

ORSAY
n° d'ordre : 1269

UNIVERSITE DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée pour obtenir le titre de

DOCTEUR EN SCIENCE

par

Mme Nicole MONTENY

Influence de facteurs biotiques et abiotiques,
induits et naturels,
sur l'efficacité larvicide de *Bacillus sphaericus* Neide, 1904.

Soutenue le 10 mai 1990 devant la Commission d'examen :

Melle Ginette LAUGE	: Présidente
Mr Jean COZ	: Examineur
Mr Jean GENERMONT	: Rapporteur
Mr Bernard PHILIPPON	: Examineur
Mr Gaston PICHON	: Rapporteur



F 30.157

AVANT PROPOS

La lutte antivectorielle est un aspect des actions que mène l'homme pour essayer d'enrayer le cycle infernal de certaines maladies tropicales que j'ai côtoyées pendant de nombreuses années en Afrique du Nord et de l'Ouest. Maladies virales, maladies parasitaires et leur compagne, la malnutrition forment une trilogie dont n'ont pas réussi à venir à bout tous les efforts de la médecine moderne.

Après avoir travaillé sur l'évaluation de campagnes de vaccination contre la fièvre jaune, la poliomyélite et la rougeole et en avoir perçu les limites, il m'a été donné d'approcher le problème par un autre volet : la lutte contre le vecteur.

Une alternative à l'emploi des insecticides chimiques, fort controversés, se présente sous la forme de la lutte biologique. La question qui m'est apparue dès la prise de contact avec ce problème est de savoir les raisons qui se sont opposées à la généralisation de ces techniques qui à première vue ne pouvaient présenter que des avantages.

Là sont apparues les difficultés à la généralisation des résultats et des succès de ce type d'action. Là est née l'idée de faire l'étude d'un agent biologique de lutte dans un contexte naturel, à la lumière d'observations faites en laboratoire sur sa valeur, son applicabilité et ses limites. Le choix s'est porté sur *Bacillus sphaericus*, utilisé récemment dans les campagnes de lutte. Les premières observations faites par plusieurs équipes indiquaient un potentiel intéressant dans ses capacités de recyclage. Encore fallait-il comprendre les mécanismes d'action des facteurs cités par différents auteurs. C'est ainsi que nous avons analysé l'effet du rayonnement solaire sur les spores de *B. sphaericus* ainsi que l'influence de certaines espèces majeures de la faune associées à *Culex* sp., cible principale de la bactérie. Le présent mémoire comporte en outre une analyse du comportement de *B. sphaericus* en présence d'insecticides chimiques (dans l'optique de son utilisation en lutte intégrée) et d'une cyanobactérie, *Anacystis nidulans*, transformée par le gène des toxines de *B. sphaericus*.

En tête de ce mémoire, je voudrais faire figurer le nom de ceux qui m'ont aidée dans la conception et la réalisation du travail qui y est présenté.

Je tiens en tout premier lieu à remercier Mademoiselle G. LAUGE pour avoir accepté de présider le jury de cette thèse et pour m'avoir prodigué ses critiques, conseils et encouragements avec tant de rigueur mais aussi de gentillesse.

Mes plus vifs remerciements vont à Monsieur J. COZ qui a suscité la réflexion qui a conduit à ce travail. Pendant plus de trois ans il en a suivi l'évolution. Les discussions nombreuses qu'il m'a accordées ont été un guide précieux dans l'élaboration d'une ligne de recherche nouvelle pour moi.

Je suis très reconnaissante à Messieurs GENERMONT, PICHON et PHILIPPON d'avoir accepté de juger cette thèse et d'avoir pris la peine de me faire les remarques me permettant d'améliorer son contenu malgré leurs emplois du temps extrêmement chargés.

Plusieurs expérimentations présentées dans cette étude ont bénéficié du soutien financier du Programme spécial PNUD/BANQUE MONDIALE/OMS de recherche et de formation concernant les maladies tropicales (TDR). Je voudrais remercier le Dr DOBROKHOTOV, secrétaire du Steering Committee du groupe Lutte biologique pour l'intérêt qu'il a porté au déroulement de ce travail.

J'adresse une attention particulière à mes collègues entomologistes du laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles à l'ORSTOM Bondy qui ont largement contribué à l'exécution de ce travail en m'apportant à des moments divers leur aide, leur compétence et leur bonne humeur, qui m'ont tant aidées : Mr S. KARCH qui s'est chargé avec enthousiasme d'une partie du travail de terrain, Melle C. TONEATTI assidue à obtenir des résultats répétitifs, Melles F. FOURNET et P. CAUBERE méticuleuses, efficaces et organisées, Melle N. ELISSA dynamique à tout instant, Mme M.F. RIANDEY d'une grande compétence, Mmes C. SANNIER et J. BARATHE toujours disponibles et efficaces, Mr G. CHAUVENCY grand "docteur d'ordinateur", Mr D. BOUCHARINC toujours prêt à rendre service et enfin Melle B. ROZE qui s'est

acquittée avec beaucoup d'assiduité de la frappe du manuscrit. Que tous sachent combien j'apprécie leur présence autour de moi.

Plusieurs expériences et observations consignées dans ce mémoire sont le fruit de collaborations avec d'autres équipes :

Mr SZULMAJSTER Chef du laboratoire d'Enzymologie (C.N.R.S. - Gif sur Yvette) est à l'origine des essais avec *Anacystis nidulans* qu'il a aimablement fourni pour chaque expérimentation. J'ai particulièrement apprécié son accueil et sa disponibilité ainsi que l'efficacité de ses collaboratrices Mmes T. BENNARDO et F. de la TORRE.

Mr J. COUSSERAN Directeur de l'E.I.D. et Mr G. SINEGRE Directeur du laboratoire à l'E.I.D. (Montpellier) qui nous ont accueillis et ont permis que nous nous intégrions aux équipes opérationnelles. Leur expérience du terrain est irremplaçable dans le sujet qui est développé ici.

Mr J. FARGUES Directeur de laboratoire à l'I.N.R.A. (La Minière) avec lequel j'ai eu plusieurs fois l'occasion d'échanger des observations et qui m'a permis de faire l'évaluation de l'absorbance des filtres U.V.

La recherche de la documentation a été largement facilitée par l'aimable efficacité de l'équipe de documentalistes de l'ORSTOM que j'ai si souvent sollicitée. Que Mmes PELLEGRIN, DELMAS, HARDY, ALDEBERT, BRAMI et leurs collègues trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Plusieurs documents photographiques ont été réalisés avec l'aide de Mme AING photographe au L.I.A. (ORSTOM - Bondy). Je la remercie pour sa disponibilité.

Je ne pourrais dire combien m'ont été précieux les encouragements continuels et l'aide quotidienne de Bruno, Claudine et Alain qui m'ont donné la sérénité indispensable à la réalisation de ce travail.

CHAPITRE I -

LA LUTTE ANTIVECTORIELLE

L'homme utilise une gamme étendue de produits aux fins de se protéger, ainsi que les plantes ou les animaux qu'il exploite, des organismes ravageurs, vecteurs de maladies ou causes de nuisances. Ils sont regroupés sous le terme de "pesticides" qui englobe des substances aussi diverses que des bactéricides, des fongicides, des nématicides, des insecticides, des acaricides, des rodenticides ou des herbicides, pour les plus courants.

Leur usage va croissant sous la pression économique et démographique, la recherche d'une qualité toujours plus concurrentielle des produits de consommation, une amélioration de la qualité de la vie. Une évolution parallèle s'observe en termes de santé publique. Elle s'accompagne d'une large prise de conscience des dangers que représentent, pour l'homme et son environnement, l'usage pas forcément abusif mais cependant inconsidéré de certains produits ou l'introduction incontrôlée d'organismes biologiques nouveaux dans des biotopes. Le développement d'agents biologiques de lutte s'inscrit tout naturellement dans ce contexte.

Un rapport de force s'installe parmi les pays industrialisés en faveur des mesures conduisant à un respect du milieu écologique, à une "sévérification" des normes. Par contre, dans les pays moins favorisés, les problèmes économiques sont tels que le respect de l'environnement n'est pas encore une dimension banale de la stratégie du développement. Certains cependant ont entrepris la production de pesticides à action biologique, ce qui constitue sans conteste le meilleur moyen de promouvoir leur utilisation dans les pays qui en ont le plus besoin et qui, sinon, avec le tarissement de l'aide internationale, n'auraient pas les moyens de se les procurer.

1. INSECTICIDES CHIMIQUES (voir planche en annexe I)

1.1 INSECTICIDES NATURELS

Les plantes possédant un pouvoir insecticide sont connues depuis des temps fort reculés. Bien que les détails précis manquent, nous savons que nous devons à l'industrie de la soie chez les Chinois et chez les Arabes l'utilisation de substances naturelles à usage insecticide dès avant le XVIIème siècle. On peut également rappeler qu'en 1690, La Quintinie fit connaître les résultats satisfaisants qu'il obtint contre *Tyngis pyri* en arrosant ses poiriers avec du jus de tabac (LHOSTE, 1960).

D'autre part, au début du XIXème siècle, on utilisait la "poudre persane" obtenue par broyat de fleurs de *Chrysanthemum roseum* et de *C. carneum*. Les fermiers américains utilisaient vers la même époque des graines de *Schoenocaulon officinale* (*Liliaceae*) pour détruire les poux de leur bétail (ENCYCLOPAEDIA UNIVERSALIS 1968), la vératrine qu'elle contiennent est un mélange d'alcaloïdes (PARIS et MOYSE, 1967).

L'intérêt se porta vers 1925 sur les plantes à pyréthrine mais leur usage ne se généralisa que lorsque les techniques d'extraction furent améliorées. Les capitules séchés des fleurs de *Chrysanthemum cinerariaefolium* (*Compositae*) contiennent six composés dont deux pyréthrine, toxiques pour les larves de lépidoptères (*Spodoptera* et *Heliothis*). De grandes exploitations de pyrèthre au Zaïre, Ruanda et Burundi ont fourni pendant plusieurs décennies la majeure partie de la matière première utilisée dans des vermifuges et des insecticides. Actuellement les principaux pays exportateurs sont l'Equateur, le Kenya et la Tanzanie.

La découverte fortuite, ou l'usage traditionnel, ainsi que la recherche systématique ont fourni depuis d'autres substances insecticides d'origine végétale. Elles ont en commun d'être, en général, peu toxiques pour les vertébrés aux doses utilisées et de présenter un effet résiduel de courte durée.

Certaines familles, riches en alcaloïdes et autres composés organiques sont des sources intéressantes d'insecticides naturels (*Rubiaceae*, *Papilionaceae*, *Simaroubaceae*, *Euphorbiaceae*, *Solanaceae* notamment). Peu d'entre eux ont joué un rôle important dans la lutte antivectorielle à part la roténone et la nicotine.

Les propriétés insecticides de la **roténone** étaient connues des Chinois bien avant 1895, date à laquelle cet alcaloïde fut isolé et caractérisé. Elle est extraite des racines de légumineuses, de *Derris* spp. originaires d'Asie tropicale (principalement *D. elliptica*) et d'espèces américaines et africaines, *Lonchocarpus utilis*, *L. urucu* et *L. nicou* ou des graines et des feuilles de *Tephrosia toxicaria* d'Amérique tropicale et de *T. candida* d'Asie. Très toxique pour les poissons, elle présente également des propriétés acaricides. Sur larves de moustiques, la toxicité de la roténone est fonction de la présentation (soluble ou forme pulvérulente) et de l'espèce : les *Anopheles (maculipennis)* sont plus sensibles que les *Culex (hortensis)* (ROMAN et NETIEN, 1939).

La **nicotine**, extraite de certaines *Solanaceae*, est un larvicide actif sur moustiques (*Culex pipiens*) et sur certains lépidoptères (*Spodoptera littoralis*, phytophage du coton) (EL GAYAR *et al.*, 1975).

Des essais encourageants ont aussi été effectués sur *Aedes aegypti* à partir d'extraits de *Convolvulaceae* (*Cuscuta*, *Ipomoea* notamment) mais la nature des substances actives n'a pas été déterminée (RAGEAU et DELAVEAU, 1979).

La toxicité des substances naturelles est généralement suffisante pour l'usage restreint que l'on peut en faire dans de petites exploitations. Cependant l'extraction des alcaloïdes peut se révéler moins rentable que la production industrielle. Depuis 1940, la synthèse chimique a pris le relais tout en s'inspirant quelquefois des molécules naturelles.

1.2 INSECTICIDES DE SYNTHÈSE

1.2.1 Composés organochlorés

Les propriétés insecticides d'un produit synthétisé en 1870 par le chimiste ZIEDLER ont été mises en évidence par P. MÜLLER en 1940 : le dichloro diphényl trichloréthylène (DDT) a pour formule brute $C_{14}H_9Cl_5$. Commercialisé en 1942 par J. R. GEIGY S.A., il est à l'origine de quelques succès spectaculaires qui laissèrent naître l'espoir d'une éradication du paludisme (comme dans la région méditerranéenne traitée par l'armée américaine). L'inconvénient majeur de ce produit, outre qu'il est irritant pour l'insecte, qui de ce fait le fuit, (*Culex fatigans* : HAMON, 1953 ; *Anopheles funestus* : COZ *et al.*, 1965), est que son utilisation conduit en peu de temps à la sélection d'une population résistante par élimination des individus sensibles. Ce phénomène a été signalé par WIESMANN dès 1946 chez *Musca domestica* L. en Suède, mais il fut décrit pour de très nombreuses espèces dans les années suivantes: *Culex fatigans* Wied. (HAMON, 1953), *Anopheles gambiae* Giles (DAVIDSON, 1956), *Aedes aegypti* (BUSVINE et PAL, 1969).

La synthèse de la molécule de DDT et sa mise sur le marché ont été suivies par celles d'autres organochlorés (γ HCH, 1945 dieldrine, 1949 méthoxychlore, 1945 ; WORTHING, 1979) qui prirent le relais dans les campagnes antivectorielles et dans la liste des substances ayant suscité l'apparition d'une résistance dans les espèces cibles : dieldrine chez *Anopheles gambiae* Giles (ADAM *et al.*, 1958), dieldrine et γ HCH chez *Culex pipiens ssp. fatigans* (HAMON *et al.*, 1958). Le mode d'action du DDT au niveau physiologique est maintenant compris de même que le mécanisme de détoxification développé par l'insecte (déchlorination enzymatique). La transmission de ce caractère suit les lois mendéliennes, nous y reviendrons au paragraphe 1.3.

Les organochlorés demeurent plus longtemps dans l'environnement que la plupart des autres insecticides de synthèse. Ils sont facilement absorbés par l'appareil gastro-intestinal ; certains d'entre eux peuvent pénétrer l'organisme humain par voie percutanée. Dans les campagnes antivectorielles, le DDT a été largement utilisé pendant plus de 20 ans,

essentiellement pour la lutte contre le paludisme. Aucun cas d'effet nocif n'a été rapporté parmi le personnel (Anonyme, 1967). De nombreux organochlorés ou leurs produits de dégradation sont liposolubles et peuvent s'accumuler dans les tissus adipeux où ils demeurent sans effet. Leur persistance chez l'homme comme dans l'environnement a cependant fait naître des inquiétudes en particulier suite au taux élevé auquel on les retrouve dans le lait maternel.

1.2.2 Composés organophosphorés et Carbamates

L'emploi massif des organochlorés ayant favorisé en très peu de temps l'expansion de populations d'insectes présentant une résistance physiologique, l'utilisation de molécules d'un type nouveau s'est imposée.

"Les propriétés insecticides des composés organophosphorés furent découvertes fortuitement par l'allemand G. Schrader sur une substance mise au point (...) au début de la 2^{de} Guerre mondiale. Ce composé fut commercialisé en 1945 sous le nom de BLADAN" (RAMADE, 1990). Il s'agit du parathion.

Des substances de synthèse comportant un site phosphorique (ou thiophosphate) et un radical dont la variabilité a donné lieu à un nombre très élevé de produits différents prennent le relais des organochlorés dans la période 1950-1960. Ils sont pour la plupart actifs par contact et après ingestion, quelques uns ont des tensions de vapeur qui permettent de les utiliser par fumigation contre les diptères adultes (dichlorvos, bromophos, fénitrothion notamment). D'autres sont plus adaptés à la lutte antilarvaire (téméphos, chlorpyrifos).

La substitution de l'acide phosphorique par l'acide carbamique conduit à une autre famille de produits insecticides dont la mise sur le marché suit de près celle des organophosphorés, les carbamates. Le propoxur, apparu en 1963, est un insecticide à large spectre (fourmis, aphides, punaises, cafards, mouches, moustiques etc.) qui produit un effet de "Knock-down" rapide (paralysie immédiate).

Un premier cas de résistance au malathion (rapport de sensibilité : 78 fois) est rapporté sur *Culex p. fatigans* en 1959 à Douala au Cameroun, par ELLIOT (*in* MOUCHET *et al.*, 1960) ; en 1963 en Sierra Leone, après traitements antilarvaires au malathion et au diazinon, THOMAS (*in* HAMON et MOUCHET, 1967) trouve des rapports de sensibilité de 4 et 65 fois respectivement.

Sans s'étendre à la vitesse de celle observée pour les organochlorés, la résistance aux organophosphorés apparaît progressivement et évolue parallèlement à celle aux carbamates (GEORGHIOU *et al.*, 1966).

De plus, en santé humaine, ces produits présentent généralement une toxicité élevée car ils interfèrent avec les mécanismes cholinestérasiques au niveau des synapses et provoquent une accumulation excessive d'acétylcholine (Anonyme, 1967). Le dysfonctionnement du système respiratoire qui s'ajoute aux désordres neurologiques peut conduire à l'asphyxie et entraîner la mort. On relève de nombreux cas d'intoxication aux organophosphates allant de suicides volontaires à des ingestions accidentelles ou des contacts professionnels (HAYES *et al.*, 1978 ; PLESTINA, 1984).

112.3 Pyréthrinoïdes

Partant de la connaissance de la formule des pyréthrines, une première molécule, l'alléthrine, a été synthétisée et commercialisée dès 1949. Insecticide de contact également, elle présente une efficacité supérieure à celle des substances naturelles. Comme elles, son activité est synergisée par le butoxyde de pipéronyle. Leur mauvaise stabilité en milieu naturel leur confère une rémanence de courte durée.

Les pyréthrinoïdes se sont surtout imposés à la fin des années 60. Plusieurs entrent dans la composition des pédiculicides (resméthrine, phénothrine, perméthrine notamment).

Sous pression de sélection intense, KEIDING (*in* FARAH, 1978) observe, dès 1977, des mouches présentant un facteur de résistance de

1600 à la deltaméthrine. En Thaïlande, une souche d'*Aedes aegypti* résistante à la bioresméthrine a été répertoriée (BRENGUES et COOSEMANS, 1977). Expérimentalement, la résistance aux pyréthriinoïdes a pu être induite après 10 et 20 générations par pression de sélection sur des larves de *C. quinquefasciatus* (PRIESTER et GEORGHIOU, 1978) entraînant une résistance croisée pour plusieurs molécules du groupe des pyréthriinoïdes mais aussi vis-à-vis du DDT car elle est sous la dépendance d'une des composantes génétiques de la résistance aux organochlorés, le gène *kdr*, pour "knock-down resistance" (GEORGHIOU, 1980). De ce fait, l'usage du DDT a très probablement présélectionné les résistances aux pyréthriinoïdes.

La toxicité de certains pyréthriinoïdes de synthèse est élevée pour les mammifères mais vu qu'ils sont biologiquement très actifs à faible concentration sur les arthropodes, la quantité de matière active dans les produits commercialisés est généralement faible. Ceci, et la métabolisation rapide chez les mammifères, en font des composés peu dangereux.

1.2.4 Inhibiteurs de croissance

La nécessité de diversifier les moyens de lutte contre les insectes amène l'idée d'une stratégie nouvelle : celle de faire appel à des molécules plus spécifiques. Les mues, la métamorphose et la maturation sexuelle des insectes sont sous la dépendance d'un contrôle neuroendocrinien permanent et complexe dans lequel deux hormones ont un rôle prépondérant : l'hormone juvénile et l'hormone de mue ou ecdysone . Pour que le développement de l'insecte se fasse normalement, il faut que les hormones n'apparaissent qu'à des moments très précis. L'idée originale d'utiliser des hormones de synthèse ou des mimétiques des molécules naturelles pour perturber et entraver le développement de l'insecte revient à l'entomologiste WILLIAMS en 1956.

Il existe deux familles de mimétiques de régulateurs de croissance (I.G.R. : Insect Growth Regulator) les juvénoïdes et les ecdysoïdes.

Les juvénoïdes, appliqués au moment où le taux naturel d'hormone juvénile diminue, c'est-à-dire peu avant la nymphose, auront pour effet d'altérer irréversiblement la mue. Les individus qui ne mourront pas dès le traitement donneront lieu à des intermédiaires non viables ou à des adultes qui ne réussiront pas à émerger totalement ou qui seront stériles.

Les ecdysoïdes sont efficaces sur tous les stades larvaires car ils interviennent dans la chaîne biochimique qui aboutit à la formation de la chitine. Ils inhibent donc le processus de mue en empêchant la formation de la nouvelle cuticule. Ils peuvent également avoir un effet ovicide.

A l'usage, il appert que les produits de synthèse présentés comme juvénoïdes ou ecdysoïdes possèdent des caractéristiques qui ne sont pas toujours nettement différenciables. Chez les diptères leur effet principal reste néanmoins la réduction de l'émergence et un impact sur la dynamique de la population par altération de la fertilité.

1.3 LE PROBLEME DE LA RESISTANCE

Les phénomènes de résistance s'observent tôt ou tard chez toutes les populations contre lesquelles des insecticides chimiques ont été utilisés. Ce phénomène est dû à l'apparition dans la population d'individus possédant une caractéristique héréditaire, physiologique ou comportementale, qui leur permet de survivre en présence d'une quantité de toxique supérieure à celle qui tue d'autres individus de la même population, définis comme "sensibles". Au cours des générations, et il suffirait à la limite d'une seule, les seuls individus résistants vont être à même de se reproduire et de donner une descendance abondante qui portera ce caractère. Leur proportion dans la population globale, en augmentant, quelquefois très rapidement, donne naissance à une population présentant statistiquement une résistance accrue.

On peut dès lors définir la résistance comme le résultat d'une sélection de souches mutantes au sein d'une population sous la pression d'un insecticide. La nature du produit, sa rémanence, la fréquence et

l'intensité des applications sont des éléments constitutifs de la pression de sélection exercée sur le génome de la population et qui détermineront le niveau de résistance.

Les processus de résistance décrits chez les arthropodes incluent des comportements d'évitement à certains toxiques agissant par contact (ex. le DDT), et des processus physiologiques : pénétration cuticulaire réduite, augmentation du stockage ou excrétion du toxique, métabolisation en dérivés non toxiques ou encore réduction de sensibilité du site d'action.

Les quatre grandes familles d'insecticides utilisées, ont pour cible le système nerveux et plus particulièrement le fonctionnement des synapses que l'on peut schématiser par la figure I.1.

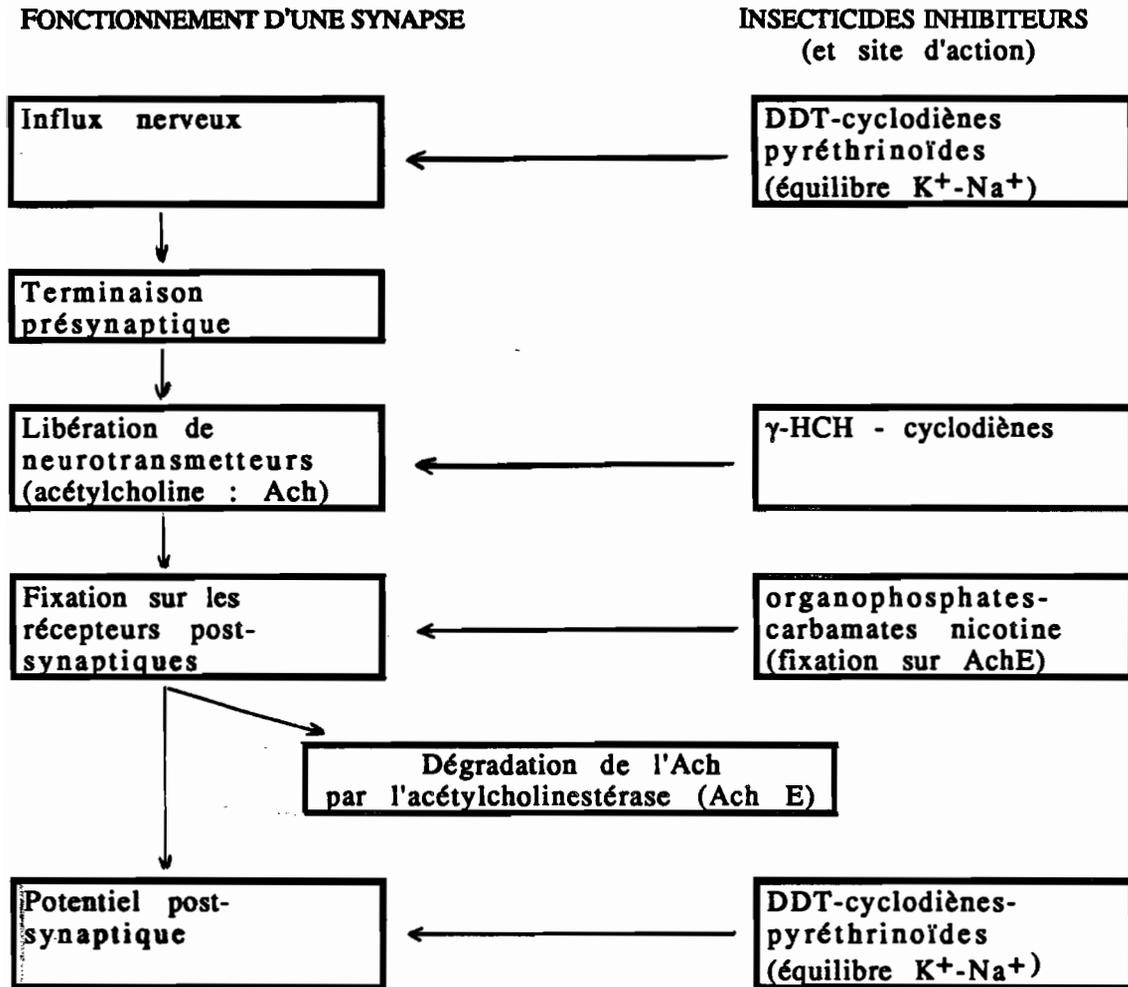
Lorsque le toxique agit de manière irréversible sur une fonction essentielle comme par exemple le blocage des fonctions acétylcholinestérasiques (prolongé par les carbamates, définitif par les organophosphorés) qui entraîne des anomalies nerveuses fatales, les insectes résistants sont ceux chez lesquels un processus biochimique empêche le toxique d'atteindre sa cible. La détoxification résulte de sa transformation par action enzymatique (généralement une estérase) en un produit moins toxique ou totalement inoffensif.

Les roténoïdes provoquent chez l'insecte un ralentissement des pulsations de l'aorte et des mouvements respiratoires dû à un arrêt de l'utilisation de l'oxygène.

La régulation des mécanismes enzymatiques est sous la dépendance de facteurs extérieurs : les enzymes de détoxification peuvent être produits en très grande quantité lorsque la pression de sélection est élevée : dans une population résistante de *Culex pipiens*, les estérases responsables de la résistance aux organophosphorés peuvent constituer jusqu'à 10 % des protéines totales. Dans une population sensible cependant, l'activité de déchlorination n'est pas nulle (BUSVINE, 1967). La production enzymatique amplifiée résulte d'une répétition des copies du gène de structure codant pour la protéine. Les séquences

répétées sont groupées en un seul endroit d'un même chromosome (PASTEUR, 1989).

FIGURE I.1 : Site d'action de divers insecticides chimiques au niveau synaptique.



Un autre processus de résistance existe théoriquement dans la possibilité de mutation de la cible protéique sur laquelle agit le toxique. La vitesse de modification est alors au plus égale au taux de mutation. L'évolution de la population vers une résistance accrue est fonction de la probabilité de transmission d'un phénomène ayant 10^{-8} à 10^{-9} chance de se produire. Cette valeur est faible comparée au processus décrit précédemment qui a une probabilité de l'ordre de la fréquence génique (10^{-2} à 10^{-4}) assortie des caractéristiques dominance/récessivité des

allèles "sensibles/résistants". Cependant, si elle confère une valeur adaptative réelle, son rôle est loin d'être négligeable à condition toutefois que la mutation n'entraîne pas une inactivation de la fonction biologique de cette protéine.

L'expansion de la résistance dans l'espace est fonction des facteurs biologiques de l'espèce considérée : longévité, fécondité, mobilité. GEORGHIOU *et al.* (1975) décrivent des populations rurales de *C. quinquefasciatus* qui, soumises à des traitements nombreux et intensifs d'organophosphorés, ne sont devenues qu'assez progressivement résistantes en raison semble-t-il des croisements avec des populations urbaines voisines non traitées.

Les types de résistances observées, croisées au sein d'une même famille chimique (ex. : entre γ HCH et dieldrine, ou entre divers organophosphorés) ou multiples (ex. : organophosphorés-carbamates) ressortissent de processus enzymatiques génétiquement fixés donc transmissibles. L'explication génétique est postérieure aux premières observations du phénomène mais certains sites chromosomiques impliqués ont pu être localisés dès 1965 chez *Culex quinquefasciatus* pour la résistance au DDT sur le chromosome 2 et pour la résistance croisée γ HCH-dieldrine sur le chromosome 3 (BUSVINE, 1967). DORVAL et BROWN (1970) attribuent la résistance de *C. quinquefasciatus* au fenthion à un gène situé sur le chromosome 1 (chromosome 2 chez *C. pipiens s.l.*) lui conférant une activité carboxyestérasique de détoxification des organophosphorés en général. L'étude des spectres de résistance fait apparaître l'existence de plusieurs mécanismes dont un au moins confère une résistance croisée entre organophosphorés et carbamates (BELL, 1967 ; GUILLET, 1976).

Cependant, la résistance aux carbamates instaurée artificiellement (sur 35 générations de *C. quinquefasciatus*) permet de distinguer l'effet de traitements appliqués sur larves ou sur adultes indiquant par là l'absence d'un mécanisme unique comme c'est le cas avec les organochlorés (GEORGHIOU *et al.*, 1966). Ceci explique également l'absence de spécificité absolue dans la manifestation des résistances croisées entre ces deux familles d'insecticides et la plus lente apparition

des échecs en lutte antivectorielle avec ces deux classes de produits. Les IGR ont l'avantage de n'être actifs que sur les arthropodes et donc de posséder une certaine sélectivité. En théorie ils ne pourraient favoriser l'apparition de résistances à leur égard puisque les insectes ne peuvent, sans conséquence létale, devenir insensibles aux effets de substances essentielles à leur développement. On a cependant montré (QUELENNEC, 1978), en laboratoire, que les insectes étaient capables de développer des mécanismes de détoxification qui les protègent de l'action des IGR de synthèse. Il semble donc que, là encore, la prudence soit de rigueur .

