing several small, dark, oval-shaped organisms representing nymphs.

larves traitées  
(B.S.et/ou B.T.)

Two small rectangular petri dishes, each containing several small, dark, oval-shaped organisms representing treated larvae.

Ces derniers vont chez l'hôte vertébré poursuivre une phase asexuée qui aboutira à la formation de gamétocytes et de schizontes (Fig19).

### III - Résultats

A l'analyse de chacune des six expérimentations effectuées (Tab.27a), 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 (Tab.27b), les différences pressenties deviennent significatives :

- les moustiques non traités sont trouvés porteurs d'oocystes dans 96,9 % des cas (62 positifs sur 64 disséqués) ;

- les anophèles traités par B.thuringiensis H 14 ne sont positifs que dans 83,6 % des cas, soit une différence significative ( $p < 0,02$ ) ;

- enfin, ceux ayant subi un contact avec B.sphaericus sont positifs pour 81,6 % d'entre eux ( $p < 0,05$ ), donc une différence ici encore significative par rapport aux témoins.

Sur un plan quantitatif (Tab. 28 ), nous trouvons un nombre d'oocystes plus faible chez les anophèles ayant été au contact de B.sphaericus que chez les témoins (significatif,  $p < 0,05$ ). Ainsi, 48,4 % des anophèles (15 sur 31) ont moins de 50 oocystes dans les traités contre 22,6 chez les non traités.

En ce qui concerne les anophèles traités par B.thuringiensis H 14, nous ne notons aucune différence (21,5 % contre 22,6 % chez les témoins).

### IV - Conclusion

Ces résultats laissent entrevoir une moindre réceptivité au plasmodium des anophèles soumis à l'effet entéropathogène de B.sphaericus et de B.thuringiensis H 14.

Les moustiques traités par B.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.

