

Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de *Simulium damnosum* s. l.

Jean MOUCHET *
Guy QUELENNEC **
Daniel BERL ***
Yves SECHAN ****
Serge GREBAUT *****

RÉSUMÉ.

Les méthodes en usage se sont révélées inadéquates pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de *Simulium damnosum* s. l. dans la zone du Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la région du bassin de la Volta. Les auteurs proposent, pour ce faire, une technique simple, reproductible et exécutable sur le terrain.

Les larves des stades 4 et 5 sont placées dans des récipients contenant 250 ml d'eau distillée à 20 ou 21° C additionnée de la concentration désirée d'insecticide; l'eau a été préalablement oxygénée, mais on n'injecte pas d'air comprimé pendant la durée du test; celle-ci est de 3 heures, au bout desquelles est effectuée la lecture de la mortalité. Les larves moribondes, c'est-à-dire qui n'ont plus de mouvements spontanés, mais réagissent à des stimuli physiques, sont comptées comme mortes. Il faut éliminer des résultats par examen microscopique les larves d'autres espèces que *S. damnosum* et celles de stade avancé; en effet, les stades 6 et 7 sont beaucoup moins sensibles aux insecticides.

Il a été prouvé qu'un temps d'exposition de 6 heures ne fournit pas de meilleures lignes de régression, mais augmente les risques de mortalité accidentelle. En effet, les élévations de température au-delà de 25° C entraînent des mortalités anormales. En adoptant un temps d'exposition de 3 heures, il est possible de faire les tests tôt le matin ou tard le soir, en évitant les brusques élévations de température du milieu de la journée.

ABSTRACT.

The usual methods for testing the susceptibility of blackflies to insecticides were found inadequate for *Simulium damnosum* s. l. in the area of the Onchocerciasis Control Programme in the Volta River Basin. A simple and reproducible testing technique, easy to carry out in the field, is proposed.

Fourth and fifth instar *Simulium* larvae are put in a 250 ml container filled with distilled water at 20° C — 21° C, to which the required insecticide dosage has been added. The water has been previously oxygenated but no compressed air is injected during the test. Exposure time is three hours at the end of which mortality is recorded. Moribund larvae which react only to prodding with a needle are also counted as dead. After examination under the microscope, larvae of other species, or of other instars, are discounted. It has been observed that 6th and 7th instar larvae are much less susceptible.

A six-hour exposure time does not give better regression lines but increases the risk of accidental mortality. Increases of temperature up to 25° C lead to abnormal mortality. With an exposure time of three hours, it is possible to carry out the tests early in the morning or late in the afternoon to avoid the heat of the middle of the day.

* Entomologiste de l'O.R.S.T.O.M., 70-74 route d'Aulnay, Bondy 93140, France.

** Entomologiste O.M.S., Genève.

*** Entomologiste de l'O.R.S.T.O.M., Institut de Recherches sur l'Onchocercose, Bouaké, B.P. 1500, Côte d'Ivoire.

**** Technicien de l'O.R.S.T.O.M., Institut de Recherches sur l'Onchocercose, Bouaké, B.P. 1500, Côte d'Ivoire.

***** Technicien Coopération, Institut de Recherches sur l'Onchocercose, Bouaké, B.P. 1500, Côte d'Ivoire.

Les CL 50 vis-à-vis de l'Abate, insecticide employé dans le Programme, varient entre 0,013 et 0,076 pour les populations de *Simulies* de Côte d'Ivoire et du Mali testées au cours de cette étude; les CL 95 correspondantes se situent entre 0,052 et 0,15 ppm.

Une dose diagnostique de 0,25 ppm est proposée. S'il y a plus de 5 % de survivants à cette concentration, on doit envisager la possibilité d'apparition d'une résistance et approfondir les études dans ce sens. En utilisant toute la gamme de concentrations, des lignes de régression présentent normalement une pente suffisante pour déceler une baisse de sensibilité d'une fraction de la population.

Il est possible qu'il y ait des différences de sensibilité suivant les cytotypes; *S. soubrense*, notamment, semble plus sensible que *S. damnosum* et surtout que *S. yahensis*. Mais aucun signe de résistance à l'Abate n'a été observé chez les souches étudiées en Côte d'Ivoire et au Mali.

MOTS CLÉS : Sensibilité et résistance aux insecticides – stades immatures – *Simuliidae* – région éthiopienne.

LD 50 for Abate, the insecticide used in the Control Programme, varied from 0,013 to 0,076 ppm according to the different strains tested from Ivory Coast and Mali. Corresponding LD 95 varied from 0,052 to 0,15 ppm.

A diagnostic dosage of 0,25 ppm is proposed. If more than five per cent of the larvae survive, resistance may be suspected and more extensive investigations have to be undertaken. The slope of the regression lines, obtained by using the whole range of concentrations, is such that a decrease in susceptibility of a fraction of the blackfly population can normally be detected.

It is possible that the different species of the *S. damnosum* complex are not equally susceptible to Abate. *S. soubrense* appears to be more susceptible than *S. damnosum* and *S. yahensis* which is the least susceptible. Nevertheless, no sign of resistance to Abate has been observed during this study in Ivory Coast and Mali.

KEY WORDS : Susceptibility and resistance to insecticides – preimaginal stages – *Simuliidae* – Ethiopian region.

1. INTRODUCTION.

La lutte contre les simulies dans le Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la région du bassin de la Volta est basée sur l'emploi continu de larvicides pendant une très longue période. Cette utilisation prolongée du même composé, actuellement l'Abate, peut entraîner l'apparition de souches de *Simulium damnosum* résistantes au produit utilisé. Il est donc nécessaire de pouvoir contrôler à tout moment la sensibilité aux insecticides, et en particulier à l'Abate, des larves de cette espèce, pour être en mesure de faire face aux problèmes qu'entraînerait l'apparition d'une éventuelle résistance.