Néanmoins, la stratégie de lutte a doublement évolué :

- d'une part, la course aux nouvelles molécules (organophosphorés et carbamates dérivés) a été réorientée vers les pyréthriinoïdes de synthèse et les mimétiques de molécules biologiques régulant la croissance (IGR),

- d'autre part, tenant compte de l'inefficacité probable à terme des produits, leur utilisation s'intègre dans un ensemble de mesures dictées par la connaissance de la biologie, de l'écologie de l'espèce-cible parmi lesquelles se développent les mesures d'assainissement, la lutte génétique et les agents biologiques de lutte.

Sans pouvoir anticiper sur les résultats, il semble que l'apparition d'une résistance vis-à-vis des IGR ou des agents biologiques de lutte est moins probable et que si tel était le cas, elle impliquerait des processus biologiques d'un tout autre ordre que le phénomène de résistance observé avec les substances chimiques.

1.4 MISE SUR LE MARCHE D'UN INSECTICIDE NOUVEAU

Des systèmes d'homologation ont été adoptés par la plupart des pays. Les procédures et les éléments entrant dans la composition du dossier à fournir pour l'autorisation de production, d'importation ou d'emploi varient considérablement selon les législations nationales.

L'homologation d'un insecticide ne doit être accordée qu'après évaluation de son efficacité et de son innocuité ainsi qu'après l'étude

toxicologique des résidus. Des normes sont édictées pour ce qui concerne différents points : étiquetage, transport, vente-distribution, stockage, évacuation des déchets.

L'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) a mis sur pied un système d'évaluation des nouvelles molécules insecticides qui comporte quatre phases assorties de méthodes strictement définies et de critères de passage à la phase suivante. Ces divers essais sont pratiqués par des Centres collaborateurs (Anonyme, 1988).

Phase 1 : évaluation en laboratoire de l'activité du produit sur divers matériaux biologiques (insectes, mollusques) et toxicité sur mammifères.

Phase 2 : essai en milieu semi-naturel, à petite échelle dans des milieux écologiques appropriés. Evaluation du produit vis-à-vis de la faune non-cible.

Phase 3 : essai à l'échelle d'un village ou d'une aire de plus grande étendue. Evaluation de l'effet résiduel, techniques d'application, type de formulation, étude de l'incidence sur l'éventuel pouvoir vecteur de l'insecte-cible, acceptabilité du traitement par les populations humaines.

Phase 4 : phase finale, bilan, élaboration du dossier, spécifications par un Comité d'Experts et recommandations aux utilisateurs potentiels.

2. LUTTE BIOLOGIQUE

2.1 INTRODUCTION

Un certain nombre de prédateurs et de pathogènes d'insectes sont utilisés dans des cas précis de lutte qui intéresse l'agriculture ainsi que la santé humaine ou animale. Ils se sont imposés comme alternative à l'utilisation des produits chimiques dont certains avaient perdu leur efficacité et dont d'autres se sont révélés trop toxiques pour l'environnement. Le principe de la lutte par des méthodes naturelles est très ancien. En 1873, C.V. RILEY adresse à Jules PLANCHON, en France, un acarien d'Amérique du Nord, *Rhigoglyphus phylloxerae* pour lutter contre une maladie de la vigne. En 1888, A. KOEBELE introduit d'Australie dans les vergers de Californie la coccinelle *Rodolia (Novius) cardinalis* prédatrice efficace de la cochenille des agrumes. Elle fut acclimatée en France dans le bassin méditerranéen en 1912. Ces premiers exemples furent suivis d'un grand nombre d'autres couronnés de succès divers mais généralement dirigés contre des ravageurs. En lutte anticulicidienne, l'utilisation de prédateurs a été limitée à des poissons et des culicidés larvivores.

Un autre type de défense développé par l'homme est la prévention des piqûres en interposant entre lui et l'insecte hématophage des moustiquaires ou des répulsifs. Après avoir été préconisé dans les campagnes de lutte antipaludique en Afrique dès 1910 par ROSS, l'usage s'en est étendu dans bon nombre de régions en fonction du degré de nuisance des moustiques, des traditions et du niveau économique des populations. Il ressort de diverses études (ROZENDAAL, 1989) que la prévalence du paludisme n'est pas diminuée par cette méthode : les moustiques trouvent des proies non protégées ou attendent l'ouverture de la moustiquaire et réussissent à prendre leur repas sanguin.

La moustiquaire imprégnée d'insecticide combine l'effet protecteur pour l'individu et le piégeage du moustique en entraînant sa mort. Plusieurs familles d'insecticides ont été successivement proposées (organophosphorés et carbamates : COZ *et al.*, 1967 ; organophosphorés : BRUN et SALES, 1976). Actuellement une grande campagne pilote est

mise en place au Cameroun (CARNEVALE, comm. pers.) pour l'utilisation de moustiquaires imprégnées de deltaméthrine après le succès d'un essai semblable au Burkina Faso (CARNEVALE *et al.*, 1988).

Plusieurs techniques comme celle évoquée ci-dessus ne fourniront de bons résultats que si elles sont basées sur la connaissance précise de la biologie et de la physiologie des insectes, qu'il s'agisse de la destruction des gîtes (selon les espèces : assèchement de marais ou drainage, suppression des ordures ménageant des petits réservoirs d'eau, débroussaillage *etc.*) ou la lutte par méthode génétique (lâchers de mâles stérilisés chimiquement ou par radiations).

Ces méthodes sont regroupées dans ce qui peut s'appeler la lutte par la connaissance de la biologie, le terme de lutte biologique étant réservé à l'ensemble de mesures qui font intervenir un adversaire vivant de l'insecte que l'on veut atteindre. Ce peut être un prédateur, un parasite ou un organisme pathogène.

2.2 PREDATEURS

2.2.1 Poissons larvivores

La première utilisation de poissons larvivores pour la lutte biologique contre *Aedes aegypti* remonte au début du siècle, lors d'une campagne anti-marielle menée à la Havane, Cuba (GERBERICH, 1985). Presque simultanément, en 1905, trois espèces de poissons larvivores (*Gambusia affinis* Baird et Girard, *Mollienesia latipinna* Le Sueur et *Fundulus grandis* Baird et Girard) originaires du Texas, U.S.A., sont introduites à Hawaï (NAKAGAWA et IKEDA, 1969) ; en 1921, *G. affinis* est transporté en Europe, d'abord en Espagne, ensuite en Italie où son élevage réussi permet de l'étendre, en 1924, aux îles yougoslaves de l'Adriatique.

D'autres espèces sont utilisées, *Poecilia reticulata* qui tolère des eaux plus polluées que *G. affinis* mais survit moins bien lorsque la température de l'eau baisse.

Les rizières constituent le lieu de prédilection pour la conduite d'une lutte antilarvaire de ce type. Cependant, l'effet peut dépasser le résultat attendu : FARLEY et YOUNCE (1977), KRAMER *et al.* (1988) rapportent une baisse significative de la population non-cible dans des rizières traitées avec *G. affinis*. Plusieurs essais ont vu leurs résultats s'améliorer par un traitement complémentaire d'insecticide et en particulier avec *B. t. israelensis* (KRAMER *et al.*, 1988) et *B. sphaericus* auxquels *G. affinis* n'est pas sensible (MIURA *et al.*, 1981). Plusieurs exemples d'acclimatation réussie et d'efficacité satisfaisante ne doivent pas occulter les échecs consécutifs à une mauvaise évaluation préalable des conditions écologiques.

2.2.2 *Toxorhynchites amboinensis* Doleschall 1857

Il existe environ 70 espèces du genre *Toxorhynchites*. Certaines se sont révélées intéressantes pour la lutte anticulicidienne. La distribution géographique de *T. amboinensis* s'étend sur l'Asie du Sud-Est et le Pacifique: îles Amboines (Moluques), Philippines, Thaïlande, îles Samoa et Hawaï.

Cette espèce fut introduite en 1975 de Tutuila (Samoa américaines) à Tahiti (Polynésie française) dans le but de limiter les populations d'*Aedes polynesiensis* vecteur de filariose de Bancroft et d'*Aedes aegypti* vecteur de dengue dans cette région (RIVIERE *et al.*, 1979).

Les larves, dès le premier stade, sont carnivores et prédatrices de larves d'autres *Culicidae*. Avant chaque mue, la larve cesse de s'alimenter (stade pharate) pendant une période de quelques minutes (stades 1 et 2) à un jour (stade 4). Au cours de cette dernière étape la larve tue les larves proies sans les manger, c'est le stade "tueur" qui correspond vraisemblablement à une protection de la future nymphe contre d'éventuels petits prédateurs (PICHON et RIVIERE, 1979).

L'oviposition a lieu dans de petites réserves d'eau qui correspondent bien aux gîtes d'*A. polynesiensis* et d'*A. aegypti*, elle est diurne. Une femelle d'une durée de vie de 60 jours produit en moyenne 265 oeufs. Le cycle de vie de cette espèce est plus approprié à la lutte biologique que celui des poissons larvivores puisqu'il n'est pas entièrement aquatique et que l'adulte, mobile, peut choisir son lieu de ponte.

Les essais de lutte antivectorielle réalisés jusqu'à présent ont donné des résultats probants mais n'ont pas atteint le niveau de réussite attendu en pratique. Les *Toxorhynchites* ne se nourrissent pas exclusivement de larves de moustiques mais aussi de la microfaune non ciblée et la durée de leur phase aquatique est trop longue par rapport à la durée moyenne d'existence des gîtes de larves-proies obligeant à procéder à des lâchers d'adultes élevés en laboratoire (PICHON et RIVIERE, 1979).

2.3 PARASITES

2.3.1 Champignons

Les champignons entomopathogènes ont été utilisés sur de nombreuses espèces terrestres. *Beauveria bassiana*, *B. tenella* ou *Metarrhizium anisopliae* mélangés à divers substrats peuvent infecter des termites (TOUMANOFF et ROMBAUT, 1965) ou des larves de lépidoptères, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, de coléoptères, *Leptinotarsa decemlineata* (doryphore) chez lesquels est observée une paralysie tétanique due à la mycotoxine produite par le champignon. La pénétration du tégument se produit préférentiellement au cours de certaines phases réceptives de l'hôte (intermue) (FARGUES, 1975).

D'autres genres conviennent plus particulièrement pour la lutte en milieu aquatique. Le genre *Coelomomyces* qui n'a été isolé que de moustiques est considéré comme celui dont l'utilisation fournit les meilleurs résultats en lutte anticulicidienne. Il comprend plus de 20 espèces dont certaines ont une spécificité d'hôte assez stricte : les

adultes et les nymphes semblent moins fréquemment atteints que les larves qui subissent une forte mortalité. L'apparition des sporanges dans l'hémocèle est accompagnée d'une destruction massive de certains organes et du corps adipeux. Ils proviennent d'un mycélium non cloisonné qui envahit toute la larve (LAIRD, 1962). Une première tentative expérimentale réussie de lutte avec *C. stegomyiae* Keilin a été entreprise en 1958-1960 aux îles Tokelau dans le Pacifique Sud sur *Aedes polysienensis* (principal vecteur de *Wuchereria bancrofti* en Polynésie). En 1946, MUSPRATT (in LAIRD, 1962) obtenait une réduction de 95 % de la reproduction d'*Anopheles gambiae* par une autre espèce de *Coelomomyces*. Les zoospores de *Coelomomyces* se propagent en milieu aquatique mais les expériences de FEDERICI et ROBERTS (1976) indiquent qu'en réalité les zoospores libérées du sporange n'infectent pas directement les larves de moustique mais celles d'un copépode, *Cyclops vernalis*, qui apparaît dès lors comme hôte indispensable. La conduite d'une lutte biologique dans ce cas présente une complexité trop élevée pour être envisageable. Le genre *Lagenidium*, auquel sont sensibles un grand nombre de larves de Culicinae produit également des zoospores mobiles en milieu aqueux.

Tolyocladium cylindrosporum Gams bien qu'isolé d'échantillons de sol est également utilisé comme larvicide notamment sur différentes espèces d'*Aedes*.

En lutte adulticide contre les Culicidae, certaines entomophtorales, *Zoophtora radicans* notamment, donnent des résultats variables suivant les souches (DUMAS et PAPIEROK, 1989).

2.3.2 Nématodes

L'étude des nématodes entomopathogènes a fourni quelques observations intéressantes sur la synchronisation des cycles de l'hôte et de son parasite notamment le nématode *Heterotylenchus autumnalis* et son hôte *Musca autumnalis*.

Ce nématode présente des stades parasites et un court passage hors de l'hôte au cours duquel se produit la fécondation après laquelle le mâle meurt alors que la femelle pénètre la cuticule d'une nouvelle larve. La maturation se poursuit et l'oviposition a lieu dans l'hémolymphe de l'insecte adulte. Les oeufs se développent en femelles parthénogénétiques dont les oeufs donneront des individus sexués immatures, mâles et

femelles, pour autant que l'insecte adulte ne soit pas entré en diapause. La présence de nématodes cause la stérilité des femelles infectées : le processus normal de ponte est remplacé par un dépôt de nématodes immatures dont le cycle se poursuivra, lié à celui de l'insecte, c'est-à-dire avec une interruption lorsque les conditions climatiques imposeront une diapause de la mouche femelle adulte (STOFFOLANO, 1967).

Romanomermis culicivorax Ross et Smith (= *Reesimermis nielsenii*) étudié depuis 1968 a été répandu dans des rizières en 1971 en vue d'infecter des larves d'*Anopheles* spp. (PETERSEN et WILLIS, 1972). Cette étude a démontré, outre la variabilité de l'efficacité de pénétration de la cuticule en fonction de la température, que la sensibilité des larves décroît au cours des stades successifs.

Le recyclage naturel des nématodes a été également mis en évidence dans cette étude. D'autres travaux ont suivi qui ont permis d'étendre l'utilisation de *R. culicivorax* à différentes espèces de *Culex*, *Psorophora* et *Aedes*. GALLOWAY et BRUST (1977) confirment l'effet bénéfique des températures élevées pour la pénétration cuticulaire, ce qui limite les possibilités d'utilisation de *R. culicivorax* aux *Culicidae* de régions chaudes.

2.4 PATHOGENES

2.4.1 Protozoaires

Différentes espèces de microsporidies sont pathogènes pour des organismes aussi variés que les sauterelles, des lépidoptères ravageurs de forêts, des gastéropodes vecteurs de trématodes, des trématodes (*Schistosoma*) ou des moustiques (LAIRD, 1977).

Les spores de *Nosema locustae* sont utilisées depuis plus de dix ans dans le Montana (U.S.A.) en épandages aériens pour lutter contre les sauterelles et les criquets (plus de 60 espèces sont sensibles à *N. locustae*). Une forte réduction de la population cible est obtenue par suite de la mort rapide de certains insectes mais également de la perte de fertilité des survivants. Une infection chronique s'installe et se

poursuit dans les générations successives. La même observation est faite dans d'autres modèles (*Nosema* spp. - chenilles défoliantes).

A une échelle moins grande *N. algerae* a été utilisé contre les moustiques en essais expérimentaux aux U.S.A. et dans un projet pilote à Lahore, Pakistan où on a obtenu 100 % d'infection des *Anopheles stephensi* et 90 % des *A. culicifacies*, vecteurs de paludisme.

Plusieurs cas de transmission transovarienne ont été décrites chez *Culiseta incidens*, *C. inornata* et *Culex tarsalis*. Il semble que la transmission soit limitée à une seule génération car les larves issues des oeufs infectés ne dépassent pas le stade IV. La transmission *per os* est cependant beaucoup plus courante.

Le maintien de la viabilité des spores dans des conditions de températures voisines de zéro degré est un élément favorable à leur utilisation en région froide.

Différentes espèces de ciliés parasites stricts de moustiques ont été proposées en lutte anticulicidienne et antisimulidienne. *Lambornella stegomyiae* et *L. clarki* isolés respectivement en Malaisie et en Californie ont pour hôte spécifique des espèces culicidiennes vivant dans les petites collections d'eau (trous d'arbre par ex.). Cette propriété en fait un matériel très intéressant pour la lutte contre *Aedes polynesiensis* dans les îles du Pacifique sud et contre *A. aegypti* en Afrique. Il semble que généralement la température interne des mammifères s'oppose au développement des microsporidies. Les contrôles préalables à une production industrielle de masse incluent des tests de toxicité sur des espèces poecilothermes d'intérêt économique (poissons et crustacés).

2.4.2 Virus

De toutes les familles de virus que l'on rencontre associées aux insectes, seuls les *Baculoviridae* et certains *Densoviridae* leur sont spécifiques et pathogènes (les *Iridoviridae* sont transmissibles à la grenouille et au porc). Ce sont des virus à double (*Baculovirus*) ou à

simple (*Densovirus*) brin d'ADN. Les *Baculovirus* essentiellement présentent un intérêt en lutte biologique. Ils sont très nombreux et forment trois groupes principaux :

- **Polyédrique nucléaire** : plusieurs virions par polyèdre (NPV). Le polyèdre est ingéré par la larve. Dans le tube digestif, les protéines qui le constituent sont soumises aux enzymes protéolytiques de la larve et libèrent les particules virales qui pénètrent les cellules ciliées de l'intestin par fusion des membranes. Le virus gagne le noyau de la cellule et s'y multiplie. Il quitte la cellule par le pôle opposé à celui de son entrée et pénètre par phagocytose dans les cellules de l'hémocoèle et des tissus adipeux où la formation de nouveaux polyèdres provoque la destruction du noyau. Le polyèdre est constitué d'une protéine majeure et, semble-t-il, d'au moins une protéase.

- **Granulose cytoplasmique** : un seul virion par polyèdre (GV), le cycle de multiplication du virus a lieu dans le cytoplasme des cellules.

- **Oryctes virus** : virion non polyédrique (OV)

Le cycle de développement de ces deux derniers groupes est très voisin de celui décrit pour le NPV.

La production industrielle est possible sur culture de cellules d'insectes. L'analyse du génome de certains *Baculovirus* a montré que la spécificité d'hôte provient de séquences transposées des cellules de l'hôte lui-même. Ceci ouvre la voie à la manipulation du génome dans le but de modifier la spécificité par l'insertion artificielle de transposons d'autres insectes. Les contrôles préliminaires d'innocuité sont renforcés car il a été démontré en culture *in vitro* que des systèmes cellulaires d'organismes homéothermes pouvaient être le siège d'une infection par *Baculovirus*. De plus, on a trouvé une réaction anticorps à certains virus pathogènes d'insectes dans des sérums de mammifères, en particulier chez le personnel de laboratoire (KURSTAK, 1978). Plusieurs pays (U.S.A., Japon, Grande Bretagne, URSS) ont autorisé la commercialisation de *Baculovirus*. Toutes les formules mises sur le marché actuellement concernent la lutte contre des insectes terrestres (lépidoptères).

2.4.3 Bactéries

Le premier insecticide biologique à être homologué fut *Bacillus popilliae* (hôte : *Popillia japonica* - lépidoptère) aux U.S.A. en 1948. Les tests de sécurité d'emploi pratiqués sur les oiseaux n'avaient pas alors montré d'effet nocif et s'appuyant sur le fait que cette bactérie ne se développe pas aux températures des organismes homéothermes, son utilisation à grande échelle a été autorisée. Elle a cependant été abandonnée en raison de son efficacité limitée. Cette bactérie gagne la cavité générale de la chenille et y provoque une septicémie lui donnant l'aspect laiteux, d'où le nom qui lui était associé : "milky-disease".

L'utilisation des bactéries en lutte biologique conserve le caractère de spécificité rencontré avec les virus (ex : *Bacillus moritai* contre *Musca domestica*).

De nombreuses souches de *Bacillus thuringiensis* sont entomopathogènes. Jusqu'en 1976, toutes les souches connues étaient principalement actives sur les larves de lépidoptères ravageurs de cultures. La recherche systématique à partir d'insectes morts a fourni depuis des souches présentant un autre spectre d'activité : *B.t.* var. *tenebrionis* est utilisé contre des larves de coléoptères, *B.t.* var. *israelensis* est largement utilisé contre des larves de diptères (moustiques, simulies et phlébotomes). Cette dernière variété a été découverte en Israël en 1976 par GOLDBERG et MARGALIT (1977) qui l'ont isolée de larves de *Culex pipiens* dans un gîte présentant une mortalité larvaire importante.

Dans l'espèce *Bacillus sphaericus*, toutes les souches entomopathogènes décrites à ce jour ne sont actives que sur larves de moustiques. Vu l'importance que revêt cette espèce dans le cadre de ce travail, nous lui consacrerons un paragraphe (3).

2.5 CONCLUSION

Comparés aux insecticides chimiques, les agents biologiques de lutte présentent l'avantage d'une excellente spécificité. Adaptés à des hôtes poecilothermes, leurs mécanismes de pénétration et de pathogénicité ont peu de chance de les rendre dangereux pour les organismes homéothermes et pour l'homme en particulier. Avant toute homologation, un ensemble d'études portant sur leur toxicité sur la faune non cible s'impose. En dehors du problème de spécificité qui doit faire l'objet d'une vérification préalable approfondie, le risque de dissémination (vent, pluie, *etc.*) incontrôlée existe. L'adaptation d'un pathogène à un hôte nouveau est connue chez certains virus, avec une augmentation de la virulence au cours des passages successifs. Des recombinaisons génétiques peuvent avoir lieu ainsi que des mutations suivies d'une sélection par apparition d'une propriété favorable.

L'homme, en manipulant ces "produits" d'un type nouveau peut être exposé à des irritations ou à des troubles respiratoires, allergiques, gastro-intestinaux ou oculaires, plus particulièrement dans les cas de mauvaise défense immunitaire comme peuvent le provoquer la malnutrition ou certaines maladies (par exemple le SIDA, le paludisme).

Bon nombre d'espèces ont satisfait aux exigences des services de contrôle et leur commercialisation, surtout ces dernières années alors que la vigilance s'était accrue, est la preuve que la lutte biologique est plus qu'une technique, c'est un état d'esprit, qui s'impose progressivement. Il semble cependant improbable dans l'état actuel du problème que les agents biologiques remplacent les insecticides chimiques dans toutes les situations où ils sont disponibles, parce que l'efficacité n'est jamais totale mais, souvent aussi, pour une raison de coût.

3. *BACILLUS SPHAERICUS* - AGENT BIOLOGIQUE DE LUTTE ANTICULICIDIENNE

3.1 DIVERSITE DES SOUCHES

L'espèce *Bacillus sphaericus* Neide 1904 (*Bacillaceae*, sporulante, aérobie Gram-variable) comporte une majorité de souches qui ne sont pas entomopathogènes, retrouvées communément dans le sol et dans l'eau (de BARJAC et CHARLES, 1983).

La première mention de la pathogénicité de *B. sphaericus* est faite en 1965 par KELLEN qui isole la souche "Kellen K", en Californie, à partir de larves moribondes de *Culiseta incidens*.

Une campagne systématique de récolte de larves de moustiques mortes, encouragée par l'O.M.S. en 1966, est à l'origine de l'obtention d'un nombre croissant de souches pathogènes isolées successivement dans diverses parties du monde : en 1973, SS II-1 en Inde et 1593 en Indonésie par SINGER (1973) qui précise (SINGER, 1980) que l'activité est due à une substance toxique et non pas à un processus de septicémie; 1691 en El Salvador en 1977, 2013-4 en Roumanie en 1980, 2297 au Sri Lanka (WICKREMESINGHE et MENDIS, 1980), 2362 au Nigéria d'un gîte à simulies (WEISER, 1984).

Parmi la cinquantaine de souche de *B. sphaericus* répertoriées actuellement, moins de la moitié présentent un intérêt potentiel en lutte antivectorielle, elles ont un spectre d'action relativement réduit : si les espèces de *Culex* sont généralement très sensibles à la bactérie, les *Anopheles* le sont moins et les exemples de pathogénicité vis-à-vis d'*Aedes* se réduisent dans l'état actuel de nos connaissances à une seule souche (1691) légèrement pathogène sur *Aedes aegypti* (LARGETHIERY, 1989). Il existe une variabilité interspécifique dans la sensibilité à *B. sphaericus*, DAGNOGO et COZ (1982) l'ont notamment étudiée sur *Anopheles*.

La différenciation des souches ne peut être basée sur des caractéristiques morphologiques ou biochimiques. Une première

approche a été réalisée par de BARJAC *et al.* (1980) par techniques chimiques et sérologiques et par KRYCH *et al.* (1980) qui étudient l'homologie ADN/ADN et certaines caractéristiques phénotypiques. Ce travail permet de définir cinq groupes parmi lesquels le groupe II a été subdivisé en IIA et IIB. Sur le critère d'une toxicité comparable pour *Culex quinquefasciatus* les différentes souches s'avèrent appartenir au sous-groupe IIA.

Une classification est proposée par YOSTEN (1984) établie sur la sensibilité bactérienne à 10 bactériophages (lysotypes) et par de BARJAC *et al.* (1985) sur l'agglutination par les antigènes flagellaires (sérotypes). La corrélation entre les résultats obtenus par ces deux méthodes différentes est excellente et fait apparaître de fortes homologies entre toutes les souches entomopathogènes.

3.2 TOXINE ET MODE D'ACTION

A l'instar de *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* au cours de sa sporulation produit une ou plusieurs protéines toxiques qui s'assemblent généralement en cristaux. Après ingestion de la spore, sous l'effet des protéases digestives, actives à des pH élevés (pH 9), les cristaux sont progressivement dissous. Deux protéines majeures (41,9 kDa = P 43¹ et 51,4 kDa = P 52) peuvent être identifiées par chromatographie. Elles entrent dans des processus différents. La protéine P 43 est activée en une forme 40 kDa ; la protéine P 52 est totalement hydrolysée (BOURGOUIN, 1988). Il a été démontré que ces deux composantes sont synergiques et que la présence de la P 52 est indispensable pour l'expression de la toxicité de la P 43 (ARAPINIS *et al.*, 1988, BAUMANN *et al.*, 1988). La cible d'action de la toxine est constituée par les cellules du mésentéron des larves. Deux autres protéines de 110 kDa et de 125 kDa sont présentes dans les cristaux de certaines souche (2362 notamment). Leur activité est encore mal comprise mais l'une d'elles pourrait être le précurseur de la P 43 (BAUMANN *et al.* 1985).

¹ souvent référenciée comme P43, il s'est avéré en affinant l'étude que son poids moléculaire est plutôt voisin de 42 Kd.

La manifestation histologique de la pathologie due à l'action de la toxine a été décrite pour différentes souches de *B. sphaericus*. La première étude faite par KELLEN *et al.* (1965) sur *Culex tarsalis* montrait que les cellules mésentériques dégénèrent progressivement avec une forte vacuolisation du cytoplasme. Chez *Culex quinquefasciatus*, DAVIDSON (1981) décrit le décollement des cellules de leur base avec augmentation des cytolysosomes également observé par SINGER (1980). Il s'en suit un éclatement des cellules dans la lumière de l'intestin. KARCH et COZ (1983) montrent que les perturbations sont précoces (30 minutes) au niveau de l'intestin postérieur et qu'elles gagnent progressivement les parties du mésentéron situées plus en amont (24 heures et plus). Les cellules épithéliales sont complètement détruites au bout de 36 heures. La dégradation du tissu épithélial a été longtemps considérée comme le processus entraînant la mort de la larve. SINGH et GILL (1988) cependant attirent l'attention sur le délai entre la manifestation cytologique de la toxicité (3 à 10 heures) et la paralysie précédant la mort de la larve, 24 à 48 heures plus tard. Ils mettent en évidence par microscopie électronique des altérations cytologiques du système nerveux et de la structure musculaire qui deviennent manifestes après la trentième heure (32 à 36 heures).

D'après ces auteurs, contrairement à ce qui a été décrit pour *B. thuringiensis*, qui semble provoquer une mort rapide par modification de la perméabilité entraînant l'éclatement des cellules, l'action de *B. sphaericus* sur les cellules épithéliales initie une chaîne d'événements cataboliques intracellulaires qui se manifestent par la digestion lysosomale d'un certain nombre de composantes cellulaires (qui fait probablement suite à celle des molécules de toxines). Ces auteurs n'ont pas pu montrer qu'il y avait eu endocytose mais ils ne l'excluent pas. De même, ALY *et al.* (1989) concluent à l'hypothèse d'une fixation de la toxine sur des récepteurs de la cellule épithéliale. DAVIDSON (1989) met en évidence par de la toxine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine qu'il y a fixation de cette dernière sur les cellules du mésentéron postérieur et des *caeca* gastriques chez *Culex pipiens*, suivie d'une internalisation (vésicules fluorescentes). N'obtenant pas les mêmes

phénomènes avec *Anopheles* spp. (fixation sans internalisation) ou *Aedes aegypti* (pas de fixation) cet auteur conclut que la liaison des toxines de *B. sphaericus* avec des récepteurs spécifiques a lieu avec une forte affinité chez *Culex* spp., avec une faible affinité ou sur des récepteurs non spécifiques chez *Anopheles* spp. La différence de sensibilité à *B. sphaericus* des trois genres semble trouver ici une explication biochimique.

4. CULEX PIPIENS VECTEUR DE FILARIOSE DE BANCROFT

4.1 LE COMPLEXE CULEX PIPIENS

Le complexe *Culex pipiens* comporte plusieurs espèces :

Culex pipiens pipiens

Culex pipiens autogenicus

Culex quinquefasciatus Say 1823 (= *C. fatigans* Wiedemann 1828).

A des particularités morphologiques se superposent des caractéristiques biologiques et écologiques.

4.1.1 *C. pipiens* et *C. autogenicus*

Ces deux espèces sont assez proches du point de vue morphologique, la distinction peut se faire au niveau du siphon de la larve plus effilé chez *C. pipiens* (indice siphonique = longueur/largeur mesurée à la base), et de la couleur du corps chez l'adulte. Les différences biologiques sont plus nettes : *C. pipiens* est anautogène, hétérodynome (période d'inactivité reproductrice durant l'hiver), rural et ornithophile tandis que *C. autogenicus* est autogène, homodyname, urbain et plus volontiers anthropophile. Les intrcroisements sont possibles entre ces deux espèces mais sont limités par des phénomènes d'amixie physiologique. Celle-ci se traduit par des manifestations létales frappant les pontes hybrides au cours de leur développement (ROUBAUD, 1945).

Les moustiques appartenant au complexe *C. pipiens* sont cosmopolites, très abondants en région tempérée. En France, en particulier en région méditerranéenne, ils constituent une nuisance importante en raison de la géographie de la région : étroit cordon littoral séparant les plages d'une longue chaîne d'étangs et de marais. La nécessité de démoustiquer apparaît dès 1950 dans cette région dont la vocation touristique se précise. Bien que la femelle ne prélève que 2 à 8 µl de sang à chaque repas sanguin, la réaction allergique provoquée chez l'homme ou les autres hôtes peut être sévère. Elle varie selon la réactivité de l'individu vis-à-vis de l'espèce.

