

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**MÉMOIRE PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT**

**PAR
LISE MEILLEUR**

**POTENTIEL SYNERGIQUE ENTRE DIFFÉRENTS LARVICIDES
BACTÉRIOLOGIQUES SUR DES LARVES DE SIMULIES**

SEPTEMBRE 2007

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

REMERCIEMENTS

L'accomplissement d'un tel travail n'aurait pu se réaliser sans la participation de certaines personnes et organismes que je tiens à souligner.

Je remercie en premier lieu mon directeur de recherche, le docteur Guy Charpentier qui a su me guider dans mes recherches au cours de ces deux dernières années. Son aide s'est souvent transportée du laboratoire aux nombreuses sorties de terrains en passant par son bureau qui recèle un trésor en terme de références et d'articles.

Je veux également remercier toute l'équipe du laboratoire dont Carole Charbonneau et Mylène St-Onge. Un merci spécial est fait à Christine Gaudreau pour son aide tant au laboratoire que sur le terrain et pour les mille autres services qui ont rendu possible la poursuite de cette maîtrise.

Pour les conseils précieux et les corrections apportées à ce mémoire, je remercie Jacques Boisvert et Jean-Pierre Bourassa.

Pour l'aide financière apportée, je tiens à remercier la Fondation de l'Université du Québec à Trois-Rivières.

Enfin, pour le soutien moral et les encouragements qu'ils m'ont manifesté tout au long de mes études universitaires, je remercie tous les membres de ma famille et plus particulièrement ma sœur Josette.

Finalement, le plus gros merci va à mes enfants, Maxime et Marie-Loup ainsi qu'à Simon Dumas pour avoir lu et corrigé ce texte.

RÉSUMÉ

Avec tous les problèmes engendrés par les mouches noires et ce, à travers le monde, la découverte de larvicides bactériologiques tels que le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, le *Bacillus sphaericus* et le *Clostridium bifermentans* sérovar. *malaysia*, a suscité un espoir nouveau dans le contrôle adéquat de ces populations de diptères. L'apparition de résistance observée chez certains moustiques envers le BspH laisse toutefois planer un doute. Cette résistance devient donc un obstacle majeur dans les différents moyens de contrôle en vigueur et c'est pourquoi nous avons procédé à différentes combinaisons de larvicides bactériologiques. Ainsi, en plus d'accroître leurs efficacités par effet de synergisme, ces combinaisons diminueront les risques d'apparition de résistance. De plus, un mélange permet de diminuer les doses à appliquer en nature tout en minimisant les coûts engendrés par les traitements.

Une seule combinaison regroupant les trois larvicides bactériologiques a été testée sur les larves d'été. L'effet antagoniste obtenu n'a pu être comparé à aucun autre bioessai ni aucune étude. Pour ce qui est des différents mélanges de deux produits qui ont été testés, ce sont le Bti + BspH, le Bti + Cbm et le BspH + Cbm. Le mélange composé de Bti et de BspH a donné un effet antagoniste, peu importe les concentrations utilisées et ce, tant sur les larves de mouches noires d'hiver que d'été. Par contre, pour les deux autres mélanges (Bti + Cbm et BspH + Cbm), plusieurs effets ont été obtenus allant de l'antagonisme au synergisme pour une même combinaison. Pour chaque bioessai où du synergisme a été observé, le Cbm était toujours impliqué dans le mélange et ce, autant chez les larves de mouches noires d'hiver que d'été.

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	ii
RÉSUMÉ	iii
Table des matières	iv
Liste des tableaux	vi
Liste des figures	viii
Symboles et abréviations	x
INTRODUCTION	1
DESCRIPTION DES LARVICIDES ET LEURS MODES D' ACTIONS	7
Description du <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	7
Mode d'action du <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	8
Description du <i>Bacillus sphaericus</i>	10
Mode d'action du <i>Bacillus sphaericus</i>	11
Description du <i>Clostridium bifermentans</i> sérovar. <i>malaysia</i>	13
Mode d'action du <i>Clostridium bifermentans</i> sérovar. <i>malaysia</i>	15
PROPRIÉTÉ D'UN BON INSECTICIDE	16
RÉSISTANCE	18
Différents mécanismes de résistance	20
Prévention de la résistance ; différentes solutions	20
Mélange	21
SYNERGISME	22
Synergisme entre toxines	23
MODÈLES MATHÉMATIQUES	24
MATÉRIEL ET MÉTHODES	26
Sites d'échantillonnages	26
Prélèvement des larves	27
Maintenance des larves	27
Préparation des suspensions pour le traitement	28
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	28

<i>Clostridium bifermentans</i> sérovar. <i>malaysia</i>	28
<i>Bacillus sphaericus</i>	29
Préparation du matériel pour les bioessais des larvicides individuels.....	29
Mesures prises lors des bioessais	32
Bioessais de combinaisons de larvicides (deux à la fois)	34
Bioessais de combinaisons de larvicides (trois à la fois)	35
Identification des larves	35
Standardisation des bioessais	36
ANALYSES STATISTIQUES ET TRAITEMENT DES DONNÉES	38
Calculs utilisés	38
L'écart-type	39
Traitement SPSS 11.0	39
RÉSULTATS	40
Déterminer les CL à utiliser pour chacun des larvicides	40
Bioessais des différents mélanges testés	44
Effets du mélange des trois larvicides	48
DISCUSSION	49
CONCLUSIONS	54
Biais d'erreurs	57
Recommandations	57
BIBLIOGRAPHIE	60
LISTE DES ANNEXES	72

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 : Pourcentage de mortalité moyenne (observée et corrigée) causée par le Cbm sur des larves de simulies d'hiver à différentes concentrations.....	41
TABLEAU 2 : Pourcentage de mortalité causée par le Bti sur des larves de simulies d'hiver à différentes concentrations.	42
TABLEAU 3 : Pourcentage de mortalité causée par le Bsph sur des larves de simulies d'hiver à différentes concentrations.	42
TABLEAU 4 : Pourcentage de mortalité causée par le Cbm sur des larves de simulies d'été à différentes concentrations.	43
TABLEAU 5 : Pourcentage de mortalité causée par le Bti sur des larves de simulies d'été à différentes concentrations.	43
TABLEAU 6 : Pourcentage de mortalité causée par le Bsph sur des larves de simulies d'été à différentes concentrations.	43
TABLEAU 7 : Bioessais de synergisme entre le Bti et le Cbm sur des larves d'hiver..	45
TABLEAU 8 : Bioessais de synergisme entre le Bti et le Bsph sur des larves d'hiver.	46
TABLEAU 9 : Test de synergisme entre le Bsph et le Cbm sur des larves d'hiver.	46

TABLEAU 10 : Test de synergisme entre le Bti et le Cbm sur des larves d'été.	47
TABLEAU 11 : Test de synergisme entre le Bti et le Bsph sur des larves d'été.	47
TABLEAU 12 : Test de synergisme entre le Bsph et le Cbm sur des larves d'été.	48
TABLEAU 13 : Test de synergisme entre le Bti, le Bsph et le Cbm sur des larves d'été.	48

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : La section encerclée montre un éventail céphalique sur une larve de simulie	2
FIGURE 2 : <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
FIGURE 3 : Tiré de l'article de Gill, Cowles et Pietrantonio (1992), voici un modèle de la formation des pores induits par les toxines du Bt.	9
FIGURE 4 : Représentation schématique du mode d'action des cristaux de <i>Bacillus sphaericus</i> sur une larve de moustique	13
FIGURE 5 : <i>Clostridium bifermentans</i> sérovar. <i>malaysia</i>	14
FIGURE 6 : Sites d'échantillonnages utilisés dans la région de la Mauricie	26
FIGURE 7 : Système de maintenance des larves en laboratoire	27
FIGURE 8 : Incubation des bouillons de culture de Cbm en jarres anaérobiques	29
FIGURE 9 : Illustration d'un montage pour bioessais.....	31
FIGURE 10 : Système de rinçage des tubes et de récupération des larves..	31
FIGURE 11 : Larves vivantes de simulies vues sous binoculaire	32
FIGURE 12 : Pourcentages des espèces de larves de simulies d'hiver	

recueillies et identifiées au cours de l'hiver 2003	33
FIGURE 13 : Pourcentages des espèces de larves de simulies d'été recueillies et identifiées au cours de l'été 2006	33
FIGURE 14 : Montage d'un bioessai de différents mélanges: mélange de deux larvicides (en haut) et de trois larvicides (en bas).....	34
FIGURE 15 : Critères d'identification morphologique des larves de simulies.....	36
FIGURE 16 : Larves de 6 ^e ou 7 ^e stade, on peut voir les branchies filamenteuses de la nymphe sur les côtés (spirale noire encerclée).	37
FIGURE 17 : Larve de <i>Cnephia mutata</i> parasitée par un mermithide	37
FIGURE 18 : Larves (pointées par les flèches) expulsées du tube par les bulles causées par le Bsph à des concentrations de 3000 et 4000 ppm.....	50

SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
BinA	Binaire A
BinB	Binaire B
Bsph	<i>Bacillus sphaericus</i>
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
Btk	<i>Bacillus thuringiensis var. kurstaki</i>
Bti	<i>Bacillus thuringiensis var. israelensis</i>
Cbm	<i>Clostridium bifermentans</i> sérovar. <i>Malaysia</i>
C _L	Concentration Létale
<i>C. tetani</i>	<i>Clostridium tetani</i>
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>C. botulium</i>	<i>Clostridium botulium</i>
<i>C. dacotensis</i>	<i>Cnephia dacotensis</i>
<i>C. mutata</i>	<i>Cnephia mutata</i>
<i>C. pipiens</i>	<i>Culex pipiens</i>
<i>C. quinquefasciatus</i>	<i>Culex quinquefasciatus</i>
DDT	Dichloro-Diphényl-Trichloréthane
d-n-d	distillée non déminéralisée
kDa	kilodalton
ml	millilitre
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
<i>P. fuscum</i>	<i>Prosimulium fuscum</i>
<i>P. mixtum</i>	<i>Prosimulium mixtum</i>
ppm	partie par million
rpm	rotation par minute
<i>S. vittatum</i>	<i>Simulium vittatum</i>
<i>S. venustum</i>	<i>Simulium venustum</i>
µm	micromètre
δ-endotoxine	delta endotoxine
°C	degré Celcius

INTRODUCTION

Nuisance pour les estivants, travailleurs et propriétaires en bordure de cours d'eau, vecteurs de différentes maladies tant humaines (onchocercose ou cécité des rivières) qu'animales et entraînant la baisse de productivité dans les milieux agricoles, forestiers et de loisirs, les mouches noires sont devenues un problème sanitaire et économique dans plusieurs régions du globe. Comme leur aire de distribution est mondiale, les problèmes reliés aux mouches noires le sont également.

Insectes de l'ordre des Diptères, la famille des *Simuliidae* compte plus de 1800 espèces identifiées à ce jour (Crosskey et Howard, 2004). Au Canada seulement, on dénombre plus de 160 espèces (Adler *et al.*, 2004) dont trois particulièrement nuisibles à l'homme et aux animaux, soient *Prosimulium mixtum*, *Simulium truncatum* et *Simulium venustum* (Fredeen, 1973 et Lacoursière et Boisvert, 2004). Au Québec, c'est 72 espèces qui y sont répertoriées (Lacoursière et Boisvert, 2004).

Le type d'habitat de croissance spécifique (l'eau courante) des larves de mouches noires, qui sont aquatiques, est particulièrement favorable à un contrôle par des produits toxiques. La grande concentration de larves dans ce type d'habitat et la possibilité d'un traitement très localisé font des larves de *Simuliidae* des cibles de choix pour un contrôle efficace des mouches noires (Lacoursière, 1984). Les larves se nourrissent de deux façons : par broutage et/ou par filtration (Raymond *et al.*, 1990). Les larves filtrent continuellement leur nourriture à l'aide de leurs éventails céphaliques (encadré à la FIGURE 1) dans lesquels elles capturent les particules en suspension qui passent à leur portée et ce, peu importe la nature de la particule (Gaugler et Molloy, 1980).

Seule la grosseur des particules semble avoir un impact sur l'ingestion ou non de cette dernière (Chance, 1970, cité par Gaugler et Molloy, 1980). Chance rapporte d'ailleurs que les larves de *Simulium vittatum* privilégieraient les particules d'environ 25 µm de diamètre avec une échelle de grandeur allant de 1 à 285 µm. Quant à Kurtak (1978), il estime que le diamètre idéal pour qu'une particule soit ingérée par une larve de *S. vittatum*, est de 100 à 150 µm. D'après Kurtak, les particules dont la taille serait supérieure aux espaces compris entre les rayons de l'éventail seraient ingérées plus facilement et en plus grand nombre que les plus petites.



FIGURE 1 : La section encadrée montre un éventail céphalique sur une larve de similie.

Certaines larves, comme celles de *Prosimulium mixtum*, sont des larves d'hiver (espèces univoltines). L'adulte des espèces d'hiver pond ses œufs au début de l'été et ces derniers entrent en diapause jusqu'à l'automne. Les larves qui vont émerger de ces œufs se développeront lentement tout au long de l'hiver pour devenir adultes au mois de mai suivant et seront les premiers à assaillir les

animaux ainsi que les hommes au printemps. Lorsque les *P. mixtum* commencent à mourir, les *Simulium venustum* (larves d'été), simules à pattes blanches communes aux terrains boisés du Canada, prennent la relève. Cette espèce produit plusieurs générations au cours de l'été (multivoltine). La dernière génération d'œufs pondus à l'automne entre en diapause tout l'hiver et les larves n'en sortiront qu'au printemps suivant, lorsque les températures seront plus clémentes (Wood, 1985).

Le "Global Program for Malaria Eradication" visant à contrôler le vecteur de la malaria (un diptère de l'ordre des *Anopheles*) a vu, dans l'utilisation du DDT (dichloro-diphényl-trichloréthane), le produit miracle par excellence. Le biochimiste Paul Muller a d'ailleurs reçu, en 1948, le prix Nobel de physiologie ou médecine pour avoir révélé les propriétés insecticides du DDT. Ce produit aux multiples vertus a tôt fait de contrer l'apparition et l'expansion de maladies mortelles (Bourassa, 2000). Mais, malgré une réduction sur l'incidence de la malaria vers 1961-62, une résistance est vite apparue dans les populations d'*Anopheles*, ne laissant du DDT que les traces que l'on connaît aujourd'hui et qui perdurent encore malgré l'arrêt de son utilisation dans les années 1970 (Regis *et al.*, 2000). Ce produit a aussi été utilisé avec succès sur les mouches noires en URSS de 1955 à 1965. Ainsi, à Angara et à Oka en Sibérie, des traitements au DDT ont été faits sur des larves et des adultes de mouches noires. Dans certains secteurs, on a constaté la disparition complète des populations de simules avec des taux de mortalité atteignant les 100% (Dubitskii, 1981). Pourtant, dès 1963, Rachel Carson lançait un cri d'alarme en publiant "Printemps silencieux" aux éditions Plon. Dans ce livre, elle constate que les oiseaux insectivores qui se nourrissaient sur les lieux où le DDT avait été épandu, mouraient en grande quantité. Les désavantages écologiques engendrés par les insecticides chimiques comme le DDT, le téméphos, le malathion et bien d'autres ont eu pour effet, notamment, d'apporter un regard nouveau sur la fragilité de notre écosystème planétaire et un intérêt croissant

pour la lutte bactériologique dans le contrôle de certaines populations d'insectes.

C'est à ce moment que les insecticides biologiques prennent de l'ampleur. Pour les larves de *Simuliidae*, l'efficacité du *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) a fait ses preuves et bien qu'aucune résistance n'ait été observée face à ce larvicide (comme pour les produits chimiques), la possibilité d'une résistance de la part de ces diptères face aux différentes souches de Bt n'est pas à écarter. Quant au *Bacillus sphaericus* (Bsph), dès 1994 on rapporte des cas de résistance chez *Culex quinquefasciatus*, diptère de la famille des *Culicidae* (Regis *et al.*, 2000). Pour le Bti, la seule résistance répertoriée à ce jour fut induite en laboratoire après plus de 32 générations de moustiques en contact continu avec une dose de Bti (CL₉₅) (Georghiou cité par Lacoursière et Boisvert, 2004; Goldman *et al.*, 1985).

Le Bti ainsi que le Bsph sont deux bactéries naturelles des sols. Ces bactéries sont des bacilles à Gram positif, aérobies et sporulées. Elles produisent des protéines cristallisées (cristaux) qui, une fois dans le milieu alcalin du système digestif des larves cibles, se dissolvent au contact d'enzymes, les protéases alcalines, libérant le fragment toxique appelé δ -endotoxine. Ce dernier se fixe aux récepteurs cellulaires créant, par un changement de conformation moléculaire (ANNEXE 1), des ouvertures dans les membranes des cellules de l'épithélium de l'intestin. Ces ouvertures modifient l'équilibre ionique en permettant la sortie d'ions et l'entrée massive d'eau. Les larves cessent de se nourrir et meurent dans les heures qui suivent leur exposition à ces bactéries (Chillcott *et al.* 1990). La différence majeure pour le Bsph réside dans le contenu de son cristal. Ce dernier produit deux toxines et c'est pourquoi on les nomme toxines binaires. Toutefois, pour être toxique, le Bsph doit suivre la même voie que le Bti.

La *Clostridium bifermentans* sérovar. *malaysia* (Cbm) est également une bactérie Gram positif en forme de bâtonnet mais anaérobie stricte. Le Cbm serait toxique par ingestion pour les larves de moustiques et de simulies. Cette toxicité serait liée aux cellules sporulées qui contiennent, à côté des spores, des inclusions protéiques parasporales dont la composition en acides aminés est comparable à celle des cristaux du Bti et du Bsph (De Barjac *et al.* 1990). Le genre *Clostridium* forme un groupe très hétérogène d'environ 100 espèces appartenant à la famille des *Bacillaceae* (Barloy, 1997).

L'approche expérimentale consistera donc, par des séries de bioessais, à combiner par deux ou par trois, à différentes concentrations, ces différents insecticides biologiques sur des larves de simulies d'hiver (dans un premier temps) en majorité composées de *Prosimulium fuscum*, *Cnephia mutata* et *Simulium vittatum*. Puis, les bioessais se poursuivront sur des larves d'été composées principalement de *S. venustum*, *S. verecundum* et *S. vittatum*. Ainsi, il sera possible de déterminer s'il y a un effet synergique, additif ou antagoniste selon les descriptions faites par Benz (1971) entre les différentes combinaisons de larvicides. Les larves seront aussi identifiées à l'espèce à l'aide des clés d'identification élaborées par Wood *et al.* (1963) et Adler *et al.* (2004). Cette identification permettra de déterminer si certaines espèces sont plus sensibles que d'autres aux différents larvicides utilisés.