MOUSTIQUE

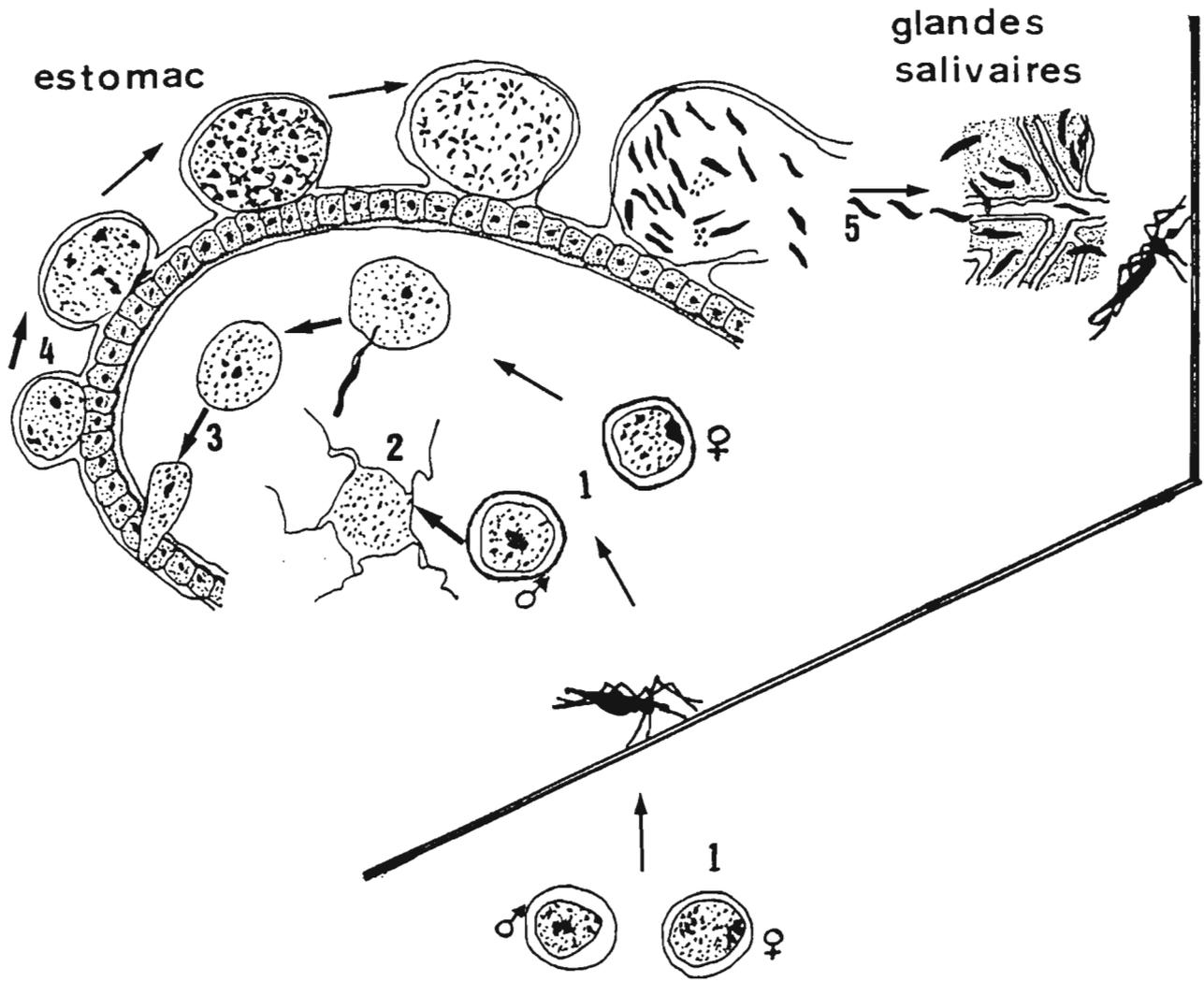


Fig.19

VERTÉBRÉ

- 1. GAMETOCYTE
- 2. EXFLAGELLATION  
DES MICROGAMETES
- 3. OOKINETE
- 4. OOCYSTE
- 5. SPOROZOITE

Tableau 27 : Corrélation entre le traitement subi par les anophèles  
et la présence d'oocystes.

a) Détail des 6 expérimentations.

Série	Traitement des Anophèles	Femelles gorgées	Femelles disséquées	Recherche d'oocystes	
				Présence	Absence
A	non traités	28	22	20	2
	B.T	8	6	6	0
	B.S	8	4	4	0
B	non traités	7	4	4	0
	B.T	9	7	5	2
	B.S	17	16	13	3
C	non traités	8	6	6	0
	B.T	17	11	9	2
	B.S	7	4	4	0
D	non traités	26	11	11	0
	B.T	15	12	7	5
E	non traités	19	11	11	0
	B.S	20	14	10	4
F	non traités	21	10	10	0
	B.T	58	25	24	1

B.T : Bacillus thuringiensis H 14

B.S : Bacillus sphaericus

b) Résultats globaux.

Traitement des Anophèles	Femelles gorgées	Femelles disséquées	Recherche d'oocystes		Différence significative par rapport aux témoins
			Présence	Absence	
non traités	109	64	62	2	-
B.T	107	61	51	10	oui $p < 0,02$
B.S	52	38	31	7	oui $p < 0,05$

Tableau 28 : 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 (série + et ++ fusionnées)
		+ < 10 oocystes	++ 10 à 15 oocystes	+++ > 50 oocystes	
non traités	62	6	8	48	-
B.T	51	2	9	40	non
B.S	31	4	11	16	oui p < 0,05

Les anophèles traités par B.thuringiensis H 14 ne permettent pas l'infestation plasmodiale dans les mêmes proportions (16,4 %). Par contre, une fois infestés, ils le sont aussi intensément que les non traités.

Ainsi, ces insecticides auraient peut-être, en plus de l'action létale sur les larves, une action défavorable sur la formation des oocystes.

Ce premier résultat doit inciter à poursuivre les investigations en ce domaine et à porter une attention accrue à ces moyens de lutte biologique.

## CONCLUSION GENERALE

La lutte biologique basée sur l'emploi de B.sphaericus, en tant que larvicide doit être menée essentiellement contre Culex, notamment Culex pipiens, le plus sensible parmi les moustiques testés (Culex, Anopheles et Aedes).