Le Programme de Lutte contre l'Onchocercose s'étend sur de très vastes étendues (700 000 km²). Les gîtes larvaires de *Simulium damnosum* sont souvent très éloignés de tout laboratoire. Il importe donc que les tests utilisés pour déceler l'apparition de la résistance puissent être facilement exécutés sur le terrain. En effet, même en utilisant l'hélicoptère, qui est très onéreux, il est souvent difficile, voire impossible, de transporter les larves à un laboratoire spécialement équipé dans des délais assez courts. Si la durée du transport est trop longue la survie ultérieure des larves se trouve abrégée et l'exécution des tests devient pratiquement impossible.

2. HISTORIQUE.

Dès 1949-1950, Gjullin *et al.* ont tenté d'évaluer en laboratoire l'activité des insecticides sur les larves de simulies. On a constaté depuis que les méthodes de laboratoire ne permettaient pas de se faire une idée précise de l'efficacité des insecticides antisimulidiens dans les conditions naturelles, mais qu'elles pouvaient par contre être employées pour mesurer la sensibilité relative de diverses souches à un même insecticide.

Plusieurs méthodes ont été proposées pour déterminer la sensibilité de ces insectes aux composés utilisés dans la lutte larvicide antisimulidienne. Ces techniques se groupent en trois catégories :

— celles dans lesquelles les larves sont mises en contact pendant un certain temps avec la solution d'insecticide (cette solution étant ou non mise en mouvement par injection d'air comprimé) puis mises en observation pendant vingt-quatre heures dans de l'eau pure aérée, (Muirhead-Thomson, 1957; Jamnback, 1962; méthode provisoire proposée par le Comité OMS d'Experts, 1970; Thomson, 1975);

— celles dans lesquelles les larves sont placées dans un courant d'eau auquel on additionne de l'insecticide pendant un certain temps ou placées dans un courant naturel ou artificiel après avoir été mises en contact

avec une solution d'insecticide (Wilton et Travis, 1965; Muirhead-Thomson, 1969; Walsh, 1973; Thomson, 1975; Raybould, 1975);

— celles dans lesquelles les larves sont placées en eau stagnante soit en contact continu avec l'insecticide soit après un contact limité, (Ovazza et Valade, 1963; Queleennec et Vervent, 1970; Raybould et Clark, 1974; Raybould, 1975).

Certaines de ces méthodes ont été essayées dans la région du Programme de Lutte contre l'Onchocercose, lorsqu'elles semblaient pouvoir être applicables compte tenu des conditions matérielles et climatologiques y prévalant.

L'obstacle majeur était le manque d'électricité en dehors des grands centres urbains. Cette carence prévient la possibilité de climatiser les laboratoires, dont la température peut s'élever dans les conditions naturelles jusqu'à 40° C, ou d'actionner soit des pompes à eau soit des compresseurs d'air. L'emploi de l'eau de rivière étant, en outre, impossible en zone traitée aux insecticides, nombre de ces méthodes devenaient inapplicables.

3. MÉTHODE PROPOSÉE.

Pour être utilisable par le Programme un test de sensibilité aux insecticides doit être reproductible, simple et exécutable sur le terrain. La méthode Queleennec-Vervent, 1970, répondait aux deux premières conditions, mais les opérations devaient être exécutées dans un local climatisé. Il fut alors envisagé de réduire la durée du temps de contact pour surmonter les problèmes posés par les élévations quotidiennes de la température, incompatibles avec la survie des larves.

3.1. DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

Les larves sont prélevées dans le gîte et amenées le plus vite possible sur le lieu où se déroulera le test. Elles sont rapidement triées et réparties dans des bols en pyrex, par lots de 25 dans 50 ml d'eau du gîte. Il est très important, pour des raisons qui seront discutées plus loin, de ne prendre que des larves apparemment du 4^e et 5^e stade, (fig. 1).

L'eau des bols est vidée avec précaution pour que les larves restent accrochées aux parois des récipients qui sont alors remplis avec 250 ml de la dilution d'insecticide.

Les dilutions d'insecticide de concentrations croissantes sont obtenues à partir de solutions dans l'éthanol de la matière active que l'on verse dans de l'eau distillée préoxygénée par barbotage d'air et amenée à une température de 19 à 20° C.

Les bols sont placés dans un lieu où les variations de la température restent faibles : sable humide ombragé

au bord de la rivière ou caisson isotherme, (fig. 2). La température ne doit pas dépasser 25° C. Il est donc recommandé d'opérer soit très tôt le matin, soit dans la soirée.

Nous avons estimé que le temps de contact optimum était de trois heures. Après ce temps de contact, la mortalité provisoire est établie en décomptant, d'un côté, les larves vivantes, de l'autre, les mortes et les moribondes. Chaque larve est ensuite contrôlée à la loupe binoculaire pour confirmer l'espèce et le stade. Toutes les larves des stades 3, 6 et 7 sont rejetées ainsi, bien sûr, que celles qui n'appartiennent pas à l'espèce testée.

La technique proposée a été mise au point du cours d'une série d'expériences exécutées en Côte d'Ivoire et au Mali, à la limite de la zone du Programme de Lutte contre l'Onchocercose ou à l'intérieur de celle-ci dans des régions encore non traitées, du 15 janvier au 28 février 1976, c'est-à-dire en pleine saison sèche. Au cours de cette période de l'année, les variations de température sont très importantes, mais la faible hygrométrie permet une bonne évaporation de l'humidité contenue dans le sable et donc le maintien d'une température convenable.

3.2. RÉSULTATS DES TESTS

Les simulies testées appartenaient au complexe *Simulium damnosum*, mais suivant les zones phytogéographiques, les cytotypes dominants étaient Soubré en forêt et savane guinéenne, Nile et Sirba en savane soudanienne, Yah dans les chutes de la Bagoé en limite de zone guinéenne. Ces cytotypes ont été élevés au rang d'espèce par Garms et Vajime, 1975, sous les noms respectifs de *S. soubrense*, *S. sirbanum* et *S. yahensis*, l'ancien nom de *S. damnosum* étant réservé au cytotype Nile.