4I.2 *Culex quinquefasciatus* Say 1823

Cette espèce, de par sa large distribution géographique en régions tropicales et subtropicales, représente le vecteur majeur de la filariose de Bancroft en Afrique de l'Est, en Asie du Sud-est et dans les îles de l'Océan Indien (BRUNHES *et al.*, 1972) où l'expansion urbaine mal structurée est un facteur favorable à son extension depuis les zones rurales où il colonise les gîtes d'eau polluée ainsi que les réserves d'eau à usage domestique (BRENGUES, 1978).

En Afrique occidentale et centrale, *C. quinquefasciatus* ne joue jusqu'à présent pas un rôle de vecteur de la filariose de Bancroft mais est responsable d'une importante nuisance en milieu fortement urbanisé. Dans les agglomérations situées en zone tropicale il peut être considéré comme un marqueur écologique de l'urbanisation (DARRIET *et al.*, 1986) car les réservoirs d'eaux usées qui y sont nombreux constituent des gîtes particulièrement propices au développement de ses larves.

La dissémination de *C. quinquefasciatus* en Afrique a été favorisée par plusieurs facteurs anthropiques évoqués ci-dessus mais la pullulation est très probablement une conséquence de l'emploi d'insecticides organochlorés ou organophosphorés contre lesquels la richesse génétique de cette espèce lui a permis très rapidement de

développer une résistance alors que d'autres espèces associées ou concurrentes, plus sensibles, ont été éliminées.

On assiste donc à l'implantation massive en Afrique de l'Ouest d'une population de moustiques qui pourrait contribuer à la multiplication des foyers de filariose de Bancroft y créant progressivement une situation similaire à celle d'Afrique de l'Est (SUBRA, 1981). En plus de cette filariose humaine, *C. quinquefasciatus* est vecteur d'une filariose canine à *Dirofilaria immitis*.

4.2 REMARQUES CONCERNANT LA FILARIOSE DE BANCROFT

La filariose de Bancroft est une infection due à *Wuchereria bancrofti* Cobbold 1877.

Sa forme clinique la plus apparente, l'éléphantiasis (signalée par les hindous dès 600 avant J.C., mais il s'agirait probablement dans ce cas de *Brugia malayi* - LAURENCE, 1968) en est une manifestation bien moins fréquente que différentes adénopathies lymphangites et hydrocèles. Il est généralement admis que le genre *Wuchereria* ne comprend qu'une espèce mais que l'on peut distinguer au moins deux formes principales :

- La forme la plus répandue montre une périodicité nocturne dans le sang périphérique de l'hôte. Elle est la seule présente en Afrique, en Amérique, dans le sud-ouest du Pacifique, en Australie, aux Nouvelles Hébrides et en Asie du Sud-est.

- L'autre forme, dite subpériodique diurne, est restreinte au Pacifique Central (Fidji, Nouvelle Calédonie, Polynésie tropicale) et à l'archipel des Nicobar dans l'Océan Indien. Elle constituerait la forme ancestrale (PICHON, 1981). C'est principalement une affection rurale à localisation côtière et à pathogénicité variable (de 5 à 10 % de prévalence selon les îles) (RAGEAU, 1979). Une forme subpériodique nocturne n'a été signalée que dans deux foyers (en Thaïlande et chez les peuples montagnards du Vietnam).

Les vecteurs de la forme subpériodique sont essentiellement des *Aedes* du sous-genre *Stegomyia*, diurnes-crépusculaire (*Aedes polynesiensis*, exophile et à activité trophique diurne a une aire de répartition qui se superpose avec la forme subpériodique diurne de *W. bancrofti*). Ceux de la forme nocturne ont une activité trophique nocturne et sont plus variés : *Culex* (principalement *Culex quinquefasciatus*), *Anopheles*, *Mansonia*.

Une concordance remarquable existe donc entre la forme filarienne et ses vecteurs : on observe une synchronisation parasite-vecteur favorable à la transmission de la filaire. Ce phénomène n'est pas unique et se retrouve, peut être un peu moins marqué, dans d'autres couples filaires-vecteurs (ex. *Loa loa* - *Chrysops* , CAUBERE 1989). Il pourrait résulter d'une grande diversité biorythmique, paraissant globalement apériodique ou subpériodique, "filtrée" par l'activité nycthémérale du vecteur.

CHAPITRE II -

ACTION DU RAYONNEMENT SOLAIRE SUR *BACILLUS SPHAERICUS*

1. INTRODUCTION

Plusieurs auteurs se sont attachés à analyser l'effet du rayonnement solaire sur divers microorganismes utilisés en lutte biologique. Le rayonnement solaire qui atteint la surface de la terre possède une composante ultra-violette (< 400 nm), une fraction perceptible par l'œil humain, qualifiée de ce fait de fraction visible (400 à 700 nm), et une fraction dans le proche infra-rouge (> 700 nm). Dans l'analyse des divers travaux, il importe de distinguer l'effet des rayonnements ultra-violet, dits stérilisants (< 290 nm), de celui des U.V. proches du visible ou du visible lui-même, qui sont différemment affectés lors de la traversée de l'atmosphère.

Nous analyserons succinctement les qualités du rayonnement solaire ainsi que leur transformation au cours de son passage à travers la couche atmosphérique ou le milieu aquatique, afin de déterminer l'impact sur les organismes qui lui sont exposés et en particulier *B. sphaericus*.

Les spores de *Bacillus sphaericus* sont des formes de résistance de la bactérie. Elles lui permettent de garder ses potentialités dans des conditions qui altéreraient la viabilité de tout autre organisme : dessiccation, froid intense ou élévation importante de la température. Peu de travaux sont consacrés à leur inactivation par l'énergie solaire.

L'absorption de l'énergie lumineuse par les protéines constitutives de la spore de *Bacillus sphaericus* ou par ses acides nucléiques a lieu dans des domaines différents du spectre et se traduit en termes de perte de la toxicité ou de diminution de la viabilité des spores.

Ainsi, en milieu naturel, le rayonnement solaire aura une incidence sur le devenir des spores et sur leur potentialité de recyclage.

Afin de mieux comprendre l'action du rayonnement solaire, nous nous proposons de faire une analyse comparative de son action sur les spores telles qu'elles sont utilisées pour la lutte antilarvaire et sur la toxine entomopathogène qui peut en être extraite et purifiée par chromatographie. Une meilleure compréhension des mécanismes peuvent éventuellement apporter des éléments utiles pour l'amélioration des conditions d'utilisation du pathogène.

2. CARACTERISTIQUES DU RAYONNEMENT SOLAIRE

2.1 SPECTRE D'EMISSION

Les longueurs d'onde des rayonnements électromagnétiques s'étendent de 1 Å (0,1 nm) à plusieurs centaines de mètres. On les subdivise classiquement en une dizaine de régions ayant des caractéristiques que l'homme perçoit ou utilise différemment (ROBINSON, 1966) :

< 1nm		rayons X et gamma		
1	à 200 nm	U.V. lointains	U.V.C	de 200 à 290
200	à 315	U.V. moyens	U.V.B	de 290 à 315
315	à 380	proches U.V.	U.V.A	de 315 à 380
380	à 700	visible		
700	à 1500	proche I.R.		
1500	à 5600	I.R. moyen		
5600	à 10 ⁶	I.R. lointain		
> 10 ⁶		micro-ondes et ondes radio.		

La valeur énergétique (E) d'un rayonnement est inversement proportionnelle à la puissance quatrième (c = constante) de sa longueur d'onde (λ) : $E = c/\lambda^4$.

Les rayonnements dont les longueurs d'onde sont comprises entre 250 et 3000 nm représentent 98 % de l'énergie totale du spectre émis par le soleil.

Les bandes spectrales impliquées dans les processus photobiologiques sont fonction des longueurs d'onde absorbées par les molécules impliquées dans les réactions considérées : acides nucléiques, protéines, pigments etc. (fig II.1).

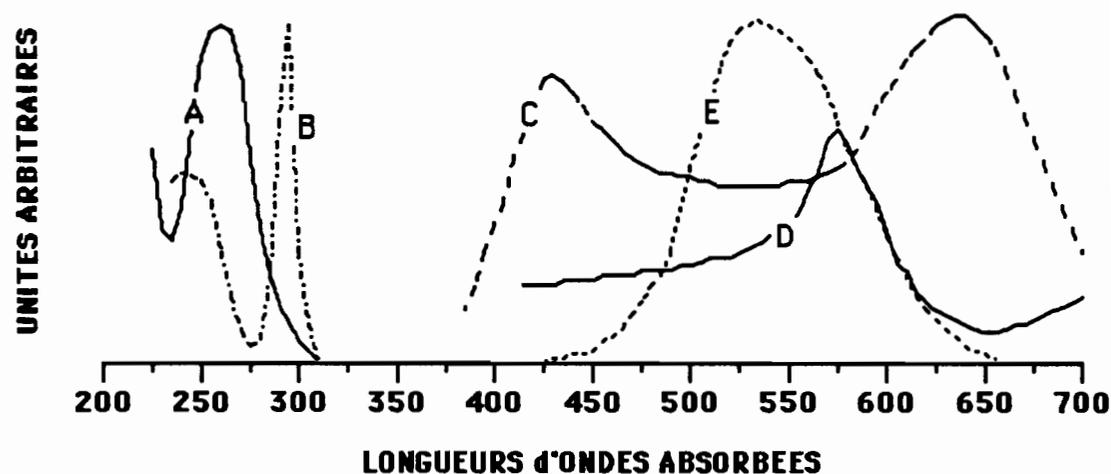


FIGURE II.1 Processus biologiques activés par différentes régions du spectre (d'après WALD, 1956) :

- A rayonnement bactéricide
- B brûlure peau humaine
- C photosynthèse chez les plantes supérieures
- D photosynthèse chez les bactéries
- E vision diurne (œil humain)

2.2 INTENSITE HORS ATMOSPHERE.

La constante solaire est définie comme la quantité d'énergie solaire parvenant avec une incidence normale sur la surface extérieure de l'atmosphère pour une distance soleil-terre moyenne. Cette intensité du rayonnement solaire, hors atmosphère, est sujette à des variations saisonnières et quotidiennes qui dépendent des positions

(astronomiques) respectives du soleil et de la terre. Elle varie selon la longueur d'onde.

2.3 EFFET DE L'ATMOSPHERE.

Lorsqu'elle atteint la surface terrestre, l'énergie solaire a été modifiée quantitativement et qualitativement par la masse atmosphérique : une partie de la lumière est diffusée, une autre partie absorbée par les diverses composantes de l'atmosphère (fig. II.2). Chaque constituant atmosphérique a ses propres coefficients de diffusion et d'absorption.

Si la diffusion est une fonction continue de la longueur d'onde mais dépend essentiellement de la taille de l'élément d'interception (molécules, brouillards, aérosols), l'absorption est en général sélective. Les principaux composants responsables de l'absorption sont l'oxygène ($O\cdot$, O_2 , O_3), l'eau (H_2O), le mono- et le dioxyde de carbone (CO et CO_2), l'azote et ses oxydes (N , N_2 , NO , N_2O), le méthane (CH_4) et dans une moindre mesure leurs isotopes.

La composition de l'atmosphère, donc son pouvoir de diffusion et d'absorption, varie le long du parcours du rayon solaire car la composition gazeuse, particulaire ou nuageuse est fonction de l'altitude et du temps pour une verticale donnée.

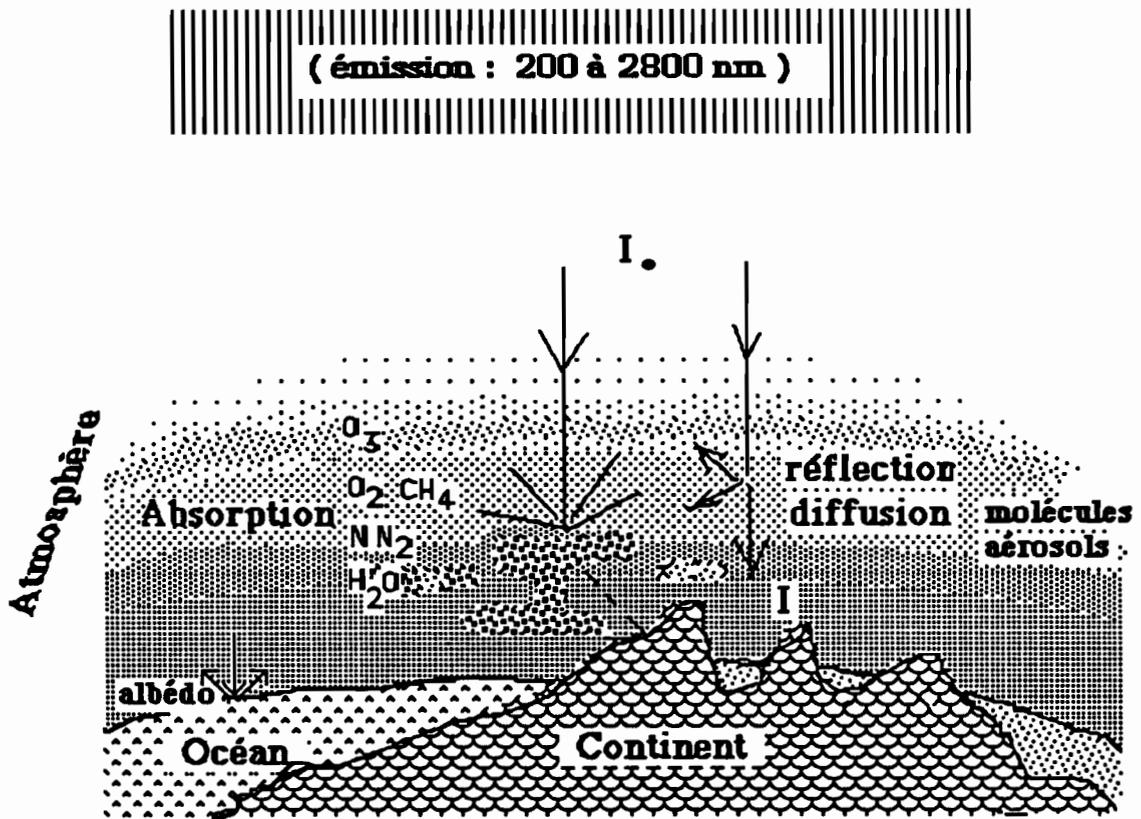
Un facteur supplémentaire de variation est constitué par la variation de pression atmosphérique qui joue un rôle sur les densités partielles des composantes. Ceci s'applique en particulier à la vapeur d'eau et aux poussières qui sont localisées préférentiellement dans les basses couches de l'atmosphère. L'ozone par contre s'accumule dans les strates plus élevées (40 à 60 km d'altitude).

Les spectres d'absorption (par transfert d'électrons) des molécules et atomes d'oxygène, d'azote et d'ozone se situent dans les longueurs d'ondes ultra-violettes (U.V.) ; ceux dus aux vibrations et rotations des

molécules polyatomiques (H_2O , CO_2 , O_3) sont dans les longueurs d'ondes infra-rouges (I.R.), l'énergie absorbée dans cette bande spectrale est entièrement transformée en énergie thermique ; il y a très peu d'absorption dans le visible.

FIGURE II.2 : Le rayon solaire au cours de sa traversée de l'atmosphère

SOLEIL



Les coefficients d'absorption associés au transfert électronique étant très élevés, il en résulte une forte atténuation des longueurs d'ondes U.V. dans la haute atmosphère. Du fait de la transmissivité quasi nulle de l'atmosphère pour les longueurs d'ondes inférieures à 200 nm et de la forte absorption de l'ozone stratosphérique pour les longueurs d'ondes inférieures à 290 nm, aucune énergie solaire d'une longueur d'onde inférieure à 290 nm ne peut parvenir au sol. La dimension de la plus petite longueur d'onde parvenant au sol dépend de la masse atmosphérique (m) qui surplombe le lieu d'observation. Elle se situe entre 290 (pour m faible) et 310 nm selon le lieu et la période choisis pour l'observation (ROBINSON, 1963).

2.4 L'ALBEDO D'UNE SURFACE D'EAU LIBRE

Une caractéristique du rayonnement solaire importante dans l'étude des mécanismes biologiques dépendra de la nature de la surface réceptrice : on définit l'albedo (a) comme le rapport du flux du rayonnement réfléchi (R) dans toutes les directions par une surface donnée au flux de rayonnement incident (I) à cette surface (I) : $a = R/I$.

Beaucoup d'études concernant l'inactivation des bactéries entomopathogènes par les rayonnements intéressent *B. thuringiensis*. Dans ce cas généralement, la surface réceptrice est constituée de feuilles de diverses espèces végétales, par contre *B. sphaericus* n'est utilisé qu'en milieu aquatique et il importe de tenir compte de la différence de qualité de lumière que l'on peut rencontrer dans ces conditions.

La réflectivité d'une surface d'eau libre fluctue très largement en fonction de l'angle d'incidence du rayonnement (KONDRATIEV, 1972), donc de l'heure. Elle est maximale pour les petites valeurs de l'angle solaire (lever et coucher du soleil) et pour les longueurs d'onde de 500 à 700 nm; elle dépend de la qualité de l'eau (turbidité et état de la surface). Par contre les longueurs d'onde ultra-violettes sont peu réfléchies. Etant également peu absorbées par l'eau, elles pénètrent plus profondément le milieu liquide que les rayonnements

visibles et surtout que les infra-rouges.

2.5 CHOIX EXPERIMENTAL

Les fluctuations importantes que l'on note dans l'intensité et la composition du rayonnement incident sont d'ordre astronomique, géographique, géométrique, physique et météorologique. Ces différents paramètres expliquent aisément que la quantité et la qualité de l'énergie solaire reçue sur une surface puissent être très variables selon le lieu et la saison.

Ces remarques nous incitent à beaucoup de prudence dans l'extrapolation des résultats expérimentaux de divers auteurs et nous amènent à analyser l'effet du rayonnement sur la toxicité et la viabilité de *B. sphaericus* en séparant l'impact des diverses régions du spectre. Notre analyse nous a amenée à subdiviser plus finement les régions U.V. et visibles dans la conduite de nos expérimentations.

3. INACTIVATION PHOTOCHEMIQUE

3.1 INACTIVATION DES ADN PAR LES U.V.C.

Les U.V.C (200 à 290 nm) sont normalement absorbés dans la haute atmosphère, principalement par l'ozone. Ils comprennent une zone qui présente un effet létal sur les cellules vivantes. Leur action sur les microorganismes pathogènes a été largement étudiée. Les lampes "bactéricides" exploitent cette propriété : elles émettent des rayonnements dans la gamme de 254 nm. L'altération que subit actuellement la couche protectrice d'ozone éclaire ces travaux d'un jour nouveau.

L'irradiation par les U.V.C provoque des lésions dans l'ADN (acide désoxyribonucléique) cellulaire par pontage entre deux pyrimidines adjacentes. Elles représentent 80 à 90% des lésions identifiées après irradiation U.V.C. D'autres lésions sont produites par l'élimination ou la

modification chimique des bases. La fréquence de la formation de ces lésions dépend entre autre de la dose d'U.V.C administrée.

Les cellules saines sont capables de tolérer un certain nombre de lésions produites sur leurs molécules d'ADN par des agents chimiques ou des rayons U.V. ou ionisants, car elles disposent d'un mécanisme de réparation par excision-resynthèse (SARASIN *et al.* 1988) : les anomalies de structure de l'ADN sont principalement détectées et éliminées par un système enzymatique complexe dans lequel interviennent des réparases, des polymérases et des ligases. Ce système de réparation a cependant des limites et il existe pour chaque cas un seuil au-delà duquel les lésions, trop nombreuses, deviennent létales.

3.2 INACTIVATION PHOTOCHEMIQUE DES PROTEINES

L'activité biologique d'une molécule protéique est généralement liée a un petit nombre d'acides aminés résiduels et à la conformation macromoléculaire déterminée par la résultante des interactions inter- et intramoléculaire.

La configuration quaternaire est sous la dépendance des interactions entre les chaînes latérales des acides aminés : les groupes polaires acides ou basiques formant le pôle hydrophile alors que les résidus aromatiques de la phénylalanine (PhA), de la tyrosine (Tyr) et du tryptophane (Trp) sont généralement plus internalisés dans la protéine globulaire où ils constituent le core hydrophobe. Leurs interactions maintiennent le peptide dans une conformation compacte, même en solution aqueuse, comme l'est le milieu biologique, et participent ainsi à la stabilisation de la protéine (BURLEY et PETSKO, 1985).

La relation entre structure, conformation et fonction détermine les caractéristiques de la protéine.

Des altérations, localisées en des sites considérés comme non

essentiels, peuvent induire des modifications de la structure tridimensionnelle et provoquer une perte de son activité, s'il s'agit d'une enzyme, ou une modification de ses caractéristiques de sensibilité à la chaleur, aux agents chimiques, à la digestion par exemple.

Les acides aminés présentent une absorption importantes aux longueurs d'ondes inférieures à 230 nm (lien peptidique) et certains d'entre eux absorbent entre 250 et 350 nm en raison de la présence de "chromophores" tels que le radical phényle (Tyr) ou le noyau indole (Trp) (WEIL, 1987).

La séquence d'événements consécutifs à l'exposition d'une protéine aux U.V. comprend : l'excitation des électrons du groupe chromophore, la rupture de liaisons, des changements de configuration avec création de radicaux libres ou émission d'électrons (phosphorescence, fluorescence). Les électrons émis en milieu aqueux peuvent agir à distance du groupe chromophore et provoquer des altérations plus nombreuses et surtout plus permanentes. Ils peuvent notamment réagir avec l'oxygène dissous pour former O_2^- , radical très réactionnel vis-à-vis de l'enzyme lui-même et entraîner des altérations variant d'un événement négligeable à une totale inactivation (GROSSWEINER, 1976).

La durée de vie des radicaux libres est de quelques secondes en milieu aqueux à 20° mais elle peut atteindre plusieurs jours, voire plusieurs années, si la protéine est anhydre (par exemple dans une poudre lyophilisée).

Un rayonnement est inactivant s'il émet à une longueur d'onde absorbée par un chromophore présent dans la protéine (le résidu tyrosyle absorbe à 250 nm, le résidu phénylalanyle à 273 nm et le résidu tryptophyle à 295 nm). Cependant tous les résidus d'une certain type ne subissent pas la photolyse dans un même temps. Le microenvironnement moléculaire et la structure tertiaire jouent un rôle protecteur qui s'amenuise avec l'augmentation de l'intensité ou de la durée de l'irradiation.

La photosensibilité d'une protéine peut être réduite par l'adjonction d'accepteurs de radicaux libres comme l'azide de sodium ou des complexes ioniques accepteurs d'oxygène. Elle peut, au contraire être augmentée par des molécules chromophores génératrices d'électrons libres, comme le bleu de méthylène ou l'éosine, dont le spectre d'absorption se situe dans les longueurs d'onde visibles. Cette observation est importante si l'on veut l'étendre au domaine biologique complexe qu'est le milieu naturel. Il peut jouer un rôle photooxydant en transférant aux protéines "incolores" l'énergie de longueurs d'ondes supérieures aux U.V. absorbée par des pigments naturels (mélanine par exemple).

La restauration partielle des propriétés enzymatiques de protéines irradiées (GROSSWEINER 1976) peut être obtenue par le froid (quelques heures à 4°C) à condition que les altérations n'aient pas dépassé un certain seuil.

4. EFFET DU RAYONNEMENT SOLAIRE SUR LES ORGANISMES ENTOMOPATHOGENES

La faible persistance des organismes entomopathogènes en milieu naturel constitue un problème majeur à leur utilisation en lutte biologique.

Dans le cas où la pathogénicité de l'agent est le fait d'une invasion des tissus de l'insecte cible suivie d'une multiplication du microorganisme, il est fondamental que sa viabilité ne soit pas diminuée afin que demeurent intactes ses potentialités. Par contre, si la mort de l'insecte cible est due à une intoxication par une substance produite hors de l'hôte mais associée aux cellules du pathogène, la perte de leur viabilité pourrait être sans conséquence ou même souhaitée. En effet si l'on recherche une action immédiate sur une population d'insectes nuisibles, seul le maintien du niveau de toxicité du produit appliqué importera.

On rejoint dans ce cas le principe du traitement par les insecticides chimiques. Les utilisateurs peuvent rechercher un tel agent dont la spécificité est très largement supérieure à celle des produits de synthèse et qui exclut toute contamination du milieu naturel. La commercialisation d'un agent pathogène non viable protège également les producteurs de toute "récupération" de la souche et sauvegarde ainsi leurs droits. Lorsqu'au contraire le recyclage de l'agent biologique est souhaité pour en prolonger l'action, on recherchera à minimiser les causes d'altération de sa viabilité.

Ces diverses considérations sont à l'origine d'un grand nombre de travaux sur les facteurs susceptibles d'agir sur la persistance des organismes entomopathogènes. Une majorité d'études sur ce sujet s'est intéressée à *B. thuringiensis* dont différentes souches sont utilisées comme pesticides. Déposée le plus souvent sur les feuilles des végétaux, la bactérie est particulièrement exposée aux différents paramètres climatiques pouvant réduire son efficacité (BRAND *et al.*, 1975).

Parmi les facteurs naturels incriminés (vent, pluie, température, altitude, latitude), le rayonnement solaire apparaît très tôt dans la littérature comme celui dont l'effet est le plus marqué. PINNOCK *et al.* (1971) confirment les conclusions de CANTWELL et FRANKLIN (1966) et (CANTWELL, 1967) sur des spores de *B. thuringiensis* indiquant qu'elles sont rapidement tuées par le rayonnement solaire alors que leur toxicité n'est pas altérée.

Les premières expériences tendant à analyser son effet sur des spores de bactéries entomopathogènes, s'inspirent des techniques disponibles en bactériologie et utilisent comme source d'U.V. des lampes ayant un pic d'émission à 254 nm. Ceci ne correspond pas à une gamme de longueurs d'onde qui atteint la surface terrestre et ne peut donc simuler les conditions naturelles (voir § 2).

FRYE *et al.* (1973) étudient la survivance de spores de *B. thuringiensis* (Thuricide 90 TS) sur des supports exposés aux conditions naturelles (insolation, pluies, vent en été dans le Nord-Dakota) et

mettent en évidence une corrélation nette entre le degré de couverture nuageuse du ciel (énergie incidente faible) et l'inactivation des spores. Ils concluent que l'effet létal est dû principalement à la fraction U.V. du rayonnement solaire sans toutefois apporter de preuve de cette hypothèse et sans étendre leur observation à une éventuelle modification du pouvoir pathogène de *B. thuringiensis*.

Les notions de viabilité de la spore de *B. thuringiensis* et de toxicité du cristal qui l'accompagne sont dissociées dans les travaux de BURGES *et al.* (1975). Ils apportent la preuve que l'activité insecticide du cristal n'est pas réduite pour des échantillons soumis à des irradiations par rayons gamma ou ultra-violet C (254 nm) qui tuent la spore et suggèrent l'utilisation de microorganismes non vivants, inactivés par cette méthode, dans les campagnes de traitement.

Dès son isolement par GOLDBERG et MARGALIT (1977) *Bacillus thuringiensis israelensis* (H-14) est reconnu comme une souche avec des potentialités nouvelles. Elle est étudiée par les auteurs sous le double aspect de la viabilité et de la toxicité des spores. Son activité sur les larves de moustiques, attribuée à une toxine stable à la chaleur (60° C pendant 20 minutes) et aux ultra-violet germicides, lui ouvre un nouveau champ d'application qui se situe dans le milieu aquatique où prévalent d'autres paramètres d'inactivation (pH, composition de l'eau) que ceux du milieu aérien.

Son comportement en milieu naturel a été étudié par MULLIGAN *et al* (1980) qui établissent une comparaison avec *Bacillus sphaericus* souche 1593-4. Leur conclusion est d'un grand intérêt : exposée au rayonnement solaire direct pendant 6 heures une suspension à 1 mg/l de *Bacillus sphaericus* a perdu toute activité larvicide (sur des larves de *C. quinquefasciatus* stades II-III) alors qu'une suspension de *B. thuringiensis* H-14 de même concentration traitée de la même manière, ainsi que les témoins non exposés, ont provoqué une mortalité de 100 % chez les larves. Ils en déduisent que la matière active de *B. thuringiensis* H-14 n'a pas été inactivée par le rayonnement solaire direct, alors que *Bacillus sphaericus* a perdu toute activité larvicide en 6 heures mais de

fait, on sent dans leur conclusion une tendance à l'extrapolation.

Celle-ci s'oppose aux observations faites par ISHIGURO et MIYAZONO (1982) avec *B. thuringiensis kurstaki* et *aizawai*. Pour ces auteurs, les deux souches réagissent de façon similaire aux conditions étudiées (la pluie et le rayonnement solaire). Seule la partie de leur expérience conduite en extérieur peut-être utile à une comparaison car sous serre le rayonnement direct est largement amputé de la composante ultra-violette. L'analyse de la viabilité et de la toxicité des spores est faite pour différentes parties du spectre visible. Les deux paramètres montrent une diminution d'autant plus marquée que les longueurs d'onde reçues sont proches du bleu (ou de l'U.V. qui n'a pas été étudié).

Ces résultats mettent en évidence la faille du travail de MULLIGAN *et al.* (1980) qui n'ont pas poursuivi leurs observations assez longtemps pour pouvoir observer une éventuelle chute d'activité larvicide d'une préparation à 1 mg/l de *B. thuringiensis* H. 14 sur *C. quinquefasciatus* alors qu'ils l'observent avec *B. sphaericus* 1593.

L'apparente discordance avec les résultats de BURKE *et al.* (1983), qui tentent de démontrer la stabilité de la toxine de *B. sphaericus* 1593 au rayonnement solaire, provient de ce que ces auteurs utilisent une lampe germicide U.V. pensant simuler "...plusieurs fois le rayonnement reçu par la terre au cours d'un jour normal". Ils apportent uniquement la preuve que la toxine de *B. sphaericus* n'est pas altérée lorsqu'elle est irradiée 4h à une longueur d'onde de 254 nm et que leur lampe germicide tue effectivement la bactérie.

LACEY et SMITTLE (1985) confirment le maintien à un haut niveau de toxicité des spores de *B. sphaericus* (2362) inactivées par rayonnement gamma alors que les spores de *B. thuringiensis* H-14 soumises aux mêmes irradiations présentent une perte significative de toxicité.

Devant les éléments quelque peu disparates et le peu d'information donnés par la littérature sur le comportement de *B. sphaericus* soumis au rayonnement solaire et la quasi absence d'une mesure précise de l'intensité des U.V., nous avons monté une expérimentation simple pour tenter de clarifier le phénomène.

5. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX ET METHODES

Grâce à plusieurs sources de rayonnement différentes nous avons couvert un spectre allant de 254 à 700 nm. En utilisant différents filtres U.V. et colorés, nous avons admis sur les échantillons expérimentaux des bandes spectrales de longueurs d'onde croissante. Enfin, nous avons comparé leur effet sur la viabilité des spores de *B. sphaericus* ainsi que sur leur toxicité résiduelle et celle d'une protéine toxique purifié obtenue par extraction sodique.