La mise au point d'une standardisation méthodologique pour un titrage biologique est difficilement réalisable. L'interprétation des résultats est analysée d'après la loi gaussio-logarithmique adoptée pour les insecticides classiques. Or, les résultats ne semblent pas suivre fidèlement ce modèle, car la même espèce ne réagit pas de façon identique d'une épreuve sur l'autre ; cela est peut-être dû à l'action lente du bacille, peut-être à la nature de la toxine ou peut-être enfin aux conditions expérimentales. En outre, l'ordinateur a le plus souvent tracé les droites de régression avec des  $\chi^2$  significatifs d'une expérimentation à l'autre, pour un même test. Donc, l'analyse doit être prudente. Il faut en effet prendre en compte tous les facteurs qui peuvent intervenir :

- Température, nature de l'eau (pH), nourriture etc,...
- Nombre de larves par test, nombre de larves par lot, temps de contact etc,...
- Disparition d'individus testés par nécrophagie ou cannibalisme (notamment chez Anopheles stephensi).

Par ailleurs, nous avons procédé avec la souche 1593-4 à des essais sur des poissons (100 ppm) et des larves prédatrices de Toxorhynchites amboinensis (nourries sur des larves de C.pipiens infectées par le bacille). Cette bactérie demeure sans effet sur la faune aquatique non-cible et les mammifères (de Barjac et al., 1979 ; Mulligan et al., 1978). Dans le cadre d'une lutte intégrée, l'utilisation simultanée de B.sphaericus et de T.amboinensis ne pose alors aucun problème de toxicité vis-à-vis de ces derniers.

Le mode d'action de B.sphaericus au niveau de l'épithélium intestinal du mésentéron des larves de C.pipiens révèle des altérations cytologiques importantes qui varient d'une région à une autre. Cela semblerait être lié aux fonctions physiologiques différentes des divers types cellulaires ou à des conditions enzymatiques suivant la région du tube digestif.

Le mésentéron est ainsi la cible de l'intoxication du bacille, particulièrement l'estomac postérieur qui est le plus touché. Cette observation avait déjà été faite par Davidson (1979), bien que la souche utilisée ait été SS II-1, toxique en stade végétatif. Les modifications histopathologiques, chez les larves de C.pipiens soumises à la souche 1593-4, apparaissent 30 minutes après l'ingestion et se manifestent par un gonflement cellulaire. Les altérations consécutives de l'estomac postérieur se traduisent en plusieurs étapes : hypertrophie, lyse cellulaire, rejet du matériel cytoplasmique dans la lumière entre la membrane péritrophique et l'épithélium intestinal, vacuolisation, puis détérioration de la cellule.

D'autre part, les cellules intestinales des larves d'Aedes caspius ne révèlent pas de modifications cytologiques, à part quelques vacuoles plus abondantes chez les sujets traités que chez les témoins.

Les travaux de Davidson (1981b) ont démontré que les spores de la souche 1593 n'ont pas été dégradées dans le tube digestif des larves de C.quinquefasciatus, et une germination a été observée. Les travaux de Myers et al. (1979) indiquent que la toxine peut être libérée par l'action des protéases chez les larves. Dans nos observations, l'ingestion du broyat des cadavres de larves intoxiquées, maintenus au moins 48h dans l'eau, engendre une mortalité plus importante chez les larves saines que la poudre du bacille. Cette toxicité est due probablement à une multiplication du bacille (Davidson 1982b) ou/et à une libération d'une toxine qui serait associée à la nouvelle génération de la bactérie. Ces hypothèses font l'objet d'une recherche plus approfondie, notamment pour connaître la quantité du bacille multiplié et l'origine éventuelle d'un élément toxique libéré.

Dans les conditions du laboratoire, la bactérie maintenue dans les cadavres de larves de C.pipiens est restée viable pendant trois mois. De plus, la toxicité du broyat a gardé son pouvoir pendant cette durée. De même, la culture du broyat des cadavres, en milieu M.B.S., dès le départ et à la fin de l'expérience, a donné approximativement 50 % de cellules végétatives et 50 % de spores. Les DL 50 de ces deux cultures, après des essais sur des larves saines, ont été analogues.

Sur le terrain, la souche 1593-4 paraît efficace contre C.pipiens dans les gîtes larvaires à eau polluée, riche en matière organique.

Dans un tel type de traitement, il faudrait tenir compte du nombre de larves tuées par le bacille. Les cadavres dans lesquels demeurent de nouvelles générations de B.sphaericus (Davidson et al., 1975) seraient progressivement dégradés et contribueraient à maintenir une certaine toxicité pour les nouvelles larves installées dans le gîte traité.