Les valeurs caractéristiques de la sensibilité de chaque souche (CL 50, CL 95), déterminées graphiquement, sont indiquées dans les tableaux pour chaque test. Si l'on considère les valeurs fortes, c'est-à-dire celles obtenues en additionnant larves mortes et larves moribondes, les CL 50 varient de 0,013 à 0,076 ppm (soit 5,8 fois) et la CL 95 de 0,052 à 0,17 ppm (soit 3,3 fois). Les lignes de régression sont parallèles et leur pente au-delà de la CL 50 définie par le rapport CL 95/CL 50 est de 3 environ. Ces données permettent de considérer ces tests comme reproductibles; en effet aucune ligne de régression n'est significativement différente d'une autre dans la même localité.

Les rapports CL 95/CL 50 de 3 sont du même ordre que ceux obtenus dans les tests, recommandés par l'OMS, sur les larves de moustiques avec 24 heures d'observation. Dans ce cas la dispersion des CL 50 et CL 95 pour une même espèce est également du même

ordre que pour *S. damnosum*. Par exemple les CL 50 à l'Abate de 200 souches sensibles d'*Aedes aegypti* variaient de 1 à 7 (Mouchet *et al.*, 1972).

La mortalité totale a toujours été atteinte en trois heures d'exposition avec des concentrations d'Abate inférieures à 1,25 ppm, 0,50 ppm lorsque les larves moribondes étaient considérées comme mortes et 1,25 ppm lorsqu'elles étaient considérées comme vivantes.

4. DISCUSSION.

Les divers facteurs impliqués dans l'exécution des tests de sensibilité : critères de mortalité, temps de contact, températures, manipulation et choix des larves, sont étudiés dans les paragraphes suivants. Ce sont les résultats de ces observations qui ont motivé les propositions présentées dans notre méthodologie.

4.1. CRITÈRES DE MORTALITÉ.

Un certain nombre de larves ne peuvent être comptées, ni comme vivantes car elles n'ont pas de mouvements spontanés, ni comme mortes car elles réagissent à des stimuli physiques : piqûres d'épingle, manipulation à la pince... Ces larves dites moribondes sont en survie précaire et d'ailleurs elles meurent rapidement si le contact avec l'insecticide est prolongé de quelques heures. Avant de décider si elles devaient être classées comme mortes ou comme vivantes dans les calculs de mortalité nous avons établi pour chaque test deux lignes de régression : une de « mortalité forte » et une de « mortalité faible ». Dans le premier cas les larves moribondes ont été considérées comme mortes, dans le deuxième comme vivantes.

Si l'on considère les tableaux I, II et III, il apparaît que le rapport CL 95/CL 50 est, pour les courbes de mortalité « forte », significativement inférieur à la valeur du même rapport pour les courbes de mortalité « faible » ($t = 4,40$ à 13 degrés de liberté); ce rapport caractérise la pente de la ligne de régression au-delà de la CL 50. Cette pente est donc beaucoup plus accusée lorsque le graphique a été établi d'après la mortalité « forte ». Or l'apparition de la résistance se traduisant par un abaissement ou une rupture de cette pente, ce phénomène sera plus facilement décelable sur les lignes de régression établies d'après la mortalité « forte ». De plus, il est fort probable qu'un début de résistance se traduirait par une augmentation du pourcentage des larves vivantes plutôt que de celui des moribondes.

En conclusion, nous pensons qu'il faut utiliser la mortalité « forte » susceptible de fournir de meilleures informations pour la détection de la résistance. En outre, sa lecture est plus rapide, plus simple et moins ambiguë que lorsqu'il faut s'assurer que les spécimens réagissent

à la piqûre ou tout autre traumatisme. Dorénavant, lorsque nous parlerons de mortalité sans autre précision, il s'agira donc de mortalité « forte ».

4.2. TEMPS DE CONTACT

Brengues, 1964, a montré que la mortalité des larves de moustiques était constante pour un insecticide donné et égale au produit du temps de contact par la concentration, affecté d'un coefficient caractéristique de l'insecticide :

$$C T n = \text{mortalité constante.}$$

Si le temps de contact diminue, il faut donc augmenter la concentration d'insecticide pour obtenir la même mortalité et les lignes de régression obtenues avec divers temps d'exposition sont parallèles.

Nous avons comparé la mortalité des larves de simules à différentes concentrations d'Abate pendant des temps de contact de 3, 6, 12 et 24 heures. Le tableau IV et la figure 3 rendent compte de nos résultats. Il apparaît que la CL 50 en 24 heures est environ la moitié de celle de 12 heures, laquelle est environ la moitié de celle de 6 heures. Par contre, la CL 50 en 3 heures est 3,5 fois supérieure à celle en 6 heures. Mais le rapport CL 50 3 heures/CL 50 6 heures n'était en moyenne que de l'ordre de 3 dans l'analyse comparative des paires de tests (T 10/T 11; T 12/T 13; T 19/T 20; T 22/T 23) (Tableau V) effectués au même endroit et dans les mêmes conditions.

L'analyse des rapports CL 95/CL 50 dans les mêmes paires de tests fait ressortir une moyenne de 2,4 lorsque le temps de contact est de 3 heures et de 2,1 pour un contact de 6 heures. Ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes ($t = 0,41$ à 4 d. d. l.). La pente des lignes de régression au-delà de la CL 50 n'est donc pas différente pour des temps de contact de 3 ou 6 heures; elles présentent un certain parallélisme confirmé par l'analyse statistique du paragraphe récent.

Dans tous les cas la mortalité totale est obtenue aussi bien en 3 heures qu'en 6 heures avec des concentrations usuelles d'Abate (moins de 0,5 ppm pour 3 heures).