S'il y avait un effet de synergie entre deux ou trois produits bactériologiques tels que le Bti, le Bsph et le Cbm, il serait alors possible de diminuer les doses des formulations à utiliser sur le terrain et/ou d'augmenter le pourcentage de mortalité. Deux larvicides offrent également moins de chances de voir apparaître de la résistance chez les espèces visées. En effet, une combinaison de Bsph 2362 et de Bti (Mulla *et al.*, 2003) chez *C. quinquefasciatus* a retardé de beaucoup le développement de la résistance.

L'objectif premier de cette étude sera donc de déterminer s'il existe une interaction synergique entre différentes concentrations létales d'une formulation commerciale de Bti (Vectobac-AS), de Bsph (Vectolex-WGD) et de Cbm (souche CH18, Institut Pasteur). Le synergisme conduira au deuxième objectif qui est une diminution des doses à appliquer et, se faisant, une diminution des coûts de traitement.

DESCRIPTION DES LARVICIDES ET LEURS MODES D'ACTIONS

Description du *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Le Bti est une bactérie faisant partie du genre des *Bacillus*, c'est-à-dire, des bactéries ayant la forme d'un bâtonnet et elles sont aérobies strictes ou facultatives. Ce sont des bacilles sporogènes dont la grande majorité sont des saprophages (se nourrissent de matières organiques en décomposition) et que l'on retrouve naturellement dans le sol, l'eau et l'air ainsi que sur le feuillage des plantes (<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm>). On les dit ubiquistes c'est-à-dire, qu'on les retrouve à plusieurs endroits sur le globe. Le Bt (FIGURE 2) est une bactérie Gram positif, ce qui lui confère une grande tolérance à la dessiccation. Ainsi, lorsque la spore du Bt se retrouve dans un milieu favorable, elle se réhydrate et germe pour donner naissance à une cellule végétative en forme de bâtonnet qui constitue la phase active du cycle vital. Les *Bacillus* sont tous mobiles sauf *Bacillus anthracis*.

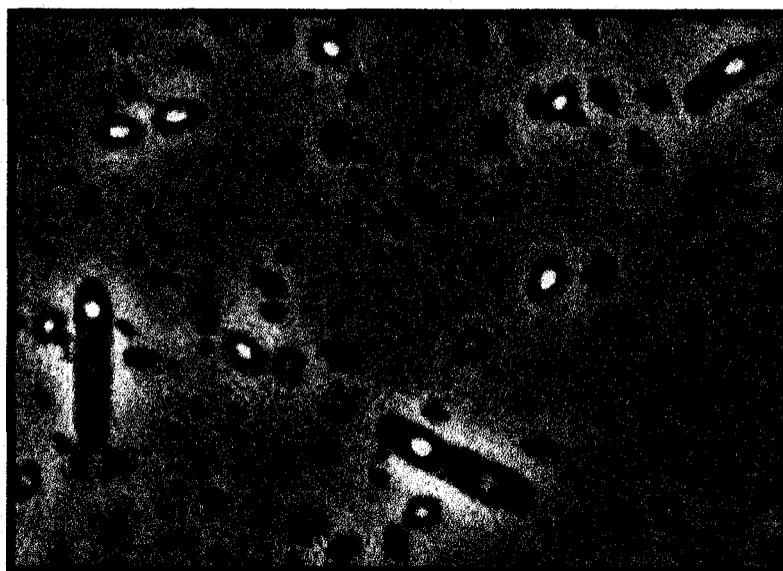


FIGURE 2 : *Bacillus thuringiensis*

Contrairement aux autres espèces de Bt, le corps parasporal du Bti est de forme sphérique et entouré d'une enveloppe. À l'intérieur de cette enveloppe se trouvent quatre protéines majeures (27, 65, 128 et 135 kDa) assemblées en trois types d'inclusions différentes (Federici *et al.*, 1990). C'est l'action combinée de ces protéines qui ont des effets synergiques et pathogènes sur différentes espèces d'insectes. L'existence du cristal du Bt a été notée pour la première fois en 1915 par Berliner et par Mattes en 1927, mais ce n'est qu'autour de 1950 que sa composition protéique a été décrite. En 1954, Angus établit le rôle pathogène de ce cristal (Frankenhuyzen, 1993, Dulmage *et al.* 1971) et en 1967, Heimpel nomme cet agent toxique la δ -endotoxine. Depuis, les recherches n'ont cessé d'exploiter cette famille de bactéries des plus prometteuses dans la lutte aux différents arthropodes, vecteurs de maladies.

Mode d'action du *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*

Le Bti garde sa toxicité plus longtemps en eau claire car les polluants semblent inactiver ses toxines (Nicolas, 1990). L'efficacité du Bti pour le contrôle des larves de simules qui vivent en eau courante serait donc plus élevée qu'en eaux stagnantes, car moins polluée que ces dernières.

Quand l'inclusion cristalline du Bti est ingérée par la larve, elle est solubilisée dans l'intestin moyen de la larve et les δ -endotoxines sont relâchées. Ces protoxines sont activées par les protéases de l'intestin moyen et les fragments toxiques clivés entrent en interaction avec l'épithélium de l'intestin de la larve causant des dommages dans l'intégrité de la membrane (FIGURE 3) (Gill *et al.*, 1992, Nicolas, 1990). Pour être solubilisée, la toxine du Bti doit être en contact

avec le pH alcalin (autour de 10) présent dans l'intestin moyen des larves de similies.

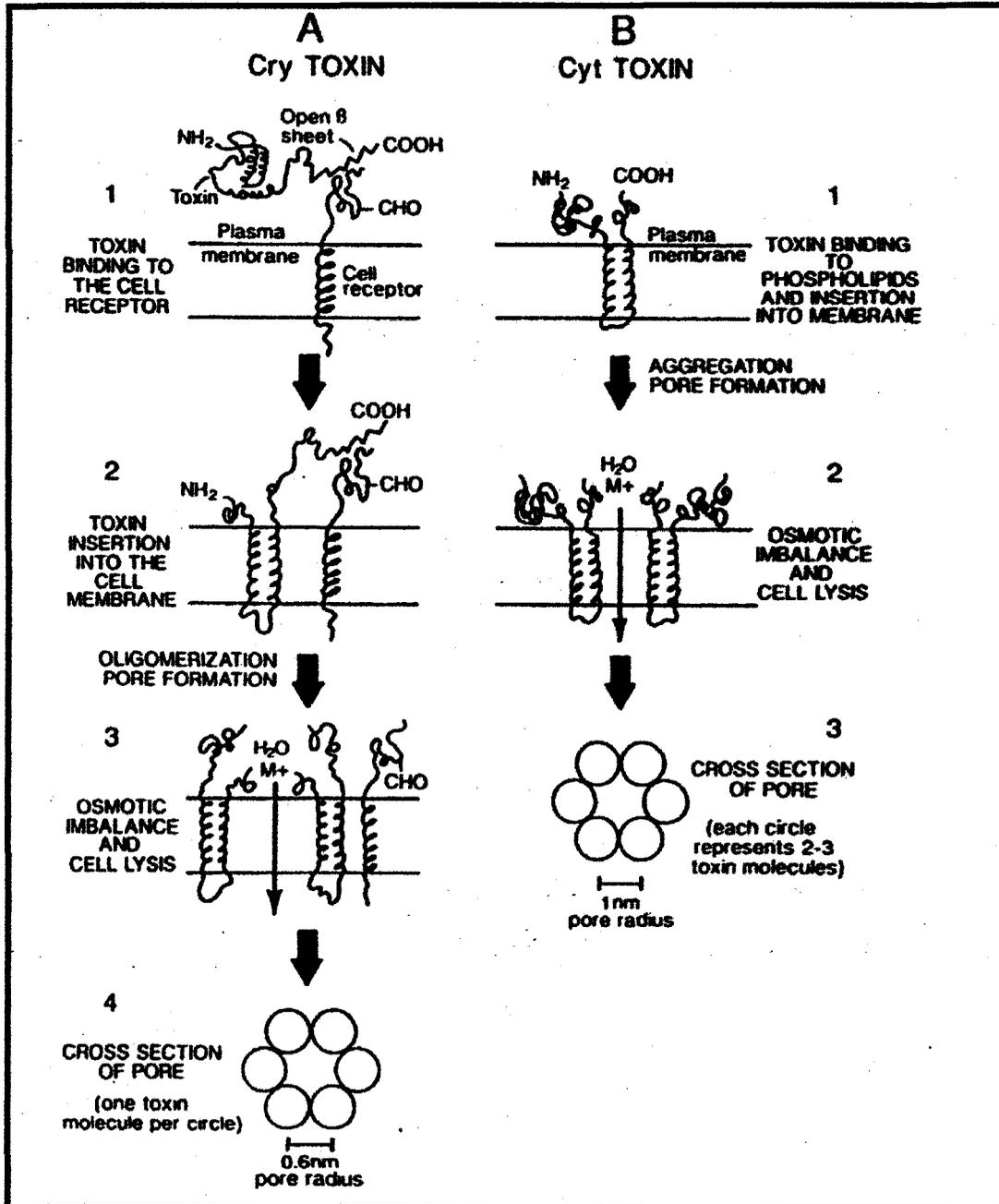


FIGURE 3 : Tiré de l'article de Gill, Cowles et Pietrantonio (1992), voici un modèle de la formation des pores induits par les toxines du Bt.

Description du *Bacillus sphaericus*

Ces bactéries aérobies strictes ont des spores rondes, en position terminale et déformante. Tout comme le Bti, c'est un saprophyte naturel des sols et des milieux aquatiques. La principale toxine de cette souche est composée de deux endoprotéines (51,4 kDa/BinB et 42,0 kDa/BinA) qui sont cristallisées dans un corps parasporal appelé cristal (Baumann *et al.* 1985, Davidson et Yousten 1990, Charles *et al.* 1996, Federici *et al.* 2003) et produites uniquement lors de la sporulation (Karch *et al.* 1987, Zhang *et al.* 1998).

Bien qu'il soit inoffensif pour les espèces non cibles et plus sélectif que le Bti au niveau de sa toxicité envers certaines espèces (*Anopheles* et *Culex*), le Bsph n'est pas toxique pour les larves de simulies. Il a été prouvé que le Bsph était beaucoup plus efficace en eau polluée où sa toxicité peut être conservée pendant des semaines (Nicolas, 1990, Regis *et al.*, 2000). Cela semble dû au fait que le cristal du Bsph est étroitement relié à la spore par un exosporium qui conférerait à ce complexe spore/cristal une protection contre l'environnement, contrairement au cristal du Bti qui lui, est physiquement indépendant de la spore (Nicolas, 1990). Il pourrait agir de façon synergique avec d'autres produits contre les larves de simulies même si, pour l'instant, il n'y a pas eu de synergisme détecté avec, entre autre, une combinaison de Bsph et de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Lacey *et al.* 1978) sur des larves de simulies. Des bioessais ont révélé que le Bsph était efficace contre les larves de certaines simulies mais à des concentrations de l'ordre de 3000 ppm et plus pour des mortalités d'environ 10% (TABLEAU 3, section résultats). Comme l'a démontré Kurtak (1978), une grande concentration de particules peut entraîner, chez les larves de certaines simulies, l'arrêt d'ingestion de nourriture, expliquant en partie la raison de l'inefficacité du produit sur les larves de simulies à de si fortes concentrations.

Mode d'action du *Bacillus sphaericus*

La propriété toxique des protéines qui composent le cristal du BspH envers les larves de certaines espèces de moustiques a été suggérée pour la première fois par Singer en 1973 (Davidson et Yousten, 1990). Depuis, il a été démontré par plusieurs chercheurs qu'il y avait une corrélation directe entre la production du cristal, la sporulation et l'activité larvicide du BspH (Baumann *et al.*, 1985). Aujourd'hui, nous savons que les toxines du BspH, composées de différentes protéines, doivent absolument être solubilisées dans le milieu alcalin de l'intestin moyen de la larve ciblée pour être actives. C'est seulement après l'ingestion du complexe spore/cristal par les larves que les protéines se clivent sous l'effet combiné du pH élevé de l'intestin et d'une protéase donnant des polypeptides de 43,0 et 39,0 kDa respectivement. C'est sous cette forme que la toxine est relâchée dans toutes les espèces et ce, même chez les espèces peu sensibles au BspH comme *A. aegypti* (Charles *et al.*, 1996). Cette toxine binaire se lie à un récepteur cellulaire spécifique, une glucosidase membranaire, une enzyme présente sur les microvillosités de l'intestin moyen des insectes (Darboux *et al.*, 2001). Cette liaison cause la lyse des cellules par la formation de pores dans la membrane des cellules épithéliales provoquant ainsi la mort de la larve intoxiquée (Davidson, 1988). Selon Nielsen-Leroux *et al.* (2002) et Darboux *et al.* (2001), la liaison de la toxine binaire sur le récepteur spécifique à la surface des cellules épithéliales de l'intestin moyen serait initiée par la protoxine BinB (42,0 kDa). La BinA (51,4 kDa) conférerait la toxicité (Darboux *et al.*, 2001). Le fait que la toxicité du BspH soit associée à une seule classe de récepteurs dans l'intestin moyen, via les composantes de la BinA (Nielsen-Leroux et Charles 1992, Silva-Filha *et al.* 1999, Yuan *et al.* 2003, Poopathi et Tyagi, 2004), expliquerait pourquoi la résistance envers cette toxine peut être aussi facilement induite. Toutefois, l'action par synergie de la BinA et de la BinB donne au BspH une plus grande toxicité que la BinA seule (Nicolas *et al.* 1993, Charles *et al.* 2000, Poopathi et Tyagi, 2004).

Chez les larves sensibles, les premiers symptômes d'intoxication au Bsph peuvent être détectés entre 30 minutes et une heure après l'ingestion (Karch et Coz 1986, Davidson 1984, Davidson et Yousten 1990, Charles *et al.* 2000). Après quatre heures, les larves cessent de se nourrir et après 36 heures, c'est une paralysie générale du corps qui se produit (Singh et Gill, 1988). Ce n'est généralement qu'après 48 heures que l'on peut déterminer la mortalité réelle cependant, la vitesse d'action serait dépendante des doses ingérées (Mulla *et al.* 1984, Davidson et Yousten 1990).

D'autres facteurs seraient aussi impliqués dans les différents degrés de sensibilités chez différentes espèces. Chez *A. aegypti*, le faible taux de toxicité envers cette espèce serait dû au fait que la toxine ne trouverait pas ou peu de récepteur sur lequel se lier (Rodcharoen et Mulla, 1995). Pour les espèces d'*Anopheles*, la toxine du Bsph pourrait se lier mais avec une spécificité et une affinité moins élevées que chez les *Culex*. Il pourrait en être de même pour les espèces de simulies. Il a également été démontré par Mulla *et al.* (1984) que les larves de moustiques d'un stade plus avancé (stade 4) étaient de deux à dix fois moins sensibles que les larves de deuxième stade. Le stade larvaire joue donc un rôle important.

Plusieurs études ont démontré que l'action toxique du cristal sur les larves susceptibles suivait une série de cinq étapes (FIGURE 4): 1) l'ingestion du complexe cristal/spore/cellule, 2) la solubilisation dans l'intestin moyen sous l'effet du pH alcalin, 3) les protéines de 51,4 et 42,0 kDa qui se clivent pour donner des protéines de 43,0 et 39,0 kDa, 4) la liaison de la protéine toxique aux cellules du caecum gastrique et de l'intestin moyen, 5) l'effet toxique par différents mécanismes plus ou moins bien connus (Baumann *et al.* 1991, Poopathi et Tyagi 2004).

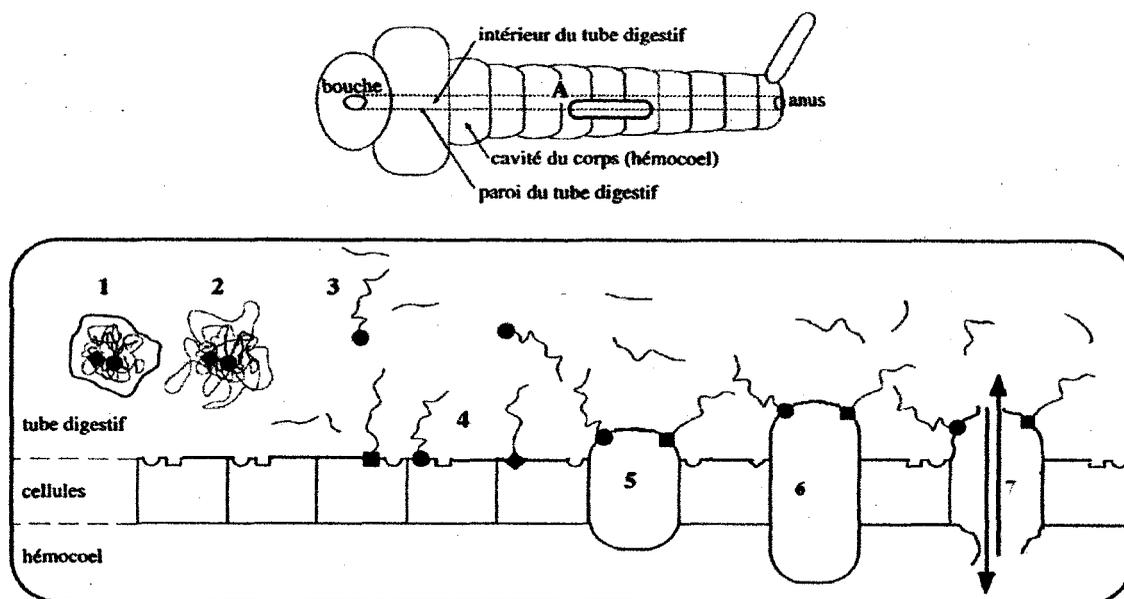


FIGURE 4 : Représentation schématique du mode d'action des cristaux de *Bacillus sphaericus* sur une larve de moustique. Après ingestion, les cristaux sont dissous dans le liquide alcalin du tube digestif (1), libérant de longues chaînes de protéines (2) qui sont par la suite sectionnées par des enzymes pour produire les segments toxiques (3). Cette toxine binaire se fixe sur une classe de récepteurs spécifiques localisés sur la membrane des cellules formant la paroi du caecum gastrique et de l'intestin moyen postérieur (4). L'effet toxique s'exerce par un mécanisme encore inconnu (5), la cellule se gonfle (6) et il y a création de pores ou de canaux dans la membrane cellulaire (7) avant l'éclatement de la cellule. (Texte, réf : Baumann *et al.* 1991, Charles *et al.* 2000) et (schéma tiré de : <http://www.mddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/>, de J.O. Lacoursière et J. Boisvert, 2004).