Il semblerait donc que le recyclage mentionné par Hertlein et al. (1979) dépende non seulement de la qualité de l'eau, mais également de la quantité de cadavres intoxiqués. Il serait intéressant de savoir, en ce qui concerne ce phénomène, si la persistance de la bactérie chez les cadavres est le facteur essentiel de la toxicité résiduelle après le traitement.

En plus de l'activité létale de B.sphaericus sur les larves de Culex et Anopheles, nous avons noté une autre action contrariante sur la formation des oocystes de Plasmodium yoelii yoelii, une des étapes du cycle de le paludisme, chez Anopheles stephensi. En effet, les anophèles traités à l'état larvaire par B.sphaericus ne permettent pas l'infestation plasmodiale, dans 18,4 % des cas. Il serait souhaitable de poursuivre les investigations dans cette voie pour connaître la nature éventuelle de telles lésions intestinales qui provoqueraient une baisse de formation d'oocystes, réduisant partiellement le nombre des femelles infectées.

L'ensemble de ces hypothèses offrent un certain nombre de perspectives de recherches et de problèmes à résoudre. Quand la confirmation sera établie, on peut éventuellement espérer l'utilisation de B.sphaericus en tant qu'agent de lutte intégrée, ouvrant la voie à une lutte anticulicidienne, car certaines espèces sont difficilement atteintes par les méthodes de lutte classiques.



RESUME

La toxicité de B.sphaericus 1593-4, testée sur quelques espèces de moustiques, a été spécifiquement efficace contre Culex et peut-être ensuite contre Anopheles. Les larves d'Aedes aegypti sont très peu touchées par la bactérie ; celles d'Aedes caspius et de Culiseta annulata ne sont nullement atteintes. En outre, aucun effet toxique n'a été noté chez les poissons et Toxorhynchites amboinensis, ce qui confirme une fois de plus l'innocuité de B.sphaericus.

Divers facteurs intervenant dans l'expérimentation ont été étudiés afin de mettre au point une standardisation pour un titrage biologique. Bien que les résultats aient été analysés selon la loi gaussol logarithmique, normalisée pour les insecticides chimiques, la relation mortalité-dose n'a pratiquement pas obéi à ce système log-probit.

L'étude effectuée sur le mode d'action de B.sphaericus sur les larves de C.pipiens met en évidence des lésions importantes au niveau de l'intestin moyen. Les altérations cytologiques du mésentéron varient d'une région à une autre ; cependant, l'estomac postérieur semble être plus atteint.

D'autre part, l'épithélium intestinal des larves d'Aedes caspius ne semble pas être touché par la bactérie. Aucune modification histologique n'a été observée, à l'exception de quelques vacuoles plus abondantes chez les sujets traités que chez les témoins.

Le broyat des cadavres de larves de C.pipiens intoxiquées par B.sphaericus possède un pouvoir larvicide caractérisé par sa rapidité d'action, supérieure à celle du bacille lui-même.

Par ailleurs, des larves mortes après intoxication du bacille ont été maintenues pendant trois mois dans l'eau ; leur pouvoir larvicide a gardé son efficacité contre des larves indemnes. Les DL 50 des cultures des broyats, en milieu M.B.S., des cadavres maintenus 48h et trois mois dans l'eau, ont été pratiquement identiques.

Dans la nature, des traitements par la souche 1593-4 ont eu lieu sur trois gîtes larvaires : à eau contenant des quantités variables de matières organiques allant de l'eau polluée à l'eau claire.

L'activité larvicide paraît être plus efficace dans le gîte à eau pollué que dans les autres gîtes. Son efficacité résiduelle dépend d'une part de la qualité de l'eau, et d'autre part de la quantité de larves mortes intoxiquées.

Des individus d'Anopheles stephensi ont été mis en contact, à l'état larvaire, avec B.sphaericus et B.thuringiensis H 14. Ils ont ensuite été nourris sur des souris infectées par Plasmodium yoelii yoelii. Le taux d'infestation plasmodiale, évalué par la présence d'oocystes sur la paroi externe de l'estomac du moustique, a été moindre dans les lots traités que dans les lots témoins.



SUMMARY

The toxicity of Bacillus sphaericus 1593-4 has been tested against some mosquitoes species. Its efficacy was limited against Culex and maybe Anopheles. The larvae of Aedes aegypti were little affected by this bacterium ; however, the larvae of Aedes caspius and Culiseta annulata were not affected. In addition, no toxic effect against fish and Toxorhynchites amboinensis larvae ; these results confirm the innocuity of B.sphaericus

Several factors involved in the experiment were studied to find a standard method for the titration in bioassays. The analyses of results showed that the gaussian-logarithmic model was not observed in this present experiment as usually done when studying the dose-mortality relationship with chemical insecticides.