Une durée de contact de 6 heures ne semble donc pas présenter d'avantage au plan des résultats par rapport à un contact de 3 heures.

4.3. TEMPÉRATURE.

La température de l'eau pendant le test et au cours du tri des larves est un des facteurs les plus importants. Dès 25° C la mortalité des témoins est susceptible d'augmenter, mais c'est au-dessus de 28 °C qu'elle devient inacceptable. Dans les tests sur le terrain la température de l'eau varie souvent de 4 à 6 °C entre le début et la fin de l'exposition. Pendant les périodes très chaudes il est intéressant de débiter à une température

TABLEAU I. — Tests réalisés avec les cytotypes Soubre, Nile, Surba à Bouaflé et Danangoro rivière Marahoue — insecticide Abate — durée de contact 3 heures.

Numéro du Test	T2					T3					T4				
	21.1.1976					22.1.1976					22.1.1976				
Date															
Concentration Insecticide (ppm)	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%
0,0025	0	0	20	0	0	0	0	47	0	0	3	0	49	8	8
0,0050	0	0	49	0	0	2	0	42	4	4	0	0	49	0	0
0,0125	4	3	45	15	9	1	0	50	2	2	0	0	47	0	0
0,025	21	11	47	66	42	13	4	46	37	28	1	6	44	16	2
0,050	24	23	50	94	48	32	8	43	93	74	15	17	49	65	30
0,10	26	19	45	100	57	40	8	48	100	83	22	8	38	79	58
0,25	36	17	53	100	68	31	5	39	100	87	36	5	41	100	88
Témoin	0	0	26	0	0	1	0	56	2	2	0	0	50	0	0
Température	23°C					-					22°C - 24°C				
Conditions	Climatisé					Terrain					Climatisé				
CL50	F. 0,02		f. 0,065			F. 0,03		f. 0,036			F. 0,042		f. 0,08		
CL95	F. 0,052		f. 0,7			F. 0,055		f. 0,45			F. 0,14		f. 0,45		
<u>CL95</u> CL50	F. 2,6		f.10,8			F. 1,8		f.12,5			F. 3,3		f. 5,6		

TABLEAU II. — Tests réalisés avec le cytotype Yah à Karilo, rivière Bagoe — Durée de contact 3 heures — Insecticide Abate.

Numéro du Test	T10					T13					T14					Total				
	4.2.1976					4.2.1976					5.2.1976					-				
Date																				
Concentration Insecticide (ppm)	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%
0,0025	0	0	52	0	0	0	0	50	0	0	1	0	45	2	2	1	0	147	1,5	1,5
0,0050	1	0	49	2	2	1	0	44	2,5	2,5	3	0	42	8	8	5	0	135	4	4
0,0125	0	0	43	0	0	2	2	42	10	5	3	0	51	6	6	5	2	136	5	4
0,025	0	0	54	0	0	6	7	48	27	12	9	0	51	18	18	15	7	153	14	10
0,050	20	6	44	59	45	28	7	45	78	82	12	7	47	40	26	60	20	136	59	44
0,10	36	10	50	92	72	35	8	45	96	78	42	1	46	93	91	113	19	141	94	80
0,25	39	7	48	96	81	35	2	37	100	95	42	2	46	100	96	116	11	131	97	89
0,50	45	2	47	100	96	54	1	55	100	98	42	1	43	100	98	141	4	145	100	97
Témoin	0	0	50	0	0	0	0	52	0	0	1	0	51	2	2	1	0	153	0,5	0,5
Température Eau	20°C - 21°C					20°C - 21°C					21°C - 22,5°C									
Conditions	Terrain					Terrain					Terrain									
CL50	F. 0,048		f. 0,06			F. 0,034		f. 0,045			F. 0,055		f. 0,076			F. 0,04		f. 0,05		
CL95	F. 0,17		f. 0,46			F. 0,06		f. 0,25			F. 0,1		f. 0,24			F. 0,13		f. 0,32		
<u>CL50</u> CL95	F. 3,5		f. 7,7			F. 1,8		f. 5,6			F. 1,8		f. 3,2			F. 3,25		f. 6,4		

TEST DE SENSIBILITÉ AUX INSECTICIDES DES LARVES DE *SIMULIUM DAMNOSUM*

TABLEAU I (suite)

T6					T7					T8					T22					Total				
23.1.1976					26.1.1976					27.1.1976					17.2.1976					-				
M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%
0	0	37	0	0	0	0	55	0	0	0	0	51	0	0	0	0	47	0	0	3	0	306	1	1
0	2	40	5	0	1	0	53	2	2	0	0	47	0	0	2	0	48	4	4	5	2	328	2	1,5
2	2	33	12	8	2	27	59	49	3	1	4	41	12	2	7	2	42	22	16	17	38	317	17	5
4	4	36	22	11	23	20	50	86	46	17	16	51	64	33	22	8	45	62	49	101	69	319	53	32
10	14	35	68	29	30	21	57	89	53	23	21	44	100	52	35	5	43	93	81	169	109	321	87	53
21	13	49	69	42	53	5	58	100	91	33	17	50	100	55	49	2	51	100	96	244	72	339	93	72
29	11	40	100	72	49	4	53	100	92	39	11	50	100	78	50	0	50	100	100	273	53	326	100	84
0	0	50	0	0	0	0	53	0	0	0	0	35	0	0	0	0	75	0	0	1	0	345	0,3	0,3
20°C - 22,5°C					21°C - 25°C					22°C - 26°C					21°C - 27°C					-				
Terrain					Terrain					Terrain					Terrain					-				
F. 0,039 f. 0,13					F. 0,013 f. 0,036					F. 0,021 f. 0,049					F. 0,021 f. 0,026					F. 0,022 f. 0,05				
F. 0,15 f. 1,25					F. 0,06 f. 0,4					F. 0,035 f. 0,64					F. 0,055 f. 0,094					F. 0,07 f. 0,40				
F. 3,8 f. 9,6					F. 4,6 f. 11,1					F. 1,7 f. 13,1					F. 2,6 f. 3,6					F. 3,18 f. 8				

M = morts
m = moribonds
T = total.