Description du *Clostridium bifermentans* sérovar. *malaysia*

Plusieurs *Clostridium* sont responsables de maladies humaines comme *C. tetani* pour le tétanos, *C. perfringens* pour la gangrène, *C. botulinum* pour le botulisme et plusieurs autres bactéries pour plusieurs autres maladies (Barloy, 1997).

L'entomopathogène qui nous intéresse a été isolé en Malaisie dans les sédiments humides des forêts de mangroves et étudié à l'Institut Pasteur. Cette bactérie est un bâtonnet Gram positif (FIGURE 5), anaérobie stricte, mobile, formant à la sporulation des inclusions (de Barjac *et al.* 1990). Les spores de cette bactérie sont ovales, centrales à subterminales et non déformantes pour la cellule. Le genre *Clostridium* forme un groupe dont les principales caractéristiques sont la production de toxines très puissantes, la capacité à fixer l'azote, la synthèse de solvants et la sécrétion d'enzymes dégradant les polymères. Ce sont des hôtes naturels des sols et commensaux des animaux. On les retrouve aussi dans les sédiments marins, les déchets animaux et végétaux, dans la flore intestinale des vertébrés et de certains invertébrés dont les insectes.

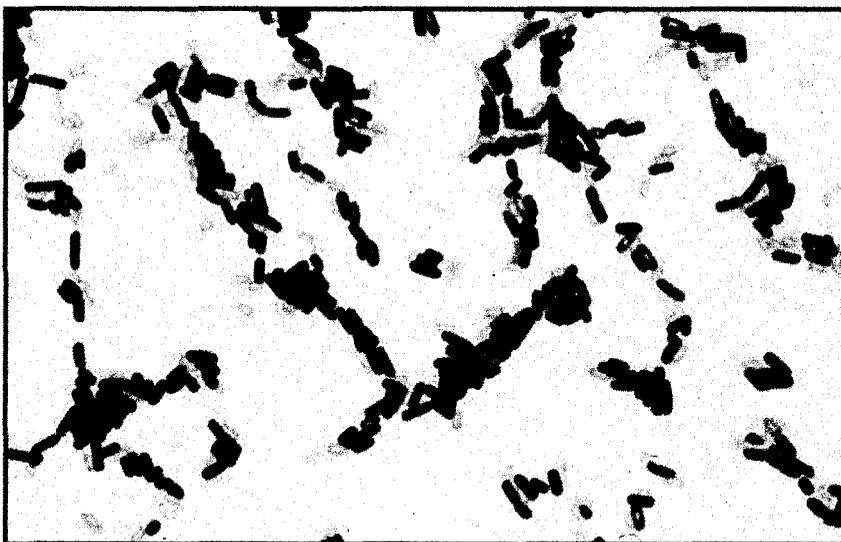


FIGURE 5 : *Clostridium bifermentans* sérovar. *malaysia*

Contrairement au Bti et au Bsph, la toxicité du Cbm n'est pas clairement associée à la production d'inclusions et les composantes toxiques n'ont pas encore été isolées (Charles et Nielsen-LeRoux, 2000). L'analyse biochimique

suggère toutefois qu'il y aurait trois protéines (66,18 et 16 kDa) impliquées dans la toxicité de la bactérie. Ces protéines ne sont pas immunologiquement reliées aux toxines de Bti et BspH et pourraient constituer une nouvelle classe de toxines à pouvoir insecticide.

De nouvelles découvertes depuis 1992 tendent à prouver qu'inclusion et toxicité ne sont pas clairement associées puisque certaines cultures de Cbm CH18 ne présentant pas ces inclusions demeurent tout de même toxiques (Barloy, 1997). Il est à noter que les tests, effectués sur les invertébrés non-cibles ainsi que sur les vertébrés, confirment l'innocuité de cette bactérie (Thiéry *et al.* 1992).

Mode d'action du *Clostridium bifermentans* sérovar. *malaysia*

Bien que le Cbm semble agir par ingestion, le mode d'action précis de ce produit n'est pas encore connu. D'autres mécanismes pourraient être impliqués comme une action par contact ou encore, un mode d'action n'impliquant pas de récepteur(s) spécifique(s) (Barloy, 1997).

On présume que la toxicité serait due à une protéine toxique susceptible à l'action de protéases et remise en circulation lors de la lyse cellulaire (Barloy *et al.*, 1996). Toutefois, la vitesse d'action du Cbm est plus rapide que celle du BspH avec des temps qui varient entre trois et seize heures selon la concentration appliquée mais est moins rapide que celle du Bti (Barloy, 1997).

Dans une étude portant sur l'innocuité du Cbm sur les vertébrés aquatiques non-cibles (Yiallouris *et al.* 1994), il a été démontré que seul *Psychoda alternata* (*Pulmonata*) et *Chaoborus crystallinus* (*Isopoda*) montraient une réaction au produit. Par contre, une autre étude portant cette fois sur la toxicité

de ce même produit mais envers des mammifères n'a révélé aucune toxicité (Seleena et Lee, 1998).

PROPRIÉTÉS D'UN BON INSECTICIDE

Selon un rapport fait par l'Université de Sydney sur les insecticides en général (<http://bugs.bio.usyd.edu.au/Entomology/Pests/insecticides.html>), les propriétés d'un parfait insecticide pourraient se résumer en 6 points :

- 1) Grande toxicité pour l'insecte visé
- 2) Toxicité sélective où les insectes non cibles ne sont pas affectés
- 3) Sans effet nocif pour les plantes et les organismes non cibles
- 4) Sans résidu toxique
- 5) Peu coûteux et sécuritaire à produire
- 6) Stable lors du stockage

Des larvicides utilisés dans cette recherche, deux répondent à ces critères mis à part le fait qu'ils sont plus coûteux à produire que certains insecticides chimiques soit le Bti et le Bsph. Pour le Cbm, la contrainte de la stabilité du produit lors du stockage s'ajoute aussi aux inconvénients.

Plusieurs études menées sur l'impact de ces larvicides biologiques sur l'environnement ont démontré qu'à application normale (doses prescrites), deux des trois produits utilisés (Bti et Bsph) n'étaient dommageables ni pour l'environnement, ni pour l'homme et ni pour les organismes non cibles autant terrestres qu'aquatiques (Frankenhuyzen, 1993).

Enfin, il faudrait ajouter à cette liste l'incapacité de l'insecte à développer de la résistance à l'insecticide utilisé, ce qui est rarement le cas. C'est pourquoi

différents moyens sont utilisés pour contrer ce phénomène de résistance qui sera développé dans la prochaine section.

RÉSISTANCE

La résistance aux insecticides est le développement de l'habileté à survivre à des doses d'insecticides auparavant létales pour la majorité des individus de la population visée (Abedi et Brown 1960, Mouchet 1968 et Georghiou 1980). C'est avant tout un phénomène d'origine génétique qui est devenu monnaie courante dans les années 1950 et affectait, en 1980, plus de 414 espèces d'arthropodes qui sont régulièrement visés par les traitements chimiques (Georghiou, 1980). Aujourd'hui, ce sont les larvicides bactériologiques qui nous inquiètent puisque des signes de résistance sont apparus. Certains culicidés sont devenus résistants au Bsph tout comme *Plutella xylostella* (un lépidoptère) est devenu résistant au Btk (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*) (Tabashnik et al., 1991). Il est urgent de développer de nouveaux moyens de contrôle et/ou d'améliorer ceux déjà existants. Si les apparitions de résistance au Bsph sont si importantes c'est que son mode d'action n'implique qu'un seul site d'ancrage de la toxine binaire et qu'il a une persistance, selon certains, d'environ 60 jours. En comparaison, le Bti implique plusieurs sites d'ancrage des toxines et la persistance n'est que de quelques jours.

Il y a différents types de résistances. En premier lieu, la résistance simple qui est, à proprement parler, le fait de développer un mécanisme de résistance pour un insecticide donné. Ensuite, la résistance multiple, c'est-à-dire lorsque plusieurs mécanismes de résistance envers différents produits se développent. Par exemple, le doryphore de la pomme de terre est résistant à plusieurs insecticides en utilisant des mécanismes différents pour chacun d'eux. Toutefois, notamment pour le doryphore, il peut aussi exister des modifications comportementales (mécanisme d'évitement) qu'il ne faut pas confondre avec de la résistance multiple. Enfin, il y a la résistance croisée où un seul mécanisme permet de résister à plusieurs produits, souvent analogues de par leurs structures chimiques.

Les premiers cas de résistances répertoriées concernaient des produits chimiques. Aujourd'hui, le développement de la résistance va au-delà des insecticides chimiques et atteint les produits microbiens et viraux. L'arrivée de produits entomopathogènes comme le Bti, le Btk et le Bsph nous a laissé croire pendant plusieurs années que le problème de résistance était révolu à cause de la variété des toxines produites par ces derniers. Toutefois, différentes études ont tôt fait de rapporter les premiers cas de résistance, tant en laboratoire que sur le terrain, chez différentes espèces de moustiques (Silva-Filha *et al.* 1995, Nielsen-Leroux *et al.* 1997, Brogdon et McAllister, 1998, Pei *et al.* 2002) et de lépidoptères (Tabashnik *et al.* 1991, Tabashnik et McGaughey, 1994). Rodcharoen et Mulla (1995) réussissaient à induire une résistance au Bsph chez *C. quinquefasciatus* par des expériences menées en laboratoire. Et dès 1994, on voit les premières mentions de résistance au Bsph en milieu naturel et ce, presque simultanément en France, en Inde et au Brésil (Regis *et al.* 2000).

Après la solubilisation et l'activation de la toxine produite par le Bsph et la liaison à un récepteur spécifique logé dans l'intestin moyen de l'insecte, il y a lyse de la cellule et dérèglement de la pression osmotique, causant la mort de l'insecte (Charles *et al.* 1996, Chevillon *et al.* 2001). De là, la résistance est probablement due à une mutation du site cible de l'insecticide qui aurait pour effet de diminuer la sensibilité à l'insecticide ou encore, un changement qualitatif et/ou quantitatif des enzymes de détoxification (Chevillon *et al.* 2001, Small, 2001, adresse internet). Selon Nielsen-Leroux *et al.* (2002), un haut niveau de résistance serait dû à une interruption dans la liaison récepteur/toxine alors qu'une faible résistance serait due à une concentration relativement faible de récepteurs dans les cellules de l'intestin moyen de la larve.

Différents mécanismes de résistance

Différents mécanismes semble être impliqués dans le développement de la résistance envers le Bsph et ce, chez une même espèce. Ces mécanismes vont d'une diminution de la concentration du nombre de récepteurs disponibles jusqu'à la mutation de certains gènes. Par exemple, un document publié par Weill *et al.* (2003) portant sur la résistance mentionne que "...le moustique ne mute pas pour résister aux insecticides. De très nombreuses mutations existent déjà dans les populations de moustiques." Ainsi donc, les individus ayant des mutations de résistance à certains insecticides survivront et se reproduiront. D'après ces mêmes auteurs, les moustiques résistants sont donc sélectionnés et non engendrés par le traitement insecticide ou par la pression sélective. Donc, plus on utilise un produit, plus on exerce une pression sélective sur les populations en cause et plus les individus résistants de ces populations risquent d'être sélectionnés. C'est ce que confirme une étude menée par Paul *et al.* (2005) dans l'État de New York avec quatre larvicides différents (méthoprène, phénothrine, Bsph et Bti) et un adulticide (phénothrine). Paul et son équipe démontrent en effet que la résistance est généralement plus élevée là où les larvicides sont les plus utilisés.

Prévention de la résistance : différentes solutions

Il faut tenter de comprendre et déterminer les mécanismes de résistance (simple, multiple ou croisée) de différentes espèces de moustiques envers différentes souches de Bsph. Cela servira à développer des solutions pour prévenir, retarder, diminuer ou renverser la résistance de ces derniers lors des différentes stratégies de contrôles utilisant le Bsph (Yuan *et al.* 2003) ou un autre insecticide microbien, comme le Bt par exemple, sur d'autres espèces de diptères comme les simulies.

Selon Regis *et al.* (2000), avant même de débiter un programme de contrôle, il faudrait d'abord élaborer des stratégies de prévention de résistance. Pour Lenormand et Raymond (1998), la superficie de territoire à traiter est un paramètre important à considérer lors d'une planification de stratégie de traitement. Les différentes tactiques utilisées pour contrer la résistance devraient consister en une réduction de la pression sélective. Pour ce faire, plusieurs solutions sont suggérées dont la rotation du Bsph avec d'autres larvicides et la réduction du nombre de traitements, ce qui évite ou diminue la pression sélective sur les populations d'insectes visées. Ces différentes méthodes ne sont que quelques-unes parmi tant d'autres qui visent avant tout un programme adéquat de contrôle de la résistance afin de diluer ou de prévenir le développement d'une résistance dans la population cible.

Mélange

Un des principaux moyens utilisés pour contrer la résistance est l'emploi d'un mélange de différents produits. Le principe du mélange de produits suppose qu'il y a un gène de résistance pour chaque famille de produit, autant chimique que biologique, et que de les retrouver tous présents chez une même espèce d'insecte est rare. Il semble important de mélanger des produits qui ont des modes d'action différents ou des sites d'ancrages différents pour les toxines comme c'est le cas pour les trois larvicides utilisés dans cette recherche. L'utilisation du Bti dans un mélange avec le Bsph est un bon candidat pour une stratégie visant à interrompre la pression sélective causée par le Bsph (Zahiri *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2003, Mulla *et al.* 2003, Su et Mulla 2004, Oliveira *et al.* 2004). Les concentrations à utiliser lors des mélanges de produits larvicides demeurent à déterminer.

Une autre méthode très utilisée est la rotation de deux produits. Zahiri et Mulla (2003) ont démontré que la rotation pouvait augmenter la vitesse d'apparition de

la résistance au Bsph (après 15 générations en rotation avec le Bti). Par contre, en utilisant un mélange de ces deux mêmes produits, ils n'ont pas noté d'émergence de résistance et ce, même après 36 générations. Ainsi, tout comme Mulla *et al.* (2003), Zahiri et Mulla (2003) sont d'accord avec le fait qu'un mélange serait plus efficace qu'une rotation pour prévenir l'émergence d'une résistance.

SYNERGISME

En 1971, Georg Benz nous offrait une terminologie et une classification des différents effets que peuvent avoir deux produits une fois combinés.

Le mot synergisme vient du grec "*synergos*" et veut dire "travailler ensemble". C'est un terme qui fait référence, notamment, à l'interaction entre deux produits ou plus. Le synergisme, ou l'effet synergique, c'est lorsque l'action de deux produits différents, combinés et agissant ensemble, crée un effet plus grand que la somme des actions produites par chacun des produits pris indépendamment. Voici un aperçu de quelques effets pouvant être obtenus selon la nomenclature de Benz (1971) :

Effet additif : on emploie ce terme quand l'effet de la combinaison est égal à la somme des deux produits pris individuellement. C'est l'effet le plus commun.

$$2 + 2 = 4$$

Potentiation : terme employé lorsqu'une substance n'a aucun effet toxique mais qui, une fois combinée à une substance toxique, rend cette dernière encore plus toxique.

$$0 + 2 > 2$$

Antagonisme : effet opposé du synergisme. C'est l'effet produit lorsque deux produits ou plus, combinés ensemble, est moins toxique que lorsque les produits sont utilisés séparément.

$$2 + 2 < 4$$

L'effet antagonisme est à la base de plusieurs antidotes contre des poisons ou dans les traitements médicaux.

Synergisme : par comparaison avec l'effet antagonisme, l'effet combiné de deux produits est plus grande que la somme de chacun d'eux pris séparément.

$$2 + 2 \gg 4$$

Voici un exemple de synergisme chez l'humain. En médecine, les barbituriques ont des effets amplifiés sur le système nerveux central (SNC) et provoquent une dépression du SNC lorsqu'ils sont consommés en même temps que des anesthésiques généraux, de l'alcool (consommation aiguë), des analgésiques narcotiques et d'autres somnifères/sédatifs (<http://www.cchst.ca/reponsesst/chemicals/synergism.html>).

Synergisme entre toxines

Plusieurs études parlent du synergisme qui existe entre les différentes toxines d'un même produit. Pour le Bti par exemple, Schnepf *et al.* (1998) ont procédé à la combinaison de ses différentes toxines et bien que plusieurs de ces combinaisons aient démontrés des effets toxiques, aucun agencement n'est plus efficace que le Bti comme tel.

Il en est de même pour la toxine binaire (BinA et BinB) du Bsph. Cette fois, c'est Poopathi *et al.* (2002) ainsi que Nicolas *et al.* (1993) qui ont démontré que

la BinA, utilisée seule, pouvait être toxique à de très fortes doses en l'absence de la toxine BinB. Ce n'est pas le cas de la toxine BinB lorsqu'elle est utilisée seule. Toutefois, la présence des deux toxines démontre une toxicité plus grande du fait qu'elles agiraient de façon synergique entre elles. Aussi, la toxine BinB est essentielle pour qu'il puisse y avoir une liaison de la toxine sur le récepteur, mettant en évidence l'effet de synergie existant dans ce mode d'action (Yuan *et al.* 2001). Ceci implique donc que l'action combinée des deux toxines est plus efficace en termes de toxicité que l'addition des deux toxines utilisées séparément.

Des effets de synergisme pourraient aussi se produire avec des produits différents selon les concentrations utilisées et ce, même si certains produits ont une action limitée sur les insectes cibles. Deux produits agissant par synergisme verraient donc leur potentiel toxique augmenter. C'est précisément la conclusion de deux études menées par Wirth *et al.* (2004) qui ont démontré que le Bti pouvait accroître la toxicité du Bsph chez les larves de *C. quinquefasciatus* (devenues résistantes au Bsph) ainsi que chez les larves de *Aedes aegypti* qui sont naturellement peu susceptible au Bsph.

En 1987, Kelada et Shaker ont démontré que le Bsph pouvait être combiné avec d'autres insecticides, aussi bien bactériologiques que chimiques. En effet, les chercheurs en ont augmenté l'effet toxique envers des larves de *Cx. pipiens* et *Ae. Aegypti*, tout en minimisant les concentrations à utiliser et donc, en diminuant les risques potentiels contre l'environnement.