Important lesions were observed in the midgut of C.pipiens larvae intoxicated with B.sphaericus. Cytological alterations were not the same in the different parts of the midgut. However, the posterior part appeared to be more affected than the other parts.

Moreover, the epithelium of the larval midgut of Aedes caspius seemed not to be affected by this bacterium. No histological modification has been observed, except in some vacuolisations which were more abundant in the treated larvae than in the controls.

The cadaver grinding of C.pipiens larvae intoxicated with B.sphaericus showed a faster effect than the bacilli itself. In addition, the dead larvae after intoxication has been maintained for three months in water. The larvicidal activity of the grinding of these cadavers was efficacious during this time. The cultures of the grinding of the cadavers maintained for 48h and three months were tested. As a result, the LD 50 were estimated to be identical.

In field applications of the strain 1593-4, the treatment was more successful in the reduction of C.pipiens larvae, in polluted water than in semi-polluted water and tap water. The larvicidal residual efficacy depends not only on the quality of water but also on the number of dead larvae intoxicated.

Adults of Anopheles stephensi that had been in contact with B.sphaericus and B.thuringiensis H 14 at larvae stage, were fed on mice

infected with Plasmodium yoelii yoelii. As a result, the plasmodial infection rate, evaluated by the presence of oocysts on the external side of stomach wall; was somewhat lower in tested batches than in control ones.

★

★

★

BIBLIOGRAPHIE

- 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. Série III, 905 - 910.
- de Barjac, H., Larget, I., Cosmao, V., Benichou, L. et Viviani, G., 1979 - Innocuité de Bacillus sphaericus, souche 1593, pour les mammifères. WHO/VBC/79., 731.
- de Barjac, H., Veron, M. et Cosmao Dumanoir, V., 1980 - Caractérisation biochimique et sérologique de souches de Bacillus sphaericus pathogènes ou non pour les moustiques. Ann.Microbiol. Institut Pasteur, 131.B., 191 - 201
- 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 3ème cycle. Univers. de Paris sud - Orsay.
- Bourgouin, C. et de Barjac, H., 1980 - Evaluation du potentiel de Bacillus sphaericus comme larvicide anti-moustiques. WHO/VBC/80., 792.
- 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.
- Chapman, H.C., 1981 - Potential for use of biological agents in the integrated control of vectors. TDR/BCV/SWG. 81/WP., 10.

- Chauvet, G., 1978 - Lutte biologique contre les vecteurs d'affections humaines et tropicales. Moyens actuels et perspectives. Méd.Trop., 38, N°6, 651- 657.
- 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. Med.Trop., 38, n° 6, 659 - 665.
- Coz, J. et Mouchet, J., 1981 - Conception actuelle de lutte contre les anophèles. Méd.Malad.Infect., n°6 bis, 404 - 407
- Dadd, R.H., 1975 - Alkalinity within the midgut of mosquito larvae with alkaline - active digestive enzymes. J.Insect.Physiol., 21, 1847 - 1853
- Dagnogo, M. et Coz, J., 1982 - 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., XX, n°2, 133 - 138.
- Davidson, E.W., 1979 - Ultrastructure of midgut events in the pathogenesis of B.sphaericus strain SS II-1 infections of Culex pipiens quinquefasciatus larvae. Can.J.Microbiol., 25, 178 -184.
- Davidson, E.W., 1981a - Site, production and chemistry of the Bacillus sphaericus toxin. TDR/BVC/SWG. 81/WP.22.
- Davidson, E.W., 1981b - 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., 1982a - Purification and properties of soluble cytoplasmic toxin from the mosquito pathogen Bacillus sphaericus strain 1593. J.Inverteb.Pathol., 39, 6 - 9.
- Davidson, E.W., 1982b - Insecticidal factors from Bacillus sphaericus and production of biocides from this organism. Working Paper, WHO, Geneve, April 1982, 11 pp.
- Davidson, E.W., 1983 - Alkaline extraction of toxin from spores of the mosquito pathogen, Bacillus sphaericus strain 1593. Can.J. Microbiol., 29, 271 - 275.
- 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, n°3, 235 - 247.
- Fast, P.G., 1982 - Chemistry and biochemistry of biocides. In Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases. Doc.Miméo. OMS, UNDP/WB/WHO ; Genève, 3, 21 - 27.
- Faye, O., 1981 - Etude de l'activité larvicide de Bacillus sphaericus sur quelques souches de moustiques. Rap.DEA., Univers. Paris VI.
- Federici, B.A., 1982 - Site of the action of the delta - endotoxin of Bacillus thuringiensis in mosquito and blackfly larvae. In Basic biology of microbial larvicides of vectors of human diseases. Doc.miméo., OMS, UNDP/WB/WHO ; Genève, 37 - 46.
- Ferron, P., 1975 - Les champignons entomopathogènes : évolution des recherches au cours des dix dernières années. Bull. S.R.O.P., 3, 54 pp.