M% = pourcentage de mortalité forte
m% = pourcentage de mortalité faible
T2 = numéro du test

CL 50 F = concentration létale 50 correspondant à la mortalité forte
CL 50 f = concentration étale 50 correspondant à la mortalité faible

TABLEAU III. - Tests réalisés avec les cytotypes Nile et Sirba à Kankela, la rivière Kankelaba - Durée de contact 3 heures - Insecticide Abate.

Número du Test	T15					T16					T19					Total				
Date	10.2.1976					11.2.1976					11.2.1976									
Concentration Insecticide (ppm)	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%	M	m	T	M%	m%
0,0025	6	0	29	21	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0	135	1,5	1,5
0,005	2	0	47	4	4	0	0	44	0	0	0	0	44	0	0					
0,0125	3	0	31	9	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	6	124	9	4
0,025	3	4	34	21	9	0	1	48	2	0	2	1	42	7	5					
0,05	7	0	36	19	19	-	-	-	-	-	20	6	38	68	53					
0,1	16	10	36	72	44	31	2	33	100	93	45	0	45	100	100	92	12	114	91	81
0,25	50	1	51	100	96	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
0,5	45	0	45	100	100	40	0	40	100	100	43	0	43	100	100	128	0	128	100	100
Témoin	0	0	50	0	0	2	0	48	4	4	1	0	50	2	2	3	0	148	2	2
Température Eau	22°C - 21,5°C					19°C - 21°C					20,5°C - 21°C									
Conditions	Terrain					Terrain					Terrain									
CL50	F. 0,076 f. 0,11					F. 0,045 f. 0,065					F. 0,043 f. 0,049					F. 0,035 f. 0,05				
CL95	F. 0,15 f. 0,22					F. 0,062 f. 0,096					F. 0,068 f. 0,076					F. 0,12 f. 0,18				
CL50 CL95	F. 2 f. 2					F. 1,4 f. 1,5					F. 1,6 f. 1,6					F. 4 f. 3,6				

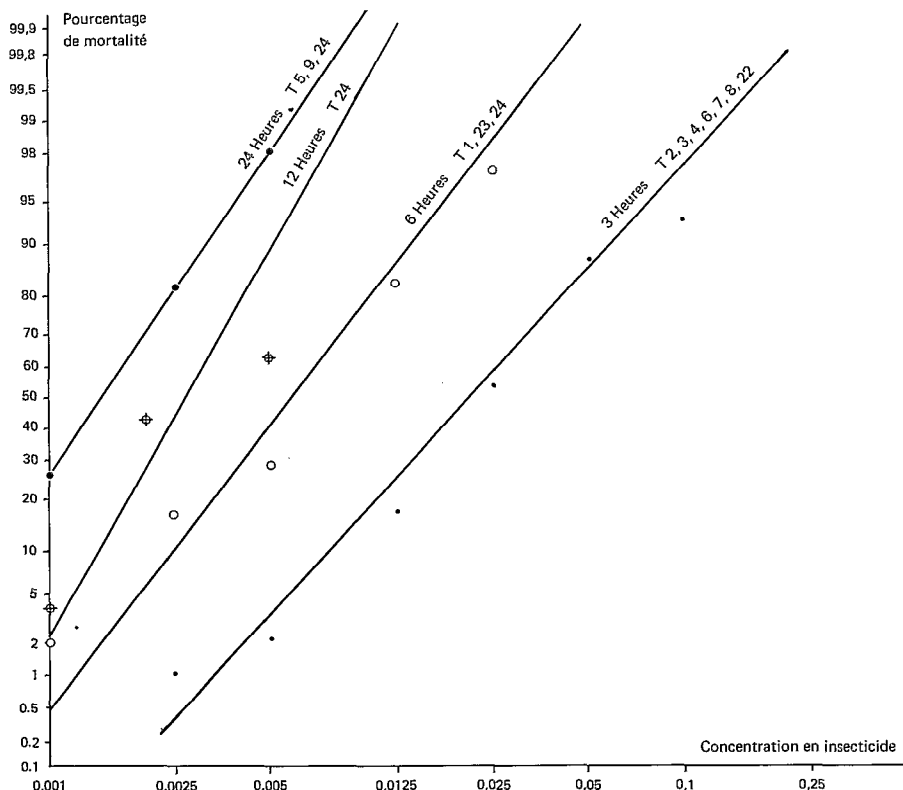


FIG. 3. — Lignes de régression comparatives de la mortalité des larves en 3, 6, 12 et 24 h.

TABLEAU IV. — Tests réalisés avec les cytotypes Soubre, Nile, Sirba — Durée de contact 3 h., 6 h., 24 h., — Insecticide Abate.

Numéro de Test	Total T2, 3, 4, 6, 7, 8, 22			Total 1, 23, 24			T24			Total T5, 9, 24		
	3 h.			6 h.			12 h.			24 h.		
Concentration Insecticide (ppm)	M + m	T	M %	M + m	T	M %	M + m	T	M %	M + m	T	M %
0,0005	—	—	—	2	52	4				31	73	42
0,001				1	50	2	2	50	4	32	124	26
0,0025	3	306	1	20	125	16	24	56	43	106	130	82
0,0050	7	328	2	42	143	29	29	47	62	129	132	98
0,0125	55	317	17	114	138	83	52	52	100	149	149	100
0,025	170	319	53	141	145	97	54	54	100			
0,050	278	321	87	94	94	100						
0,10	316	339	93									
0,25	326	326	100									
Témoin	1	345	0,3	1	140	0,7	0	51	0	0	125	0
CL50	0,021			0,058			0,0027			0,0015		

assez basse de l'ordre de 19 à 20 °C pour que les larves ne soient soumises à des températures élevées que pendant une durée assez courte à la fin du test.