MODÈLES MATHÉMATIQUES

La littérature nous propose plusieurs modèles mathématiques pour traiter les effets combinés d'insecticides biologiques : le modèle de Finney ainsi que le modèle quadratique que l'on retrouve dans l'article de Brousseau *et al.* (1998) et le modèle de Tabashnick (1992). De ces trois modèles, celui de Finney a été

retenu tout d'abord pour sa simplicité mais aussi pour le manque de données. Le modèle quadratique et celui de Tabashnick auraient nécessité beaucoup plus de données que celles recueillies pour cette recherche.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sites d'échantillonnages

Les sites d'échantillonnages se situent dans la région de la Mauricie (FIGURE 6). Différents lacs et rivières ont été explorés afin de trouver des larves de mouches noires en quantités suffisantes pour permettre plusieurs bioessais avec un même échantillon. Les rivières Yamachiche à St-Boniface de Shawinigan ($46^{\circ}30'N$ et $72^{\circ}49'O$) et St-Élie à St-Élie-de-Caxton ($46^{\circ}29'N$ et $72^{\circ}58'O$) ont été retenues pour les échantillonnages de larves et ce, autant en hiver qu'en été.



FIGURE 6 : Sites d'échantillonnages utilisés dans la région de la Mauricie.

Prélèvement des larves

Les différents substrats (feuilles, branches, pierres) sur lesquels les larves se fixent sont recueillis et déposés dans des seaux remplis d'eau de la rivière. Les échantillons sont ensuite transportés directement au laboratoire de recherche à l'UQTR.

Maintenance des larves



Dès l'arrivée au laboratoire de l'université, les seaux sont déposés dans une chambre environnementale où de l'eau est entreposée à une certaine température (4°C en hiver et 12°C en été). La photopériode est également ajustée selon la saison, reproduisant ainsi le mieux possible les conditions existantes dans l'environnement naturel. Des diffuseurs d'air sont installés dans les seaux afin de reproduire les conditions d'oxygénation des cours d'eau (FIGURE 7) nécessaire à la survie des larves de simules.

FIGURE 7 : Système de maintenance des larves en laboratoire.

Au laboratoire, un nettoyage plus minutieux des brindilles et autres substrats recueillis est ensuite effectué et les larves sont remises dans les seaux. Cette manipulation permet d'éviter la surcharge de matières organiques en décomposition. Des plaquettes de plastique (FIGURE 7) sont insérées dans chacun des seaux, ce qui permettra, en plus de servir de substrat artificiel, de

faciliter les manipulations ultérieures. De l'eau distillée et non déminéralisée (d-n-d) est ajoutée tous les trois ou quatre jours dans les seaux contenant les larves. Ensuite, les larves sont nourries avec de la nourriture à lapin, préalablement broyée.

PRÉPARATION DES SUSPENSIONS POUR LE TRAITEMENT

Bacillus thuringiensis var. israelensis

À partir d'une préparation commerciale de Bti (Vectobac-AS, Abbott laboratories, lot-90-065-BA) brassée énergiquement, une dilution de 10^{-1} a été préparée. Cette dilution sert de solution mère qui, à son tour, est brassée pendant 30 minutes avec un agitateur pour ensuite être diluée d'un facteur 100. On prélève donc 5 ml de solution mère que l'on dissout dans 495 ml d'eau d-n-d. La concentration sera alors de 100 ppm.

Clostridium bifermentans sérovar. malaysia

À partir d'une souche lyophilisée (CH18, de l'Institut Pasteur), le Cbm estensemencé selon la méthode décrite par De Barjac *et al.*, (1990) (FIGURE 8). Les bouillons de culture ainsi obtenus sont centrifugés dans une centrifugeuse IEC Centra-7A à 2000 rpm pendant 30 minutes à 4°C. On récupère le culot obtenu à partir duquel différentes dilutions sont préparées. On conserve ensuite la partie non utilisée au congélateur (-20°C) afin d'en préserver la toxicité (Yiallourous *et al.* 1994). La solution qui servira pour les bioessais aura une concentration de 300 ppm. Cette concentration a été déterminée en pesant un volume connu de culot séché au four.



FIGURE 8 : Incubation des bouillons de culture de Cbm en jarres anaérobiques.

Bacillus sphaericus

À partir de la préparation commerciale de Bsph (Vectolex, WDG, Valent Biosciences, lot 125-858-PG), une solution mère est préparée à partir de 4 g de poudre diluée dans 100 ml d'eau distillée et non déminéralisée. La solution finale aura une concentration de 40 000 ppm.

Préparation du matériel pour les bioessais des larvicides individuels

L'eau nécessaire pour les bioessais, afin d'obtenir 40 ml de solution suite à l'ajout du larvicide pour chacune des concentrations, est mise dans des tubes oxygénés à partir de tuyaux (bâtons à café) (FIGURE 9a) dans une chambre environnementale à 4°C pour les larves d'hiver et à 12°C pour les larves d'été pour une période d'une heure afin de stabiliser à température désirée. La photopériode est également ajustée selon la période de l'année de l'échantillonnage (FIGURE 9b). L'eau utilisée pour les bioessais et pour les tubes

contrôle sans larvicide est distillée mais non déminéralisée (d-n-d), tel que recommandé par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) lors des tests de sensibilité aux insecticides (Lacoursière, 1984). Un total de 40 larves est alors ajouté dans chacun des tubes contenant l'eau d-n-d puis laissées dans la chambre environnementale pour une période d'adaptation d'une heure. Le larvicide est ensuite ajouté à intervalles de 10 minutes entre chaque concentration pour une heure de contact. Ensuite, les trois tubes de chacune des concentrations ainsi que les tubes témoins sont vidés puis rincés deux fois (avec de l'eau d-n-d) au-dessus d'un coton à fromage recouvert d'un essuie-tout. Ceci permet de récupérer les larves qui se sont décollées (l'essuie-tout facilite grandement la récupération des larves qui peuvent se décoller des parois de l'éprouvette durant cette manipulation) (FIGURE 10). Une bonne quantité d'eau d-n-d est préalablement mise en chambre environnementale afin que l'eau de rinçage soit à la même température que l'eau des bioessais. À la suite de ces rinçages, 40 ml d'eau d-n-d sont ajoutés aux tubes. Après ce dernier ajout d'eau, les larves décollées sont récupérées et remises dans le tube, lequel est remis en chambre environnementale pour 48 heures.

Les mêmes opérations sont répétées pour chaque larvicide utilisé ainsi que pour les différentes combinaisons de larvicides.

À la fin de chacun des bioessais, les tubes d'aération (bâtons à café), après autoclavage, sont jetés et remplacés avant de procéder à un autre bioessai. Quant aux éprouvettes, une fois autoclavées, elles sont lavées, rincées puis trempées pendant une heure dans l'eau d-n-d avant de pouvoir être utilisées pour d'autres bioessais. Les solutions de larvicides utilisées pour les bioessais ainsi que l'eau de rinçage recueillis dans l'erlenmeyers (FIGURE 10) sont passées à l'autoclave avant d'être jetées.



FIGURES 9 : Illustration d'un montage pour bioessais.

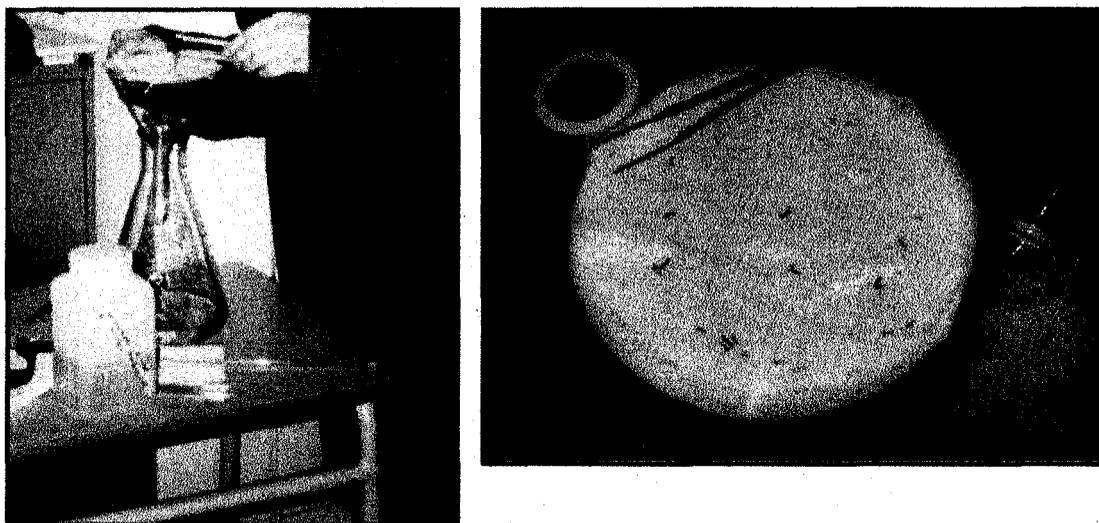


FIGURE 10 : Système de rinçage des tubes et de récupération des larves.

Mesures prises lors des bioessais

Après la période de 48 heures, le contenu de chaque éprouvette est versé dans une boîte de Pétri pour faciliter le dénombrement des larves mortes et vivantes. Dans un premier temps, les larves vivantes facilement observables à l'œil nu (FIGURE 11), sont enlevées et comptées. Ensuite, une légère pression est exercée sur l'abdomen des autres larves; celles qui n'ont aucune réaction sont observées sous binoculaire avant d'être déclarées officiellement mortes. Les larves moribondes (qui ne bougent pas lorsqu'une légère pression est exercée sur l'abdomen mais qui, sous binoculaire, présentent des signes de vie) ont été déclarées comme mortes (Stephens 2004, Poopathi *et al.*, 2002, Mouchet *et al.*, 1977). Toutefois, certains auteurs dont Lepage (1992) considèrent les larves moribondes comme étant vivantes. Des spécimens de larves mortes et vivantes ont été conservés dans l'alcool 95% pour fin d'identification. Des échantillons récoltés lors d'une première étude au cours de l'hiver 2003 étaient principalement composés de *Simulium vittatum*, de *Prosimulium fuscum*, de *Cnephia mutata* et de *C. dacotensis* (FIGURE 12).

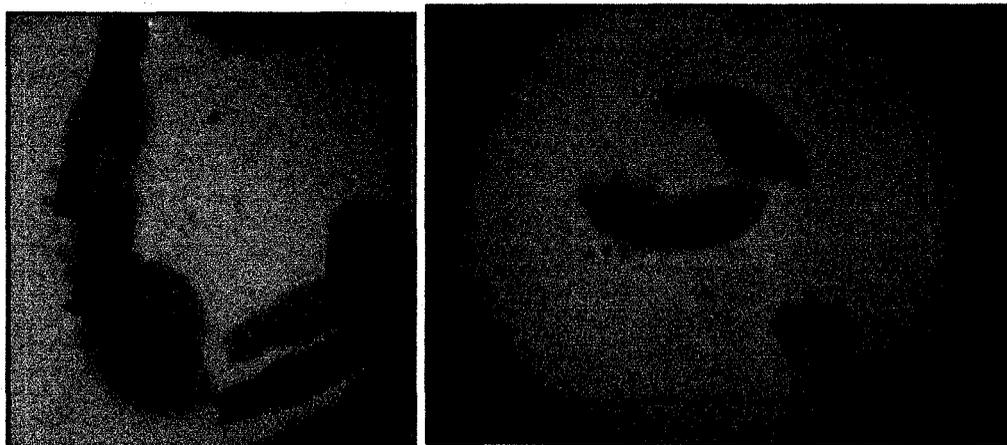


FIGURE 11 : Larves vivantes de simulies vues sous binoculaire.

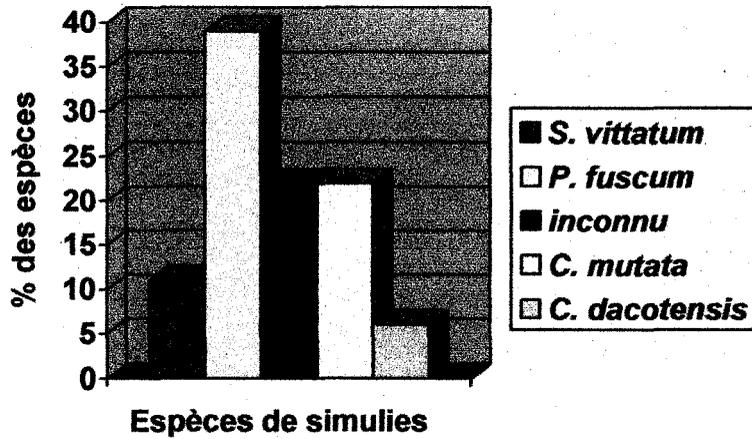


Figure 12: Pourcentages des espèces de larves de simulies d'hiver recueillies et identifiées au cours de l'hiver 2003.

Pour les échantillons recueillis et identifiés à l'été 2006 et qui ont servi aux bioessais, ils étaient composés principalement de *S. vittatum*, *S. venustum* et *S. verecundum* (FIGURE 13).

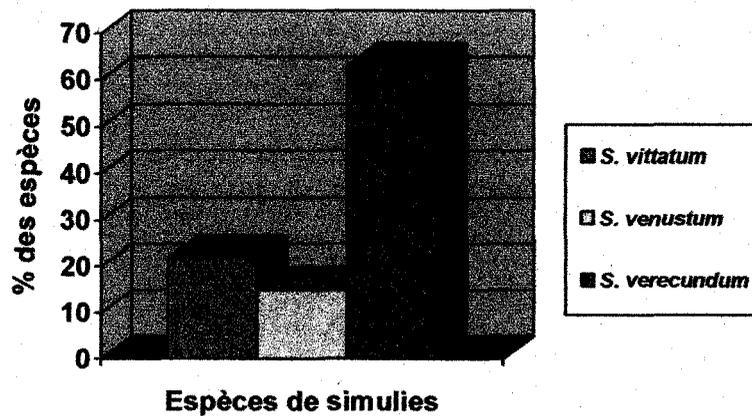


FIGURE 13: Pourcentages des espèces de larves de simulies d'été recueillies et identifiées au cours de l'été 2006.

Bioessais de combinaisons de larvicides (deux à la fois)

Après avoir déterminé les doses létales à utiliser pour chacun des larvicides, on procède aux combinaisons des larvicides en duo. Différentes concentrations seront utilisées pour une même combinaison de larvicides. Un premier bioessai sera réalisé avec trois tubes contenant du Bti, trois tubes contenant du Cbm ainsi que trois tubes contenant du Bti + Cbm avec les concentrations létales déterminées sans oublier trois tubes témoins (FIGURE 14). Suivront ensuite le Bti + Bsph et le Bsph + Cbm. Chacun des bioessais est répété au moins trois fois avant de pouvoir conclure à un effet quelconque.

Le montage effectué pour ces bioessais ainsi que les différentes manipulations sont les mêmes que pour les bioessais de larvicide seul.

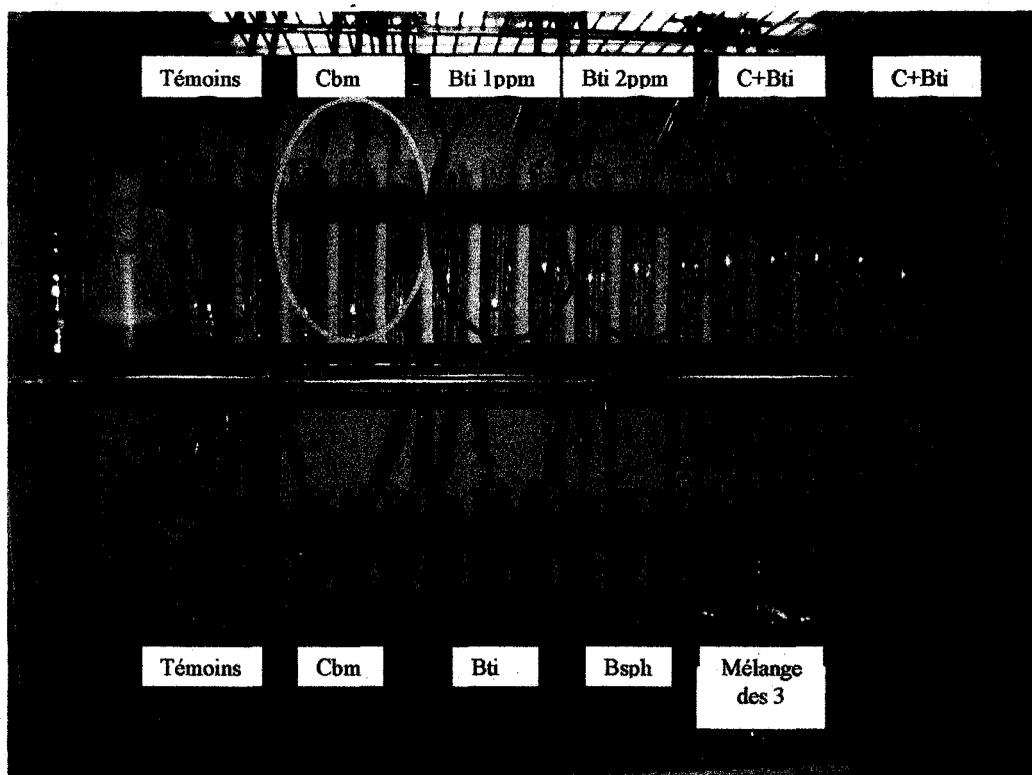


FIGURE 14 : Montage d'un bioessai de différents mélanges: mélange de deux larvicides (en haut) et de trois larvicides (en bas).

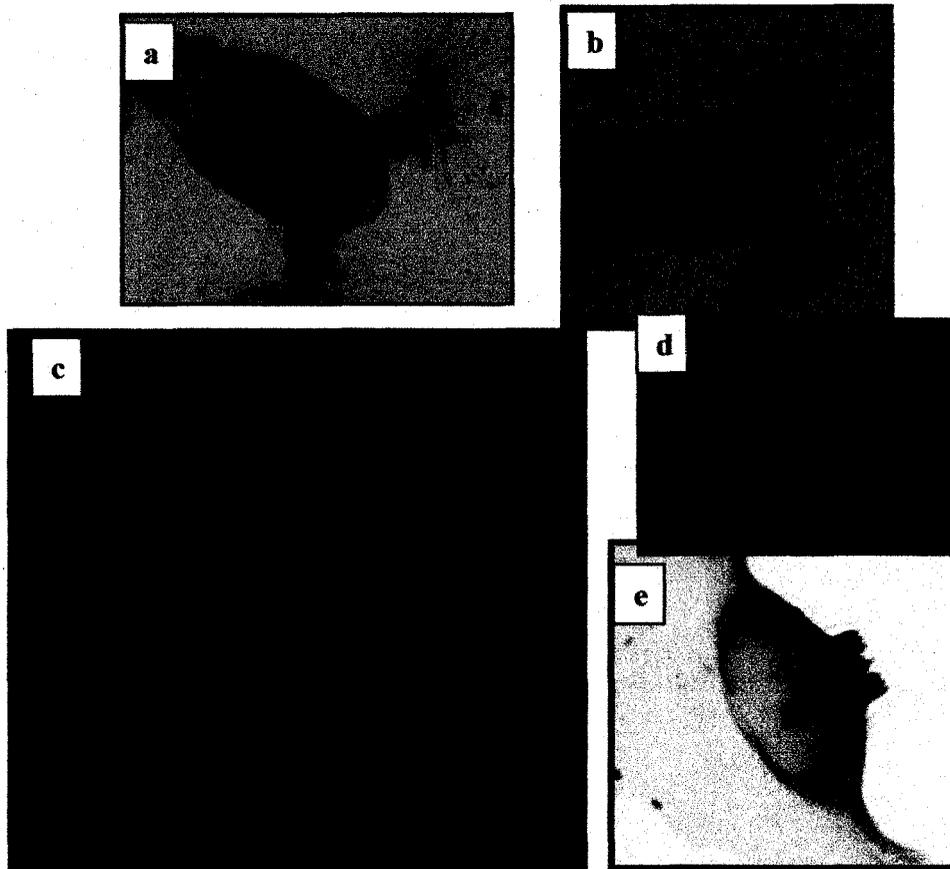
Bioessais de combinaisons de larvicides (trois à la fois)

Encore une fois, on détermine les doses létales à utiliser pour chacun des larvicides puis on procède aux combinaisons des larvicides en trio. Un seul bioessai sera réalisé à trois reprises avec trois tubes contenant du Bti, trois tubes contenant du Cbm, trois tubes contenant du Bsph ainsi que trois tubes contenant du Bti + Cbm + Bsph avec les concentrations létales déterminées sans oublier trois tubes témoins (FIGURE 14, en bas).