- Gargan, T.P., II, Charles, L., Glen, B.A., Adel Gad, H. and El Saïd, S., 1983 - The effects of laboratory colonization on the vector - Pathogen interactions of egyptian Culex pipiens and Rift Valley Fever Virus. Am.Trop.Med.Hyg., 32, n°5, 1154 - 1163.
- Gerberg, E.J. and Visser, W.M., 1978 - Preliminary field trial for the biological control of Aedes aegypti by means of Toxorhynchites brevipalpis, a predatory mosquito larvae. Mosq.News., 38, 197 - 200.
- Hamon, J., 1981 - Science and appropriate technology for vector control. POST (Kenya), 6, n°1, 24 -32.
- 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, n°5, 217.
- 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.Miméo.Doc. WHO/VBC/81, 830.
- Hougaard, 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 : Culicidae) en Afrique de l'Ouest. Cah.ORSTOM, Sér.Ent.Méd. et Parasitol., XXI, n°2 ; 111 - 117.
- Jadin, J., 1967 - Du rôle des bactéries dans le tube digestif des insectes vecteurs des plasmodia et des trypanosomidae. Ann.Soc.Belge Med. Trop., 47, n°4, 331 - 342.
- Jenkins, D.W., 1964 - Pathogens, parasites and predators of medically important Arthropods. Bull.WHO.Suppl. to vol 30.

- 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., Larget- Tiéry, 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.
- 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, n°4, 442 - 448.
- Krych, V.K., Johnson, J.L. and Yousten,A.A., 1980 - Desoxyribonucleic acid homologies among strains of Bacillus sphaericus. Int.J.Syst. Bacteriol., 30, 476 - 484.
- Lacey, L.A., 1982 - The efficacy, persistence and cycling potential of Bacillus sphaericus. Proc.IIIrd.Int.Coll.Invert.Pathol., 490 - 493.
- Landau, I., Miltgon, F., Boulard, Y., Chabaud, A.G. et Baccam,D., 1979 - Etudes sur les gamétocytes des plasmodium du groupe "vivax". Ann.Parasitol., 54, n°2, 145 - 161.
- 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. N.B.L. 53rd TPR., Part 1, 70 - 79.
- 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.Experim.Biol., 20, 768 - 772.
- Miller, L.K., Lingg, A.J. and Bulla, L.A.Jr, 1983 - Bacterial, Viral and Fungal insecticides. Science, 219, 715 - 721.

- Moreau, C.M. and Stiles, A.R., 1978 - Insect chemosterilants. WHO/VBC/78, 695.
- Motabar, M., 1974 - Malaria and the nomadic tribes of Southern Iran. Cah.ORSTOM,Sér.Ent.Méd.Parasitol., XII, n°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.
- Mulligan, F.S., Schaefer, C.H. and Miura, T., 1978 - Laboratory and field evaluation of Bacillus sphaericus as a mosquito control agent. J.Eco.Entomol., 71, 774 - 777.
- 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, n°3, 1047 - 1053.
- Myers, P. and Yousten, A.A., 1980 , Localization of mosquito larval toxin of Bacillus sphaericus 1593. Appl.Environ.Microbiol., 39, n°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, n°11, 1227 - 1231.
- O.M.S., 1970 - Résistance aux insecticides et lutte antivectorielle. Sér.Rapp.Techn., 443.
- O.M.S., 1979 - Biological control agent data sheet, Bacillus sphaericus, strain 1593-4. WHO/VBC/BC DS/79.09, DRAFT.
- O.M.S., 1980a - Bibliography on pathogens of medically important arthropods. WHO.Suppl. to vol 58.