La température optimale se situe entre 21 et 24 °C. Pour l'obtenir sur le terrain on peut utiliser de l'eau

préalablement refroidie à 19 ou 20 °C dans une glacière et préparer extemporanément les dilutions. Ensuite les bols sont placés, durant l'expérimentation, sous abri ombragé, dans le sable humide. L'évaporation naturelle de l'humidité du sable provoque une réfrigération qui

TEST DE SENSIBILITÉ AUX INSECTICIDES DES LARVES DE *SIMILIUM DAMNOSUM*

TABLEAU V. — Tests réalisés avec les cytotypes Yah à Kariko, rivière Bagoé, et Nile Sirba à Kankela, rivière Kankelaba
Durée 6 heures — Insecticide Abate.

Numéro du Test	T11			T12			T20		
	Yah			Yah			Nile, Sirba		
Date	4.2.1976			4.2.1976			11.2.1976		
Concentration Insecticide	M + m	T	M %	M + m	T	M %	M + m	T	M %
0,001	2	53	4	0	50	0			
0,0025	0	43	0	1	46	2			
0,005	1	43	2	2	50	4	0	44	0
0,0125	12	48	25	35	51	69			
0,025	19	37	51	40	43	93	38	42	90
0,05	39	39	100	51	51	100	38	38	100
0,1	46	46	100	47	47	100	45	45	100
0,25									
0,50									
1,25									
Témoin	0	55	0	1	50	2	1	50	2
CL50	0,025			0,010			0,016		

maintient l'eau des récipients en expérience nettement au-dessous de la température ambiante. C'est ainsi qu'à Kankela, Mali, la température de l'eau des bols a varié de 21 à 23 °C entre 7 h et 13 h alors que la température de l'air ambiant passait de 22 à 32 °C.

Il serait très souhaitable de pourvoir les équipes de terrain de caissons isothermes simples permettant de maintenir la température entre 21 et 23 °C durant 3 à 6 heures, en particulier dans les périodes de l'année où la température est élevée et l'hygrométrie, importante.

Un temps d'exposition de 3 heures présente un net avantage sur des durées plus longues de 6 ou 12 heures car il permet d'exécuter le test en début de matinée ou en fin de soirée en évitant les heures chaudes de la journée. D'ailleurs en travaillant dans de telles conditions, la température n'a pas constitué un problème pour nous, la mortalité des témoins a été pratiquement nulle et tous les essais ont été valables.

4.4. CHOIX DES LARVES.

Il est recommandé d'utiliser seulement les larves du 4° et 5° stades. Les larves du 6° et 7° stades sont beaucoup moins sensibles. A Kankéla, Mali, les tests exécutés simultanément sur des larves des stades IV et V et des stades VI — VII montrent que la CL 50 « forte » est de 0,044 dans le premier cas et 0,36 dans le second, soit 9 fois plus. Le même écart s'observe pour les mortalités « faibles ». Les limites de la CL 100 accusent encore plus cette différence puisqu'elles se situent respectivement à 0,1 et 2,5 pour la mortalité

« forte »; à cette dernière concentration, on observe encore des larves moribondes (Tableau VI, fig. 4).

Les larves du stade 3, par contre, ne se comportent pas très différemment de celles du stade 4 et leur utilisation pourrait être envisagée au cas où le matériel

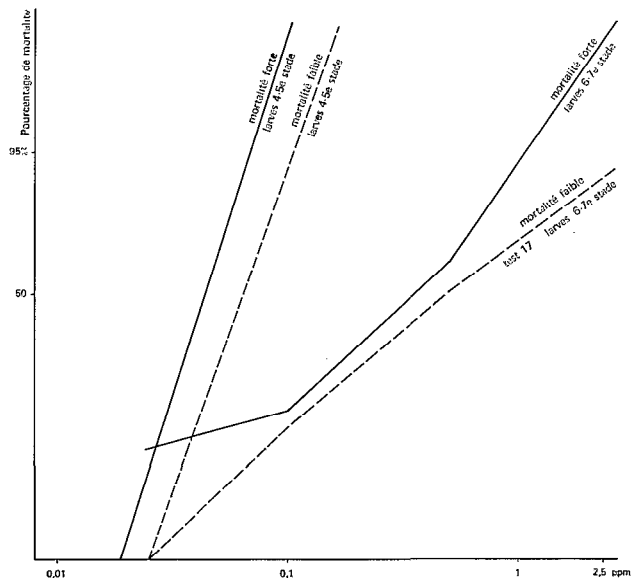


FIG. 4. — Lignes de régression comparées de la mortalité des larves de *Simulium damnosum* s.l. des stades IV et V et des stades VI et VII, à des concentrations croissantes d'Abate.

TABLEAU VI. — Mortalité comparée des larves de *Simulium damnosum* des stades IV et V et des stades VI et VII après exposition de 3 heures à l'Abate.
Localité : Kankela, Mali.

Concentration Abate	Stades IV et V			Stades VI et VII		
	Nbre de larves	Mortalité forte	Mortalité faible	Nbre de larves	Mortalité forte	Mortalité faible
0,005	44	0	0	41	0	0
0,025	48	2	0	50	4	0
0,10	33	100	93	44	9	7
0,50	40	100	109	46	65	52
2,50	38	100	100	49	100	92
		CL50 : 0,045 CL100 entre 0,1 et 0,5	CL50 : 0,065 CL100 entre 0,025 et 0,1		CL50 : 0,38 CL100 entre 0,5 et 2,5	CL50 : 0,48 CL 100 > 2,5

biologique serait en nombre très limité pour l'exécution des tests.