Le montage effectué pour ces bioessais ainsi que les différentes manipulations sont les mêmes que pour les bioessais précédents.

Identification des larves

Les larves de mouches noires qui sont utilisées pour les bioessais sont identifiées à l'espèce à l'aide de différentes clés d'identification (Wood 1963, Adler *et al.* 2004). Pour des espèces comme *Cnephia mutata* et *Cnephia dacotensis*, l'identification se fait essentiellement à partir de l'échancrure, des antennes et des dents hypostomiales qui peuvent être observées sous un binoculaire (FIGURE 15a et 15b). Les larves identifiées comme étant des *Prosimulium*, de par la présence des plumeaux céphaliques secondaires, doivent être identifiées à l'espèce suite à l'observation des dents hypostomiales au microscope (FIGURE 15 c, d et e).



FIGURES 15: Critères d'identification morphologique des larves de simulies.

Standardisation des bioessais

Selon Lacoursière (1984) et Mouchet *et al.* (1977), du 2^e au 5^e stade larvaire, les larves de simulies sont plus sensibles aux larvicides que des larves de 6^e ou 7^e stade (FIGURE 16) qui elles, cessent de se nourrir. Il est donc important de faire en sorte que des larves de derniers stades ne se retrouvent pas dans les échantillons lors des bioessais car c'est le bioessai complet qu'il faudrait refaire.



FIGURE 16 : Larves de 6^e ou 7^e stade, on peut voir les branchies filamenteuses de la nymphe sur les côtés (spirale noire encerclée).

Aussi, afin d'éviter d'obtenir des résultats qui pourraient être erronés, d'autres larves doivent parfois être exclues du décompte, comme cette larve de la figure 17 où la présence d'un parasite (un mermithide) est facilement décelable. Dans le cas où une larve parasitée est retrouvée parmi les larves mortes, cette dernière n'est pas comptabilisée car il est difficile de déterminer si la larve est morte par intoxication au larvicide ou par parasitisme.

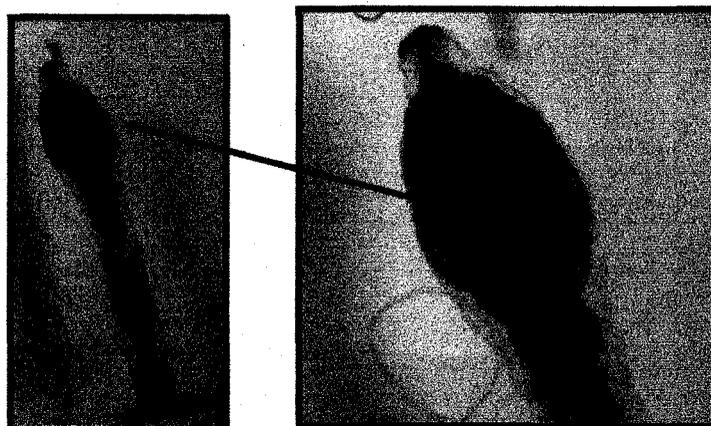


FIGURE 17 : Larve de *Cnephia mutata* parasitée par un mermithide.

ANALYSES STATISTIQUES ET TRAITEMENT DES DONNÉES

Calculs utilisés

Les taux de mortalité observés en laboratoire sont corrigés afin de tenir compte de la mortalité naturelle des tubes témoins. Pour ce faire, la formule adaptée d'Abbott (1925) a été utilisée :

$$\% \text{ mortalité corrigée} = \frac{(\% \text{ mortalité observée}) - (\% \text{ mortalité témoin})}{(100) - (\% \text{ mortalité témoin})} \times 100$$

Pour déterminer l'effet obtenu lors des bioessais des différentes combinaisons de larvicides pris deux par deux, une mortalité théorique doit être calculée. La formule utilisée est la suivante (Finney cité par Brousseau *et al.* 1998):

$$P = P_{L1} + P_{L2} (1 - P_{L1} / 100)$$

P = mortalité théorique

P_{L1} = mortalité observée, larvicide 1 seul

P_{L2} = mortalité observée, larvicide 2 seul

Le P de cette équation étant équivalent au taux de mortalité attendu de la combinaison de deux larvicides qui agiraient indépendamment.

À partir de cette formule, mais avec quelques modifications, on a obtenu une mortalité théorique avec une combinaison de trois larvicides. Cette formule, proposée par Alain Chalifour, professeur au département des mathématiques de l'UQTR (comm. pers.), est la suivante :

$$P_m = 1 - [(1 - P_{L1} / 100) * (1 - P_{L2} / 100) * (1 - P_{L3} / 100)]$$

P_m = mortalité théorique

P_{L1} = mortalité observée, larvicide 1 seul

P_{L2} = mortalité observée, larvicide 2 seul

P_{L3} = mortalité observée, larvicide 3 seul

Le P_m de cette équation étant équivalent au taux de mortalité attendue de la combinaison de trois larvicides qui agiraient indépendamment.

L'écart-type

Afin de déterminer la variabilité existant entre les différents bioessais comportant les mêmes concentrations, on détermine l'écart-type. Pour ce faire, Microsoft Office Excel 2003 a été utilisé.

Traitement SPSS 11.0

Les résultats des figures 20 à 25 des annexes 2 et 3 ont été recueillis au cours des années 2002 et 2003. Ces données ont été transformées à l'aide du logiciel SPSS 11.0 puis placées sur un graphique log-probit. Cette transformation de la concentration en logarithme puis de la mortalité en échelle probit permet d'obtenir une relation approximativement linéaire en plus de déterminer différentes CL (Finney, 1971, cité par Lacoursière, 1984).

RÉSULTATS

Détermination des CL à utiliser pour chacun des larvicides

Tous les résultats obtenus lors des différents bioessais effectués en 2002 et 2003 sur des larves d'hiver, pour le Bti et le Bsph, sont compilés dans les annexes 2 et 3. Ces mêmes annexes comprennent également les graphiques log-probit pour ces larvicides. Ce sont les résultats compilés dans cette section qui ont servi comme point de départ pour les nouveaux essais (2005-2006) et ce, autant sur les larves d'hiver que sur les larves d'été. Toutefois, pour la présente section des résultats, seuls seront présentés les tableaux des bioessais dans lesquels ont été obtenues les CL utilisées lors des différents bioessais effectués en 2005 et 2006.

Pour déterminer les concentrations létales à utiliser pour chacun des larvicides, les moyennes et les écarts-types des taux de mortalités obtenus à chaque concentration et pour chacun des larvicides sont compilés dans les tableaux 1, 2 et 3. Chacune des moyennes obtenues pour les différentes concentrations évaluées ont un écart-type qui nous indique la variabilité qu'il peut y avoir entre les bioessais. Lorsque l'écart-type n'est pas indiqué, c'est qu'un seul bioessai à été effectué ou un seul a été retenu.

Pour les larves d'hiver autant que pour les larves d'été, c'est le Cbm qui semble être le plus constant d'un bioessai à l'autre. Toutefois, le Bti obtient les plus hauts taux de mortalité avec les plus faibles concentrations, allant de 1 à 10 ppm pour les larves d'hiver et de 1 à 3 ppm pour les larves d'été pour des mortalités allant de 5,3 à 33,8%. Vient ensuite le Cbm avec des concentrations un peu plus élevées, soit entre 8,25 et 165,00 ppm pour les larves d'hiver et entre 8,25 et 16,50 ppm pour les larves d'été pour des mortalités variant de 0,0 à 10,6%. Le Bsph arrive troisième avec des doses qui varient entre 1000 et

5000 ppm (larves d'hiver) pour des mortalités ne dépassant pas les 10.1% de mortalité corrigée (autant en hiver qu'en été). Chaque fois que le taux de mortalité des tubes témoins était supérieur à 5% pour un bioessai donné, ce dernier n'était pas comptabilisé, tel que pratiqué par Chevillon *et al.* 2001.

Les concentrations retenues pour les bioessais combinés sur les larves d'hiver sont de 8,25 et 16,50 ppm pour le Cbm avec des taux de mortalité corrigée respectifs de 0,4 et 0,0% (TABLEAU 1). Dans le cas du Bti, ce sont les 1 et 3 ppm qui ont été sélectionnées avec des taux de mortalité corrigée de 5,3 et 11,4 respectivement (TABLEAU 2). Quant au Bsph, les concentrations choisies sont de 1000 et 2000 ppm avec des taux de mortalité corrigée de 4,0 et 3,9% respectivement (TABLEAU 3).

TABLEAU 1

Pourcentage de mortalité moyenne (observée et corrigée) causée par le Cbm sur des larves de simuliés d'hiver à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Témoins (mortalité) (%)	Mortalité observée (%)	Mortalité corrigée (%)	Écart-type
8,25	1,0	1,3	0,4	0,6
16,50	0,9	0,9	0,0	- ^a
24,75	3,0	4,4	1,9	3,2
82,50	1,2	6,1	4,9	2,8
165,00	0,5	7,2	6,7	3,9

^a : Lorsqu'aucun écart-type n'est inscrit c'est qu'un seul bioessai a été fait ou retenu

TABLEAU 2

Pourcentage de mortalité causée par le Bti sur des larves de simulies d'hiver à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Témoins (mortalité) (%)	Mortalité observée (%)	Mortalité corrigée (%)	Écart-type
1	2,7	7,8	5,3	4,15
3	2,4	13,57	11,35	7,6
5	2,7	25,5	23,3	7,1
7	2,7	20,9	18,7	0,3
10	0	33,8	33,8	- ^a

^a : Lorsqu'aucun écart-type n'est inscrit c'est qu'un seul bioessai a été fait ou retenu

TABLEAU 3

Pourcentage de mortalité causée par le Bsph sur des larves de simulies d'hiver à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Témoins (mortalité) (%)	Mortalité observée (%)	Mortalité corrigée (%)	Écart-type
1000	3,4	7,3	4,0	2,4
2000	1,4	5,3	3,9	4,0
3000	3,0	12,0	9,5	7,8
5000	2,0	12,0	10,2	0,2

Sur les larves d'été, les différentes concentrations utilisées sont sensiblement les mêmes que celles utilisées sur les larves d'hiver obtenant toutefois des différences au niveau des taux de mortalité. Pour le Cbm, les mêmes concentrations de 8,25 et 16,50 ppm sont utilisées avec des pourcentages de mortalité corrigée de 3,8 et 10,6% respectivement (TABLEAU 4). Pour le Bti, seul une dose de 2 ppm a été utilisée avec une mortalité corrigée de 11,1% (TABLEAU 5). Quant au Bsph, des concentrations de 1000 et 2000 ppm ont été utilisées, résultant en des mortalités respectives de 8,2 et 4,3% (TABLEAU 6).

TABLEAU 4

Pourcentage de mortalité causée par le Cbm sur des larves de simulies d'été à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Témoins (mortalité) (%)	Mortalité observée (%)	Mortalité corrigée (%)	Écart-type
8,25	4,1	7,8	3,8	2,5
16,50	4,9	15,0	10,6	- ^a

^a : Lorsqu'aucun écart-type n'est inscrit c'est qu'un seul bioessai a été fait ou retenu

TABLEAU 5

Pourcentage de mortalité causée par le Bti sur des larves de simulies d'été à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Témoins (mortalité) (%)	Mortalité observée (%)	Mortalité corrigée (%)	Écart-type
1	5,8	20,0	15,1	- ^a
2	4,9	15,5	11,1	9,3
3	5,8	30,3	26,0	-

^a : Lorsqu'aucun écart-type n'est inscrit c'est qu'un seul bioessai a été fait ou retenu

TABLEAU 6

Pourcentage de mortalité causée par le BspH sur des larves de simulies d'été à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Témoins (mortalité) (%)	Mortalité observée (%)	Mortalité corrigée (%)	Écart-type
1000	4,4	12,1	8,2	4,9
2000	4,6	8,7	4,3	3,3
3000	5,8	3,3	0,0	- ^a

^a : Lorsqu'aucun écart-type n'est inscrit c'est qu'un seul bioessai a été fait ou retenu

Certains résultats montrent que d'autres concentrations auraient pu être testées puisque les CL se rapprochent de 10%. Par exemple, le tableau 1, rapportant les mortalités causées par le Cbm, montre qu'à une concentration de 165 ppm, les mortalités corrigées sont de 6,7%. Bien que ce taux de mortalité soit plus près de la CL₁₀ que les concentrations choisies pour les mélanges (8,25 et 16,50), le choix s'est porté sur celles-ci puisqu'un des objectifs de cette recherche est une diminution des doses à appliquer sur le terrain. Le même choix a été effectué pour le Bsph où les mortalités ne dépassent pas 10,2% pour des concentrations allant jusqu'à 5000 ppm et ce, autant sur les larves d'hiver que d'été.

Bioessais des différents mélanges testés

Connaissant maintenant les CL voisinant les 10%, nous sommes en mesure de procéder aux différents mélanges. Les tableaux 7, 8 et 9 donnent les résultats de différentes combinaisons de larvicides qui ont été testées à différentes concentrations et au moins à trois reprises sur des larves d'hiver (sauf la combinaison Bti (3) + Cbm (16,50)). Pour chacune des combinaisons, les mortalités obtenues pour les larvicides seuls (ML₁ et ML₂), sont similaires à celles des bioessais initiaux des tableaux 1 à 3. L'effet obtenu selon la nomenclature de Benz (1971) y est également compilé. Cette fois, tous les bioessais dont les mortalités témoins étaient inférieures à 10% ont été conservés faute de quoi, trop de bioessais auraient été rejetés. On remarque que sur cinq combinaisons testées (TABLEAUX 7, 8 et 9), seulement deux présentent des effets de synergisme dit supplémentaire (Bti (1) + Cbm (8,25) et Bsph (1000) + Cbm (8,25)) puisque la mortalité observée est plus élevée que la somme algébrique des effets des larvicides employés seuls. Toutes les autres combinaisons ont donné des interactions antagonistes ou additifs, peu importe les concentrations individuelles utilisées puisque cette fois, les mortalités

observées sont inférieures aux mortalités théoriques. Des trois combinaisons de Bti + Cbm qui ont été évaluées (TABLEAU 7), une seule obtient des effets de synergisme, soit le Bti (1) + Cbm (8,25). Pour cette dernière, deux bioessais sur cinq ont obtenu un effet de synergisme et trois des effets antagonistes. Les deux autres combinaisons n'ont obtenu que des effets antagonistes pour tous les bioessais. Pour ce qui est de la combinaison Bsph (1000) + Cbm (8,25) (TABLEAU 9), sur quatre bioessais, trois ont obtenu du synergisme et un, un effet additif.

TABLEAU 7

Bioessais de synergisme entre le Bti et le Cbm sur des larves d'hiver.

Larvicide	Mortalité témoin (%)	ML1 (%)	ML2 (%)	Mortalité attendue (%)	Mortalité observée (%)	Effet
Bti ₁ +Cbm _{8,25}	5,6	4,1	0,0	3,9	0,6	antagonisme
Bti ₁ +Cbm _{8,25}	4,1	1,6	0,0	2,4	7,5	synergisme
Bti ₁ +Cbm _{8,25}	0,0	4,0	8,1	9,1	6,9	antagonisme
Bti ₁ +Cbm _{8,25}	4,5	14,5	3,0	15,8	0,0	antagonisme
Bti ₁ +Cbm _{8,25}	2,7	1,8	0,5	2,3	7,0	synergisme
Bti ₁ +Cbm _{16,5}	4,5	3,4	3,0	6,18	5,0	antagonisme
Bti ₁ +Cbm _{16,5}	7,9	34,5	14,8	32,3	12,1	antagonisme
Bti ₁ +Cbm _{16,5}	0,0	7,0	8,6	14,5	7,2	antagonisme
Bti ₃ +Cbm _{16,5}	0,8	8,7	1,5	9,3	3,3	antagonisme

ML₁ = 1^{er} larvicide seul, ML₂ = 2^e larvicide seul, attendu = mortalité théorique attendu et observé = le pourcentage de mortalité corrigée observé.

TABLEAU 8

Bioessais de synergisme entre le Bti et le Bsph sur des larves d'hiver.

Larvicide	Mortalité témoin (%)	ML1 (%)	ML2 (%)	Mortalité attendue (%)	Mortalité Observée (%)	Effet
Bti ₃ +Bsph ₂₀₀₀	1,7	8,6	6,7	13,7	10,9	antagonisme
Bti ₃ +Bsph ₂₀₀₀	5,1	13,8	0,0	14,8	6,1	antagonisme
Bti ₃ +Bsph ₂₀₀₀	1,1	9,8	1,1	9,8	4,0	antagonisme
Bti ₃ +Bsph ₂₀₀₀	2,8	7,8	8,0	14,6	7,1	antagonisme
Bti ₃ +Bsph ₂₀₀₀	7,5	47,0	1,7	47,5	7,8	antagonisme

ML₁ = 1^{er} larvicide seul, ML₂ = 2^e larvicide seul, attendu = mortalité théorique attendu et observé = le pourcentage de mortalité corrigée observé.

TABLEAU 9

Test de synergisme entre le Bsph et le Cbm sur des larves d'hiver.