5.1 SOURCES DE RAYONNEMENT ET FILTRES

5.1.1 Rayonnement ultra-violet

Trois sources de rayonnement U.V. ont été utilisées (tableau II.1). La distance source-échantillon est de 30 cm.

TABLEAU II.1 : Caractéristique des sources U.V. utilisées

254 nm : lampe germicide neuve, puissance : 30 Watt intensité d'irradiation : en U.V.A. = 0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ en U.V.B. = 0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ en U.V.C. = 700 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ le spectre d'émission présente un pic à 253,7 nm.
312 nm : lampe neuve (Vilber-Lourmat T-6M) puissance : 15 Watt intensité d'irradiation : en U.V.A. = 0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ en U.V.B. = 700 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ en U.V.C. = 0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$
366 nm : lampe neuve, (Minuvis - Heidelberg) puissance : 30 Watt intensité d'irradiation : en U.V.A. = 700 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ en U.V.B. = 10 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ en U.V.C. = 0 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

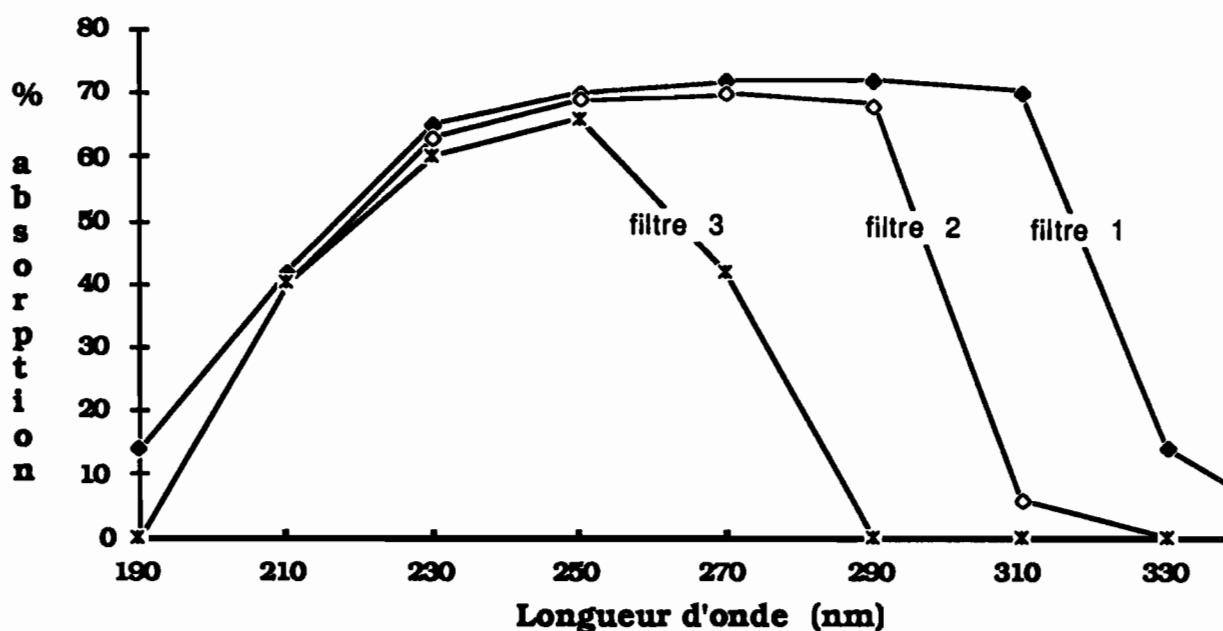
Des filtres sélectifs en verre ont été interposés sur le trajets des rayons ultra-violet. Leurs caractéristiques sont données tableau II.2 et leur spectre figure II.3.

TABLEAU II.2 : Caractéristiques des filtres d'arrêt des ultra-violet utilisés dans les expériences d'irradiation de *B. sphaericus* (λ en nm).

		Rayonnement absorbé jusqu'à λ	Transmission de 90 % du rayonnement
Filtre 1	U.V.A ⁺	314	320 à > 700
Filtre 2	U.V.A ⁺ B ⁺	290	295 à > 700
Filtre 3	U.V.A ⁺ B ⁺ C ⁺	250	260 à > 700

FIGURE II.3 :

Spectre d'absorption des filtres ultra-violet

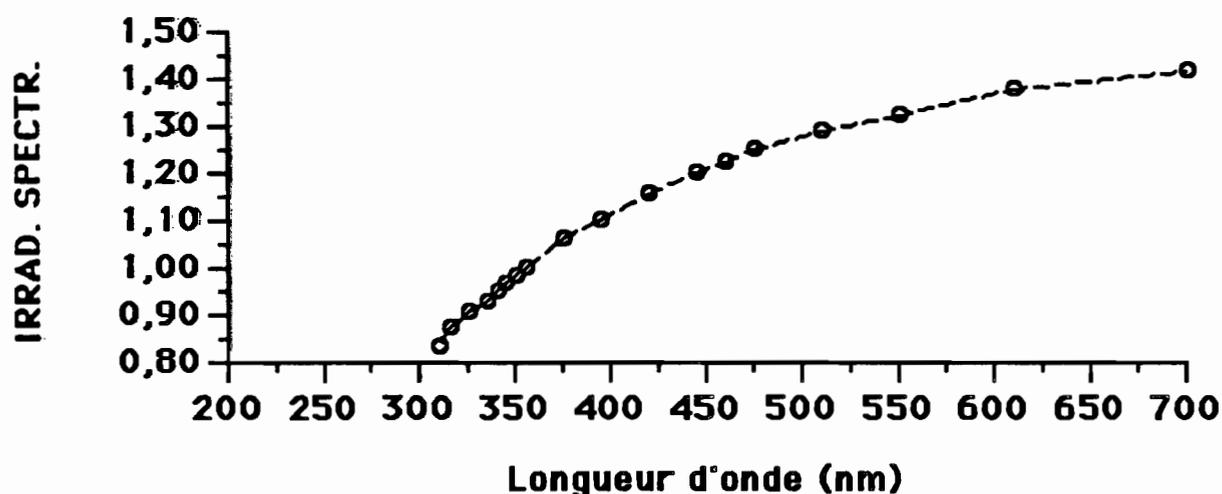


5.1.2 Rayonnement visible

La majorité des expériences dans la bande spectrale du visible a été réalisée en lumière artificielle et en irradiant les échantillons perpendiculairement. La source, choisie pour reproduire au mieux le spectre solaire, est la lampe quartz halogène. Elle possède un spectre

continu à partir de 310 nm (fig. II.4) puissance d'émission : 500 Watt. La distance source-échantillon est de 70 cm.

FIGURE II.4 : Irradiation spectrale de la source d'énergie visible (10^{-4} W/cm².nm)

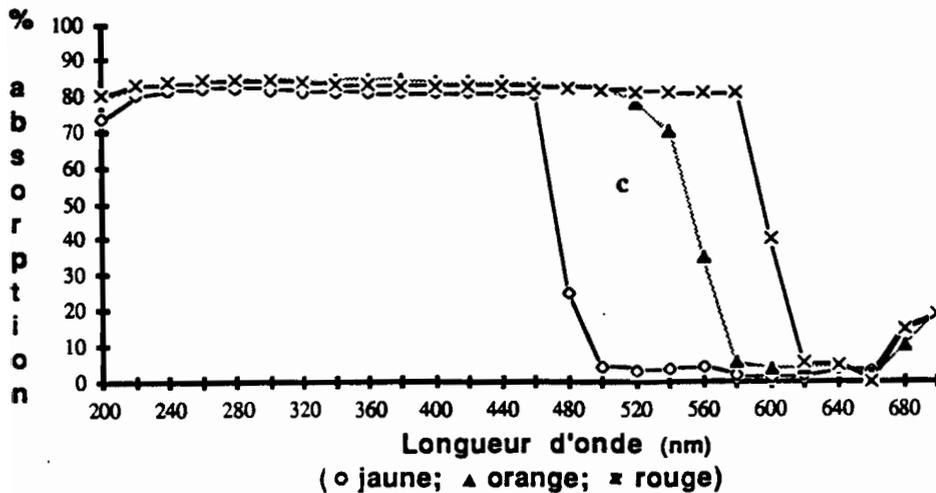
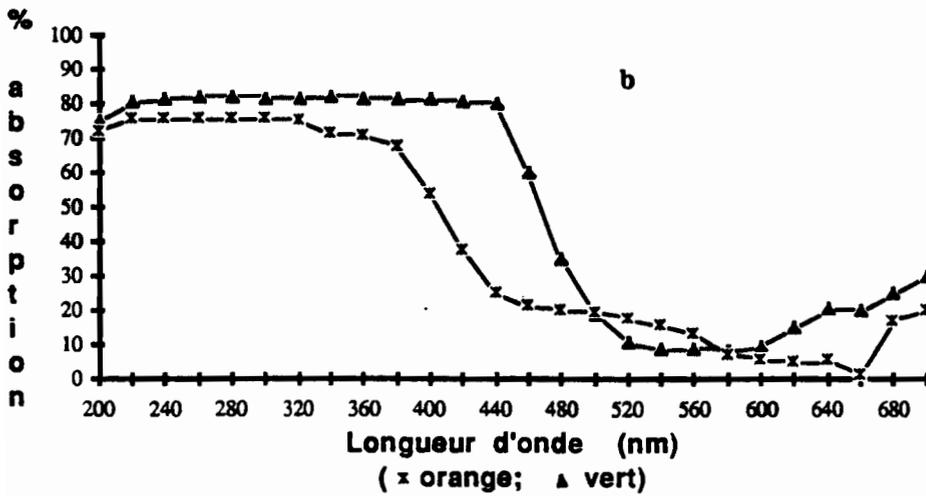
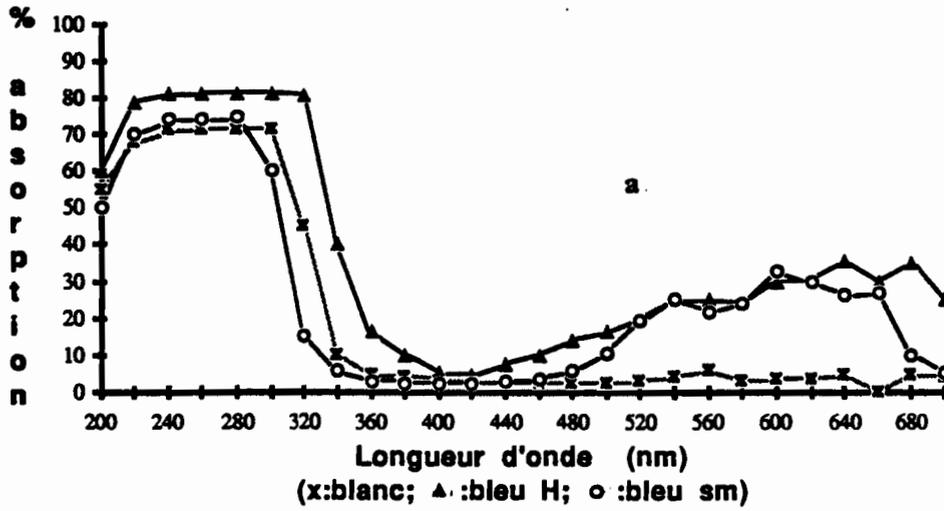


Afin de distinguer l'action éventuelle de différentes régions du spectre, divers filtres ont été interposés sur le trajet des rayons lumineux. Ces filtres en verre coloré, utilisés en photographie, ont été choisis après détermination de leur spectre de transmission par un spectrophotomètre différentiel. Leurs caractéristiques sont données dans le tableau II.3. Les spectres d'absorption-transmission sont figurés (II.5 a,b,c).

TABLEAU II.3 : Caractéristiques des filtres colorés utilisés dans les expériences d'irradiation de *B. sphaericus* (λ en nm).

Type		Rayonnement absorbé jusqu'à λ	Au moins 50 % du rayonnement transmis de λ inf. à λ sup.
Bleu	sans marque	290	300 à > 700
Blanc	sans marque	300	320 à > 700
Bleu	Hoya HMC	320	340 à > 700
Orange	Hoya HMC	360	400 à > 700
Vert	Vivitar n° 11	440	470 à > 700
Jaune	Kenko Y 2	460	480 à > 700
Orange	Vivitar n° 02	500	580 à > 700
Rouge	Kenko R 1	580	600 à > 700

FIGURES II.5 a,b,c. Spectre d'absorption des filtres colorés



5.2 ECHANTILLONS IRRADIES

L'échantillon est constitué soit d'une suspension de spores de *B. sphaericus*, soit d'un extrait de toxine de *B. sphaericus* purifié par gel filtration (voir § 5.3). Le volume de l'échantillon soumis à l'irradiation est de 100 µl. Sa concentration, déterminée par titrage préalable, a été choisie pour qu'il fournisse une CL 90 (concentration létale pour 90 % des larves) pour 25 larves de *Culex pipiens* au stade III lorsqu'il sera repris dans 100 ml d'eau permutée.

L'échantillon a été déposé sur divers supports : une languette de papier filtre, une lame de verre (lame de microscope), une coupelle en porcelaine. Seul ce troisième support a permis d'obtenir des résultats reproductibles et a donc été utilisé pour toutes les expériences dont les résultats seront présentés (§ 6).

Pour éviter l'effet thermique du rayonnement, le support de l'échantillon est maintenu au contact d'une plaque réfrigérée à 16° C. La température de la pièce est enregistrée par un thermographe tout au long de la période d'irradiation. Elle n'a jamais dépassé 25° C.

Le temps d'exposition est fonction des bandes spectrales :

sources U.V. : 100 et 200 minutes

source lumière visible : 24 et 48 heures.

Les témoins sont constitués par des échantillons traités spécialement :

- échantillon non irradié, maintenu à 4° C
- échantillon non irradié, maintenu en conditions d'expérience, recouvert d'une feuille d'aluminium
- échantillon en irradiation directe (absence de filtre).

Autant d'échantillons sont prévus qu'il y a de bandes spectrales à analyser (trois en U.V., huit en lumière visible). Les filtres sont posés sur la coupelle de porcelaine.

A l'issue du temps d'exposition, l'échantillon est repris dans 100 ml d'eau permutée; dans le cas de la suspension de spores, un prélèvement de 2 ml est effectué en vue du comptage du nombre d'unités pouvant former une colonie (ufc). Le test de toxicité est pratiqué sur 25 larves, la lecture est faite après 48 heures de contact. Chaque expérience a fait l'objet d'au moins trois répétitions.

5.3 PURIFICATION DE LA TOXINE DE *B. sphaericus*

L'obtention d'une fraction purifiée de toxine de *B. sphaericus* souche 2362 nécessite :

- une extraction par dissolution en pH alcalin
- une purification de cet extrait brut par chromatographie
- une vérification de la pureté de la fraction choisie, par électrophorèse de protéines.

5.3.1 Extraction - protocole (selon DAVIDSON, 1987)

- agitation pendant trois heures d'1 g de poudre technique (ABG 6184) dans 100 ml de solution NaOH 0,05 M
- centrifugation, 20 mn à 25 000 g, élimination du culot
- le surnageant filtré à 0,45 μ est dialysé une nuit à 4° C contre de l'eau permutée
- centrifugation, 10 mn à 10 000 g, élimination du culot
- précipitation par abaissement du pH à 4, par tampon acétate 1 M, sous agitation
- centrifugation, 30 mn à 25 000 g, élimination du surnageant
- relargage du précipité par solution Tris-NaOH 0,2 M, pH 10 sous un petit volume (4 à 5 ml maximum).

5.3.2 Chromatographie

Des différents procédés chromatographiques possibles, nous avons retenu l'ultrafiltration sur gel de polyacrylamide qui permet d'obtenir une séparation par poids moléculaire (P.M.). Le gel utilisé (Ultrogel AcA 44) exclut les protéines d'un P.M. supérieur à 130 kD. La relation P.M.-

volume d'élution est linéaire entre 130 et 10 kD et permet de déterminer le P.M. des protéines éluées. La colonne a une hauteur de 40 cm et un diamètre de 3 cm, elle présente un volume mort de 20 ml. Le volume des fractions d'élution a été choisi égal à 3 ml.

Le résultat de l'ultra-filtration est suivi par mesure de la densité optique de chaque fraction à 280 nm, bande d'absorption des protéines (fig. II.6). Les fractions donnant lieu à un pic d'absorption sont testées sur larves de *C. pipiens* (100 µl de la fraction dans 5 ml d'eau permutée, 5 larves stade II, lecture à 24 et 48 heures). Les fractions appartenant au même pic et ayant présenté une toxicité sur larves sont regroupées.

5.3.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide : vérification de la pureté de la protéine

L'échantillon a été concentré par dialyse contre du saccharose en poudre. Chaque dépôt correspond à 500 µg de protéines,

Gel d'acrylamide à 7%

Mise en place des échantillons en saccharose à 40 %

Tampon de migration : Tris 0,6 % - glycine 2,9 %

Temps de migration : 2 heures

Témoin de migration : bleu de bromophénol

Fixation : 30 mn en acide trichloracétique à 12,5 %

Révélation : bleu de Coomassie en TCA 0,1 %, durée : une nuit

Décoloration : une nuit à température ambiante en tampon acide acétique 7,5 %, méthanol 5 %.

5.3.4 Immunoélectrophorèse : vérification de l'identité de la protéine

* Préparation : 40 µl d'extrait (contenant 5,1 µg de protéine) sont traités par 15 µl de mélange dissociant (8 % SDS et 40 % Glycérol en tampon Tris HCl 0,5 M à pH 6,8) et 5 µl de bleu de bromophénol (= témoin de migration) ; un mélange de marqueurs de P.M. est préparé dans les mêmes conditions (sérum albumine bovine 68 kD, ovalbumine 43 kD, Dnase 30 kD, cytochrome C 12,4 kD).

* **Electrophorèse** : les échantillons sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide à 12 %, chaque puits correspond à une piste; la migration est réalisée en 5 heures à voltage constant (15 mn à 80 V puis à 180 V). Le gel de polyacrylamide est découpé en deux selon son épaisseur. Une moitié sera colorée au bleu de Coomassie pour servir de témoin de migration. L'autre moitié va servir au transfert.

* **Electrotransfert** : la feuille de polyacrylamide est déposée sur un film de nitrocellulose ; le transfert se fait par champ électrique (30 V, une nuit) en tampon tris glycérine pH 8,3, SDS 0,1 %, méthanol 20 %.

* **Immunodétection** : le gel est découpé afin de séparer les pistes ; celle qui comprend les marqueurs de P.M. est colorée au noir amido ; deux autres bandes sont traitées avec des immunsérums :

bande S : immunsérum de souris anti-toxine brute (protéine native), dilué au 1/1 000^e

bande L : immunsérum de lapin anti-fraction 38 kD de la toxine de *B. sphaericus* souche 2775 (anti-protéine dénaturée), dilué au 1/1000^e.

Un conjugué (IgG de chèvre anti-lapin ou IgG de mouton anti-souris) marqué à la peroxydase est ensuite appliqué. La coloration est révélée par 0,5 % de diaminobenzidine en solution à 0,1 % de peroxyde d'hydrogène.

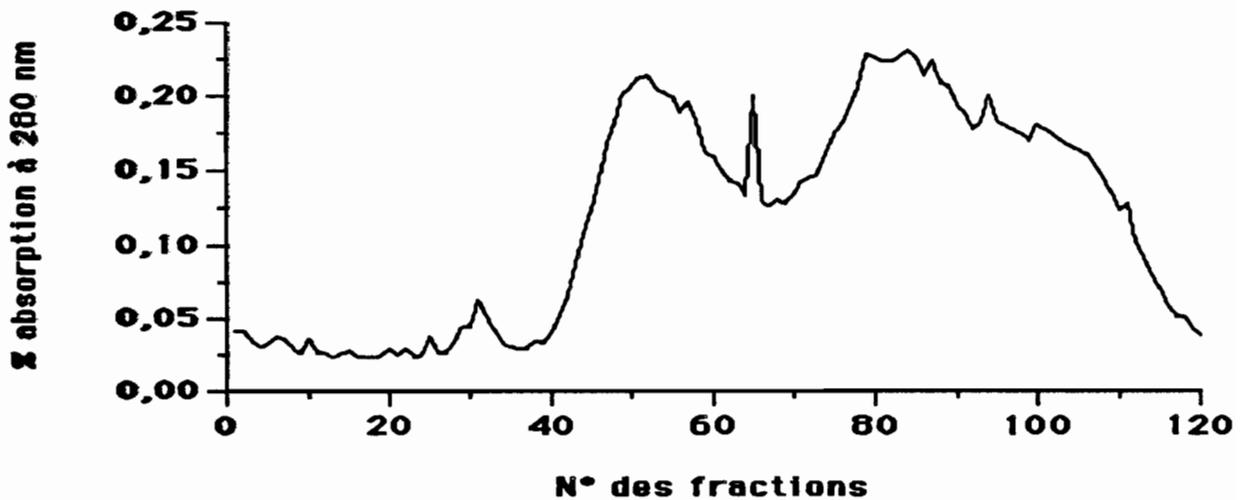
6. RESULTATS

6.1 OBTENTION D'UN EXTRAIT PURIFIE DE TOXINE

6.1.1 Purification par gel-filtration

L'extrait brut est une solution d'une teinte brune. Le résultat de l'élution de cet extrait brut est présenté figure II.6.

FIGURE II.6 : Chromatographie par gel-filtration de l'extrait brut de toxine de *B. sphaericus* (31/03/87).



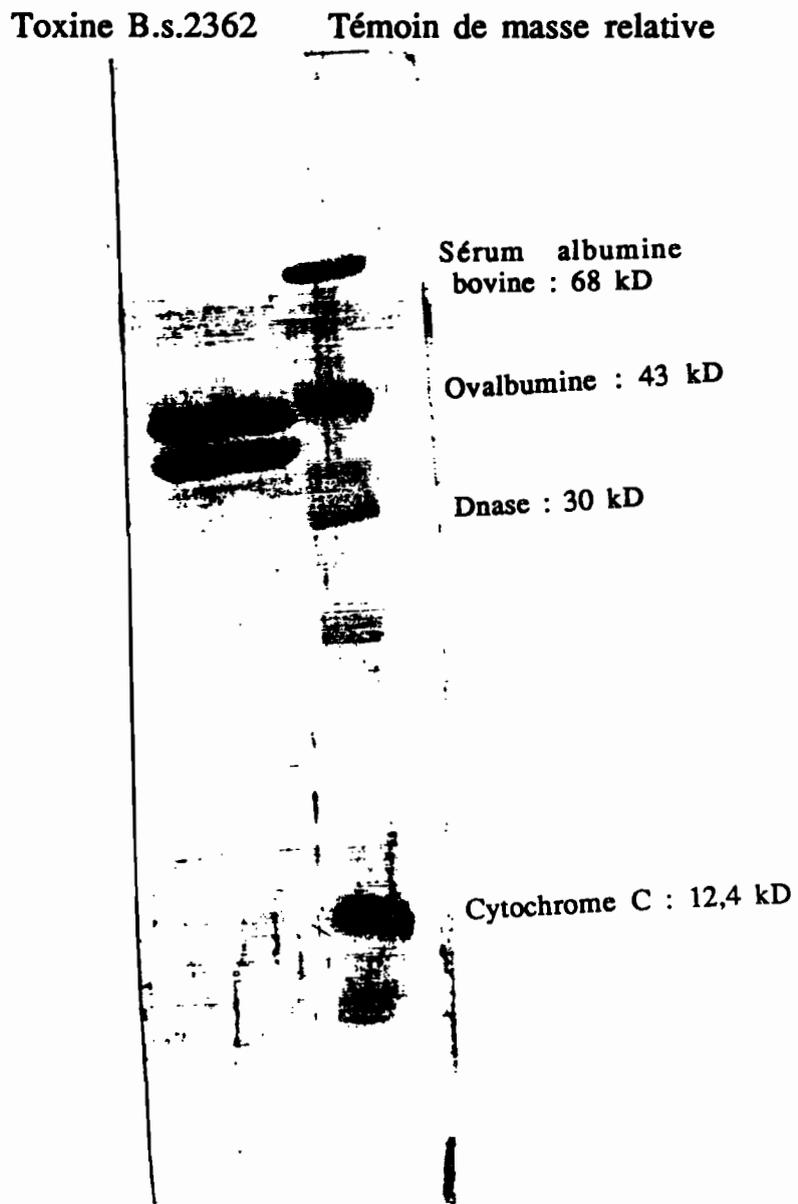
La vérification, sur larves de moustiques, de la toxicité des différents pics a conduit à regrouper les fractions n° 40 à 50. L'échantillon est incolore. Par électrophorèse en gel de polyacrylamide de cet échantillon reconcentré, il apparaît deux bandes majeures rapprochées et une troisième sous forme de traces à migration plus rapide. La comparaison avec les étalons permet de fixer leur P.M. à 43, 38 et 27 kD. Les gels cylindriques de polyacrylamide sont découpés à la hauteur des bandes, chaque disque contenant une des trois bandes est broyé et ajouté à 20 ml d'eau permutée contenant 10 larves de *Culex pipiens* (stade III). Le disque contenant la protéine de 43 kD donne une mortalité larvaire de 8 sur 10 (75 % compte tenu de la mortalité chez le

témoin), le disque correspondant à la protéine de 38 kD conduit à une mortalité larvaire négligeable (13 %). La troisième protéine de l'échantillon présente une toxicité intermédiaire (38 %).

6.1.2 Caractérisation des protéines séparées par gel-filtration

Le gel coloré au bleu de Coomassie montre l'existence de deux protéines dans l'extrait. Une bande se trouve à 43 kD, l'autre à 38 kD. La bande de nitrocellulose colorée au noir amido atteste que les protéines ont été transférées avec succès (figII.7).

FIGURE II.7 : Témoin de transfert et détermination des masses relatives des fractions de toxine de *B. sphaericus* purifiées.



L'examen de la bande S montre l'existence de deux bandes protéiques ayant réagi avec l'anticorps de souris. L'intensité de la réaction est faible. Ceci est vraisemblablement dû au fait que les protéines ont été dénaturées pour une meilleure migration dans le gel de polyacrylamide alors que l'immunsérum a été préparé à partir d'une protéine native. L'examen de la bande L montre l'existence d'une bande protéique unique ayant fortement réagi avec l'immunsérum de lapin anti-toxine de 38 kD de la souche 1593.

A l'analyse de ces résultats, il apparaît que l'extraction et la purification des protéines de *B. sphaericus* fournit deux composés qui correspondent à la protoxine (43 kD) et à un fragment de 38 kD peu toxique. L'origine de la toxine, souche 1593 ou 2362, ne semble pas influencer la qualité de la protéine : l'immunsérum préparé sur lapin est très spécifique de la forme 38 kD, l'immunsérum préparé sur souris est sans aucun doute dirigé contre les deux protéines 43 et 38 kD, la première correspondant très nettement à la fraction la plus toxique.

6.2 IRRADIATION PAR LE RAYONNEMENT ULTRA-VIOLET

6.2.1 Spores de *Bacillus sphaericus*

Dans une première expérience de calibrage, les échantillons

TABLEAU II.4. : essai préliminaire d'irradiation de *B. sphaericus* par rayonnement U.V.

Durée d'irradiation	Nombre de larves mortes (sur 25)	
	100 mn	200 mn
Filtre 1 (U.V.A ⁺)	25	24
Filtre 2 (U.V.A ⁺ B ⁺)	24	21
Filtre 3 (U.V.A ⁺ B ⁺ C ⁺)	25	17
Aucun filtre	11	7
Témoin irradiation nulle :		
à 4° C	20	24
à t° expérience	25	25
Témoin <i>Culex</i>	2	

de spores ont été soumis à l'irradiation simultanée des sources énergétiques à 254 et 366 nm pendant des durées variables, avec ou sans filtre. Les résultats pour 100 et 200 minutes sont présentés dans le tableau II.4 pour des lots de 25 larves.

Suite à cet essai préliminaire, il a été décidé de retenir 100 et 200 minutes d'irradiation. Toutes les expériences suivantes ont été menées avec des sources distinctes à 254, 312 et 366 nm. La toxicité sur 25 larves de *Culex pipiens* par échantillon irradié ainsi que le nombre résiduel d'unités formant une colonie sont présentés dans le tableau II.5.

TABLEAU II.5. : évaluation de la toxicité et de la viabilité de spores de *B. sphaericus* soumises aux rayonnements ultra-violets A, B et C.

	254 nm (C)		312 nm (B)		366 nm (A)	
	Nombre moyen de larves mortes (sur 25)					
		σ		σ		σ
Irradiation:						
100 mn	11,0	4,2	14,5	2,1	14,5	0,7
200 mn	6,5	2,1	6,5	3,5	18,0	1,4
Témoin irradiation nulle						
200 mn à 4° C	23,5	0,7	25	0	22	0
200 mn à t° expérience	23,0	1,4	20,5	6,4	19	0
Témoin Culex	2	1,4	0	0	2	-
	Nombre d'unités formant une colonie dans 100 μ l					
Irradiation:						
100 mn	0	0	> 200	-	156,5	48,8
200 mn	0	0	14	2,8	210	-
Témoin irradiation nulle						
200 mn à 4° C	122,0	2,8	210	-	224	-
200 mn à t° expérience	130,0	3,5	110	35,4	163	-
	Résultats du test (en %)					
Perte de toxicité						
100 mn	43		42		37,5	
200 mn	79		74		20	
Perte de toxicité (*) :						
Témoin 200 mn t° exp.	2		18		15	
Perte de viabilité						
100 mn	100		non apparente		pas de perte	
200 mn	100		87,3		pas de perte	

(*) : la perte de toxicité est référée au témoin conservé à 4° C

6.2.2 Toxine purifiée

Des échantillons des toxines de *B. sphaericus* purifiées par chromatographie (43 + 38 kD) irradiés par différentes bandes spectrales U.V. sont étudiés quant à la persistance de leur caractéristique entomopathogène. Le tableau II.6 présente les résultats de ces expériences.

TABLEAU II.6. : évaluation de la toxicité des protéines 43 et 38 kD associées soumises à des rayonnements ultra-violet A, B et C.

	254 nm (C)		312 nm (B)		366 nm (A)	
	Nombre moyen de larves mortes (sur 25)					
		σ		σ		σ
Irradiation:						
100 mn	19	1,4	15	8,5	18	12,7
200 mn	15	2,8	16,5	2,1	15	1,4
<u>Témoin irradiation nulle</u>						
200 mn à 4° C	21	-	22	-	21	-
200 mn à 1° expérience	19	-	20	-	19	-
<u>Témoin Culex</u>	0	0	0	0	0	0
	Résultats du test (en %)					
Perte de toxicité (*) :						
100 mn	9,5		NS		14,3	
200 mn	28,5		25		28,6	
Perte de toxicité :						
Témoin 200 mn 1° exp.	9,5		9,1		9,5	

(*) la perte de toxicité est référée au témoin conservé à 4° C
NS résultat non significatif

6.3 IRRADIATION PAR LE RAYONNEMENT VISIBLE

6.3.1 Spores de *Bacillus sphaericus*

Plusieurs essais ont été effectués jusqu'à obtention de témoins satisfaisants conférant une valeur de reproductibilité aux résultats. Dans le tableau II.7 sont représentés les résultats de trois tests. Le pourcentage d'inactivation (I) d'un échantillon est obtenu en exprimant

le nombre de larves vivantes dans les lots :

$$I = \frac{(\text{échantillon} - \text{témoin à } 4^{\circ} \text{ C})}{\text{témoin irradiation totale} - \text{témoin à } 4^{\circ} \text{ C}} \times 100$$

TABLEAU II.7 : pourcentages d'inactivation d'une suspension de *Bacillus sphaericus* par différentes bandes spectrales du rayonnement visible (durée d'irradiation : 48 heures).