La détermination spécifique des larves en fin de test se fait à la loupe suivant la clef de Crosskey, 1960, mais il est nécessaire de posséder un certain entraînement pour trier les larves à l'œil nu avant le test et obtenir des échantillons presque monospécifiques. La séparation des différents stades se fait d'après la taille, la coloration et l'aspect des ébauches des branchies nymphales. Ces caractères ainsi que la taille relative des divers stades sont reproduits dans la figure 1. Il est encore nécessaire d'avoir un cytotaxonomiste pour déterminer la composition, à l'intérieur du complexe *damnosum*, de la population testée; quelques critères, notamment la dimension des tubercules dorsaux, fournissent des présomptions, mais ne permettent pas encore de statuer de manière ferme.

5. SIMPLIFICATION DE LA MÉTHODE PAR UTILISATION DE DOSES DIAGNOSTIQUES.

Le dernier Comité d'Experts de l'OMS sur la « Résistance des Vecteurs et des Réservoirs de Maladies aux Insecticides », OMS, 1976, a recommandé de simplifier les épreuves de détection de la résistance en utilisant 1 ou 2 doses (concentrations) diagnostiques.

Il serait souhaitable d'étendre cette méthode aux larves de simules, en particulier lorsque le nombre de larves dans le gîte est faible ou que la quantité d'eau distillée nécessaire aux tests est limitée en raison de difficultés d'approvisionnement ou de transport.

Nous proposons comme dose diagnostique d'Abate, dans la région de l'Afrique où nous avons opéré, la concentration de 0,25 ppm. Si plus de 5 % des larves de *Simulium damnosum* survivaient à 0,25 ppm, il

faudrait envisager l'éventualité de l'apparition d'une résistance et exécuter plusieurs tests complets pour se prononcer.

6. DIFFÉRENCES DE SENSIBILITÉ A L'ABATE ENTRE LES DIVERSES FORMES DU COMPLEXE *DAMNOSUM*.

Les populations de *Simulium damnosum* étudiées provenaient de trois rivières différentes coulant dans deux zones phytogéographiques et appartenaient à plusieurs cytotypes. Dans la Maraoué, à Bouaflé et Danangoro, à la limite nord de la forêt, le cytotype Soubré (*S. soubrense*) était très largement dominant accompagné d'un faible pourcentage des cytotypes Nile (*S. damnosum*), Sirba (*S. sirbanum*) et Bandama (*S. sancitipauli*). A Kariko, dans les chutes de la Bagoé, le cytotype Yah (*S. yahensis*) était pratiquement seul présent alors qu'à Kankéla, dans la Kankélaba, les cytotypes Nile (*S. damnosum*) et Sirba (*S. sirbanum*) constituaient la quasi totalité de la population du complexe.

Si l'on groupe, d'une part, les populations de la Maroué à cytotype Soubré dominant et, d'autre part, celles en provenance de la Bagoé et de la Kankélaba (tabl. VII), on constate au niveau de la CL 50 que les premières sont significativement plus sensibles que les secondes. Mais au niveau de la CL 95 la différence s'atténue; les populations de la Maroué restent les plus sensibles, mais ceci n'est plus significatif au plan statistique.

Les populations étant plus ou moins un mélange de cytotypes, il est difficile de conclure, mais il n'est pas exclu qu'il y ait des différences de sensibilité d'un cytotype à l'autre qui ne devraient pas se traduire par des augmentations de plus de deux ou trois fois de la CL 50. Il serait toutefois nécessaire de tenir compte de

TEST DE SENSIBILITÉ AUX INSECTICIDES DES LARVES DE *SIMULIUM DAMNOSUM*

TABLEAU VII. — CL50 et CL95 comparée des différentes populations déterminées par une exposition de 3 heures à l'Abate.

Groupe Soubré dominant		Groupe Yah, Nile-Sirba	
CL50	CL95	CL50	CL95
0,013	0,06	0,034	0,045
0,020	0,052	0,043	0,068
0,021	0,049	0,045	0,062
0,021	0,035	0,048	0,17
0,030	0,055	0,055	0,24
0,032	0,052	0,076	0,15
0,035	0,13		
0,039	0,15		
0,042	0,14		

cette variabilité de la sensibilité lors des opérations de surveillance.

7. CONCLUSION.

La méthode de test en eau stagnante avec trois heures de contact et lecture immédiate, outre sa facilité d'exécution, offre les avantages suivants :

— Les lignes de régression présentent une pente suffisante pour que l'apparition d'une résistance dans une fraction de la population soit décelable. Des durées d'exposition de 6 heures ne présentent aucun avantage statistiquement significatif.

— La mortalité totale des larves exposées est obtenue à des concentrations compatibles avec la solubilité de la plupart des insecticides et en particulier l'Abate et le DDT. Il est recommandé de considérer les larves moribondes comme mortes pour les calculs de mortalité.

— Le temps de contact de trois heures donne la possibilité d'éviter de travailler pendant les périodes de forte chaleur et d'exécuter un ou deux tests en vingt-quatre heures. Le problème de températures étant ainsi résolu, il n'est plus nécessaire de disposer d'un local climatisé et il devient donc possible d'opérer sur le terrain près des gîtes, ce qui évite le transport délicat des larves. Il faut, par contre, transporter sur le terrain le matériel d'exécution des tests, mais celui-ci est peu encombrant.

— Les résultats des différents tests exécutés sur le terrain sont homogènes et reproductibles.

Une fois que la sensibilité de base des larves vis-à-vis d'un insecticide est établie dans une région, grâce à des séries de tests complets, il suffit, par la suite, pour avoir une idée de la sensibilité des larves dans cette région, à un moment donné, de les mettre en contact pendant trois heures avec la dose diagnostique choisie. La présence de larves vivantes à l'issue de ce test constitue le signal d'alarme.

REMERCIEMENTS.