- O.M.S., 1980b - "Culicinomyces sp.". Data sheet on the biological control agent. WHO/VBC/80, 755, VBC/BC DS/80.03.
- O.M.S., 1980c - Data sheet on the biological control agent, Bacillus sphaericus, strain 1593. WHO/VBC/80, 777, VBC/BC DS/80.10.
- O.M.S., 1980d - Fourth meeting of the scientific working groups on biological control of insect vectors of disease. TDR/BCV-SWG (4)/80.3.
- O.M.S., 1980e - Vavraia (Pleistophora) Culicis (Weiser 1946) - Data sheet on the biological control agent. WHO/VBC/80, 759, WHO/BC DS/80.05.
- O.M.S., 1981 - Fifth meeting of the scientific working group on biological control of vectors. TDR/VEC - SWG (5)/81.3.
- O.M.S., 1982 - Sécurité pour les mammifères des agents microbiens utilisés dans la lutte antivectorielle. Mémo, OMS. Bull : 60 (1), 61 - 68.
- Petersen, J.J., 1981 - Observations on the biology of Octomyomermis muspratti, a Nematode parasite of mosquitoes. J.Inverteb.Path., 37, 290 - 294.
- Petersen, J.J. and Willis, O.R., 1972 - Procedures for the mass rearing of a mermithid parasite of mosquitoes. Mosq.News, 32, 226 - 230.
- 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.
- 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, n°1, 127 - 132.
- Ramoska, W.A., Burgess, J. and Singer, S., 1978 - Field application of a bacterial insecticide. Mosq.News, 38, n°1, 57 - 60.

- Ramoska, W.A. and Hopkins, T.L., 1981 - Effects of mosquito larval feeding behavior on Bacillus sphaericus efficacy. J.Inverteb. Pathol., 37, 269 - 272.
- Ramoska, W.A., Singer, S. and Levy, R., 1977 - Bioassay of three strains of Bacillus sphaericus on field. Collected mosquito larvae. J.Inverteb.Pathol., 30, 151 - 154.
- Richins, C.A., 1945 - The development of the midgut in the larvae of Aedes dorsalis Meigen. Ann.Ent.Soc.Amer., 38, 314 - 320.
- Robert, V, Barathe, J., Sannier, C. et Coz, J., 1983 - Comparaison du développement larvaire et des stades tueurs de Toxorhynchites brevipalpis et de T.amboinensis. (Diptera : Culicidae). Cah.ORSTOM, Sér.Ent.Med.et Parasitol. XXI, n°1, 13 - 18.
- 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., VI, n°3/4, 237 - 246.
- Silapanantakul, S., Pantuwatana, S. and Bhumiratana, A., 1982 - The stability of toxicity of Bacillus sphaericus strain 1593 and Bacillus thuringiensis H 14 in different kinds of water against mosquito larvae. Proceedings of second Southeast Asian Symposium on Biological Control, National Biological Control Research Center ; Bangkok, 22 - 24, June 1982.
- 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.
- Sinègre, G., Gaven, B. et Vigo, G. 1980 - 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.

- 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.
- Singer, S., 1981 - Potential of Bacillus sphaericus and related spore-forming bacteria for pest control. P. 283 - 298. In : Burges, H.D.Ed., Microbiol. Control of Pests and Plants diseases. 1970 - 1980. Academic press, New York.
- Tinelli, R. and Bourgouin, C., 1982 - Larvicidal toxin of Bacillus sphaericus spores ; isolation of toxin components. FEBS, Letters, 142, n°1, 155 - 158.
- Trpis, M., 1972 - Development and predatory behaviour of Toxorhynchites brevipalpis (Diptera : Culicidae) in relation to temperature. Envir.Entomol., 1, 537 - 546.
- 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.
- Yousten, A.A., de Barjac, H., Hedrick, J., Cosmao Dumanoir, V. and Myers, P., 1980 - Comparison between bacteriophage typing and serotyping for the differentiation of Bacillus sphaericus strains. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 131B, 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, n°6, 1449 - 1455.
- Yousten, A.A., 1984 - Bacteriophage typing of mosquito pathogenic strains of Bacillus sphaericus. J.Inverteb.Pathol., 43, 124 - 125.