Filtre	λ absorbé jusqu'à	λ transmises à > 50 %	Perte de toxicité (en %)				
			Test 1	Test 2	Test 3	moyenne	σ
Bleu sans marque	290	≥ 300	96	100	83	93	9
Blanc sans marque	300	≥ 320	64	67	79	70	8
Bleu Hoya	320	≥ 340	76	57	87	73	15
Orange Hoya	360	≥ 400	64	66	50	60	9
Vert vivitar	440	≥ 470	32	100	66	66	34
Jaune kenko	460	≥ 475	20	70	50	47	25
Orange vivitar	500	≥ 560	16	46	50	37	18
Rouge kenko	580	≥ 595	36	81	75	64	24
Aucun filtre	310	≥ 310	100	100	100	100	0
Irradiation nulle :							
1 ^o expérience	–	–	28	0	0	9	16
4 ^o C	–	–	0	0	0	0	0

6.3.2 Toxine purifiée

Des échantillons formés des protéines 43 et 38 kD associées, purifiées par chromatographie ont été soumis au rayonnement visible ; la toxicité résiduelle, établie sur larves de *Culex pipiens* est portée dans le tableau II.8.

TABLEAU II.8 : effet de l'irradiation par l'énergie visible d'un échantillon de toxine de *B. sphaericus* purifiée par gel-filtration.

	visible (350 à 700 nm)	
	nombre moyen de larves mortes (sur 25)	
		σ
<u>Aucun filtre :</u>		
Irradiation 24 h	24	1,4
48 h	25	0
<u>Témoin irradiation nulle :</u>		
48 h à 4° C	24	—
48 h à t° exp.	20	—
<u>Témoin <i>Culex</i></u>	1	—
	Résultats du test (en %)	
<u>Perte de toxicité (*) :</u>		
24 h	0	
48 h	0	
<u>Perte de toxicité :</u>		
Témoin 48 h t° exp.	6,7	

(*) la perte de toxicité est référée au témoin conservé à 4°C.

6.4 ANALYSE DES RESULTATS

6.4.1 Rayonnement ultra-violet

* Viabilité

Le pouvoir bactéricide des rayons ultra-violets d'une longueur d'onde encadrant 254 nm est très largement exploité en bactériologie. Les résultats obtenus sur les spores de *B. sphaericus* (tableau II.5) sont en conformité avec cette caractéristique. Dans les conditions de l'expérience, 100 minutes d'irradiation entraînent une inactivation totale. Avec une source énergétique émettant dans la gamme des U.V.B (312 nm) une certaine inactivation se manifeste lorsque la période d'exposition atteint 200 mn. Il ne semble pas que ceci corresponde à un phénomène retenu par les bactériologistes ; il n'est pas exclu qu'une émission résiduelle de plus courte longueur d'onde soit à l'origine de ce résultat, en effet lorsqu'on interpose le filtre n° 2 (U.V.A+B+) la perte de

viabilité en 200 mn n'est plus que de 15 %. Dans la gamme U.V.A (366 nm), en 200 minutes, on n'obtient pas de réduction de la viabilité.

* Toxicité

L'action des rayons ultra-violetes sur le pouvoir entomopathogène de *B. sphaericus* est mise en évidence mais il faut rappeler à cette occasion que la gamme des longueurs d'onde inactivantes (effet croissant en fonction du temps) est située dans la partie du spectre qui n'atteint pas la surface terrestre ou en quantité infime puisqu'elle est arrêtée par l'ozone (≤ 312 nm). Les U.V.A émis par la source 366 nm sont nettement moins inactivants. Nous nous situons à la limite du rayonnement visible et nous verrons plus loin qu'il y a lieu de moduler ces observations par le facteur temps.

Lorsque la toxine extraite de la spore bactérienne est soumise aux mêmes irradiations, sa stabilité peut être mise en évidence. Les résultats présentés dans le tableau II.6 indiquent une légère perte de toxicité, de l'ordre de 10 %, due aux conditions expérimentales, alors que la perte enregistrée après 200 minutes d'irradiation (25 à 28 %) semble indépendante de la longueur d'onde incidente.

6.4.2 Rayonnement visible

Les spores de *B. sphaericus* sont exposées 48 heures sous divers filtres à une source énergétique émettant dans les bandes spectrales visibles (lampe halogène). Leur perte de toxicité est fonction décroissante de la longueur d'onde qu'elles ont reçu jusqu'à un zone située vers 560 nm (tableau II.7). Les moyennes de perte de toxicité obtenues sous différents filtres pour trois essais font apparaître trois zones.

* Filtres "bleu sans marque", "blanc sans marque" et "bleu Hoya" (figure II.5a) : la perte de toxicité est élevée (> 70%) surtout avec le premier filtre bleu qui transmet une quantité non négligeable de rayonnement ≤ 312 nm (près de 25%).

* Filtres "vert Vivitar", "jaune Kenko" et "orange Vivitar" (figure II.5b et II.5c) : à mesure que la bande spectrale transmise se situe dans

les grandes longueurs d'onde, l'inactivation du pouvoir pathogène de *B. sphaericus* diminue (66 à 37 %).

* Filtre "rouge Kenko" (figure II.5c) : l'énergie admise sur l'échantillon, avec ce filtre, a une longueur d'onde supérieure à 580 nm; la perte de toxicité est en nette augmentation dès que les spores ne reçoivent plus le rayonnement compris entre 560 et 580 nm. L'absence de cette bande spectrale provoque une plus forte inactivation de la toxine, c'est-à-dire qu'elle comporte une radiation dont la longueur d'onde est protectrice ou restauratrice des molécules photoinactivées.

Deux phénomènes antagonistes peuvent donc être mis en évidence par cette expérience : une action inactivatrice du rayonnement U.V., surtout les U.V.B (vers 310 nm), sur la toxicité des spores de *B. sphaericus* et une restauration des propriétés des protéines photoinactivées par les rayonnements de la bande spectrale située entre 560 et 580 nm.

Comme il avait déjà été noté pour le rayonnement ultra-violet, la toxine purifiée ne semble pas altérée par le rayonnement visible. Nous n'avons obtenu aucune perte de toxicité après 48 h d'irradiation par énergie visible (spectre complet, sans filtres). Le pouvoir d'absorber les énergies restauratrices revient donc à une substance photophore qui serait présente dans la spore.

7. DISCUSSION

Si l'on fait la synthèse des nombreux travaux qui tentent d'apporter un éclaircissement au problème de l'inactivation des bactéries entomopathogènes par les rayonnements, la disparité des résultats n'est qu'apparente. En effet, ils peuvent être regroupés selon la bande spectrale utilisée par les différents auteurs : le rayonnement solaire ($\lambda > 290$ nm) ou les U.V.C et rayons γ qui n'atteignent pas la surface terrestre.

Toutes les études conduites avec un rayonnement d'une longueur d'onde inférieure à 290 nm, toutes souches confondues et quelles que soient la durée ou l'intensité de l'irradiation, concluent à l'inactivation de

la spore avec conservation de ses qualités toxiques (BURGES *et al.*, 1975 ; GOLDBERG et MARGALIT, 1977 ; BURKE *et al.*, 1983). Seuls LACEY et SMITTLE (1985) indiquent une légère perte d'activité larvicide pour *B. thuringiensis* H-14 à de très fortes irradiations γ .

Par contre, les études menées en conditions d'ensoleillement naturel ou simulé mettent en évidence une diminution de la viabilité des spores accompagnée d'une chute ou d'une perte de leur toxicité (FRYE *et al.*, 1973 ; MULLIGAN *et al.*, 1980 ; ISHIGURO et MIYAZONO, 1982). Il semble que les deux processus ne soient pas directement liés et que leur cinétique soit plus lente que dans le cas de l'altération par les U.V.C ou le rayonnement gamma. L'énergie d'un rayonnement étant inversement proportionnelle à la quatrième puissance de sa longueur d'onde, ceci peut être un facteur influençant les vitesses des réactions biochimiques impliquées.

Le processus chimique des altérations enzymatiques par irradiation est encore mal élucidé alors qu'il est prouvé que les acides nucléiques sont le siège de mutations sous l'effet des U.V.C ($\lambda < 290$ nm) et que le mécanisme mutagène est connu. L'inactivation photochimique des enzymes pourrait être provoquée par l'absorption directe d'énergie U.V. par les acides aminés aromatiques ou par l'intervention d'une substance pigmentée (ou chromophore) transporteuse d'électrons ou productrice d'oxygène naissant (O^{\cdot}).

L'effet inactivant des U.V. est mis en évidence par FARGUES *et al.* (1988) qui démontrent l'intervention des U.V.A (320 à 400 nm) et des U.V.B (290 à 320 nm). Ils suggèrent également une intervention du rayonnement visible dans ce processus sans définir les bandes spectrales impliquées.

Le spectre Raman du cristal d'endotoxine de *B. t. kurstaki* a été étudié par POZSGAY *et al.* (1987) avant et après 40 heures d'exposition au rayonnement solaire. Les auteurs démontrent, par l'analyse du spectre émis, que l'irradiation a provoqué la destruction des noyaux indoles dans les chaînes latérales du tryptophane. Une photolyse directe consécutive à l'absorption d'un photon semble hautement improbable (λ abs Trp < 290).

Ceci suggère que la toxine pure n'est pas le récepteur du rayonnement inactivant. Le mécanisme de photosensibilisation supposé implique l'existence d'un chromophore, qui n'a pas été identifié, mais qui serait lié à la toxine de manière non covalente.

Les expériences d'irradiation des fractions toxiques (43 et 38 kD) de *B. sphaericus* conduisent à la même conclusion à savoir que la toxine pure est photostable. Rappelons que la fraction colorée (couleur rouille) est très nettement séparée de la fraction toxique par chromatographie (gel filtration).

Les spores de *B. thuringiensis* présentent également des pics d'absorption à 330 et 400 nm (GRIEGO et SPENCE, 1978) alors que le cristal purifié absorbe à 273 nm (MORRIS, 1983), énergie qui n'atteint pas la surface terrestre.

Afin de maintenir les potentialités des bactérie entomopathogènes, des techniques de protection contre les U.V. ont été proposées. Elles font appel à l'encapsulation, à l'addition de granules d'argile (RAUM et JACKSON, 1966) ou de composés chimiques absorbeurs d'U.V. (JAQUES, 1972). Ces divers procédés n'ont pas trouvé d'application en raison de l'impossibilité de les utiliser à grande échelle.

MORRIS (1983) fait une étude de l'action des U.V. sur *B. thuringiensis* et propose diverses formules protectrices dans la gamme 250 à 380 nm. Celles-ci comprennent notamment des hydrates de carbone (mélasse, peptone, carboxyméthyl cellulose), des extraits de levure et des substances colorées dont certaines commercialisées pour adjonction aux produits cosmétiques (cyasorb, Brilliant sulfoflavine, blancofor, Erio Acid Red XB 100, Erio Yellow, Maximillian Brilliant Pink and Maximillian Brilliant Flavine, benzyl cinnamate, benzophenone). La plupart de ces formules ont une absorbance (capacité d'absorption) maximale à 282 et à 330 ou 340 nm, certaines présentent également un pic dans le visible. Avec chacune d'entre elles, une protection significative de la viabilité des spores est obtenue en raison de l'arrêt des U.V.A et B.

L'activité insecticide résiduelle de *B. thuringiensis* combiné à diverses formules bien que meilleure dans plusieurs essais n'a été satisfaisante (7 jours d'efficacité contre un pour le témoin) qu'avec une formule assez complexe (*B. thuringiensis* + Uvinul DS 49* 1 % + Erio Acid Red** 0,1 % + mélasse 10 %). Les pics d'absorption de ce mélange sont situés à 282, 330, 400 et 564 nm. L'auteur fait remarquer que ce résultat s'accompagne de l'absence de prolifération de la bactérie dans le processus de pathogénicité, ce qui conduit à l'hypothèse que la protection obtenue s'applique au maintien des qualités de la seule toxine.

Ces résultats, complétés par notre observation apportent un élément original : l'intervention de la bande spectrale de 560 à 580 nm dans un processus protecteur ou restaurateur des molécules photoinactivées. Il est tout à fait intéressant de constater que MORRIS (1983) obtient un excellent maintien de la toxicité de *B. thuringiensis* par l'adjonction d'une substance absorbant à 564 nm (EAR). Nous n'avons pas été en mesure d'approfondir le mécanisme biochimique impliqué mais il est indéniablement important que par deux approches différentes et sur deux *Bacillus* entomopathogènes différents, l'intérêt de la bande spectrale 560-580 nm soit confirmée. De plus, l'intervention du photophore présent dans la cellule pourrait être potentialisé par un photophore extérieur à celle-ci comme le montre l'adjonction de EAR. Nous pensons qu'il y a lieu d'approfondir cette analyse dans le but d'améliorer la persistance de *B. thuringiensis* et de *B. sphaericus* en milieu naturel en tenant compte de ce que les rayons U.V. sont peu absorbés par l'eau et pénètrent donc plus profondément l'élément liquide (voir § 5).

* Uvinul DS 49 : Sodium 2,2' -dihydroxy -4,4' -dimethoxy -5- sulfobenzophenone

** Erio Acid Red = EAR
sel de sodium de l'acide formyl -m-benzènedisulfonique

CHAPITRE III -

FACTEURS BIOTIQUES IMPLIQUES DANS LE POTENTIEL DE RECYCLAGE DE *B. SPHAERICUS*

1. INTRODUCTION

Dans un nombre croissant de programmes de lutte contre les insectes ravageurs, vulnérants tant dans le domaine agricole que dans celui de la santé, on ne dispose plus d'insecticides suffisamment actifs à des doses acceptables, que ce soit sur le plan économique ou en termes de sécurité pour l'environnement. Une des solutions de remplacement déjà évoquées précédemment consiste en l'utilisation de *B. sphaericus*. Pour qu'un agent bactérien puisse se substituer à des produits largement commercialisés, il doit présenter des avantages incontestables. Les qualités qui permettraient à *B. sphaericus* de s'imposer sont la persistance de sa toxicité et son pouvoir de recyclage. Ces deux propriétés sont fonction d'un certain nombre de paramètres que nous allons tenter de cerner.

Dans la littérature consacrée à *B. sphaericus*, les notions d'efficacité, de persistance et de recyclage sont souvent confuses. Les définitions que nous adopterons diffèrent légèrement de celles de MULLA *et al.* (1984) et nous distinguerons :

L'efficacité (ou activité initiale) d'une souche ou d'une formulation qui exprime une valeur presque instantanée, un pourcentage de mortalité par rapport au témoin, dès que l'effet du produit se manifeste (48 heures pour *B. sphaericus*); l'efficacité est totale si 100 % des larves mises en contact avec l'échantillon meurent à la concentration choisie. Ce paramètre doit permettre les comparaisons d'échantillons ou de traitements appliqués dans des conditions identiques (standard de laboratoire par exemple).

La persistance ou rémanence, qui exprime la durabilité de l'effet de toxicité du produit. Après un traitement ayant détruit complètement une population de moustiques, celle-ci réapparaîtra à partir de nouvelles pontes. Aussi longtemps que la toxicité sera suffisante dans le milieu, aucune émergence d'adulte ne pourra se produire, même s'il y a des éclosions et si l'on observe de jeunes stades larvaires dont la durée de vie est inférieure au temps d'action du larvicide. La notion de persistance doit être placée dans un contexte dynamique des conditions de l'environnement.

Le recyclage est un phénomène dont la manifestation est différée. Il est le fait d'un processus lié à la vie de l'agent bactérien et implique une transformation de la spore en cellule végétative ou germination, et, après une ou plusieurs divisions cellulaires, la néoformation d'une spore présentant les mêmes caractéristiques de toxicité que la cellule du départ.

Chacune des trois caractéristiques ainsi définies est l'objet d'une évaluation et de comparaisons multiples dans la littérature. Les facteurs de variabilité sont nombreux. Tous ne sont pas clairement explicités à ce jour. Le recyclage en particulier est fort mal compris.

Dans la bibliographie qui traite de la lutte par insecticides chimiques, les conclusions portent essentiellement sur l'efficacité du traitement, éventuellement sur sa persistance; l'autre volet, l'impact du produit sur la faune non cible, est souvent minimisé, s'il n'est pas complètement absent. Lorsque ce problème est évoqué, c'est en terme d'abondance de quelques espèces, relativement à un témoin. La dynamique de la reconstitution du milieu n'est généralement pas étudiée. La richesse et la variabilité des communautés trouvées en association avec les populations de moustiques sont sans conteste la cause de cette déficience.

Nous attacherons, dans ce chapitre, une importance particulière au rôle des espèces syntrophiques des espèces cibles de *B. sphaericus*.

1.1 PERSISTANCE

Alors que l'on attend des insecticides chimiques, peu sélectifs et souvent toxiques pour les vertébrés, qu'ils subsistent très peu de temps dans les milieux naturels, la tendance s'inverse lorsqu'il s'agit d'agents biologiques que leur spécificité rend précisément inoffensifs pour les espèces syntrophiques de la cible.

La rémanence de *B. sphaericus* dans la zone de nutrition des larves est variable selon la souche mais en règle générale elle est plus longue que celle de *B. thuringiensis* suite à la différence de vitesse de sédimentation de la matière active. Plusieurs auteurs en font l'évaluation (GUILLET *et al.*, 1980 ; DAVIDSON *et al.*, 1984 ; HORNBY *et al.*, 1984 ; HOUGARD *et al.*, 1985 ; KARCH et HOUGARD, 1986). Cette observation est à mettre en relation avec la particularité du lien qui unit spore et toxine dans les deux cas : dissociation des deux entités à l'issue de la sporulation chez *B. thuringiensis* et conservation du complexe spore-cristal chez *B. sphaericus*.

Les résultats de ces expérimentations conduisent à la conclusion que pour être efficace, la matière active de *B. sphaericus* doit être présente dans la zone de nutrition des larves, et qu'elle doit être ingérée par ces larves en quantité suffisante pour provoquer les désordres physiologiques entraînant les lésions létales. Ceci implique que le traitement des gîtes tienne compte, entre autres facteurs, de la quantité de matière particulaire et de la flore microbienne susceptibles de jouer un rôle compétitif dans la nutrition des larves.

En conditions expérimentales (eau de ville ou eau pure), le nombre de 100 à 500 spores/ml est généralement cité comme le seuil de létalité d'une formulation (MULLA *et al.*, 1984 bis ; NICOLAS *et al.*, 1987). Le degré de pollution des eaux est un élément défavorable en ce sens qu'il nécessite d'augmenter la concentration de *B. sphaericus* pour obtenir une même efficacité. Ce faisant, plusieurs auteurs observent une rémanence prolongée (MULLIGAN *et al.*, 1980 ; HOUGARD, 1986). Malgré les essais expérimentaux annonçant des rémanences prometteuses, il est à noter que d'un point de vue opérationnel, SINEGRE (1985) souligne que la formulation commerciale qu'il a testée en bassin de lagunage (souche

2362), cas de pollution élevée, à raison de 1 l/ha, bien que présentant une efficacité résiduelle de plusieurs jours ne permet pas de surseoir aux traitements hebdomadaires. Une remarque de cet auteur apporte un élément de réflexion important concernant l'appréciation de la rémanence : "il est bien évident que si les applications de *B. sphaericus* sont réalisées dans des biotopes fermés ou présentant des possibilités de réinvasion très faibles, on peut observer des "efficacités résiduelles" de plusieurs mois qui ne correspondent en rien à une persistance du principe actif dans l'eau" (SINEGRE, 1985). Il observe également que "des applications répétées ne semblent pas cumuler leurs effets très significativement" (SINEGRE, comm. pers.). Nous reprendrons ces deux points et tâcherons de les préciser.

Dans une étude publiée en 1984 (bis), MULLA *et al.* comparent deux souches (1593 et 2362) de *B. sphaericus* appliquées dans des conditions légèrement différentes quant à la qualité de l'eau (eau de ville, pH 8,2, absence de végétation et eau artésienne, pH 9,4, couverte de végétation). Bien que les couvertures végétales ne soient pas identiques, et que la qualité de l'ombrage obtenu ne soit pas précisée, les résultats sont fort peu différents. Ils sont exprimés en pourcentage de réduction de la population culicidienne en fonction du temps. Les observations sont interrompues après 14 jours lorsque la population de *Culex tarsalis* se reconstitue.

Avec ce travail de cette équipe (MULLA *et al.*, 1984 bis), nous abordons le problème de la végétation et du rôle protecteur qu'elle peut présenter pour *B. sphaericus* vis-à-vis du rayonnement solaire (radiation ou échauffement). A la fin de cette observation les mares ont été vidées par évaporation naturelle (DAVIDSON *et al.*, 1984). Après cinq mois de dessiccation complète, elles ont été remises en eau (en octobre). Au cours de l'été californien, l'insolation est élevée et si la température de l'air atteint 49° C, la température de surface du lit des mares peut avoir régulièrement dépassé 60° C. L'efficacité de *B. sphaericus* soumis à ces conditions s'est révélée nulle. Les boues (dont la quantité n'est pas précisée) ne peuvent avoir eu un rôle protecteur et les populations culicidiennes se sont abondamment développées lors de la remise en eau. Il s'agit ici de conditions extrêmes mais non inhabituelles en régions

tempérées chaudes ou tropicales sèches. Dans le cas décrit par HERTLEIN *et al.* (1979), la remise en eau périodique et l'humidité permanente des boues profondes confèrent au milieu des propriétés permettant le maintien de la viabilité. Quant à la toxicité de ces bactéries elle peut fortement baisser ou même disparaître. Ceci a été clairement mis en évidence par KARCH et CHARLES (1987) qui observent quatre semaines après épandage de *B. sphaericus*, la perte d'efficacité larvicide d'un échantillon prélevé sur le fond du gîte bien qu'il contienne des spores viables dont l'image, obtenue par microscopie électronique, montre la disparition des inclusions cristallines initialement associées dans le complexe spore-cristal. Nous verrons qu'il s'agit là d'une observation d'une importance majeure dans l'étude des possibilités de recyclage.

1.2 RECYCLAGE DE *B. SPHAERICUS*

Il est indéniable qu'un pathogène anticulicidien qui pourrait se maintenir dans le milieu aquatique et exercer son action de manière permanente permettrait d'exercer en continu une pression sur la population larvaire. A la limite, le nombre de traitements se limiterait à une seule application, en début de saison par exemple. *B. sphaericus* est l'un des pathogènes de Culicidae qui ouvrent des perspectives dans ce sens. Dans l'état actuel de nos connaissances, nous sommes encore loin de maîtriser tous les facteurs qui favorisent le renouvellement de l'agent par multiplication naturelle, le "recyclage" défini par HERTLEIN *et al.* (1979). Il n'existe pas d'autre exemple d'efficacité durable d'un recyclage naturel que celui décrit dans ce chapitre (KARCH. *et al.*, 1988) bien que la possibilité de recyclage que présenterait *B. sphaericus* ait été évaluée dans des conditions variées par plusieurs équipes.

Les résultats disponibles à ce jour sont quelquefois contradictoires et reflètent comme dans d'autres domaines le scepticisme ou l'optimisme de leurs auteurs. HERTLEIN *et al.* signalent dès 1979 la possibilité que présente *B. sphaericus* de se recycler dans un fossé. Cette hypothèse ne fait pas toujours l'unanimité et certaines études (DAVIDSON *et al.*, 1984 ; MULLA *et al.*, 1984) dans des conditions d'environnement différentes

(eaux claires) indiquent qu'il n'y a pas de persistance significative ou de recyclage lors de la remise en eau de mares asséchées cinq mois et exposées à des conditions climatiques assez drastiques. Par contre, si une population de *Culex* sp. est à même de se renouveler par réinvasion dans une eau naturelle chargée de matières organiques telles que le sont souvent les gîtes à *Culex* sp., le recyclage de *B. sphaericus* deviendrait possible. L'expérience réalisée par SILAPANUNTAKUL *et al.* (1983) est la première approche positive de ce phénomène. D'après les observations de ces auteurs, absence de recyclage par *Aedes aegypti*, seuls les *Culex* sp. peuvent apporter un facteur d'amplification tel que le recyclage puisse se produire. La germination des spores de *B. sphaericus* dans le tube digestif des *Culex* est suivie d'une période de multiplication végétative exponentielle qui prend fin, lorsque les conditions sont moins favorables notamment à la mort de la larve, par l'apparition de spores d'une nouvelle génération. Ce processus a été décrit par plusieurs auteurs dans différentes conditions expérimentales (DAVIDSON *et al.*, 1984 ; DES ROCHER et GARCIA, 1984 ; KARCH et COZ, 1985 ; NICOLAS et DOSSOU-YOVO, 1987 ; CHARLES et NICOLAS, 1986).

La sporulation de *B. sphaericus* dans les cadavres de larves est manifeste 36 à 48 h après le début de l'ingestion. Elle culmine à 96 h. L'amplification de la quantité totale de bactéries, si l'on fait le rapport de la quantité de spores produites à la quantité ingérée, est d'environ 10 fois et ceci est à mettre en relation avec le temps de génération de *B. sphaericus* qui est de l'ordre de 20 h ($2^3 = 8$ fois).

La quantité initiale d'unités de *B. sphaericus* ingérées est fonction de leur concentration et de la présence éventuelle d'autres particules dans le milieu. L'augmentation globale du nombre de bactéries larvicides dans le biotope du fait des larves cibles est donc en relation avec la densité de la population larvaire.

Les différents exemples repris dans le tableau III.1 illustrent la variabilité des résultats que l'on peut rencontrer dans la littérature qui traite du recyclage de *B. sphaericus* dans des larves de *Culex* sp. Très peu de travaux par contre abordent l'évaluation de la quantité totale de *B. sphaericus* dans un milieu naturel. Celle-ci est sans conteste sous la

dépendance d'un grand nombre de paramètres. SILAPANUNTAKUL *et al* (1983) avaient suggéré le rôle joué par la qualité de l'eau. DAVIDSON *et al.* (1984) ne fournissent comme valeurs expérimentales que le nombre de spores (après pasteurisation de l'échantillon). Il n'est pas possible de déduire de leur chiffre s'il y a ou

TABLEAU III.1 : comparaison de quelques données expérimentales indiquant le nombre d'unités de *B. sphaericus* que peuvent ingérer des larves de *Culex* sp. en fonction des traitements appliqués.

quantité cfu/ml dans le milieu	milieu	quantité ingérée pour la mesure initiale		nombre cfu/larve à 96 h	référence
			temps initial		
100 000 spores/ml souche 1593	eau de ville	400 000	15 mn	1 000 000	Davidson <i>et al.</i> 1984
0,1 lb/acre = 112g/ha/0,3 ≈ 3 000 cfu/ml souche 1593	gîte expérimental	9 000	4 h	90 000	ibidem
0,2 lb/acre ≈ 6 000 cfu/ml souche 1593	gîte expérimental	9 000	4 h	1 200 000	ibidem
0,1 lb/acre ≈ 3 200 cfu/ml souche 2362	gîte expérimental	2 000	4 h	150 000	ibidem
0,2 lb/acre ≈ 6 400 cfu/ml souche 2362	gîte expérimental	8 000	4 h	800 000	ibidem
0,02 mg/l souche 1593-4	eau distillée	30 000 100 000	1/2 h 2 h	à 72 h 1 000 000	Karch et Coz, 1986
1 500 000 spores/ml souche 2362	eau déméralisée	15 000	1/2 h	à 72 h contact interrompu après 30 mn 250 000	Charles et Nicolas, 1986
0,1 mg/l 9,5.10 ⁷ spores/mg ≈ 10 000 cfu/ml souche 2362	eau permutée	10 000 12 000	1 h 2 h	à 72 h 50 000	Karch, Monteny, Toneatti et Coz, 1988

non présence de cellules végétatives en évolution dans le milieu. Un résultat (dans leur figure) cependant pourrait le suggérer : trois semaines après un traitement avec la souche 2362, la quantité totale de spores retrouvée dans les boues du fond du gîte a doublé en une semaine (alors

que les valeurs pour les autres gîtes sont à peu près constantes). En l'absence de précisions sur les conditions de l'environnement (à part le minimum et le maximum de température de l'eau en avril) il n'est pas possible d'en déduire la signification ; il pourrait s'agir d'un enrichissement dû à la prolifération de *B. sphaericus* dans les cadavres de larves de *C. tarsalis*. Alors que les auteurs ne retiennent pas cette hypothèse, ceci va dans le sens de la conclusion de DES ROCHER et GARCIA (1984) qui montrent que *B. sphaericus* prolifère dans les cadavres de larves et est ensuite relargué dans le milieu aquatique lorsque ceux-ci se désagrègent.

Dès lors que l'existence de ce processus a été prouvée, il convient d'essayer de le comprendre et de trouver le parti que l'on peut en tirer. C'est ce vers quoi va tendre notre analyse.

1.3 RECYCLAGE ET FAUNE AQUATIQUE

Les différentes études tendant à prouver le recyclage de *B. sphaericus* consistent plutôt en des observations d'une prolongation de l'efficacité, laquelle est mise en rapport avec la qualité de l'eau dont la charge organique aurait un effet protecteur par effet écran-U.V. (HORNBY *et al.*, 1984). MULLIGAN *et al.* (1980) cependant trouvent que les matières en suspension réduisent l'activité larvicide de *B. sphaericus* (1593). On retrouve là la confusion entre efficacité et persistance de la toxicité. Ces auteurs obtiennent une limitation des populations successives de jeunes larves par brassage mécanique de l'eau qui a pour effet de remettre en suspension les spores qui avaient sédimenté.

Sachant, grâce aux travaux déjà cités précédemment (DAVIDSON *et al.*, 1984, SILAPANUNTAKUL *et al.*, 1983, KARCH et COZ, 1986, CHARLES et NICOLAS, 1986), la possibilité d'amplification du nombre de spores ingérées par les *Culex* sp. , il convient de se poser la question du rôle que pourraient jouer dans le processus de recyclage les autres espèces que l'on rencontre dans le milieu aquatique. Curieusement, les divers auteurs qui se sont intéressés à la faune non cible ne l'ont fait que pour apprécier la toxicité de *B. sphaericus* sur elle.

Les organismes qui partagent le niveau trophique des larves de *Culex pipiens* peuvent indirectement affecter la survie du moustique de différentes manières. Ils peuvent réduire l'effet de la bactérie pathogène en la consommant, entrer en compétition avec *Culex* pour la nourriture et servir également de proie à ses prédateurs. Peu d'études sont menées jusqu'à présent sur l'importance de ces organismes syntrophiques sur la survie et le développement des populations de moustiques alors qu'ils peuvent avoir un effet non négligeable en termes de lutte biologique. Nous essayerons d'apporter des précisions sur leur participation à la dynamique de *B. sphaericus* en milieu naturel.

2. MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES

2.1 ESPECE ELEVEE EN LABORATOIRE

**Culex pipiens* Linné 1758.

La souche élevée en laboratoire est originaire de la région de Montpellier. Elle est entretenue depuis plusieurs années en nourrissant les larves avec une poudre obtenue par broyage et tamisage de granulés pour souris. L'espèce possédant le caractère d'autogénie, les adultes ne sont nourris que d'eau glucosée à 10 %. En cas de baisse de production de l'élevage un repas sanguin sur poule est fourni aux femelles mais un enrichissement protéique apporté aux larves sous forme de jaune d'oeuf a pratiquement fait disparaître cette contrainte.

Les tests de sensibilité ainsi que de comportement alimentaire vis-à-vis de *B. sphaericus* sont pratiqués avec des larves au stade III. Les lots comportent toujours 25 larves placées dans des suspensions de *B. sphaericus* en eau bipermutée.

2.2 ESPECES SAUVAGES

Des expériences sur le comportement alimentaire d'espèces sauvages vis-à-vis de *B. sphaericus* ont été pratiquées sur quatre espèces. Ces dernières ont été récoltées dans les gîtes à *Culex pipiens* en l'absence

de tout traitement larvicide. Les lots étaient constitués de 10 individus, immédiatement ou au plus tard dans la demi-journée qui a suivi leur récolte. Les lots témoins étaient au minimum au nombre de deux.

**Culiseta annulata* : culicidé que l'on trouve souvent dans les mêmes gîtes que *Culex pipiens* en région tempérée. Ses larves possèdent des habitudes alimentaires et une zone d'activité très voisines de celles de *C. pipiens*. Elles étaient cependant moins abondantes que celles de *C. pipiens* dans les gîtes où nous les avons récoltées (juillet 87, BONDY).

**Chironomus plumosus* : culicidé dont la larve vit et se nourrit sur le fond du gîte, de débris végétaux. Elle tire l'essentiel de son alimentation de la microflore bactérienne (MOUREAU, comm. pers.)

**Daphnia pulex* : crustacé cladocère se nourrissant d'algues planctoniques et de déchets organiques en suspension dans l'eau.

**Cypris reticulata* : crustacé ostracode très abondant dans certains gîtes à *C. pipiens*. Il ne semble pas y avoir d'interaction entre ces deux populations.

Les déplacements incessants de ces deux représentants de la classe des crustacés et leur type d'alimentation (par filtration) en font des éléments actifs pour la dispersion d'un agent bactérien si toutefois ce dernier ne présente pas d'action pathogène à leur égard.

2.3 SOUCHES DE *B. SPHAERICUS*

* souche 1593-4 : poudre lyophilisée (Institut Pasteur, Paris), utilisée en juillet 1983 dans un gîte semi-naturel, en dose unique de 160 mg/m². La suspension bactérienne a été projetée à la surface de l'eau à l'aide d'un asperseur (150 ml/ mn).

* souche 2362 poudre lyophilisée contenant 9,5 10¹⁰ spores/g (ABG 6184, Abbott laboratories, USA), utilisée dans les essais de comportement alimentaire, en laboratoire, mise en suspension en eau distillée

* souche 2362 : formulation commerciale (Vectolex[®] - Abbott laboratories, USA) contenant $1,2 \cdot 10^9$ spores/ml, utilisée en traitement des gîtes larvaires à une concentration finale de 4 l/ha (soit $4,8 \cdot 10^{12}$ spores/ha). La suspension est distribuée à l'aide d'un applicateur sous pression sur le pourtour du gîte larvaire, jusqu'à environ deux mètres du bord.

2.4 GITES LARVAIRES

2.4.1 REGION PARISIENNE (Centre ORSTOM, Bondy)

Mare témoin (A) : l'apparition de la population naturelle de *C. pipiens* est observée en chaque début de saison dans une mare témoin, située à une centaine de mètres de toute mare expérimentale, et n'ayant jamais fait l'objet d'aucun traitement insecticide. D'une profondeur de 20 à 30 cm et d'une superficie de 12 m² environ, elle est mise en eau (eau de ville) au début du printemps. Partiellement ombragée, elle est très rapidement envahie de débris végétaux et colonisée par de nombreuses espèces animales.

Mare expérimentale (B) : installée dans une jachère en tenant compte des critères considérés comme facteurs de la persistance de *B. sphaericus*, forte teneur en matières organiques, ombrage par un couvert végétal, profondeur de 20 à 30 cm, surface 7 m² environ. Le traitement a consisté en une application unique de *B. sphaericus* 1593-4 dosé à 160 mg/m² en juillet 1983.

2.4.2 REGION MIDI-MEDITERRANEEN (E.I.D., Montpellier)

Bassin de lagunage (C) : situé à Fabrègues (10 km de Montpellier) constitué de deux bassins communicants, le second reçoit les eaux décantées du premier. Les deux bassins sont abondamment colonisés par *C. pipiens*. Seul le bassin situé en amont (1600 m²) a été traité par les autorités locales avec *B. sphaericus* souche 2362 à raison de 4 l/ha (Vectolex[®]), le bassin en aval (2200 m²) n'ayant pas été traité a pu servir à observer l'évolution des espèces non-cibles ainsi que la population de *Culex*. La profondeur varie de 40 cm en bordure à 120 cm

dès deux mètres du bord. Cette ceinture de faible profondeur est couverte d'algues et de lentilles d'eau et héberge les populations de *C. pipiens*. Le niveau de l'eau reste sensiblement constant.

Trois sites de prélèvements ont été choisis dans ce bassin :

Site 1 : à l'endroit de remplissage permanent du bassin,

Site 2 : latéralement au sens d'écoulement lent de l'eau,

Site 3 : diamétralement opposé au site 1, à l'effluent.

La période d'observation s'étend de mi-juin à début août 1988. Le bassin en aval a perdu sa qualité de témoin lorsque des spores de *B. sphaericus* y ont été détectées en faible quantité vers la mi-juillet (de l'ordre de 20 spores/ml en surface).

Des analyses physico-chimiques ont pu nous être fournies pour ce bassin de lagunage (et son témoin) :

matières organiques acides 64,5 (43,5) mg/O₂/l
 matières organiques basiques 30,5 (15,9) mg/O₂/l
 azote ammoniacal 36,0 (36,0) mg/l
 NO₂⁻ 0,25 (0,20) mg/l
 Cl⁻ 106,5 (88,7) mg/l
 CO₃H⁻ 475,5 (512,4) mg/l
 pH 7,5 (7,8)
 indice de pollution 212,2 (201,8).

La température de l'eau a été relevée à 9 h du matin à l'aide d'une sonde thermométrique.

Vide sanitaire (D) : situé sous un immeuble (Pont St Louis, Montpellier), surface 120 m², profondeur d'eau 15 à 20 cm, absence de substrat, présence monospécifique de *C. pipiens*, traitement en août 1987 avec la souche 2362 (BSP2[®]-Solvay) dose 40 l/ha. Observations : octobre 87 à juillet 88.

Analyses physico-chimiques :

matières organiques acides 7,8 mg/O₂/l
 matières organiques alcalines 4,3 mg/O₂/l
 azote ammoniacal 1,2 mg/l
 NO₂⁻ 0 mg/l
 Cl⁻ 71 mg/l
 CO₃H⁻ 311,1 mg/l
 pH 7,6
 indice de pollution 9,9

Canal de drainage (E) d'un ancien vignoble situé en région périphérique de Narbonne, largeur 1 m, profondeur 0,40 m, eau courante, substrat composé de débris végétaux, pH 6,0, semi-ombragé, fond sablo-vaseux, traitement juillet-août 1987 avec la souche 2362 (BSP1®- Solvay).

2.5 COMPTAGE BACTERIOLOGIQUE DE *B. SPHAERICUS*

B. sphaericus est mis en culture sur un milieu sélectif M.B.S. + streptomycine (KALFON *et al.*, 1983) à partir des prélèvements (eau ou organismes d'élevage ou prélevés dans les gîtes traités). Deux aliquotes de chaque échantillon sont analysées séparément pour distinguer les cellules végétatives des spores : l'une d'elles est soumise à un choc thermique de 12' mn à 80° C qui tue les formes végétatives. L'ensemencement doit avoir lieu immédiatement après broyage et choc thermique pour éviter toute variation incontrôlable : prolifération (même à 4° C) ou mort des cellules végétatives par éclatement lors de la congélation.

Les boîtes de Pétriensemencées de 0,1 ml de l'échantillon ou d'une dilution de celui-ci sont placées à 35° C. Le dénombrement des colonies est réalisé après 24 heures d'incubation.

2.6 CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DE *B. SPHAERICUS*

L'activité toxique des colonies qui se développent est confirmée sur des larves de *C. pipiens* d'élevage. La caractérisation de *B. sphaericus* est réalisée par immunofluorescence indirecte (anticorps anti-spores de *B. sphaericus* préparés sur souris puis anticorps anti-IgG de souris conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine). L'identification est obtenue par la méthode d'agglutination (de BARJAC *et al.*, 1980), la souche est référée à un sérotype déterminé.

2.7 MISE EN CONTACT POUR L'ETUDE DE L'INGESTION DE *B. SPHAERICUS*

Le comportement alimentaire de plusieurs espèces vis-à-vis de *B. sphaericus* a été étudié selon un protocole double :

* contact continu : les organismes sont maintenus dans la suspension de *B. sphaericus* tout au long de la période d'expérimentation.

* contact interrompu : au bout d'un temps donné, les organismes sont rincés et placés en eau bipermutée stérile.

Selon le comportement alimentaire et la sensibilité de l'espèce (déterminés par des essais préalables) le contact a été interrompu à des temps différents : 2 heures pour *C. pipiens*, *Daphnia pulex* et *Cypris reticulata*, 1 heure pour *Culiseta annulata* et 24 h pour *Chironomus plumosus*. Les concentrations utilisées sont 1 mg/l pour *Culiseta annulata* et *Chironomus plumosus* ; 0,1 mg/l pour les autres espèces.

Le dénombrement de toutes les cellules ou des seules spores de *B. sphaericus* présentes dans le tube digestif de ces divers organismes est effectué au cours du temps par broyage en eau stérile des 10 individus d'un lot préparé comme décrit ci-dessus. L'échantillon est toujours scindé en deux pour détermination du nombre total et du nombre de spores (après pasteurisation de l'aliquote correspondante).

3. RESULTATS

3.1 PERSISTANCE DE *B. SPHAERICUS* - Observations de moyenne et de longue durée en milieu naturel

3.1.1 Gîte E : canal de drainage d'un ancien vignoble.

Un prélèvement d'eau effectué sur le fond, au printemps (03/05/88) soit huit mois après le dernier traitement, fournit les éléments suivants :

- nombre de larves de *Culex pipiens* présentes dans 100 ml : 20
- stade : L II
- ensemencement de l'échantillon sur milieu sélectif : nombreuses colonies (8 à 25 colonies/0,1 ml)
- caractérisation par I.F.I. : *B. sphaericus*
- identification par méthode d'agglutination : souche 2362
- toxicité de l'eau du gîte sur des larves LII d'élevage : nulle.

Ces observations nous permettent d'affirmer que :

- les spores de *B. sphaericus* ont subsisté sur le fond du gîte pendant huit mois, qu'elles ont conservé leur pouvoir germinatif mais qu'elles ont perdu leur toxicité vis-à-vis des larves de *Culex.*;

- la prolifération des spores qui germent dans les tubes digestifs des *Culex* conduit à la formation de cellules présentant à nouveau un caractère de toxicité à condition d'être consommées par d'autres larves sensibles.

- il ne semble pas y avoir de déjection naturelle de ces cellules toxiques dans le milieu ambiant ou du moins pas en quantité suffisante pour le rendre toxique.

3.1.2 Gîte D : vide sanitaire

Contrairement à ce qui est observé dans le gîte précédent, de très nombreuses larves de *Culex* sont trouvées mortes en juillet 1988. Le traitement effectué 11 mois auparavant a gardé une efficacité de près de 90 % : on relève quelques larves stades II et III. Dans les larves mortes on dénombre de l'ordre de 10^4 unités formant une colonie de *B. sphaericus* mais seulement 10^2 spores. Ceci indique que les larves récoltées étaient mortes depuis peu de temps (moins de 24 h) et illustre la dynamique de

l'interaction entre la bactérie et la larve-cible. Les échantillons d'eau contiennent de 10^5 à 10^6 spores/ml et tuent 100 % de larves stade III d'élevage en 24 heures.

L'exemple fourni par le site est représentatif d'une situation idéale: l'efficacité du produit s'est maintenue au-delà de la saison défavorable. Etant donné la démonstration qui a été faite de la perte de l'inclusion de toxine après quatre semaines (KARCH et CHARLES, 1987), nous sommes ici en présence d'un maintien de l'efficacité de *B. sphaericus* vraisemblablement par recyclage des spores après passage dans le tube digestif d'une première génération de larves.

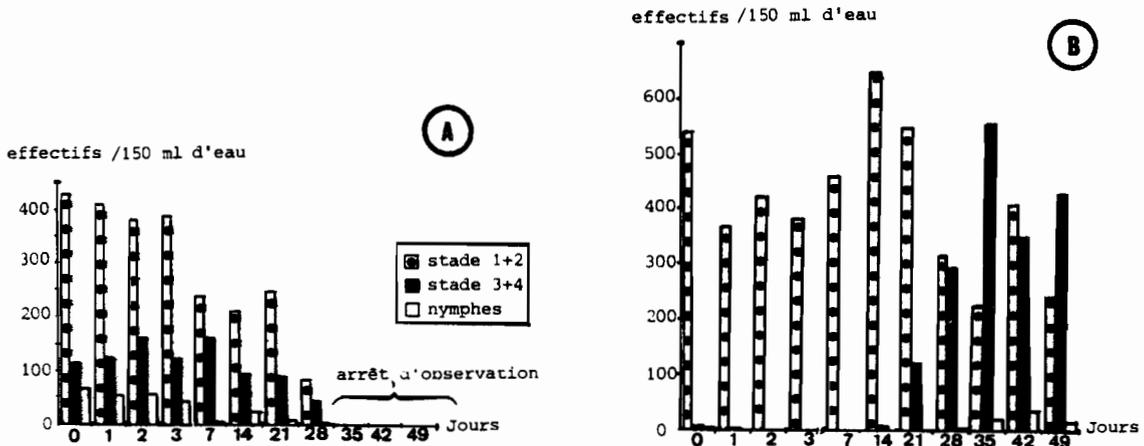
3.1.3 Gîtes A et B : mare expérimentale semi-naturelle (B) et sa mare témoin (A)

Dans le cas du gîte B, nous combinons des caractéristiques des deux exemples précédents : écosystème complexe comportant une faune et une flore variées, site ombragé comme dans le canal de drainage (gîte E) mais surtout, espace clos, absence d'écoulement de l'eau comme dans le cas du vide sanitaire (gîte D).

En août 1987, quatre ans après un traitement unique par *B. sphaericus* souche 1593-4, des souches bactériennes entomopathogènes ont été isolées à partir de prélèvements d'eau du gîte B et de larves de *C. pipiens* trouvées mortes. Elles ont été trouvées identiques à *B. sphaericus* 1593-4 par I.F.I. et agglutination.

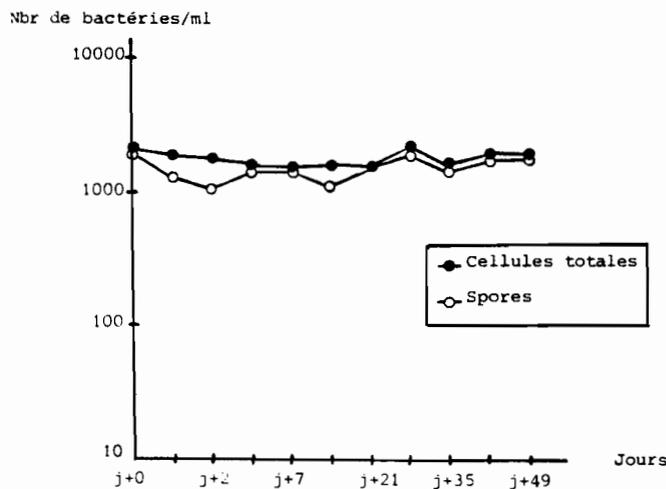
La comparaison de la densité larvaire de *C. pipiens* dans les mares témoin et expérimentale après une très longue période sans intervention révèle d'emblée un phénomène de limitation des populations en pleine période d'activité (figure III.1 a et b) : dans le gîte témoin tous les stades larvaires et les nymphes sont présents simultanément, dans la mare expérimentale seuls les stades I et II se développent et l'on note une absence quasi totale des stades III, IV et des nymphes. Ce n'est qu'en fin d'été (31 août 87) que ces dernières formes apparaissent.

FIGURE III.1 : Dénombrement des larves et des nymphes de *Culex pipiens* au cours d'une période d'observation de 49 jours. A : gîte témoin (l'arrêt de l'observation est dû à l'apparition massive de prédateurs de larves dans cette mare); B : gîte traité 4 ans auparavant avec *B. sphaericus*.



Le nombre d'unités de *B. sphaericus* relevé au cours des 49 jours d'observation en surface et sur le fond de la mare expérimentale est reporté sur la figure III.2, il est nul dans la mare témoin.

FIGURE III.2 : Dénombrement des spores de *B. sphaericus* présentes au fond du gîte B au cours de la période d'observation.



Des essais pratiqués avec des larves d'élevage au stade III indiquent que l'eau du fond du gîte B ne possède qu'une faible toxicité (10 % de mortalité) mais qu'elle donne lieu au développement de colonies dont les spores sont normalement toxiques. Avec en moyenne 2.10^3 spores/ml, cette eau devrait atteindre une CL 90 pour des larves stade III.

Il est donc vraisemblable que la majorité des spores retrouvées sur le fond ne possèdent plus leur inclusion toxique.

Le cas de cette mare expérimentale est unique dans la littérature. La manifestation de l'action de *B. sphaericus* quatre ans après un traitement larvicide implique le maintien au cours des saisons d'une quantité suffisante de spores. Ces formes de résistance sont connues pour pouvoir subsister même par le grand froid des hivers de nos régions. Quant à la toxicité, elle ne peut s'exercer qu'à condition qu'un cycle germination-sporulation ait eu lieu récemment. Les larves de *Culex* représentent un milieu favorable à ce processus. Les spores toxiques sont libérées lors de la désintégration des larves mortes. Le chaînon manquant se situe donc entre les spores présentes sur le fond du gîte et les larves de *Culex* dont la zone de nutrition se situe préférentiellement en surface, surtout pour les jeunes stades. On observe en effet que les larves LIII et LIV se nourrissent volontiers sur le fond si la colonne d'eau n'est pas trop haute. La remise en suspension des spores peut avoir lieu à cette occasion ou suite à des mouvements de l'eau (inversions thermiques, bulles de fermentation, remous divers) ou par l'intermédiaire d'autres espèces aquatiques.

Afin de vérifier le rôle que pourrait jouer la faune syntrophique de *Culex*, nous avons poursuivi cette étude en milieu contrôlé au laboratoire.

3.2 ROLE DE LA FAUNE SYNTROPHIQUE DE *CULEX PIFIENS* DANS LE RECYCLAGE DE *B. SPHAERICUS* - Etude en laboratoire

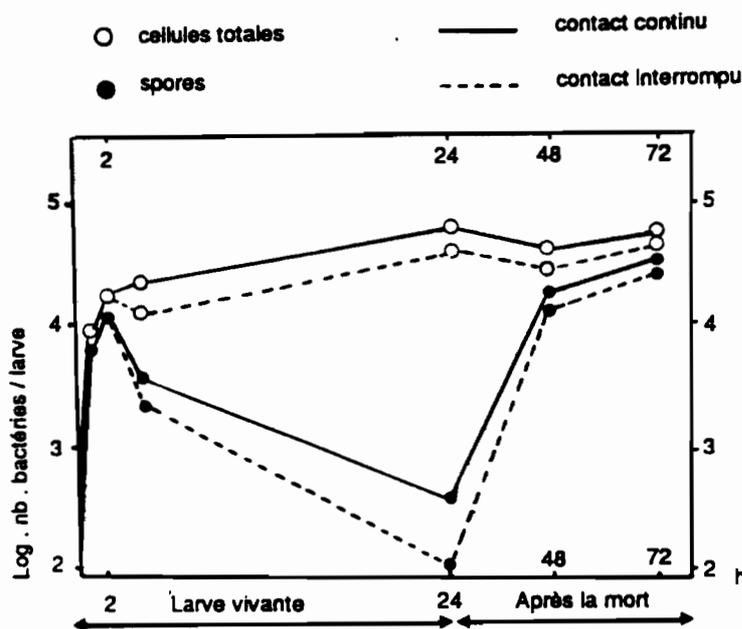
La sédimentation des spores de *B. sphaericus* après un épandage ou des cadavres de *C. pipiens* intoxiqués peut conduire à un enrichissement des boues et substrats. Pour déterminer l'éventualité d'une remise en suspension de la bactérie en milieu naturel, nous avons comparé le comportement alimentaire à son égard des larves aquatiques de deux

diptères : *Culiseta annulata* et *Chironomus plumosus* et de deux crustacés *Daphnia pulex* et *Cypris reticulata* à celui de *Culex pipiens*.

3.2.1 Le recyclage par *Culex pipiens*

Les observations sur l'évolution du nombre de bactéries dans les larves de *C. pipiens* montrent (figure III.3) que quelle que soit la durée du contact, la proportion de spores dans le total des cellules présentes diminue dès les premières évaluations indiquant une germination rapide de la bactérie dans un milieu qui lui est favorable. Par contre dès la mort des larves (24 heures après le premier contact), on assiste à une nouvelle sporulation qui s'étend à l'ensemble des cellules présentes dans le tube digestif. L'augmentation de la population bactérienne sans apport supplémentaire par ingestion (contact interrompu) met en évidence la multiplication des cellules végétatives qui entraîne une amplification de l'ordre de quatre fois en 24 heures. En fait, le recyclage est sous la dépendance de deux phénomènes : le premier, la germination, permet au second, la multiplication, d'avoir lieu.

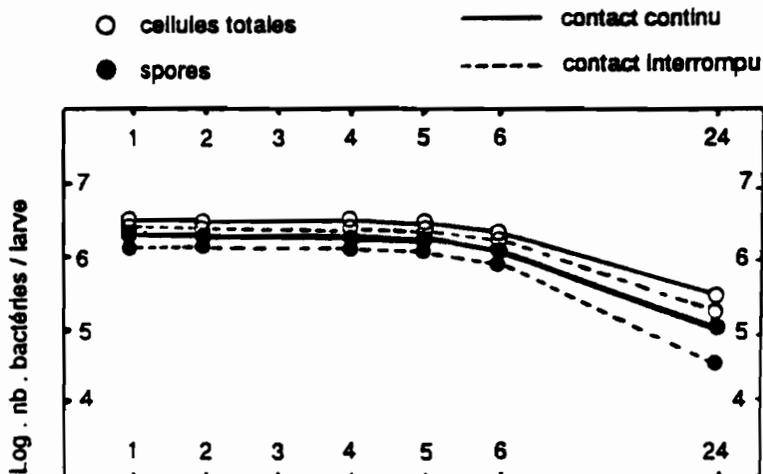
FIGURE III.3 : Cinétique de l'évolution de *B. sphaericus* dans le tube digestif de *Culex pipiens*.



3.2.2 Evolution du nombre de bactéries chez *Culiseta annulata*

Dès la première heure de contact, *C. annulata* ingère une grande quantité de bactéries (figure III.4). Ce nombre reste ensuite sensiblement constant même si la larve a la possibilité d'en ingérer davantage. Ceci suggère qu'elle se nourrit de manière intermittente. La germination des spores se produit pour environ la moitié d'entre elles dans les premières heures; cette proportion augmente au cours du temps mais elle est accompagnée d'une diminution progressive de la quantité globale de cellules bactériennes, indiquant soit une déjection soit une dégradation à l'intérieur du tube digestif.

FIGURE III.4 : Cinétique de l'évolution de *B. sphaericus*. dans le tube digestif de larves de *Culiseta annulata*.

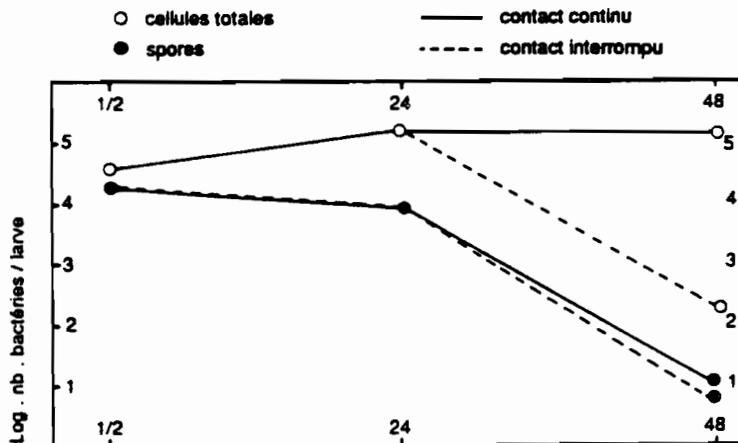


3.2.3 Devenir et évolution de la bactérie chez *Chironomus plumosus*

Lorsque les larves sont maintenues en continu dans la suspension de *B. sphaericus* (figure III.5), une quantité importante de bactéries est absorbée dès les premières 30 minutes. L'ingestion continue pendant 24 heures environ pour se maintenir à une valeur relativement constante ensuite. La très faible proportion de spores dénombrées (moins de 10 %) indique un milieu favorable à la germination. Dès que l'on prive les larves de l'apport constant de spores bactériennes, il se produit une chute brutale du nombre des cellules totales présentes dans le tube digestif indiquant,

par comparaison avec ce qui précède, que les *Chironomus plumosus* se nourrissent de manière continue lorsque les conditions le permettent. S'agissant essentiellement de cellules végétatives, la question se pose de savoir si celles-ci sont digérées ou rejetées. Le comptage des bactéries présentes dans les déjections des larves va dans le sens d'un transit intestinal rapide. La larve en digère une part importante mais re-dissémine 2 à 3 % du nombre de spores ingérées, dans le milieu extérieur.

FIGURE III.5 : Cinétique de l'évolution de *B. sphaericus* dans le tube digestif de larves de *Chironomus plumosus*.



3.2.4 Crustacés filtreurs

En eau douce et notamment dans les eaux stagnantes on rencontre un grand nombre d'espèces vivant sur le fond ou se déplaçant dans la masse d'eau. Les *Daphnia pulex* et les *Cypris reticulata* se nourrissent d'algues planctoniques et de déchets organiques en suspension dans l'eau. L'essai de comptage de *B. sphaericus* consommé et rejeté par ces deux espèces (tableau III.2) indique que tous deux ingèrent *B. sphaericus* aussi longtemps que la bactérie est présente dans leur zone de nutrition : un faible pourcentage de spores germe dans leur tube digestif en deux heures, le pourcentage de germination a tendance à augmenter avec le temps. On observe une déjection de plus 20 % des cellules ingérées par les daphnies et de près de 10 % par les *Cypris*. Les valeurs à 24 heures

d'observation indiquent, en milieu restreint, un appauvrissement en *B. sphaericus* du fait de la digestion par ces crustacés.

TABLEAU III.2 Résultats d'un test de laboratoire concernant le nombre d'unités de *Bacillus sphaericus*. ingérées ou relarguées par deux crustacés filtreurs en 24 heures.

		Nombre d'unités formant une colonie						
		Dans une suspension de <i>B. sphaericus</i>			En eau stérile (1)		ufc relarguées dans l'eau par individu (2)	
		2 h	5 h	24 h	2 h	24 h	2 h	24 h
<i>Daphnia pulex</i>	bactéries totales	8 100	15 700	100	7 000	100	1 630	1 000
	spores	7 900	10 300	0	6 500	0	1 570	520
	% de spores dans le total	97,5	65,6	-	92,8	-	96,0	52,0
<i>Cypris sp.</i>	bactéries totales	8 900	8 200	1 500	6 300	100	530	1 540
	spores	8 100	7 100	0	5 700	200	360	1 290
	% de spores dans le total	91,0	86,6	-	90,5	-	67,9	83,8

(1) tous les résultats ont été obtenus sur des dilutions au 1/100 des échantillons.

(2) les résultats ont été obtenus avec 0,1 ml d'eau stérile contenant 10 individus/10 ml.

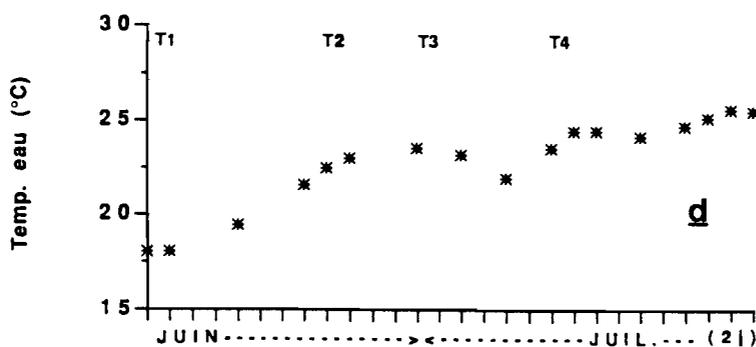
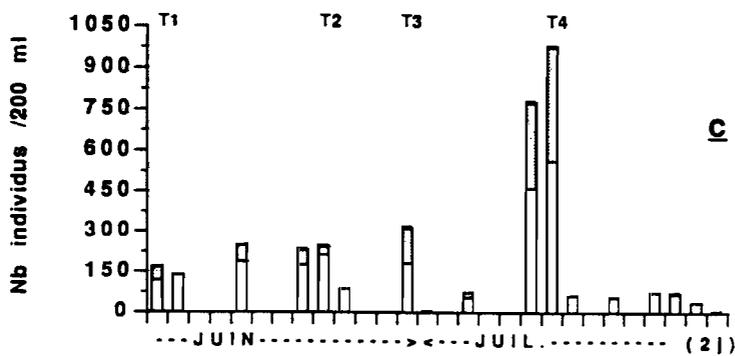
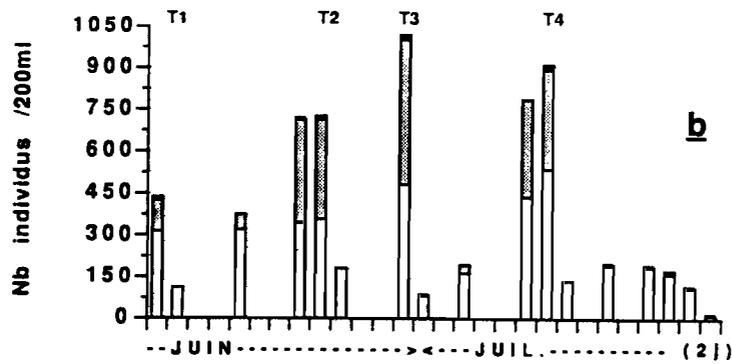
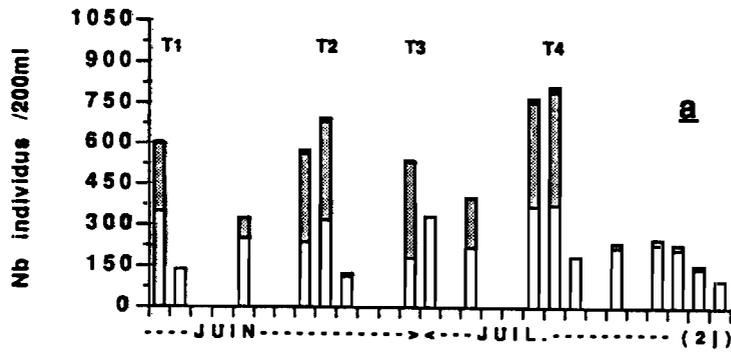
3.3 ETUDE DYNAMIQUE EN MILIEU NATUREL DE L'INTERACTION *CULEX PIPIENS* - *B. SPHAERICUS* - INTERVENTION DE LA FAUNE NON CIBLE

Le bassin de lagunage de Fabrègues (gîte C) soumis à la surveillance de l'E.I.D. en matière de lutte antilarvaire nous fournit un site particulièrement intéressant dans lequel il nous a été possible d'observer la dynamique de la population de *Culex pipiens* pendant une série de quatre traitements avec *Bacillus sphaericus*. L'observation fut interrompue par la vidange des installations pour entretien fin juillet 88.