Nous tenons à remercier l'Organisation mondiale de la Santé (l'OMS), qui a financé cette recherche, l'Organisation de Coordination et de Coopération pour la Lutte contre les grandes Endémies (OCCGE) et l'Office de la Recherche scientifique et technique outre-mer (ORSTOM), qui ont fourni le personnel et le matériel pour l'exécution de ce travail. Nous avons trouvé un très grand appui auprès de Monsieur le Directeur de l'Institut de Santé publique de Côte d'Ivoire, qui a mis sa base de Bouaflé à notre disposition ainsi qu'auprès de Messieurs les Médecins du Département. Les autorités administratives de Côte d'Ivoire, Monsieur le Préfet de Bouaflé et Monsieur le Sous-Préfet de Tingrela, ainsi qu'au Mali, Monsieur le Préfet de Kolondieba, nous ont réservé un excellent accueil. Nous remercions nos camarades de l'Institut de Recherches sur l'Onchocercose (IRO), OCCGE, Bouaké, Côte d'Ivoire, du Laboratoire d'Hydrobiologie de l'ORSTOM, Bouaké, Côte d'Ivoire, du Bureau de Calcul des S.S.C. de l'O.R.S.T.O.M., Bondy et du Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la région du bassin de la Volta, qui nous ont apporté un appui constant et efficace.

Manuscrit reçu au Service des Publications, le 25 octobre 1976

BIBLIOGRAPHIE

- BRENGUES (J.), 1964. — Etude de la relation existant chez les larves (4^e stade) d'*Aedes aegypti* L., entre la durée d'exposition à un insecticide et la mortalité résultante, *Bull. Soc. Path. exot.*, 57, 2 : 339-350.
- CROSSKEY (R.W.), 1960. — A taxonomic Study of the Larvae of West African Simuliidae (*Diptera, Nematocera*) with comments on the morphology of the larval blackfly head, *Bull. Brit. Mus., (Nat. Hist.)*, 10 : 1-74.
- GARMS (R.) & VAJIME (C.C.), 1975. — On the Ecology and Distribution of the Species of the *S. damnosum* complex in different bioclimatic zones of Liberia and Guinea, *Tropenmed. Parasit.*, 26 : 375-380.
- GJULLIN (C.M.) *et al.*, 1949. — The Effect of some Insecticides on Blackfly Larvae in Alaskan Streams, *J. Econ.*, 42 : 100-105.
- GJULLIN (C.M.) *et al.*, 1950. — Tests with DDT to control Blackfly Larvae in Alaskan Streams, *J. Econ. Ent.*, 43 : 696-697.
- JAMNBACK (H.A.), 1962. — An eclectic Method of testing the Effectiveness of chemicals in killing Blackfly Larvae (*Simuliidae, Diptera*), *Mosq. News.*, 22, (4) : 384-389.
- MOUCHET (J.), DEJARDIN (J.), BARATHE (J.), SANNIER (C.) & SALES (S.), 1972. — Doses discriminatives pour la résistance d'*Aedes aegypti* aux insecticides organophosphores et étude de quelques éléments susceptibles de modifier les résultats des tests, *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. Parasitol.*, vol. X, n° 1 : 77-83.

- MUIRHEAD-THOMSON (R.C.), 1957. — Laboratory Studies on the Reactions of *Simulium* Larvae to Insecticides, I. A Laboratory Method for studying the Effects of Insecticides on *Simulium* Larvae, *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 16 : 920-925.
- MUIRHEAD-THOMSON (R.C.), 1969. — A Laboratory Technique for establishing *Simulium* Larvae in an experimental Channel, *Bull. Ent. Res.*, 59 : 533-536.
- OMS, 1970. — Comité OMS d'Experts des Insecticides, *Org. mond. Santé, Sér. Rapp. Techn.*, 335, 96 p.
- OMS, 1976. — Résistance des Vecteurs et des Réservoirs de Maladies aux Pesticides, 22^e Rapport du Comité OMS d'Experts des Insecticides, *Org. mond. Santé, Sér. Rapp. Techn.*, 585, 97 p.
- OVAZZA (M.) & VALADE (M.), 1963. — Recherche sur la Prophylaxie de l'Onchocercose humaine en Afrique de l'Ouest de langue française. III. Essais de Larvicides sur le Terrain et en Laboratoire, *Bull. I.F.A.N., Sér. A*, 25, (4) : 1215-1234.
- QUELENNEC (G.) & VERVERT (G.), 1970. — Mesure de la Sensibilité aux Insecticides des Larves de Simulies (*Diptera, Simuliidae*), *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol.*, vol. VIII, n° 1 : 21-44.
- RAYBOULD (J.N.), 1975. — A Report on a short-term Assignment to investigate the Insecticides Susceptibility of *Simulium damnosum s.l.* in the Volta River Basin Area, *Unpublished WHO Report*, 53 p.
- RAYBOULD (J.N.) & CLARK (A.E.), 1974. — A new simplified Laboratory Method for testing the Susceptibility of *Simulium (Lewisellum)* Larvae to Insecticides, *Mimeog. Doc WHO, Geneva, WHO/ONCHO.74.106*, 11 p.
- THOMPSON (B.H.), 1975. — Testing the Susceptibility of *S. damnosum (Diptera, Simuliidae)* to Insecticides in the Laboratory and in the Field, *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 52 : 351-357.
- TRAVIS (B.V.), 1968. — Some Problems with simulated Stream Tests of Blackfly Larvicides, *Proceed. 55th Ann. Meet. New-Jersey, Mosq. Exterm. Assoc., March 19, 20, 21, 22, 1968* : 129-134.
- WILTON (D.P.) & TRAVIS (B.V.), 1965. — An improved Method for simulated Stream Tests of Blackfly Larvicides, *Mosq. News*, 25, (2) : 118-123.
- WALSH (J.F.), 1973. — Report on a short-term Assignment to carry out Susceptibility Tests on *Simulium* Larvae in OCP area, *Unpublished WHO Report*, 17 p.