Larvicide	Mortalité témoin (%)	ML1 (%)	ML2 (%)	Mortalité attendue (%)	Mortalité Observée (%)	Effet
BS ₁₀₀₀ +Cbm _{8,25}	2,7	6,0	0,5	6,5	11,4	synergisme
BS ₁₀₀₀ +Cbm _{8,25}	4,5	5,0	3,0	6,0	6,1	additif
BS ₁₀₀₀ +Cbm _{8,25}	4,5	0,8	0,0	1,0	5,0	synergisme
BS ₁₀₀₀ +Cbm _{8,25}	5,6	6,1	0,0	5,7	10,1	synergisme

ML₁ = 1^{er} larvicide seul, ML₂ = 2^e larvicide seul, attendu = mortalité théorique attendu et observé = le pourcentage de mortalité corrigée observé.

Les tableaux 10, 11 et 12 montrent les résultats des combinaisons administrées sur des larves d'été. Comme pour les tests effectués sur les larves d'hiver, les bioessais des différents mélanges ont été conservés tant que la mortalité des témoins était inférieure à 10%. Des quatre combinaisons analysées, deux seulement ont été mesurées en triplicata. Toutes ont obtenu, à au moins une reprise, des effets de synergisme ou additif. Toutefois, pour chacune des combinaisons, des effets antagonistes ont également été obtenus, sauf pour le

mélange Bti (2) + Bsph (2000) pour lequel un seul bioessai a pu être effectué et dont le résultat est un effet additif (TABLEAU 11). Le manque de larves et la difficulté à conserver les larves d'été au laboratoire sont les causes principales du petit nombre de bioessais qui ont pu être fait et compilés.

TABLEAU 10

Test de synergisme entre le Bti et le Cbm sur des larves d'été.

Larvicide	Mortalité témoin (%)	ML1 (%)	ML2 (%)	Mortalité attendue (%)	Mortalité Observée (%)	Effet
Bti ₂ +Cbm _{8,25}	4,9	21,1	0,6	21,6	10,6	antagonisme
Bti ₂ +Cbm _{8,25}	9,5	18,3	18,3	33,3	13,9	antagonisme
Bti ₂ +Cbm _{8,25}	9,9	7,0	2,0	8,9	29,3	synergisme
Bti ₂ +Cbm _{16,5}	9,5	18,3	2,0	19,9	21,4	add-syn
Bti ₂ +Cbm _{16,5}	4,9	21,1	10,6	27,2	14,1	antagonisme

ML₁ = 1^{er} larvicide seul, ML₂ = 2^e larvicide seul, attendu = mortalité théorique attendu et observé = le pourcentage de mortalité corrigée observé.

TABLEAU 11

Test de synergisme entre le Bti et le Bsph sur des larves d'été.

Larvicide	Mortalité témoin (%)	ML1 (%)	ML2 (%)	Mortalité attendue (%)	Mortalité Observée (%)	Effet
Bti ₂ +Bsph ₂₀₀₀	5,0	3,6	8,1	4,8	5,0	add-anta

ML₁ = 1^{er} larvicide seul, ML₂ = 2^e larvicide seul, attendu = mortalité théorique attendu et observé = le pourcentage de mortalité corrigée observé.

TABLEAU 12

Test de synergisme entre le Bsph et le Cbm sur des larves d'été.

Larvicide	Mortalité témoin (%)	ML1 (%)	ML2 (%)	Mortalité attendue (%)	Mortalité Observée (%)	Effet
Bsp ₂₀₀₀ +Cbm _{8,25}	2,9	4,7	3,2	7,7	6,8	antagonisme
Bsp ₂₀₀₀ +Cbm _{8,25}	3,0	7,7	6,5	13,4	9,7	antagonisme
Bsp ₂₀₀₀ +Cbm _{8,25}	2,9	4,9	3,2	7,9	10,2	synergisme

ML₁ = 1^{er} larvicide seul, ML₂ = 2^e larvicide seul, attendu = mortalité théorique attendu et observé = le pourcentage de mortalité corrigée observé.

Effets du mélange des trois larvicides

Un bioessai combinant les trois larvicides (TABLEAU 13) a pu être réalisé à trois reprises sur des larves d'été. Un effet d'antagonisme a été observé.

TABLEAU 13

Test de synergisme entre le Bti, le Bsph et le Cbm sur des larves d'été.

Larvicide	Mort. tém. (%)	ML1 (%)	ML2 (%)	ML3 (%)	Mortalité attendue (%)	Mortalité Observée (%)	Effet
Bt ₂ +Bs ₂₀₀₀ +Cbm _{8,25}	3,0	6,5	7,4	10,9	22,9	14,8	antagonisme
Bt ₂ +Bs ₂₀₀₀ +Cbm _{8,25}	5,4	1,6	0,8	8,4	10,6	5,2	antagonisme
Bt ₂ +Bs ₂₀₀₀ +Cbm _{8,25}	5,4	4,4	0,0	3,6	7,9	2,4	antagonisme

ML₁ = 1^{er} larvicide seul, ML₂ = 2^e larvicide seul, ML₃ = 3^e larvicide seul, attendu = mortalité théorique attendu et observé = le pourcentage de mortalité corrigée observé.

DISCUSSION

Le contrôle d'une espèce nuisible peut causer l'apparition de résistance envers les produits utilisés. De là l'importance de connaître les risques potentiels de résistance envers les produits en question et si possible, prévoir des plans d'actions pour la déjouer, la retarder ou encore la diminuer. Lorsqu'une résistance est détectée, on évite, entre autre, de faire un mélange avec un autre insecticide de même catégorie impliquant ainsi les mêmes mécanismes de résistance que le produit précédent (Small, 2001, adresse internet). C'est pourquoi un mélange de Bti et de Bsph dont les toxines et les récepteurs sont différents est un mélange intéressant. Ce mélange a d'ailleurs déjà fait ses preuves sur certaines espèces de diptères dont *Culex quinquefasciatus*. Pour ce qui est du Cbm, contrairement au Bti et au Bsph, sa toxicité n'est pas associée à la production d'inclusion et les composants toxiques n'ont pas encore été isolés (Charles et Nielsen-LeRoux, 2000), donc les récepteurs n'en sont pas connus.

Avant de procéder aux bioessais de différents mélanges de larvicides, nous avons procédé à des tests en utilisation simple pour chacun d'eux afin de déterminer les concentrations à utiliser. Le choix de ces concentrations, en ppm, de ces différents larvicides lors des bioessais mixtes a été fait en fonction du taux de mortalité obtenu pour chacun d'eux pris isolément. Les concentrations létales (CL) se rapprochant le plus de 10% ont été retenues afin de permettre une meilleure évaluation du potentiel synergique pouvant exister entre deux ou trois larvicides. Ainsi, deux concentrations de Cbm (8,25 et 16,50 ppm) (TABLEAUX 1 et 4), trois concentrations de Bti (1, 2 et 3 ppm) (TABLEAUX 2 et 5) et deux concentrations de Bsph (1000 et 2000 ppm) (TABLEAUX 3 et 6) ont été retenues pour les bioessais sur les larves de mouches noires d'hiver et d'été. Lorsque plusieurs concentrations d'un larvicide obtenaient des mortalités oscillant autour de 10%, les concentrations les moins élevées étaient choisies, respectant ainsi un des objectifs de l'étude qui est de

diminuer les doses à appliquer sur le terrain. Une autre raison est qu'avec le Bsph, avec lequel plusieurs concentrations offraient des mortalités d'environ 10% sur les larves de simulies d'été, le choix de la plus faible concentration possible s'est imposé. En effet, lors des bioessais effectués avec les plus fortes concentrations (3000 ppm, voire le 4000 ppm qui a été retiré) de Bsph et sous l'effet de l'oxygénation dans les tubes, la production de bulles était telle que les larves étaient expulsées hors des tubes et certains bioessais ont donc dû être répétés (FIGURE 18). Aussi, la courbe log-probit de la figure 25 (ANNEXE 3) démontre bien qu'avec le Bsph, on obtient un seuil de mortalité (ou un plateau) où les concentrations en log vont de 2,5 à 3,5 (soit l'équivalent de 500 à 5000 ppm). Donc, pour une même mortalité, plusieurs doses peuvent être utilisées.



FIGURE 18 : Larves (pointées par les flèches) expulsées du tube par les bulles causées par le Bsph à des concentrations de 3000 et 4000 ppm.

Il est à noter que les mortalités corrigées obtenues avec le Cbm sont toutes inférieures à 10% à part une mortalité 10,6% obtenue avec le 16,50 ppm sur des larves d'été (TABLEAU 4). Aussi, dans le tableau 1 concernant les bioessais

sur les larves d'hiver, on remarque que des concentrations de 8,25 et 16,50 ppm de Cbm obtiennent des mortalités corrigées de 0,4 et de 0,0% alors que sur les larves d'été (TABLEAU 4), ces deux mêmes concentrations obtiennent des mortalités corrigées de 3,8 et 10,6%. Pour le Bti, les taux de mortalités corrigées obtenus avec 1 et 3 ppm sur les larves d'été (TABLEAU 5) sont également plus élevés que sur les larves d'hiver (TABLEAU 2). Cette augmentation de la mortalité avec l'augmentation des températures est confirmée par Lacoursière et Charpentier (1988). Leurs recherches ont démontré que les larves d'été meurent à des concentrations plus faibles et avec des temps de contact plus courts. Quant au Bsph, les tableaux 3 et 6 montrent que les mortalités corrigées sont également plus élevées sur les larves d'été que sur les larves d'hiver, exception faite du dosage de 3000 ppm.

Sur les différentes combinaisons évaluées, deux ont obtenu des effets de synergisme dit supplémentaire (selon la nomenclature de Benz (1971)) sur les larves d'hiver et sur les larves d'été respectivement. Ces combinaisons sont le Bti (1) + Cbm (8,25) et Bsph (1000) + Cbm (8,25) pour les larves d'hiver et Bti (2) + Cbm (8,25) et Bsph (2000) + Cbm (8,25) pour les larves d'été. À aucun moment, le mélange de Bti et de Bsph n'a obtenu de synergisme sur les larves de simuliés d'hiver et d'été, contrairement à ce qui avait été obtenu sur *C. quinquefasciatus* (Mulla *et al.* 2003).

Il est important de mentionner qu'il est fréquent de retrouver des variations importantes entre les résultats de deux bioessais identiques et ce, même en suivant rigoureusement le protocole établi (Benz, 1971). D'ailleurs, les différences sont si élevées entre certains bioessais que les écarts-types, devenaient, par moments, équivalents ou plus élevés que les mortalités corrigées, comme pour le Bsph à 2000 ppm où l'écart-type est équivalent à la mortalité corrigée (TABLEAU 3).

Les résultats obtenus pour les combinaisons de Bti et de Bsph ont résulté en des effets antagonistes, peu importe la saison et les concentrations utilisées. Un effet additif a toutefois été obtenu avec le mélange de Bti (2) + Bsph (2000) sur les larves d'été mais comme un seul bioessai a pu être effectué, on ne peut conclure de façon claire. De tels résultats étaient attendus puisque le Bsph n'est pas réputé être toxique pour les larves de simulies, sinon à de très fortes doses. Toutefois, ce sont les conclusions de deux études menées par Wirth *et al.* (2004) qui avaient motivé ce choix de mélange. Ils ont en effet démontré que le Bti pouvait accroître la toxicité du Bsph mais chez des larves de *C. quinquefasciatus* et de *Aedes aegypti* qui sont des espèces de moustiques. De par les résultats obtenus dans cette étude, il s'avère que les larves de simulies ne démontrent pas la même sensibilité à cette combinaison de larvicides.

Il est également à noter qu'aucun facteur biotique ou abiotique n'a été pris en compte lors des bioessais sinon la toxicité du larvicide lui-même utilisé seul ainsi que la température de l'eau selon la saison. Lacoursière et Charpentier (1988) a démontré que le pH pouvait avoir une influence sur l'effet du Bti envers les larves de mouches noires. De plus, selon Lacoursière (1984), du 2^e au 5^e stade larvaire, les larves seraient plus sensibles face aux larvicides. Aussi, lors des derniers bioessais qui ont eu lieu à l'été 2006, des larves de 6^e et 7^e stade (ces larves cessent de se nourrir pour nymphes) étaient présentes dans les échantillons. Bien qu'un tri visuel soit effectué lorsque les larves sont mises dans les tubes au début des bioessais, les larves de 5^e et 6^e stade sont difficiles à différencier et cela peut contribuer à augmenter la variabilité des résultats obtenus.

En plus de la température de l'eau, la saison (hiver vs été) a aussi son influence. On sait que lorsque les températures sont plus chaudes (printemps et été), le métabolisme des larves n'est pas le même qu'en hiver. Lors des bioessais sur les larves d'été, il est arrivé, à quelques reprises, de déposer des larves dans les tubes au début du bioessai et d'y retrouver des nymphes 48

heures plus tard. La température de l'eau influence également l'effet toxique des bactéries qui est directement proportionnel à cette température, donc, plus efficace en termes de toxicité l'été que l'hiver. Lacey et Fedirici (1979) ont d'ailleurs noté que le Bti était non seulement plus toxique lorsque la température de l'eau était plus élevée mais aussi que la mortalité survenait plus rapidement, soit après 24 heures seulement.

La présente étude est aussi réalisée avec des populations différentes de simulies (hiver et été) présentant des conditions de développements distincts. Aussi, tel que mentionné dans l'introduction, les espèces de mouches noires échantillonnées ne sont pas les mêmes selon la saison. En hiver, on a surtout retrouvé des *Prosimulium fuscum*, des *Cnephia mutata* et des *Simulium vittatum* alors qu'en été, les échantillons étaient principalement composés de *S. venustum*, *S. verecundum* et *S. vittatum*. Dans un même échantillon on pouvait donc retrouver plusieurs espèces différentes alors que chacune d'elle est susceptible à des degrés divers comme l'ont démontré Molloy *et al.* (1981). Ils ont observé que les larves de *S. verecundum* étaient plus susceptibles au Bti que les larves de *S. vittatum*, deux espèces qui peuvent se retrouver dans un même bioessai puisque les deux se développent en été.

Tous ces critères ont-ils eu des effets sur les résultats? Voilà une question pour laquelle bien d'autres bioessais seront nécessaires.

CONCLUSION

Plusieurs facteurs, tant biotiques qu'abiotiques, peuvent influencer l'activité du Bsph envers les espèces cibles et les espèces non-cibles. En plus de l'espèce proprement dite, ajoutons le stade larvaire et le mode de nutrition (filtreur vs brouteurs) des différentes espèces. Des facteurs environnementaux comme la température, la turbidité de l'eau (quantité de matières en suspension), la pollution (dégradation du milieu naturel) et bien d'autres peuvent aussi agir sur l'efficacité du Bsph. La formulation utilisée, le dosage (en spores/ml ou unités/ml) de la bactérie dans le produit et la fréquence des traitements sont autant de facteurs qui peuvent également influencer la toxicité du larvicide (Lacey et Merritt, 2003). Plusieurs de ces facteurs ont également été évalués avec le Bti et la même conclusion a été émise; l'efficacité du Bti est influencée par plusieurs paramètres extérieurs tel que le pH et la température (Lacoursière et Charpentier, 1988). Pour ce qui est du Cbm, bien qu'il soit encore à l'étude, on sait déjà que la température est un facteur très important pour cette bactérie. En effet, les toxines de cette dernière se dégradent rapidement perdant ainsi leur effet avec l'augmentation des températures, d'où la nécessité de congeler la solution entre chaque bioessai. Pour la conservation à plus long terme ou l'entreposage du larvicide, la lyophilisation semble être une très bonne solution afin d'en préserver sa toxicité (De Barjac *et al.*, 1990).

Cette étude a permis de démontrer qu'en certaines conditions expérimentales en laboratoire, l'usage simultané de trois larvicides bactériologiques d'une formulation commerciale de Bti, Cbm et de Bsph peut s'avérer moins efficace que lorsqu'on utilise chacun des larvicides indépendamment. Il ne faut toutefois pas abandonner cette possibilité puisqu'une seule combinaison de trois larvicides a été testée sur des simules d'été. Lorsque deux larvicides sont combinés, des résultats mitigés ont été obtenus. Effectivement, pour une même

combinaison, des résultats synergiques, d'antagonisme et additifs ont été obtenus.

Lorsque des résultats autres que synergisme et antagonisme sont obtenus pour une série de bioessais d'une même combinaison, il est évident que d'autres essais doivent être effectués afin de confirmer les effets réels de ces mélanges de larvicides. Toutefois, il est intéressant de remarquer que pour chaque bioessai où un effet de synergisme ou additif est obtenu, le Cbm était impliqué dans le mélange.

Différentes recherches ont démontré que les mouches noires ne sont pas susceptibles au Bsph (sinon à de très fortes doses, tableaux 3 et 6) et ce, même si une des souches les plus toxiques pour les moustiques, soit la souche 2362, a été isolée à partir d'une simule (Davidson et Yousten, 1990). Le Bsph a pourtant été intégré à cette étude puisqu'il était important d'évaluer son efficacité lorsque combiné à d'autres larvicides. Le mélange Bti + Bsph a déjà été éprouvé avec succès sur des larves de *C. quinquefasciatus* (Wirth *et al.* 2004) mais son impact potentiel envers les larves de mouches noires n'avait pas encore été évalué. Les bioessais n'ont démontré aucun effet de synergisme avec ce mélange. De surcroît, les bioessais ont démontré un effet d'antagonisme.

Les bactéries pathogènes d'insectes et les différentes toxines qui les composent ont été et doivent demeurer des sujets de recherches importants. Ces études permettront de mieux connaître le mode d'action des toxines ainsi que les mécanismes conduisant au développement de la résistance. Cette compréhension devient maintenant nécessaire car la résistance aux larvicides bactériologiques est actuelle; on a pu l'observer sur le terrain chez certaines espèces de moustiques envers le Bsph (Silva-Filha *et al.* 1995, Nielsen-Leroux *et al.* 1997, Brogdon et McAllister, 1998, Pei *et al.* 2002).

D'autres solutions peuvent être envisagées pour de futurs bioessais. Par exemple, des traitements différés pourraient être tentés, c'est-à-dire, une première application d'un larvicide au temps zéro (t_0) et l'application du deuxième larvicide au temps un (t_1). Naturellement, un épandage par avion ou par hélicoptère est à exclure si l'on tient compte des coûts engendrés par une telle solution. Pour ce genre de procédé, l'encapsulation pourrait s'avérer un bon moyen puisqu'elle permet à un second produit d'être expulsé après un certain temps dans l'environnement, obtenant ainsi une activité prolongée des larvicides. Gunasekaran *et al.*, (2002) ont démontré qu'une formulation de Bti encapsulée dans l'alginate augmentait la durée de la persistance de l'activité toxique du Bti, permettant ainsi une diminution de l'abondance des pupes chez *C. quinquefasciatus* de plus de 80%. En effet, le produit est libéré de façon plus continue dans le temps. Pour notre étude, les capsules pourraient être recouvertes d'une couche d'un des larvicides puis l'intérieur de la capsule pourrait contenir un deuxième larvicide. Ainsi, un premier produit serait dissous dans l'eau dès le premier contact (t_0) et une fois la capsule dissoute, le deuxième larvicide se répandrait dans l'eau (t_1).