FIGURE III.6 : Densité de la population préimaginale de *C. pipiens* en trois points du bassin de lagunage traité avec *B. sphaericus*.

a : site 1; **b** : site 2; **c** : site 3; **d** : température de l'eau à 9 h.

□ stades I et II; ▨ stades III et IV; ■ nymphes.



3.3.1 Efficacité de *B. sphaericus* sur *C. pipiens*

Les quatre traitements appliqués furent suffisants pour limiter la population préimaginale de *C. pipiens* pendant la période d'observation (juin-juillet 88). L'intervalle entre deux traitements a été choisi en fonction de la réapparition des jeunes stades larvaires de *C. pipiens*. La figure III.6 indique une différence d'efficacité selon le point de prélèvement. Ceci est à mettre en relation avec le mouvement d'écoulement de l'eau dans le bassin (remplissage au site 1) et ne reflète en rien une absence ou un défaut de qualité du produit.

3.3.2 Faune non-cible

Un relevé des principales espèces animales constituant le macroplancton, présentes dans le bassin de lagunage traité avec *B. sphaericus* et son déversoir, est fourni par le tableau III.3. Il ne semble pas y avoir de différence importante entre les deux bassins indiquant par là l'innocuité de *B. sphaericus* sur les espèces dénombrées. Au cours de la période d'observation, on assiste à un enrichissement qui progresse avec l'augmentation de la température de l'eau (figure III.6 d).

Dans la même région, d'autres gîtes à *Culex* ont été traités par des insecticides chimiques. Il a été observé (KARCH, comm. pers.) qu'en particulier avec le chlorpyrifos ces espèces prédatrices de larves de moustiques sont également éliminées.

TABLEAU III.3 : Comparaison de l'abondance des principales espèces trouvées associées à *C. pipiens* dans un bassin de lagunage à Montpellier, Juin et Juillet 1988.

Espèces	Dates de prélèvement (200 ml) et (traitement)									
	03/06 (T1)		20/06 (T2)		28/06 (T3)		11/07 (T4)		25/07	
	T	tr	T	tr	T	tr	T	tr	T	tr
<i>Corixa punctata</i>	+	+	++	+	++	++	++	++	++	++
<i>Nepa cinerea</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Cloeon dipterum</i>	+	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
Dytiscidae (larves)	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
Dytiscidae (adultes)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Chironomidae	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Anisoptera (larves)	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>Daphnia</i> sp.	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Isopoda	-	-	-	-	+	-	+++	++	+++	+++
<i>Cypris</i> sp.	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Nombre de specimen de chaque espèce dans 200 ml : - absent ; + 1 à 50 ; 50 à 100 ; +++ > 100

T : témoin

tr : bassin traité

3.3.3 Devenir de *B. sphaericus* dans le gîte

La concentration de *B. sphaericus* est sensiblement la même dans les trois points de prélèvements (figure III.7). Dès les premières 48 heures après le traitement, la bactérie se raréfie dans la zone de nutrition des larves par suite de sa sédimentation. Les prélèvements permettent d'établir le devenir des spores :

- en surface : deux jours après le premier épandage représenté (deuxième traitement : T2) le nombre de spores est de 0 à 50 par ml alors qu'il se maintient entre 50 et 600 spores/ml après le quatrième traitement (T4). La disparition de la population larvaire est en accord avec les observations de HORNBY *et al.* (1984) et de NICOLAS *et al.* (1987) qui indiquent qu'une concentration de 100 à 500 spores/ml est une valeur minimale d'efficacité contre les larves de *Culex* sp.

- au fond du gîte (profondeur 0,4 m) : au début de la période d'observation (deux semaines après un premier traitement T1) le nombre de spores par ml est de 100 à 200. Il présente une forte augmentation après le quatrième traitement (500 à 2 000 sp/ml). Il est à remarquer que ceci n'est pas le simple fait de la sédimentation étant donné que la concentration en surface est également plus élevée.

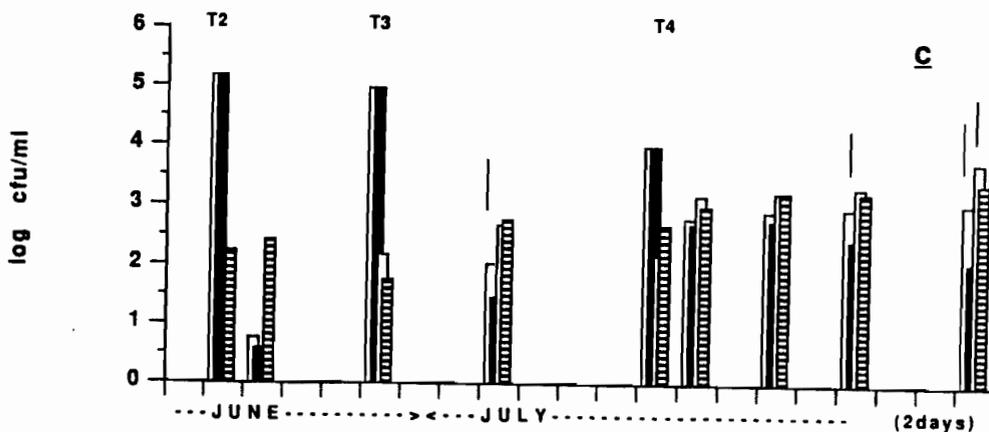
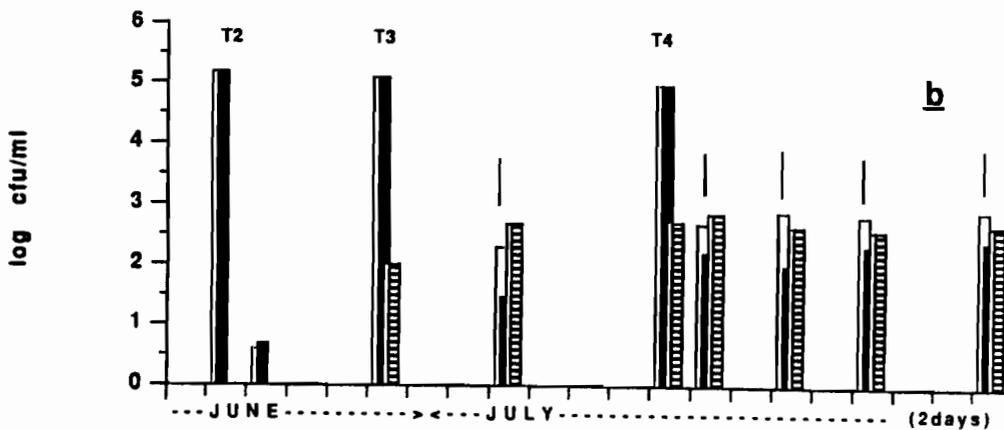
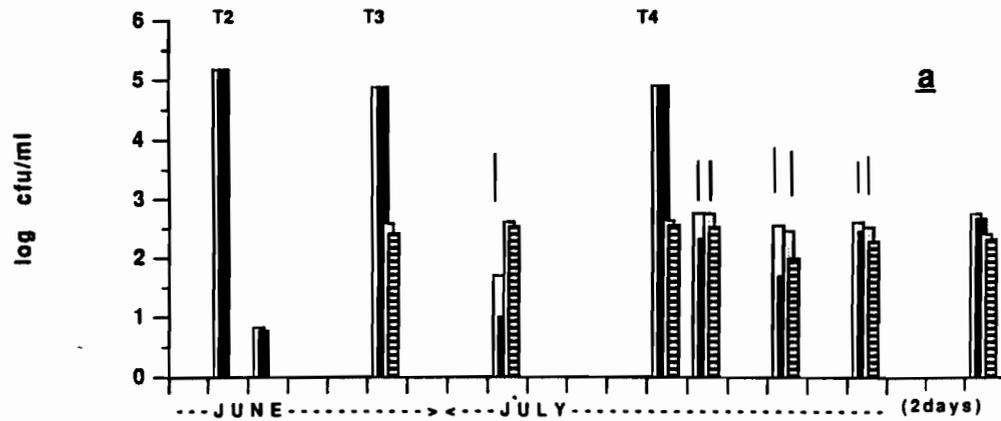
Le choc thermique appliqué à chaque demi-échantillon permet de mettre en évidence une quantité non négligeable de formes végétatives, ou du moins thermosensibles. Ce phénomène est plus fréquent en surface mais on en trouve quelques manifestations sur le fond du gîte également.

3.3.4 *B. sphaericus* et les arthropodes associés à *C. pipiens*

Nous avons vu que certains arthropodes pouvaient ingérer *B. sphaericus* et de ce fait participer à sa redispersion dans le milieu. S'il n'a pas été possible de les étudier tous en laboratoire, nous avons pu vérifier en milieu naturel à quel niveau ils étaient susceptibles d'intervenir dans le maintien de *B. sphaericus* (figure III.8).

FIGURE III.7 : Nombre total de *B. sphaericus* et de spores thermo-résistantes présentes en trois points du bassin de lagunage traité contre *C. pipiens*.

a : site 1; **b** : site 2; **c** : site 3; O, ● : cellules totales, spores en surface
 ⊙, ⊚ : cellules totales, spores sur le fond.



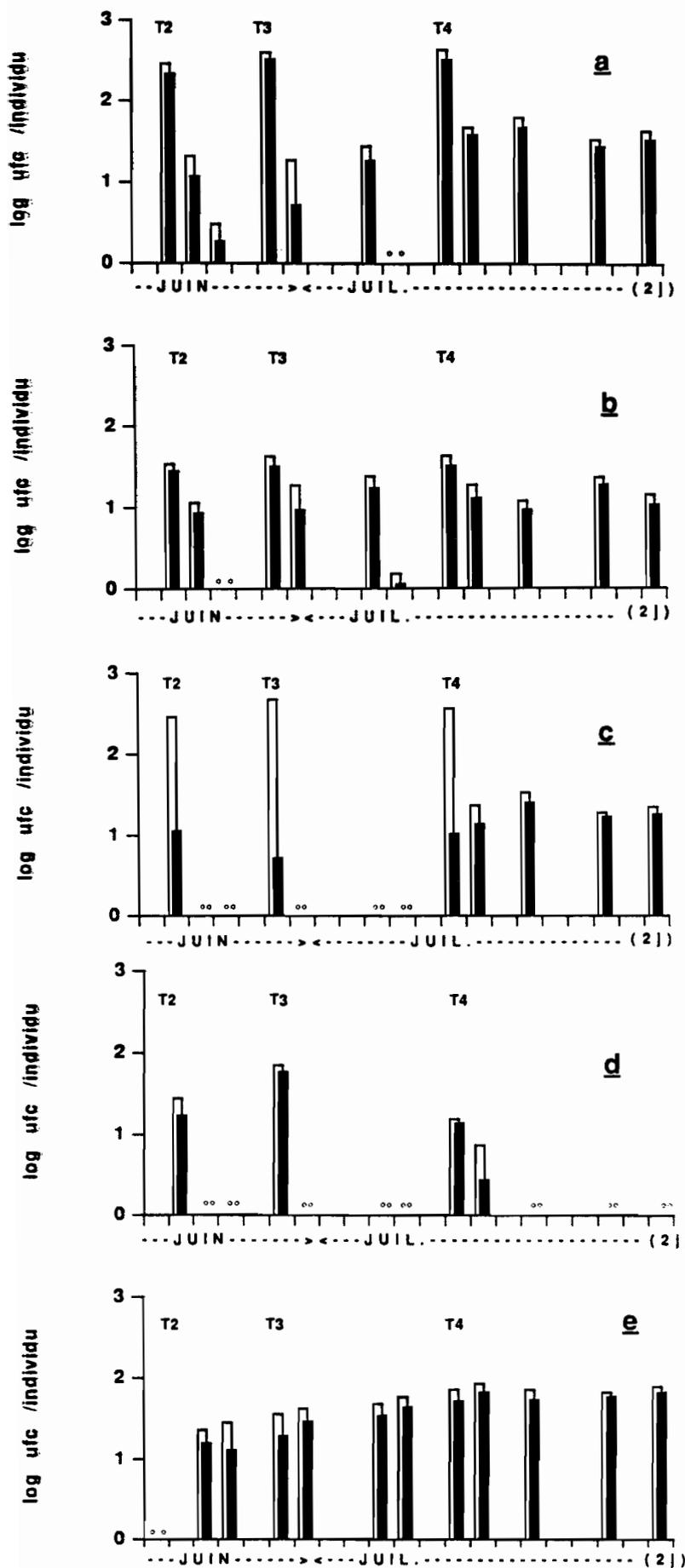


FIGURE III.8 :
 Nombre total de *B. sphaericus* et de spores thermo résistantes présentes dans le tube digestif de quelques arthropodes syntrophiques de *C. pipiens*.

- a** : *Daphnia sp.*
- b** : *Cypris sp.*
- c** : *Cloeon dipterum*
- d** : *Corixa punctata*
- e** : *Chironomus sp.*
- O : cellules totales
- : spores
- OO : zéro ufc

- espèces filtrantes, *Daphnia* sp. et *Cypris* sp. : ingèrent *B. sphaericus* aussi longtemps que celui-ci est présent dans leur milieu, parmi les débris végétaux. Une faible proportion de ces cellules sont sous forme végétative. Ceci rejoint exactement les vérifications faites en laboratoire.

- espèces prédatrices, *Cloeon dipterum* et *Corixa punctata* : on retrouve *B. sphaericus* dans ces espèces lorsqu'il est présent dans leurs proies ; la proportion de cellules végétatives et de spores retrouvées chez *C. dipterum* (III.8.c), reflète très exactement le devenir de *B. sphaericus* dans les larves de *Culex*.

- espèces de fond de gîte, *Chironomus* sp. : le dénombrement de *B. sphaericus* dans cette espèce suit les mêmes variations que l'enrichissement des larves du fond du gîte.

4. DISCUSSION

Trois facteurs principaux différencient les sites observés dans cette étude. Ce sont d'une part l'éclairement, ombrage pour l'un et totale obscurité pour l'autre, d'autre part l'éventail des populations aquatiques, écosystème complexe ou population monospécifique ; le troisième facteur est bien sûr le mouvement de l'eau, courante ou stagnante, dont l'incidence est nette sur le maintien de la population bactérienne.

Dans le gîte E (canal de drainage semi-ombragé) les conditions sont favorables au recyclage naturel du fait de la conservation d'un nombre élevé de spores viables. Cependant la mise en route du processus n'a pas eu lieu. Par contre il est manifeste dans le gîte D (vide sanitaire). La germination des spores non toxiques se produit dans le tube digestif des larves de *Culex*. Les cellules végétatives sont alors soumises aux enzymes digestives d'un organisme qui, n'étant pas invalidé par la toxine, poursuit normalement ses processus digestifs. Des cellules toxiques doivent cependant être produites puisque le broyat de ces larves fourni à d'autres *Culex* a sur eux un effet létal. Cette observation suggère que la sensibilité des cellules du tube digestif varie en fonction de leur position dans le tractus digestif.

Il apparaît ainsi que pour que le recyclage puisse avoir lieu, il faille probablement attendre un effet cumulatif du passage des spores de *B. sphaericus* dans les premières générations de *Culex*.

Il est indéniable toutefois qu'un recyclage peut avoir lieu et que son effet de limitation de la population de *B. sphaericus* peut se manifester de manière différée (quatre ans dans la mare B) ou à court terme (trois semaines dans le bassin de lagunage C) à condition d'atteindre un niveau de concentration de *Bacillus sphaericus* suffisant. Dans le cas du bassin de lagunage (C) c'est certainement le cumul des quatre traitements qui a permis de l'obtenir. L'effet bénéfique du cumul des traitements est une notion qui se fait jour dans les équipes opérationnelles qui ont eu l'occasion d'utiliser *B. sphaericus* en campagne de masse (SINEGRE, comm. pers.).

5. CONCLUSION

En analysant les résultats obtenus dans des sites aussi divers que ceux que nous avons décrits, il apparaît combien sont aléatoires les possibilités de recyclage de *B. sphaericus*. L'imbrication des facteurs favorables et limitants est à l'image de l'écosystème : un réseau complexe où chaque variation entraîne un réajustement dont les conséquences échappent à notre prévision.

L'organigramme présenté en annexe II tente de résumer les différentes interventions. Il faut considérer *B. sphaericus* en milieu naturel comme un des éléments d'une dynamique dont on ne maîtrise pas les autres paramètres à savoir l'abondance de pontes des *Culex*, la densité de ses prédateurs, la présence d'une faune à mobilité verticale dans le milieu. A l'opposé, l'élément flore est plus permanent au cours de la période estivale pour son intervention au niveau de l'ombrage.

L'application d'un traitement à base de *B. sphaericus* peut viser la diminution du nombre de passage des équipes. Il semble souhaitable de charger le milieu progressivement. On pourra obtenir un étalement de la fréquence d'épandage mais en pleine saison d'activité des *Culex*, le fragile équilibre est sujet à rupture.

CHAPITRE IV -

EXEMPLE D'APPLICATION DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE à LA LUTTE BIOLOGIQUE : ETUDE ECOLOGIQUE D'UNE CYANOBACTERIE TRANSFORMEE

1. INTRODUCTION

Les agents de lutte contre les larves de moustiques et de simulies, représentés par deux espèces, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus*, se trouvent complémentaires dans leur spectre d'action. Cependant, les limites à leur utilisation sont sensiblement les mêmes : à un bon niveau de toxicité pour leurs cibles respectives s'oppose l'inconvénient de leur disparition plus ou moins rapide de la zone de nutrition des larves, essentiellement par sédimentation. Le recyclage qui a été décrit pour *B. sphaericus* n'est pas suffisamment efficace pour pallier cette disparition et pour *B. thuringiensis* il n'a pas été observé. Cette espèce semble incapable de se propager seule dans le biotope. Les techniques biochimiques récemment développées et les transformations génétiques offrent la perspective d'améliorer l'efficacité de ces larvicides et de développer des méthodes nouvelles pour augmenter la rémanence de leur toxicité.

Les travaux entrepris ces dernières années par plusieurs équipes concernant la biologie moléculaire des protéines toxiques ont pour but de déterminer quels sont les gènes responsables de leur synthèse, de trouver les conditions de transformation de différents organismes hôtes susceptibles d'exprimer ces protéines et de subsister dans le milieu.

La littérature est riche en études fondamentales visant la connaissance des gènes codant pour chacune des protéines toxiques de différentes souches de *B. thuringiensis* essentiellement utilisées en agro-foresterie : *kurstaki* (ADANG *et al.*, 1985 ; DONOVAN *et al.*, 1988), *morrisoni* (EARP et ELLAR, 1987 ; GALJART *et al.*, 1987), *berliner* 1715

(HOFTE *et al.*, 1986 ; KLIER *et al.*, 1982), *tenebrionis* (HOFTE *et al.*, 1987) ainsi que *israelensis* (BOURGOUIN *et al.*, 1986 ; WARD et ELLAR, 1988) et diverses souches de *B.sphaericus* (BAUMANN *et al.*, 1988 ; HINDLEY et BERRY, 1987)

Le transfert d'un gène d'un organisme à un autre peut être réalisé par conjugaison entre deux espèces bactériennes, par exemple entre *B. thuringiensis* et *B. subtilis* (KLIER *et al.*, 1983) ou par transformation génétique (le fragment d'ADN peut rester intracytoplasmique s'il est porté sur un plasmide ou même être inséré dans le génome de l'organisme receveur). Ainsi des cellules de *B. subtilis* ont été transformées par des gènes de *B. t. kurstaki* (AKASHI *et al.* 1988) et de *B. t.israelensis* (WARD *et al.*, 1986) et des cellules de *E. coli* par des gènes de *B. t. morrisoni* (GRANUM *et al.*, 1988), de *B. t. aizawa* (KLIER *et al.*, 1985), de *B. t. tenebrionis* (JAHN *et al.*, 1987), de *B. t. israelensis* (WARD *et al.*, 1984) et de *B. sphaericus* (GANESAN *et al.*, 1983; LOUIS *et al.* 1984). Dans une optique d'application plus concrète, des *Pseudomonas*, bactéries intracellulaires qui colonisent les racines des végétaux, ont été transformées par le gène de la δ -endotoxine de *B. thuringiensis* (OBUKOWICZ *et al.*, 1986) et la cyanobactérie *A. nidulans* R₂ a été transformée pour exprimer les gènes de la toxine de *B. sphaericus* (TANDEAU de MARSAC *et al.*, 1987).

Il est apparu à la lumière de ces travaux que l'effet larvicide n'est pas le fait d'une seule protéine mais qu'il existe une synergie entre plusieurs composantes. WU et CHANG (1985) la décrivent chez *B. t. israelensis* et ARAPINIS *et al.* (1988) chez *B. sphaericus*. Les différentes fractions purifiées sont de 20 à 100 fois moins toxiques que leur mélange (ou que le cristal complet). La forte toxicité du cristal parasporal de *B. t. israelensis* est très vraisemblablement due à un effet synergique entre trois protéines (130, 65 et 28 kD). La protéine de 28 kD, très hydrophobe, jouerait un rôle particulier au niveau de la pénétration membranaire. Ajoutée à la protéine 65 kD, elle en augmente le pouvoir hémolytique.

Chez *B. sphaericus* , le pouvoir larvicide est porté par la protéine de 41,9 kD. Lorsque l'on procède à l'expression du gène codant pour cette protéine dans *E. coli* , la présence de la protéine de 51,4 kD est nécessaire pour obtenir un effet pathogène sur *Culex*.. Par contre chez *B. subtilis* la

toxicité est exprimée par des cellules ne portant que le gène codant pour la protéine 41,9 kD. La maturation semble être réalisée par les enzymes de l'hôte (de la TORRE *et al.* 1989). Il est remarquable que les gènes codant pour les protéines de 41,9 et de 51,4 kD soient contigus dans *B. sphaericus*.

L'attitude des chercheurs est mitigée vis-à-vis de l'utilisation en terrain ouvert d'organismes ayant subi des transformations génétiques. On conçoit qu'après les quelques accidents écologiques survenus suite à l'introduction par l'homme d'espèces nouvelles dans un biotope, la prudence en ce domaine soit de mise. Le congrès d'Asilomar (Californie - 1975) fut la première étape dans la prise de conscience du monde scientifique devant ce nouvel outil qu'est le clonage des gènes.

L'O.M.S pour sa part, impliquée dans plusieurs programmes de recherche visant à l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés émet un ensemble de recommandations et attire l'attention des équipes impliquées dans ces essais sur la probabilité de transfert spontané des transposons (éléments chromosomiques à haute mobilité) des organismes porteurs vers des organismes naturels (Anonyme, 1987 ; LERECLUS *et al.*, 1986). Ceci pourrait avoir pour conséquence que les gènes insérés dans des organismes porteurs échappent au contrôle de l'expérimentateur. Ce risque bien que théorique n'est pas négligeable.

Grâce à la collaboration établie entre le Laboratoire de Lutte contre les Insectes nuisibles (L.I.N. - ORSTOM-Bondy) et le Laboratoire d'Enzymologie (CNRS - Gif-sur-Yvette), nous avons pu faire une étude-type d'une cyanobactérie transformée : *Synechococcus* R2 (*Anacystis nidulans* R₂) dans laquelle on a introduit par transformation les gènes de la toxine de *B. sphaericus* souche 1593.

Les cyanobactéries sont des procaryotes Gram-négatifs ayant un système photosynthétique analogue à celui des chloroplastes des plantes supérieures. Elles possèdent une chlorophylle a et des phycobilines. Ces pigments, localisés sur des structures spécialisées, thylakoïdes pour les premiers, phycobilinosomes pour les seconds, confèrent à ce groupe de bactéries la propriété de photosynthétiser leurs métabolites, du glycogène notamment (STANIER et COHEN-BAZIRE, 1977). Certaines

souches acceptent la transformation génétique par les méthodes classiquement en vigueur.

La souche *Synechococcus* R₂ (ou PCC 7942), encore couramment dénommée *Anacystis nidulans* R₂, et nous garderons ce nom pour cet exposé, est la souche de choix pour des essais de transformation génétique étant donné que l'on dispose d'un plasmide à haut pouvoir de recombinaison avec son ADN (KUHLEMEIER *et al.*, 1981).

Nous avons pu disposer de différents échantillons :

- souche témoin non transformée : *A. nidulans* R₂
- souches transformées portant le plasmide :
 pGsp 12 : insert = déterminant génétique de 3,5 kb portant les deux gènes codant pour la toxine de *B. sphaericus* souche 1593

pGsp 73 : insert = déterminant génétique (différent du précédent) portant en plus des deux gènes codant pour la toxine, un gène codant pour la protéine enveloppe d'une vésicule gazeuse présente dans certaines souches de cyanobactéries.

Trois points essentiels ont été étudiés :

- activité sur petit mammifère
- niveau de toxicité sur larves de moustiques
- comportement en mare semi-naturelle

2. TESTS D'INNOCUITE SUR PETIT MAMMIFERE

2.1 MATERIEL ET METHODE

Une étude-type d'innocuité a été pratiquée sur souris de race Swiss. Toutes les voies conventionnelles d'introduction d'une substance étrangère ont été retenues à l'exception de l'injection intraveineuse :

* voie orale : par tubage, introduction de 0,5 ml dans l'oesophage de chaque individu

* inhalation : pulvérisations, en aérosol, d'un volume total de 0,5 ml par souris; une cage contenant une souris est placée dans un cylindre étanche pourvu d'un nébulisateur (tour de Potter).

* voie sous-cutanée : injection de 0,2 ml au niveau du flanc droit

* voie intra-péritonéale : injection de 0,2 ml.

La suspension bactérienne utilisée contient 10 mg de protéines par ml, ce qui correspond à 200 CL 50 sur *Culex pipiens* stade III par ml. Des lots de cinq souris âgées de trois mois ont été constitués. L'observation du poids total de chaque individu s'est poursuivie pendant un mois à l'issue duquel les animaux ont été sacrifiés. L'autopsie a porté sur l'aspect et le poids des organes suivants : foie, poumons, rate, coeur, cerveau et reins. Les animaux témoins ont reçu les mêmes traitements que ci-dessus avec une suspension d'*A. nidulans* R₂ (souche témoin).

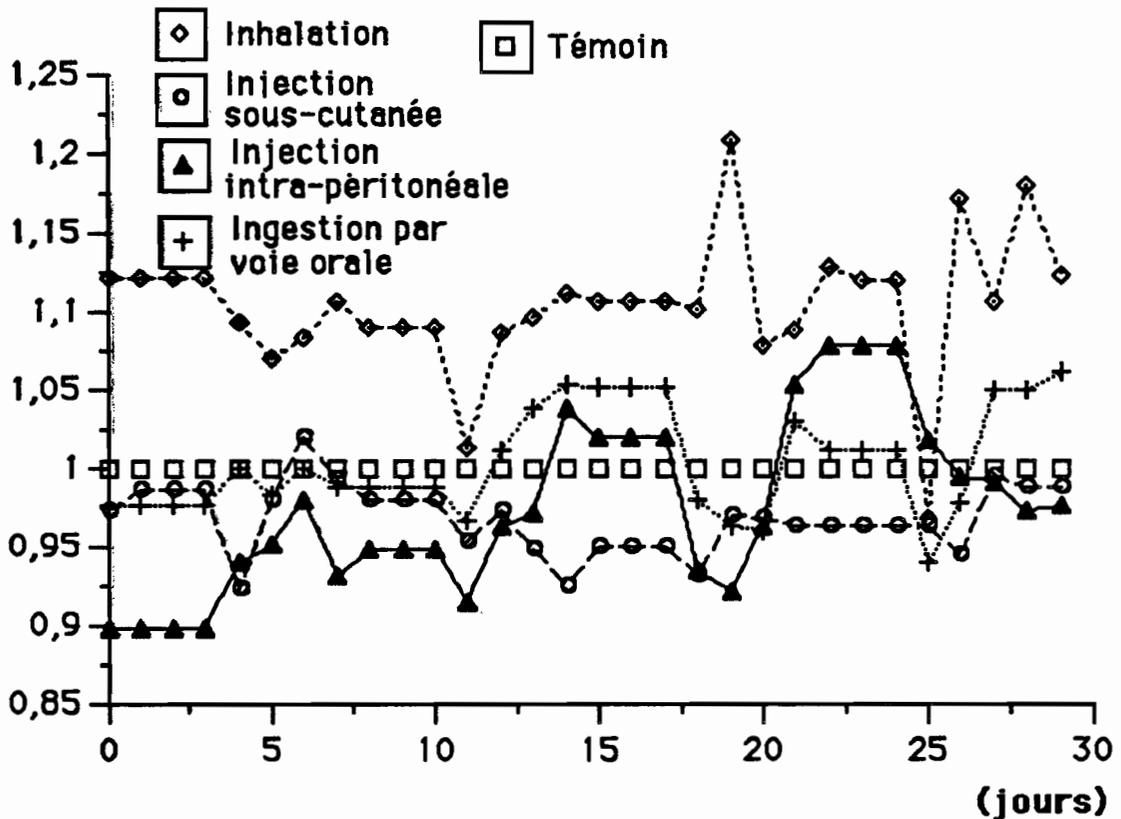
2.2 RESULTATS

Les courbes d'augmentation de poids (fig. IV.1) des animaux traités et des témoins sont très semblables. A l'autopsie, tous les organes avaient un aspect normal. Le rapport de leur poids au poids de l'animal est sensiblement identique à celui des témoins (tableau IV.1).