Un moyen biochimique tel que l'ajout d'un additif pour augmenter l'efficacité d'un produit bactériologique peut également être envisagé. En optimisant les conditions à l'intérieur du tube digestif de l'insecte, on obtient la formation de fractions toxiques à partir de l'endotoxine intacte non toxique. Ce procédé consiste à incorporer au larvicide un composant, non toxique et peu coûteux, ayant différents modes d'actions avec l'endotoxine (El-Moursy *et al.*, 1993). Par ce moyen, Salama *et al.* (1985) ont réussi à augmenter le potentiel d'efficacité des endotoxines du *Bacillus thuringiensis var. entomocidus* contre *Spodoptera littoralis*. Ils ont ajouté des additifs tels que des agents émulsifiants, des agents qui aident la solubilisation des protéines (disodium glycérophosphate) ou des composants non toxiques (composés azotés).

Biais d'erreurs

Les grandes variations obtenues entre les bioessais (parfois les coefficients de variation pouvaient dépasser le résultat de certains bioessais) suggèrent que davantage de bioessais d'une même combinaison devraient être effectués afin d'établir une moyenne de mortalité qui soit utilisable aux fins de comparaison. Aussi, la standardisation des bioessais (larves aux mêmes stades et même espèce) peut-être plus que le nombre de bioessais, pourrait confirmer de façon plus efficace les résultats obtenus. Une des démarches qu'il serait peut-être intéressante de suivre, serait de dénombrer la mortalité obtenue pour chaque espèces lors des bioessais.

Par ailleurs, comme les écarts entre deux bioessais d'une même combinaison sont très élevés, il serait pertinent de revoir en profondeur la méthodologie employée. Du moment de l'échantillonnage jusqu'au décompte des larves mortes, il y a probablement des techniques et/ou des appareils qui permettraient d'augmenter la reproductibilité des bioessais.

Dans le même ordre d'idée, un coefficient de variation fixé à l'avance concernant les variations sur les mortalités pourrait être établi. Ainsi, si l'écart-type d'un essai est trop élevé en comparaison des autres valeurs obtenues, le bioessai aberrant serait alors rejeté.

Recommandations

À la lumière des résultats obtenus, il convient de poursuivre les recherches en mettant l'emphase sur les mélanges de Bti + Cbm ou Bsph + Cbm. En conservant ces deux mêmes mélanges, mais en évaluant différentes

concentrations, nous trouverons peut-être une combinaison plus efficace et/ou plus économique à utiliser. Il serait également envisageable d'augmenter les concentrations létales des larvicides utilisés seuls, voire jusqu'à 20 ou 30% ou encore les diminuer de façon à atteindre une CL de 0% et de détecter, non plus un effet de synergisme, mais un effet de potentiation. En utilisant des doses sub-létales d'un produit pour un mélange et des doses normales pour le deuxième produit on réussit du coup à diminuer les doses et les coûts de traitement. Le Cbm semble être tout désigné pour cette étude puisque plusieurs bioessais, à certaines concentrations, ont obtenu des taux de mortalité presque nuls, voire même de 0% (FIGURE 1 et 4).

À ce jour, le Bti demeure un excellent moyen de contrôle pour les espèces de simulies. Toutefois, le Cbm mérite qu'on s'y attarde puisqu'on le sait également efficace contre les larves de simulies. Il faut donc approfondir les connaissances déjà acquises avec ce produit afin d'être davantage en mesure d'en tirer le maximum.

Les recherches doivent donc se poursuivre pour une gestion efficace d'une possible apparition de résistance envers les larvicides bactériologiques. Avec le retour du paludisme l'OMS a autorisé l'utiliser du DDT après plus de trente ans d'abandon du produit (OMS, 2006). Avec les dangers réels que ce produit chimique provoque à l'environnement, il devient urgent de trouver une solution écologique. Pour ce faire, d'autres insecticides biologiques pourraient être évalués comme l'huile de Neem (ou azadirachtine) ou encore des molécules dérivées de ce produit (Charbonneau *et al.* 2007). Le Spinosad (<http://www.dowagro.com/fr/success4/>) ou d'autres souches bactériennes comme le *Photorhabdus* ou le *Xenorhabdus* pourraient être envisagées afin de contrer une éventuelle résistance de la part des larves de simulies. Aussi, d'autres souches de *Clostridium* dont le *C. bifermentans* sérovar. *paraiba* (Cbp), qui a été isolé en 1997, (Seleena *et al.* 1997, cité par Charles et Nielsen-Leroux, 2000) pourraient être utilisées dans un mélange avec le Bti ou le Bsph.

De plus, lors de tests ultérieurs, il serait important de connaître la composition des différentes formulations commerciales de larvicides utilisés. La connaissance des ingrédients actifs et inertes de chacun des produits pourrait permettre de mieux comprendre l'interaction possible entre les différentes combinaisons.

Les résultats obtenus pourraient permettre, dans un premier temps, d'augmenter les connaissances déjà acquises mais également de permettre d'orienter les études ultérieures. Bien que certains mélanges analysés sur les larves de simules d'hiver et d'été aient obtenu des résultats positifs encourageants, les essais devraient être validés avant de pouvoir affirmer, notamment, qu'un mélange impliquant le Cbm s'avère vraiment efficace.

Pour une prochaine étude, il serait approprié de ne se concentrer que sur un seul type de larves, préféablement celles d'été. Les possibilités de comparaison et de dosages sont si nombreuses que cela faciliterait la comparaison.

BIBLIOGRAPHIE

Abedi, Z.H. et Brown, A.W.A., 1960. Development and reversion of DDT-resistance in *Aedes aegypti*. *Canadian Journal of Genetic Cytology*, 2:252-261.

Abbott, W.S., 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18:265-267.

Adler, P.H., Currie, D.C. et Wood, D.M., 2004. The blackflies (Simuliidae) of North America. ROM Publication in sciences. New York, U.S.A. 941pp.

Barloy, F., 1997. Caractérisation des déterminants génétiques dans la toxicité de *Clostridium bifermentans* subsp. *Malaysia*, souche CH18, sur les larves de moustiques. Thèse de doctorat de l'Université Paris VII- Denis Diderot. 279 pp.

Barloy, F., Delécluse, A., Nicolas, L. et Lecadet, M-M., 1996. Cloning and expression of the first anaerobic toxin gene from *Clostridium bifermentans* subs. *malaysia*, encoding a new mosquito itocidal protein with homologies to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Journal of Bacteriology*, 178:3099-3105.

Baumann, P., Clark, M.A., Baumann, L. et Broadwell, A.H., 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: Properties of the organism and its toxins. *Microbiological Reviews*, 55:425-436.

Baumann, P., Unterman, B.M., Baumann, L., Broadwell, A.H., Abbene, S.J. et Bowditch, R.D., 1985. Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular-weight precursors. *Journal of Bacteriology*, 163:738-747.

Benz, G., 1971. Synergism of micro-organisms and chemical insecticides. Chapitre 14 dans H.D. BURGESS (éditeur), *Microbial control of insects and mites*. Academic Press, New York. 327-354 pp.

Bourassa, J-P., 2000. Le moustique par solidarité écologique. Édition du Boréal, Montréal, 239 pp.

Brogdon, W.G. et McAllister, J.C., 1998. Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases*. 4 :605-613.

Brousseau, C., Charpentier, G. et Belloncik, S., 1998. Effects of *Bacillus thuringiensis* and destruxins (*Metharizium anisopliae* mycotoxins) combinations on spruce budworm (*Lepidoptera: Tortricidae*). *J. Invertebr. Pathol.*, 72:262-268.

Carson, R.L., 1972. *Le printemps silencieux*. Édition Plon, Paris. 319pp.

Charbonneau, C., Côté, R. et Charpentier, G., 2007. Effects of azadirachtin and of simpler epoxy-alcohols on survival and behaviour of *Galleria mellonella* (*Lepidoptera*). *Journal of Applied Entomology*, 131 :447-452.

Charles, J.-F. et Nielsen-Leroux, C., 2000. Mosquitocidal bacterial toxins: Diversity, mode of action and resistance phenomena. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 95: 201-206.

Charles, J.-F., Nielsen-Leroux, C et Delécluse, A., 1996, *Bacillus sphaericus* toxins: Molecular biology and mode of action. *Annu. Rev. Entomol.*, 41:451-72.

Charles, J.-F., Silva-Filha, M.H. et Nielsen-Leroux, C., 2000. Mode of action of *Bacillus sphaericus* on mosquito larvae : incidence on resistance. pp. 227-252. Dans : *Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to field application*. Charles, J.-F., Delécluse, A., and Nielsen-Leroux, C., (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Chevillon, C., Bernard, C., Marquine, M. et Pasteur, N., 2001. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (*Diptera :Culicidae*) : Interaction between recessive mutants and evolution in southern France. *Journal of Medical Entomology*, 38:657-664.

Chilcott, N.C., Knowles, B.H., Ellar, D.J. et Drobniowski, F.A., 1990. Mecanism of action *Bacillus thuringiensis israelensis* parasporal body. Dans: *Bacterial control of mosquitoes & black flies de Huguette de Barjac et Donald J. Sutherland*, aux éditions Rutgers University Press, New Brunswick , NJ. pp. 45-65.

Crosskey, R.W. et Howard, T.M., 2004. A revised taxonomic and geographical inventory of world blackflies (Diptera:Simuliidae). The Natural History museum. 7pp.

Darboux, I., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.-F. et Pauron, D., 2001. The receptor of *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) midgut : molecular cloning and expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31:981-990.

Davidson, E.W., 1984. Microbiology, pathology and genetics of *Bacillus sphaericus*: biological aspects which are important to field use. *Mosquito news*, 44:147-152.

Davidson, E.W., 1988. Variation in binding of *Bacillus sphaericus* toxin and wheat germ agglutinin to larval midgut cells of six species of mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*, 53:251-259.

Davidson, E.W. et Yousten, A.A., 1990. Chapitre 15. The mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus*. pp. 237-255. Dans *Bacterial control of mosquitoes & black flies*. H. De Barjac, et Sutherland, D. J., éds Rutgers University Press, New Brunswick, 1990.

De Barjac, H., Sebald, M., Charles, J.-F., Cheong, W.H. et Lee, H.L., 1990. *Clostridium bifermentans* sévorar. *malaysia*, une nouvelle bactérie anaérobie pathogène des larves de moustiques et de simulies. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 310, série III, p.383-387.

Dubitskii, A. M., 1981. Blackflies control occasioned by major hydroelectric projects in the USSR from 1955-1965. Tiré de: *Blackflies, the future for biological methods in integrated control*. Laird M., Academic Press Inc, New York. 399p.

Dulmage, H.T., Boening, O.P., Rehnborg, C.S. et Hansen, G.D., 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *Journal of Invertebrate Pathology*, 18:240-245.

El-Moursy, A.A., Sharaby, A. et Awad, H.H., 1993. Some chemical additives to increase the activity spectrum of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel 2X) against the rice moth *Corcyca cephalonica*. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 6:149-154.

Federici, B.A., Lüthy, P. et Iberra, J.E., 1990. Chapitre 3. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*: structure, protein composition, and toxicity. Dans: Bacterial control of mosquitoes & black flies de Huguette de Barjac et Donald J. Sutherland, aux éditions Rutgers University Press, New Brunswick, N.J., pp 16-44.

Federici, B.A., Park, H-W., Bideshi, D.K., Wirth, M.C. et Johnson, J.J., 2003. Recombinant bacteria for mosquito control. *The Journal of Experimental Biology*, 206:3877-3885.

Frankenhuyzen, K.V., 1993. Chapitre 1; The challenge of *Bacillus thuringiensis*. Tiré de ; *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: Theory and practice. Éd. John Wiley & Sons, New York. pp 1-35.

Gaugler, R. et Molloy, D., 1980. Feeding inhibition in black fly larva (*Diptera* : *Simuliidae*) and its effects on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Environ. Entomol.*, 9:704-708.

Georghiou, G.P., 1980. Mosquito resistance to insecticides. *California Agriculture*, march, 33-34.

Gill, S.S., Cowles, E.A. et Pietrantonio, P.V., 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.*, 37:615-636.

Goldman, I.F., Arnold, J. et Carlton, B.C., 1985. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47:317-324.

Gunasekaran, K., Prabakaran, G. et Balaraman, K., 2002. Efficacy of a floating sustained release formulation of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* in controlling *Culex quinquefasciatus* larvae in polluted water habitats. *Acta Tropicana*, 83:241-247.

Karch, S. et Coz, J., 1986. Recycling of *Bacillus sphaericus* in dead larvae of *Culex pipiens* (*Diptera, Culicidae*). *Cah. ORSTOM, sér. Entomologie Médicale et Parasitologie*, 24 :41-43.

Karch, S., Monteny, N., Toneatti, C. et Coz, J., 1987. Intervention de l'entomofaune dans le recyclage et le potentiel d'action du complexe

cristal/spore de *Bacillus sphaericus*, larvicide anti-moustiques. Cah. ORSTOM, sér. Entomologie Médicale et Parasitologie. numéro spécial 1987 :121-125.

Kelada, N.L. et Shaker, N., 1987. Toxicity of three chemical insecticides in combination with *Bacillus spp.* against mosquito larvae. Insect. Sci. Applic., 9:229-231.

Kurtak, D.C., 1978. Efficiency of filter feeding of black fly larva (Diptera : Simuliidae). Can. J. Zool., 56: 1608-1623.

Lacey, L.A., Mulla, M.S. et Dulmage, H.L., 1978. Some factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against blackflies. Environmental Entomology, 7:583-588.

Lacey, L.A. et Federici, B.A., 1979. Pathogenesis and midgut histopathology of *Bacillus thuringiensis* in *Simulium vittatum* (Diptera :Simuliidae). J. Invert. Pathol., 33:171-182.

Lacey, L.L. et Merritt, R.W., 2003. The safety of bacterial microbial agents used for black fly and mosquito control in aquatic environments. pp. 151-168. Dans Environmental impacts of microbial insecticides, need and methods for risk assessment (Hokkanen H.M.T. et Hajak A.E.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands

Lacoursière, J.O., 1984. Études des principaux facteurs influençant la pathogénéicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* envers les mouches noires (Diptères:Simuliidae). Mémoire de Maîtrise en Science de l'Environnement, UQTR, Trois-Rivières, 191p.

Lacoursière, J.O. et Boisvert, J., 2004. Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec. Ministère de l'Environnement. 107 pages.

Lacoursière, J.O. et Charpentier, G., 1988. Laboratory study of the influence of water temperature and pH on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* efficacy against black fly larvae (Diptera:Simuliidae). Journal of the American Mosquito Control Association, 4:64-72.

Lenormand, T. et Raymond, M., 1998. Resistance management : the stable zone strategy. Proceedings of the Royal Society of London. Série B. 265:1985-1990.

Lepage, S., 1992. Évaluation du potentiel toxique d'extraits et de mycotoxine élaborés par le champignon entomopathogène *Metharidium anisopliae* sur des diptères piqueurs (*Simuliidae* et *Culicidae*). Mémoire de M.Sc. en Science de l'environnement, UQTR, Trois-Rivières, 135p.

Molloy, D., Gaugler, R. et Jamnback, H., 1981. Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of black fly larvae. J. Econ. Entomol., 74:61-64.

Mouchet, J., 1968. Résistances des Culicidés aux insecticides. Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Entomologie Médicale et Parasitologie., 6:225-232.

Mouchet, J., Quelennec, G., Berl, D., Sechan, Y. et S. Grebaut., 1977. Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de *Simulium damnosum* s.l. Ent. Méd. et Parasitol., XV:55-66.

Mulla, M., Darwazeh, H.A., Davidson, E.W. et Dulmage, H.T., 1984. Larvicidal activity and field efficacy of *Bacillus sphaericus* strains against mosquito larvae and their safety to nontarget organisms. Mosquito News, 44:336-342.

Mulla, M., Thavara, U., Tawatsin, A., Chomposri, J. et Su, T., 2003. Emergence of resistance and resistance management in field populations of tropical *Culex quinquefasciatus* to microbial control agent *Bacillus sphaericus*. Journal of the American Mosquito Control Association, 19:39-46.

Nicolas, L., 1990. Bacteriological control of mosquitoes and blackflies: present aspects and perspectives of research. 2^{ième} simposio de controle biologico siconbiol. Brasilia, Brazil.

Nicolas, L., Nielsen-Leroux, C., Charles, J.-F. et Delécluse, A., 1993. Respective role of the 42- and 51kDa components of the *Bacillus sphaericus* toxin overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiology Letters.106:275-280.

Nielsen-Leroux, C. et Charles, J.-F., 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *European Journal of Biochemistry*, 210:585-590.

Nielsen-Leroux, C., Pasquier, F., Charles, J.-F., Sinègre, G., Gaven, B. et Pasteur, N., 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* involves different mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) larvae. *Journal of Medical Entomology*, 34:321-327.

Nielsen-Leroux, C., Pasteur, N., Prêtre, J., Charles, J.-F., Sheikh, H.B. et Chevillon, C., 2002. High resistance to *Bacillus sphaericus* binary toxin in *Culex pipiens* (Diptera :Culicidae) : The complex situation of west Mediterranean Countries. *Journal of Medical Entomology*, 39:729-735.

Oliveira, M.F., Silva-Filha, M.H., Nielsen-Leroux, C., Pei, G., Yuan, Z. et Regis, L., 2004. Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae) from China and Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 41:58-64.

Paul, A., Harrington, L.C., Zhang, L. et Scott, J.G., 2005. Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21:305-309.

Pei, G., Oliveira, C.M.F., Yuan, Z., Nielsen-Leroux, C., Silva-Filha, M.H., Yan, J. et Regis, L., 2002. A strain of *Bacillus sphaericus* causes slower development of resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:3003-3009.

Poopathi, S., Mani, T.R., Rao, D.R. et Kabilan, L., 2002. Evaluation of synergistic interaction between *Bacillus sphaericus* and Neem-Based biopesticide on *Bsph*-susceptible *Culex quinquefasciatus* say larvae. *Insect. Sci. Applic.*, 22:303-306.

Poopathi, S. et Tyagi, B., 2004. Mosquitocidal toxins of spore forming bacteria : recent advancement. *African Journal of Biotechnology*, 3:643-650.

Raymond, K.C., Wabiko, H., Faust, R.M. et Bulla L., A. Jr., 1990. Chapitre 7. Transfer of the *Bacillus thuringiensis israelensis* mosquitocidal toxin gene into mosquito larval food sources. Tiré de: *Bacterial control of mosquitoes & black*

flies de Huguette de Barjac et Donald J. Sutherland, aux éditions Rutgers University Press, New Brunswick, 1990. pp 94-109.

Regis, L., Da Silva, S.B., Melo-Santos, M.A.V., 2000. The use of bacterial larvicides in mosquitos and black fly control programmes in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 95, Suppl.1:207-210.

Rodcharoen, J. et Mulla, M.S., 1995. Comparative ingestion rates of *Culex quinquefasciatus* (Diptera :Culicidae) susceptible and resistant to *Bacillus sphaericus*. Journal of Invertebrate Pathology, 66:242-248.

Salama, H. S., Foda, M. s. et Sharaby, A., 1985. Potential of some chemicals to increase the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* Berl. Against *Spodoptera littoralis* (Boisd.). Zeitschrift für angewandte Entomologie, 100:425-433.

Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. et Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62:775-806.

Sellena, P. et Lee, H.L., 1998. Mosquitocidal bacteria isolated from Malaysia. Israel Journal of Entomology, vol. XXXII:155-158.

Silva-Filha, M-H., Nielsen-Leroux, C. et Charles, J.-F., 1999. Identification of the receptor of *Bacillus sphaericus* crystal toxin in the brush border membrane of the mosquito *Culex pipiens* (Diptera:Culicidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology, 29:711-721.

Silva-Filha, M-H., Regis, L., Nielsen-Leroux, C. et Charles, J.-F., 1995. Low-level resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-treated population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Economic Entomology, 88:525-530.

Singh, G.J.P. et Gill, S.S., 1988. An electron microscope study of the toxin action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 52:237-247.

Stephens, M.S., Overmyer, J.P., Gray, E.W. et Noblet, R., 2004. Effects of algae on the efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against larval black flies. Journal of the American Mosquito Control Association, 20:171-175.

Su, T. et Mulla, M.S., 2004. Documentation of high-level *Bacillus sphaericus* 2362 resistance in field populations of *Culex quinquefasciatus* breeding in polluted water in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 29:405-411.

Tabashnick, B.E., 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3343-3346.

Tabashnik, B.E. et McGaughey, W. H., 1994. Resistance risk assessment for single and multiple insecticides: responses of Indian meal moth (Lepidoptera:Pyralidae) to *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*, 87:834-841.

Tabashnik, B.E., Finson, N. et Johnson, M.W., 1991. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis*: lessons from the Diamondback moth (Lepidoptera:Plutellidae). *Journal of Economic Entomology*, 84:49-55.

Thiéry, I., Hamon, S., Dumanoir, V. C. et De Barjac, H., 1992. Vertebrate safety of *Clostridium bifermentans* serovar. *malaysia*, a new larvicidal agent for vector control. *Journal of Economic Entomology*, 85:1618-1623.

Wirth, M., Jiannino, J.A., Federici, B.A. et Walton, W.E., 2004. Synergy between toxins of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*, 41:935-941.

Wood, D.M., Peterson, B. V., Davies, D. M. et Gyorkos, H., 1963. The Black Flies (Diptera:*Simuliidae*) of Ontario. Part II. Larvicidal identification, with descriptions and illustrations. *Proc. Entomol. Soc. Ont.*, 93: 99-129.

Wood, D.M., 1985. Diptères piqueurs du Canada qui s'attaquent à l'homme et au bétail. Publication Agriculture Canada, Ottawa, Ontario, publication #1781/F, 39p.

Yiallourous, M., Storch, V., Thiery, I. et Becker, N., 1994. Efficacy of *Clostridium bifermentans* sérovar. *malaysia* on target and nontarget organisms. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 10:51-55.

Yuan, Z., Rang, C., Maroun, R.C., Juarez-Perez, V., Frutos, R., Pasteur, N., Vendrely, C., Charles, J.-F. et Nielsen-Leroux, C., 2001. Identification and

molecular structural prediction analysis of a toxicity determinant in the *Bacillus sphaericus* crystal larvicidal toxin. *European Journal of Biochemistry*, 268:2751-2760.

Yuan, M.Z., Pei, G.F., Regis, L. , Nielsen-Leroux, C. et Cai, Q.X., 2003. Cross-resistance between strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in colonies of mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 17:251-256.

Zahiri, N.S. et Mulla, M.S., 2003. Susceptibility profile of *Culex quinquefasciatus* (Diptera :Culicidae) to *Bacillus sphaericus* on selection with rotation and mixture of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Journal of Medical Entomology*, 40:672-677.

Zahiri, N.S., Su, T. et Mulla, M.S., 2002. Strategies for the management of resistance in mosquitoes to the microbial control agent *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*, 39:513-520.

ADRESSES INTERNET

<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/bt.htm>

Université D'Édimbourg

(photo de l'annexe 1, dernière consultation avril 2004)

<http://svl.la.asu.edu/ubep98/abstracts/abst43/abst43.html>

(The structure and function of mosquitoicidal binary toxin from *Bacillus sphaericus*)

Zhang Q., E.W. Davidson et J.P. Allen. 1998.

<http://www.érudit.org/revue/ms/2003/v19/n12/007392ar.html>

(La résistance du moustique *Culex pipiens* aux insecticides)

Weill M., O. Duron, P. Labbé, A. Berthomieu et M. Raymond. 2003.

<http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR96/Ecoentomo.html>

(Unité de bacteriologie des entomopathogènes, 1996)

Charles J.-F., A. Delécluse, P. Laurent, C. Nielsen-Leroux et F. Barloy. 1996.

http://www.mim.su.se/english/events/insecticide_resistance_conf/small1-eng.html

(Titrages biologiques pour évaluer la résistance croisée chez les insectes)

Small G. Université de Cardiff, R-U, 2001.

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc217.htm>

IPCS Inchem home (dernière consultation le 8 mars 2007)

(United nations environment programme

International labour organisation

World health organization)

<http://www.cchst.ca/reponsesst/chemicals/synergism.html>

Centre Canadien d'hygiène et de sécurité au travail

<http://www.mddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/>

Développement durable, environnement et parcs

Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec, document de mars 2004 (dernière consultation le 26 mars 2007)

J.O. Lacoursière et J. Boisvert

<http://bugs.bio.usyd.edu.au/Entomology/pests/insecticides.html>

Entomology

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr50/fr/index.html>

Lutte antipaludique: l'OMS estime que l'utilisation de DDT à l'intérieur des habitations est sans danger pour la santé.

L'OMS, Washington, 15 septembre 2006.

(dernière consultation le 12 avril 2007)

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Structure et fonctionnement de la delta-endotoxine	79
ANNEXE 2 : Résultats des différents tests effectués avec le Bti sur des larves d'hiver en 2002 et 2003	80
ANNEXE 3 : Résultats des différents tests effectués avec le Bsph sur des larves d'hiver en 2002 et 2003	84

ANNEXE 1

STRUCTURE ET FONCTIONNEMENT DE LA DELTA-ENDOTOXINE



FIGURE 19 : La δ -endotoxine est constituée de trois domaines. Le Domaine I est formé par 7 hélices- α qui peuvent s'insérer dans les membranes des cellules de l'intestin créant des pores d'où les ions peuvent circuler librement. Le Domaine II consiste en trois feuillets- β antiparallèles qui se lient aux récepteurs de la paroi cellulaire de l'intestin. Quant au Domaine III, il serait la partie charnière composée de deux feuillets- β . C'est ce dernier qui, par son changement de conformation, ferait basculer le Domaine I dans la membrane des cellules intestinales.

(<http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/bt.htm>)

ANNEXE 2

RÉSULTATS DES DIFFÉRENTS TESTS EFFECTUÉS AVEC LE BTI SUR DES LARVES D'HIVER EN 2002 ET 2003

TABLEAU 14

Pourcentage de mortalité causée par le Bti sur des larves de *Simuliidae* à différentes concentrations. (Première expérience servant de pratique aux différentes manipulations).

Concentration (ppm)	Mortalité moyenne (%)	Mortalité corrigée (%)
Témoin	3,60	---
10	41,62	39,44
25	36,71	34,35
50	24,58	21,76
100	54,98	53,30
150	58,18	56,62

TABLEAU 15

Pourcentage de mortalité causée par le Bti sur des larves de *Simuliidae* à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Mortalité moyenne (%)	Mortalité corrigée (%)
1	5,78 (t=4.59)	1,24
3	15,44 (t=4.59)	11,37
10	19,38 (t=0)	19,38
30	35,53 (t=0)	35,53
50	27,80 (t=1)	27,07

: % de mortalité moyen des témoins qui ont servi pour ces concentrations.

TABLEAU 16

Pourcentage de mortalité causée par le Bti sur des larves de *Simuliidae* à différentes concentrations. (Larves fraîchement prélevées).

Concentration (ppm)	Mortalité moyenne (%)	Mortalité corrigée (%)
Témoin	0,70	---
1	7,70	7,05
5	8,80	8,16
10	7,14	6,49
100	22,00	21,45
250	23,20	22,66

TABLEAU 17

Pourcentage de mortalité causée par le Bti sur des larves de *Simuliidae* à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Mortalité moyenne (%)	Mortalité corrigée (%)
Témoin	1,00	---
10	17,70	16,87
50	27,80	27,07
100	37,30	36,67
500	23,80	23,03
1000	44,20	43,64

TABLEAU 18

Pourcentage de mortalité causée par le Bti sur des larves de *Simuliidae* à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Mortalité moyenne (%)	Mortalité corrigée (%)
Témoin	0	---
10	19,38	19,38
50	35,53	35,53

TABLEAU 19

Pourcentage de mortalité causée par le Bti sur des larves de *Simuliidae* à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Mortalité moyenne (%)	Mortalité corrigée (%)
Témoin	4,59	---
1	5,78	1,24
3	15,44	11,37

Les C_L sur courbe log-probit

Les résultats des différents bioessais ont été transformés à l'aide du logiciel SPSS 11.0 puis placés sur un graphique log-probit. Cette transformation de la concentration en logarithme puis de la mortalité en échelle probit permet d'obtenir une relation approximativement linéaire (Finney, 1971, cité par Lacoursière, 1984). Ces mêmes transformations ont été faites sur les résultats du Bsph (ANNEXE 3)

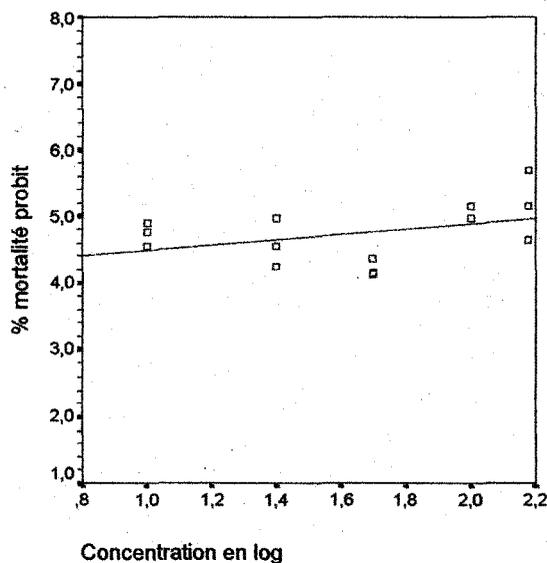


FIGURE 20: Mortalité corrigée (Probit) en fonction du log de la concentration (10, 25, 50, 100 et 150ppm) d'exposition au Bti sur des larves de *Simulium*, (données du tableau 14).

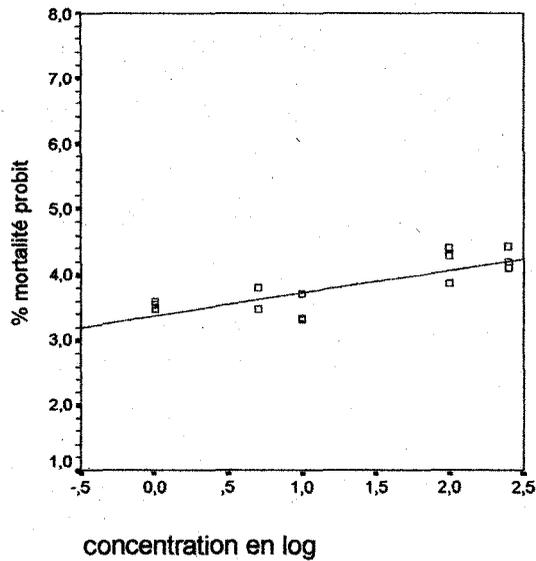


FIGURE 21: Mortalité corrigée (Probit) en fonction du log de la concentration (1, 5, 10, 100 et 250ppm) d'exposition au Bti sur des larves de *Simulium* (données du tableau 16).

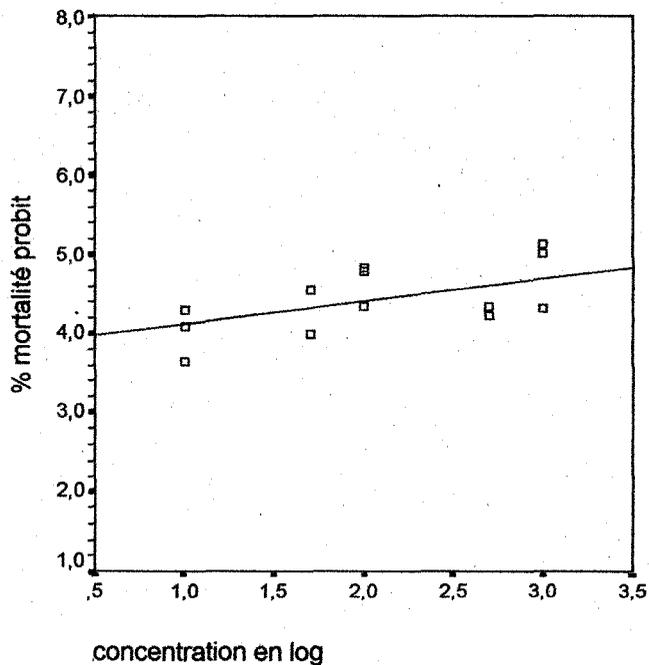


FIGURE 22: Mortalité corrigée (Probit) en fonction du log de la concentration (10, 50, 100, 500 et 1000ppm) d'exposition au Bti sur des larves de *Simulium* (données du tableau 17).

ANNEXE 3

RÉSULTATS DES DIFFÉRENTS TESTS EFFECTUÉS AVEC LE BSPH SUR DES LARVES D'HIVER EN 2002 ET 2003

TABLEAU 20

Pourcentage de mortalité causée par le Bsph sur des larves de *Simuliidae*
à différentes concentrations. (Taux de mortalité trop élevé).

Concentration (ppm)	Mortalité moyenne (%)	Mortalité corrigée (%)
Témoin	2,13	---
25000	92,83	92,67
30000	95,87	95,78
45000	97,21	97,15

TABLEAU 21

Pourcentage de mortalité causée par le Bsph sur des larves de *Simuliidae*
à différentes concentrations. (Trop de ressemblance dans les données).

Concentration (ppm)	Mortalité moyenne (%)	Mortalité corrigée (%)
Témoin	1,47	---
1000	17,65	16,42
2000	18,54	17,32
3000	18,25	17,03
4000	11,56	10,24
5000	17,23	16,00

TABLEAU 22

Pourcentage de mortalité causée par le Bsph sur des larves de *Simuliidae* à différentes concentrations.

Concentration (ppm)	Mortalité moyenne (%)	Mortalité corrigée (%)
Témoin	4,99	---
250	10,05	5,33
500	21,69	17,58
750	11,33	6,67
7500	26,26	22,39
10000	50,63	48,04

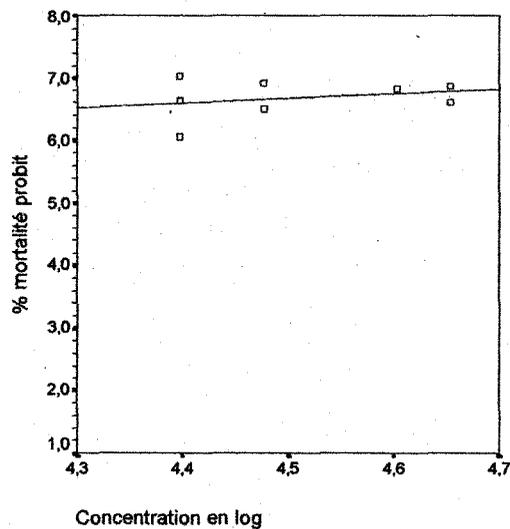


FIGURE 23: Mortalité corrigée (Probit) en fonction du log de la concentration (25000, 30000 et 45000 ppm) d'exposition au Bsph sur des larves de *Simulium* (données du tableau 20).

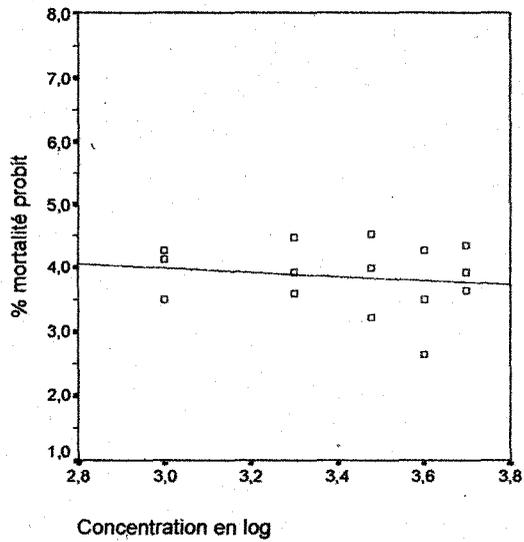


FIGURE 24: Mortalité corrigée (Probit) en fonction du log de la concentration (1000, 2000, 3000, 4000, et 5000 ppm) d'exposition au Bsph sur des larves de *Simulium* (données du tableau 21).

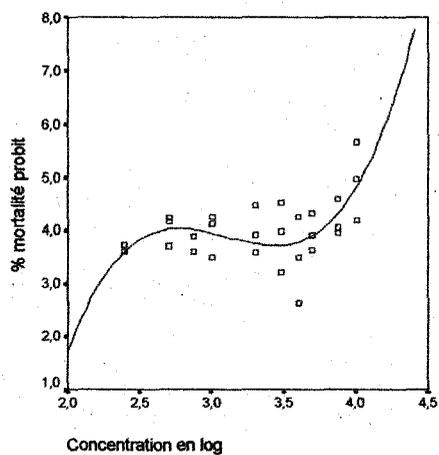


FIGURE 25 : Mortalité corrigée (Probit) des larves de Simuliidae en fonction du log de la concentration d'exposition au Bsph. Données combinées des tableaux 20, 21 et 22.