Tableau IV.1 Poids moyen des organes autopsiés par rapport au poids moyen de l'animal, pour chacun des traitements de vérification de toxicité.

Organe	Foie	Poumons	Rate	Coeur	Cerveau	Reins
Traitement :						
<u>Voie orale</u>						
org./poids total	0,059	0,012	0,005	0,007	0,010	0,016
témoin	0,068	0,016	0,006	0,008	0,011	0,017
<u>Inhalation</u>						
org./poids total	0,064	0,013	0,005	0,009	0,013	0,016
témoin	0,059	0,013	0,005	0,008	0,013	0,016
<u>Sous-cutanée</u>						
org./poids total	0,065	0,012	0,004	0,008	0,012	0,020
témoin	0,065	0,011	0,005	0,008	0,012	0,019
<u>Intrapéritonéale</u>						
org./poids total	0,062	0,013	0,003	0,008	0,010	0,021
témoin	0,063	0,012	0,004	0,009	0,009	0,021

Figure IV.1 : Evolution quotidienne des poids moyens relatifs des lots de souris soumises aux différents traitements de vérification de toxicité.



Nous pouvons en conclure que le produit est inoffensif sur les animaux auxquels il a été administré.

3. ETUDE DE LA TOXICITE DE *ANACYSTIS NIDULANS* R2 PORTANT OU NON LES GENES DE LA TOXINE

Une évaluation préliminaire de la toxicité de deux souches transformées a été conduite en laboratoire sur des larves de *C. pipiens* d'élevage. Des vérifications ont été faites sur *Aedes aegypti* et *Anopheles stephensi* avec l'une d'entre elle : quatre fois 25 larves stade III sont mises en contact avec des dilutions progressives des échantillons. La mortalité des larves est établie après 48 h de contact. Une analyse log-probit permet de déterminer la CL 50 de chaque échantillon. Les

concentrations en cyanobactéries sont exprimées en mg de protéines totales par ml.

3.1. TOXICITE SUR MOUSTIQUES de *A. nidulans* pGsp 12

La comparaison de la toxicité de la souche transformée d'*A. nidulans* R₂ sur trois espèces de moustiques est présentée tableau IV.2.

Tableau IV.2 : Evaluation de la toxicité de *A. nidulans* pGsp 12 portant les gènes de la toxine de *B. sphaericus* 1593 sur trois espèces de moustiques

Espèce	% Mortalité chez Témoins		<i>A. nidulans</i> R ₂ + pGsp 12		
	Eau pure	<i>A. nidulans</i> (1 µg/ml)	concentration (µg/ml)	% mortalité larvaire	CL 50 (en µg/ml)
<i>Aedes aegypti</i>	0	0	20	0	-
			10	0	
			5	0	
<i>A. stephensi</i>	0	0	1	85	0,716
			0,5	10	
			0,1	0	
<i>Culex pipiens</i>	4	7	1	97	0,380
			0,5	55	
			0,1	0	

On retrouve le même profil de toxicité qu'avec une suspension de *B. sphaericus*. Il est à noter la mauvaise répétabilité des résultats (non repris ci-dessus) obtenus avec des échantillons transportés congelés. Cette observation va dans le sens d'une dispersion de la protéine dans le cytoplasme cellulaire, peut-être sous forme soluble, certainement pas en agrégat cristallin, voire amorphe. La congélation-décongélation en milieu non protégé provoque l'éclatement des cellules et les larves de moustiques, ingérant préférentiellement du matériel particulaire, peuvent ne pas absorber autant de toxine que lorsqu'elle est enclose dans des cellules intactes.

Les concentrations d'*A. nidulans* sont exprimées en protéines/ml. Si la proportion de toxine vis-à-vis des protéines totales a pu être

évaluée à 5 à 10 % selon les souches chez *B. sphaericus*, cette évaluation n'a pas encore été faite chez le transformant d'*A. nidulans* étudié ici.

3.2 EFFET DES VESICULES GAZEUSES SUR LA TOXICITE

Une autre étude de laboratoire a porté sur la comparaison d'efficacité des deux souches transformées disponibles, la seconde (pGsp 73) portant en plus des gènes de toxines, un gène codant pour une protéine d'enveloppe de vésicule gazeuse.

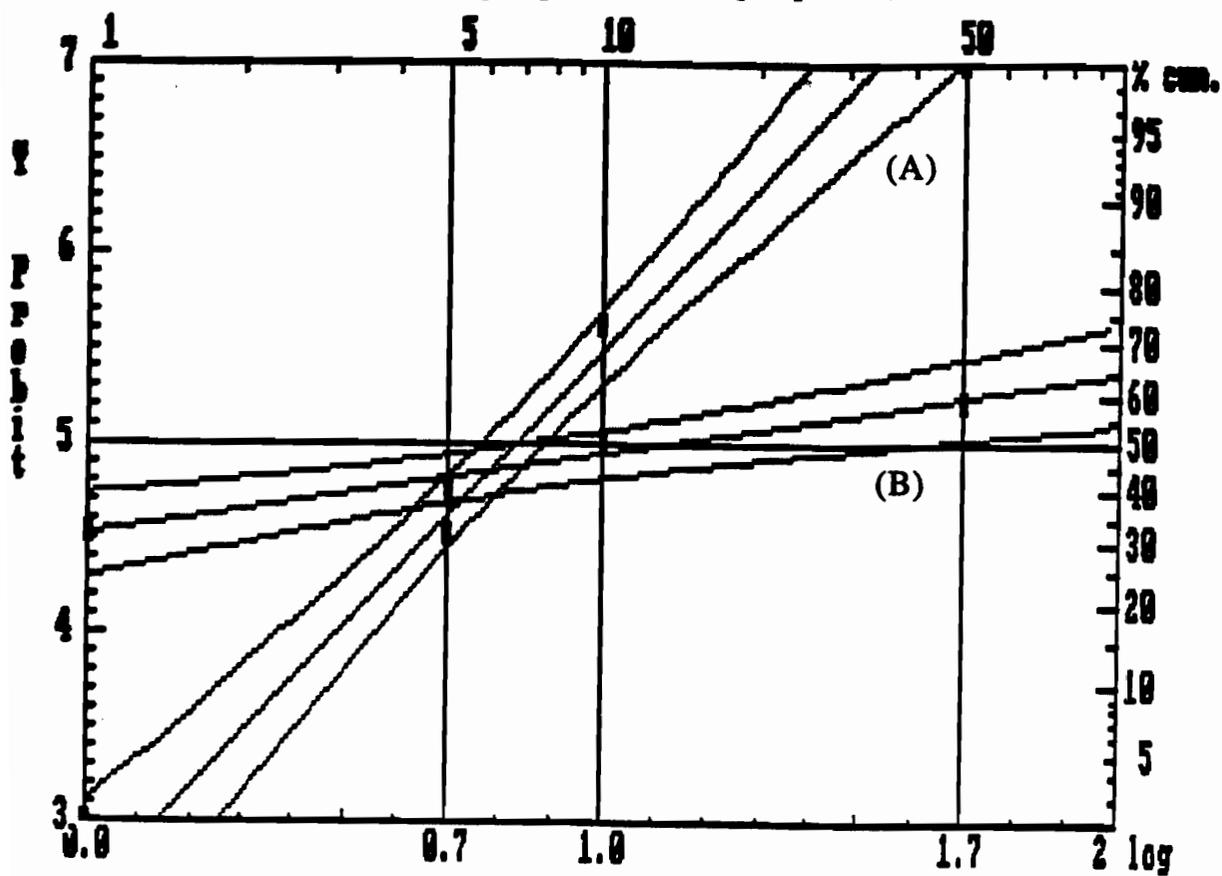
Les droites de régression log-probit (pourcentage de mortalité en fonction de la concentration en protéines) construites avec les résultats des titrages sur *C. pipiens* des deux souches d'*A. nidulans* pGsp 12 et pGsp 73 présentent des pentes très significativement différentes (2,89 et 0,42 respectivement) (fig. IV.2). Ceci indique une différence dans le niveau de toxicité des deux souches vis-à-vis des moustiques. Deux hypothèses peuvent être émises :

- la toxicité de la souche est liée au niveau d'expression et de maturation de la protéine par la machinerie génomique et être sous la dépendance du nombre de plasmides ou encore de l'efficacité d'un gène promoteur par exemple; les deux souches ayant été transformées par des inserts différents nous n'avons pas la preuve que l'expression de la toxine soit du même ordre dans les deux ;

- une différence de comportement alimentaire des larves vis-à-vis de ces deux produits dont la dispersion dans le milieu n'est pas identique (la pGsp 12 est plus concentrée sur le fond). Il est courant d'observer que les larves de *Culex* se nourrissent en surface. Ceci correspond à des larves au repos. En réalité lorsque la profondeur de l'eau le permet, et c'est le cas au moins en élevage et dans le cas des tests en laboratoire, les larves au stade III et IV se déplacent sur le fond des récipients, en position verticale, et filtrent les corpuscules qui ont sédimenté.

Nous n'avons pas suffisamment d'éléments, à l'heure actuelle permettant d'étayer une hypothèse plutôt que l'autre.

Figure IV.2 : Droites dose-mortalité et leur intervalle de confiance à 95 % obtenus sur larves de *C. pipiens* (stade III) avec des suspensions de *A. nidulans* pGsp 12 (A) et pGsp 73 (B).



(Programme OVERDOS- PICHON 1989)

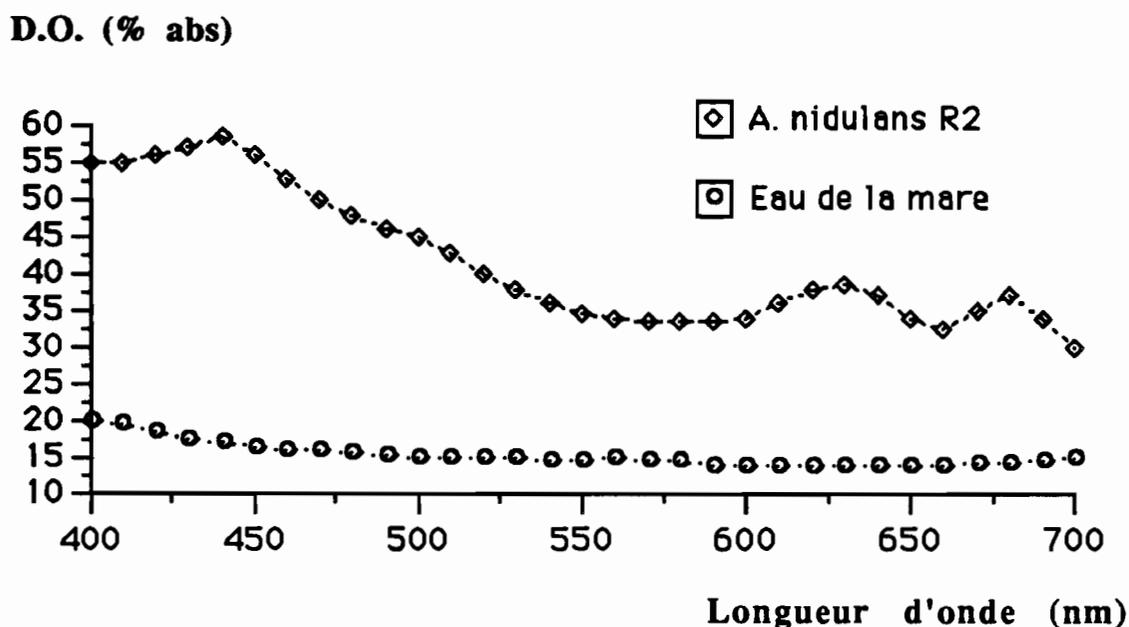
4. ESSAIS EN MARES SEMI-NATURELLES

4.1 MATERIEL ET METHODES

Dans le but de suivre la croissance de la cyanobactérie dans un milieu aussi complexe que l'eau d'un milieu naturel, le spectre d'absorption d'une suspension de la souche étudiée a été comparé à celui de l'eau de la mare expérimentale (fig. IV.3). Trois pics d'absorption correspondant spécifiquement à *A. nidulans* peuvent être retenus ; ils se présentent aux longueurs d'onde de 440, 630 et 680 nm.

Il est possible d'avoir une bonne évaluation de la présence de la cyanobactérie dans le milieu grâce à une simple mesure de densité optique. Nous avons choisi 630 nm. Ces valeurs pourront être mises en

Figure IV.3 : Spectre d'absorption pour les longueurs d'ondes visibles d'une suspension d'*A. nidulans* R2 comparé à celui de l'eau de la mare expérimentale.



relation avec les conditions climatiques afin de déterminer quelles grandeurs peuvent influencer le maintien ou provoquer la disparition du micro-organisme en milieu naturel.

Avec le vieillissement de la culture, les pics d'absorption à 630 et 680 nm ont tendance à se déplacer vers les plus courtes longueurs d'onde ("jaunissement" de la culture).

Deux études ont été conduites en mares semi-naturelles situées à Bondy (15 km nord-est de Paris). Afin d'éviter toute dispersion incontrôlée des souches, les mares ont été entourées d'un grillage (1 m de haut) et recouvertes d'un filet à mailles de 2 cm. Elles sont installées dans une propriété close.

* **Eté 1988** : les deux mares retenues pour cette étude ont plusieurs années d'existence. Leur fond est cimenté, elles sont colonisées par une faune et une flore aquatiques spontanées (salamandres, grenouilles entre autres). La surface a été débarrassée des lentilles d'eau (*Lemna minor*) avant l'expérimentation. Elles ont une superficie de 3 et 5 m² et une profondeur moyenne de 0,35 et 0,50 m respectivement. Une mare témoin d'une superficie de 30 m² et de 0,20 à 0,30 m de profondeur, située à environ 100 m des précédentes permet de suivre l'évolution de la population naturelle de *C. pipiens*. La densité larvaire dans chacune d'elles a été suivie par la méthode des prélèvements aléatoires : trois fois par semaine un volume de 200 ml est prélevé au hasard en trois points de chaque mare. Les larves sont comptées en différenciant les stades. Les données climatiques, durée journalière de l'insolation, températures maximales et minimales au cours de la période, ont été fournies par la Météorologie Nationale (station Le Bourget à 7 km du lieu d'expérimentation).

La quantité d'inoculum d'*A. nidulans* pGsp 12 à appliquer a été régie par les dosages préliminaires faits en laboratoire. La suspension de cyanobactéries a été épanchée de manière homogène à la surface de chaque mare. La première mare a été traitée à 1,2 mg de protéines par litre, la seconde à 6 mg/l.

***Eté 1989** : suite aux résultats de l'été 1988, il a été décidé de procéder à un nouvel essai faisant intervenir non plus la dose appliquée mais un nouveau transformant (pGsp 73) portant, en plus du gène codant pour la toxine, un gène codant pour la protéine d'enveloppe de vésicules

gazeuses (VG) présentes dans certaines souches de cyanobactéries. Le but était de diminuer la densité des cellules transformées et d'améliorer ainsi leur flottabilité.

Trois mares identiques en surface (3 m²) et remplies trois mois auparavant (0,35 m) d'eau de ville ont reçu un premier inoculum le 4 juillet (1,5 litre d'une suspension à 1,6 mg de protéines/ml c'est-à-dire une concentration finale de 2,4 mg/litre) de chacune des trois souches : *A. nidulans* R₂ témoin, *A. nidulans* transformée pGsp 12 et *A. nidulans* transformée pGsp 73. Une mare témoin de l'évolution naturelle de *C. pipiens* de 30 m² est située à environ 100 m de ces dernières. Elles ont été traitées une seconde fois, respectivement avec les mêmes souches, le 2 août (1,3 litre c'est-à-dire 2,1 mg/l) pour renouveler les observations.

4.2 RESULTATS

4.2.1 Eté 1988 : la comparaison porte sur la dose appliquée

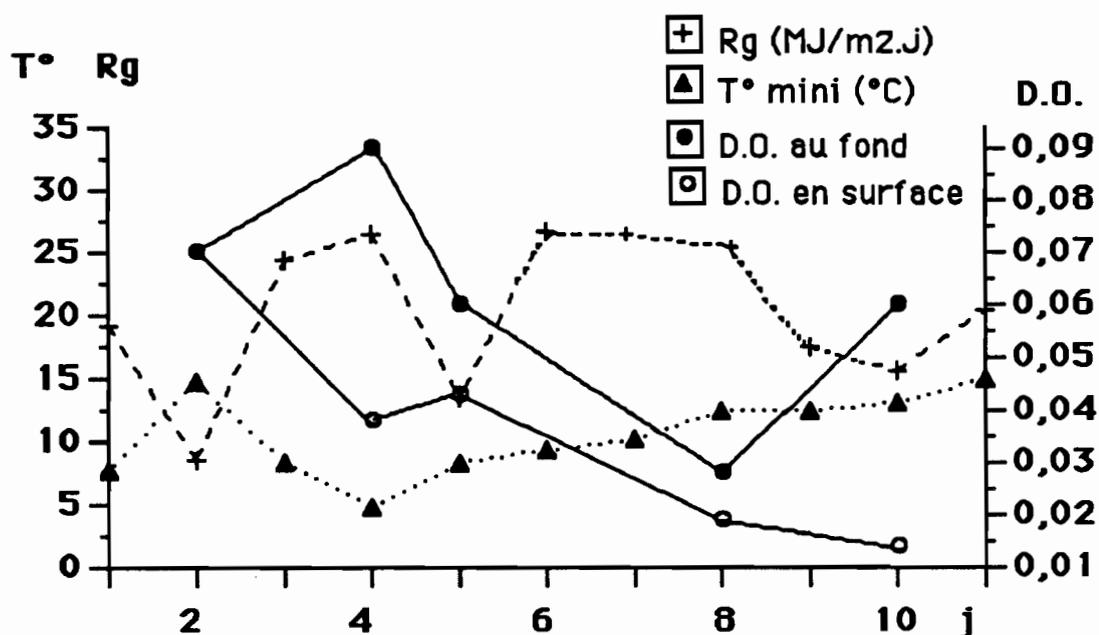
Les populations naturelles de *C. pipiens* ont été observées dans les mares témoin et expérimentales. Les résultats (tableau IV.3) montrent qu'il y a effectivement eu une limitation de la population de moustiques dans les mares traitées.

Tableau IV.3 : Densité de population naturelle de larves de *C. pipiens* (valeur moyenne de trois prélèvements de 200 ml).

Temps (jours)	Mare témoin	Mare I traitée à 1,2 mg/litre	Mare II traitée à 6 mg/ litre
0	51 ± 10	12 ± 12	35 ± 5
2	241 ± 20	10 ± 3	0
6	157 ± 31	24 ± 4	0
9	207 ± 23	17 ± 5	0
12	368 ± 58	17 ± 3	0
14	344 ± 69	101 ± 15	0
16	503 ± 60	39 ± 10	0

Des prélèvements réguliers d'eau dans la mare 1 permettent d'évaluer la densité de cyanobactérie par mesure de l'absorption à 630 nm, sur le fond (D.O. au fond) et à 10 cm sous la surface (D.O. en surface) (figure IV.4)

Figure IV.4 : Evolution de la densité d'une suspension d'*A. nidulans* pGsp12 dans un milieu naturel, relation avec les conditions climatiques.



En dépit d'une insolation (rayonnement global : Rg) et d'une température nocturne (T° mini) élevées, la concentration en cyanobactéries décroît au cours du temps, plus rapidement en surface mais également sur le fond, après un premier enrichissement dû très vraisemblablement à une sédimentation.

L'introduction d'un plasmide et l'expression d'une protéine nouvelle dans les cellules d'*A. nidulans* leur confèrent une densité telle que la bactérie ne se maintient pas en surface. De même, la toxicité vis-à-vis des larves de *C. pipiens* est systématiquement plus forte dans les échantillons prélevés au fond de la mare. Si l'effet se maintient ce n'est pas la preuve que la cyanobactérie soit restée vivante : l'eau des gîtes est chargée de débris organiques, ce qui la rend peu perméable aux

rayonnements solaires, or la croissance d'*A. nidulans* nécessite un fort ensoleillement.

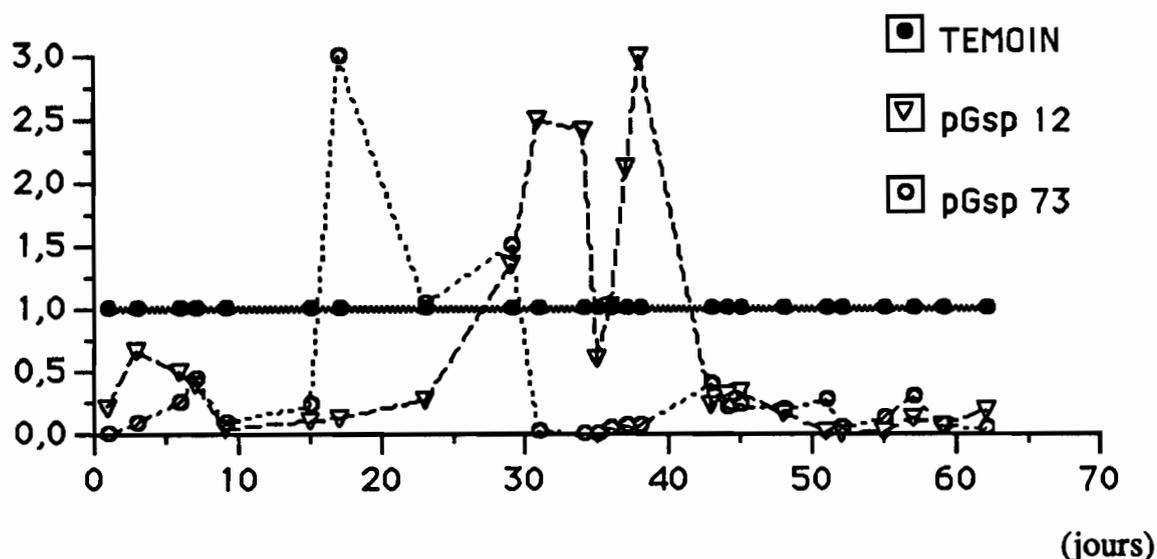
Quoiqu'il en soit le transfert des gènes de *B. sphaericus* dans un organisme susceptible de se maintenir proche de la surface n'ayant pas été probant, une autre approche a été mise en place : l'adjonction dans le plasmide vecteur d'un gène d'une autre souche de cyanobactérie codant pour la protéine enveloppe de vésicules gazeuses. Ce travail réalisé par une équipe mixte CNRS-Institut Pasteur a abouti à la souche *A. nidulans* pGsp 73 dont nous avons étudié la flottabilité et le comportement en milieu naturel au cours de l'été 1989.

4.2.2. Eté 1989 : la comparaison a porté sur l'efficacité des transformants pGsp12 et pGsp 73

Les vésicules gazeuses n'ayant pu être visualisées par microscopie par l'équipe qui a réalisé la transformation, nous avons monté un dispositif expérimental destiné à observer l'effet de la transformation sur la flottabilité de la souche *A. nidulans* pGsp 73 : 100 ml d'une culture dense sont déposés au fond d'un récipient cylindrique en verre contenant deux litres d'eau de mare filtrée. La densité du milieu de culture est telle que l'échantillon se répartit sur le fond du récipient. Au cours des heures qui suivent, une différence de diffusion manifeste entraîne une répartition homogène de l'échantillon pGsp 73 ainsi que de la suspension *A. nidulans* témoin alors que l'échantillon pGsp 12 montre une tendance très nette à l'accumulation dans le bas de la colonne d'eau apportant la preuve s'il en était encore besoin de l'augmentation de sa densité consécutive à la transformation.

Dans les mares expérimentales, on retrouve la manifestation de la différence observée avec les souches portant pGsp 12 et pGsp 73. Les résultats sont portés dans la figure IV.4.

FIGURE IV.5 : Densité larvaire naturelle relative de *C. pipiens* dans des mares expérimentales traitées avec différentes souches d'*A. nidulans* exprimant le gène d'une toxine de *B. sphaericus* en fonction du temps (jours).



Il apparaît une baisse sensible de la densité de population larvaire dans les mares traitées. Néanmoins certains relevés fournissent des résultats moins favorables : c'est le cas à J 18 avec pGsp 73 et à J 31, 34, 37 et 39 avec pGsp 12 lequel semble dès lors moins performant (fig. IV. 4). En analysant plus finement les résultats il s'avère que chaque fois la raison du manque apparent d'efficacité du traitement provient de la présence d'un nombre élevé de larves stade I. Sachant que la toxicité de *B. sphaericus* ne se manifeste qu'après 48 heures de contact, il faut minimiser le rôle des larves stade I dans cette évaluation car elles n'ont pas encore eu le temps de subir l'action de la toxine. Elles indiquent une ponte récente. En général, les pontes de *Culex* étaient très abondantes dans la mare témoin et assez rares, si ce n'est inexistantes, dans les mares traitées. Il y a d'ailleurs tout lieu de croire que la faible densité larvaire tenait plus de l'absence de repopulation que de la toxicité de l'eau.

L'attractivité relative des trois mares est mise en évidence par un essai en laboratoire : dans une cage de *C. pipiens* d'élevage contenant des individus dont l'émergence remonte à trois jours sont placés trois

pondoirs contenant l'eau des trois mares expérimentales chargées de *A. nidulans* pGsp 12 (I), *A. nidulans* pGsp 73 (II) et *A. nidulans* R₂ (III). Les pondoirs sont observés chaque jour et ne sont retirés que lorsque la production de pontes se tarit, soit après 6 jours. Les résultats de trois répétitions (tableau IV.4) reflètent la répartition des pontes dans les mares.

Tableau IV.4 : Vérification de l'attractivité de l'eau des mares expérimentales à l'oviposition : dénombrement des pontes dans des pondoirs placés dans des cages d'élevage et contenant de l'eau des mares expérimentales.

Mare I (pGsp 12)	Mare II (pGsp 73)	Mare III Témoin <i>A. nidulans</i>
19	7	45
21	14	43
8	3	51
Moyenne		
16	8	46,3
écart-type		
7	5,6	4,2

L'observation a pris fin à la fin de la période naturelle de présence des *C. pipiens* dans la région.

5. CONCLUSION

La croissance d'*A. nidulans* est tributaire de plusieurs facteurs. Des conditions optimales d'éclairage et de température ont été définies pour le maintien de cet organisme en conditions artificielles de même que la composition en éléments minéraux (RIPPKA *et al.*, 1979).

La figure IV.3. permet de constater que la diminution progressive de la population d'*A. nidulans*, surtout en surface, n'est influencée ni favorablement par le rayonnement solaire global (R_g) ni

défavorablement par les températures minimales. Il faut donc admettre que la composition minérale du milieu des mares expérimentales s'écarte très sensiblement de la formule idéale. La comparaison de la composition des deux milieux confirme un très large déficit en nitrates et en ion sodium (tableau IV.5).

Tableau IV. 5 : Analyse des éléments chimiques majeurs des divers milieux impliqués dans l'expérimentation (concentrations en milliéquivalents par litre).

ion	Mare témoin	Mare traitée	Milieu optimal de culture
Ca ⁺⁺	3,97	2,67	0,39
Mg ⁺⁺	1,24	1,20	0,40
K ⁺	1,13	0,24	0,17
Na ⁺	0,92	1,00	18,35
HCO ₃ ⁻	4,12	2,12	0,75
Cl ⁻	1,63	1,55	0,39
PO ₄ ⁻	0,02	0,01	0,17
NO ₃ ⁻	0,01	0,03	17,60
SO ₄ ⁻⁻	1,71	1,54	0,40
pH	7,5	7,5	7,4

L'importance des nitrates pour un organisme autotrophe est bien connue. Si les normes de sécurité pour l'eau potable (< 50 mg NO₃⁻/l) imposent une limitation à l'épandage des "engrais azotés", l'agriculture intensive est à l'origine d'un enrichissement permanent en nitrates des eaux de ruissellement. Il serait donc intéressant de vérifier la viabilité d'*A. nidulans* dans des eaux chargées en nitrates. Le mauvais maintien d'*A. nidulans* dans nos mares expérimentales au cours d'une période climatiquement favorable n'est pas la preuve de la non applicabilité du produit dans d'autres conditions.

Nonobstant cette réserve, le traitement a eu un effet bénéfique inattendu : l'absence marquée d'oviposition dans les mares contenant les transformants pGsp 12 et surtout pGsp 73. En effet, l'absence durable de population larvaire dans les mares I et II n'est pas imputable à une toxicité rémanente comme nous avons pu le vérifier (absence de

mortalité dans 25 larves d'élevage placées dans un échantillon de 200 ml de la mare, plusieurs essais entre le 7ème et le 30ème jour) mais à une forte diminution sinon à une absence totale de pontes alors que dans la mare III (*A. nidulans* non transformée) ainsi que dans le bassin témoin, le renouvellement du premier stade larvaire était quotidien.

La sélectivité des femelles de Culicidae pour leurs sites d'oviposition a été étudiée par plusieurs équipes. Les résultats sont souvent contradictoires et ne permettent pas d'être généralisés car de nombreux facteurs semblent être pris en considération à des niveaux divers selon les espèces, et les auteurs. MAIRE (1983) dans une analyse de la bibliographie sur ce sujet, relève l'importance pour le moustique, à échelle géographique décroissante, de l'ensoleillement, de la couleur du substrat, de la salinité, de la présence et de la nature des composés organiques enfin de phéromones qui regroupent l'ensemble de facteurs spécifiques liés à la présence non seulement des larves et des nymphes mais également des pontes antérieures (BRUNO et LAURENCE, 1979). Ces auteurs notent cependant que pour *C. pipiens fatigans* l'oviposition n'est pas influencée par la présence de larves ou de nymphes.

Le rôle attractif de certaines bactéries sur *Culex pipiens* est également cité : *Pseudomonas aeruginosa* et *Aerobacter aerogenes*. Rien, à notre connaissance, n'a été publié concernant un éventuel rôle répulsif. Dans le cas de nos observations, il y a tout lieu de croire que nous sommes en présence d'un tel phénomène. Les pondoirs placés dans les cages d'élevage ont reçu les échantillons des trois cyanobactéries en suspension dans de l'eau filtrée d'une même mare non traitée. Il ne saurait être question d'un effet répulsif dû à d'éventuelles larves mortes. Il y a donc lieu de trouver une explication au niveau de la cyanobactérie transformée elle-même. Nous n'avons pas encore pu poursuivre cette analyse.

CHAPITRE V -

ETUDE DE L'INTERVENTION DE *B. SPHAERICUS* DANS UN SCHEMA DE LUTTE INTEGREE

1. INTRODUCTION

A l'analyse des études menées pour appliquer ou promouvoir la lutte biologique contre les insectes nuisibles, il s'avère que trop souvent les objectifs ne sont pas atteints et que l'alternative d'une "lutte intégrée" est proposée faisant intervenir des insecticides chimiques.

Le but est alors de provoquer une baisse substantielle du niveau de la population par un insecticide non rémanent de telle sorte que la lutte biologique par prédateurs ou pathogènes présents dans la faune naturelle ou introduits puisse alors prendre le relais.

Le principe n'est valable que si le traitement insecticide n'agit pas défavorablement sur les prédateurs naturels ou sur les pathogènes introduits à sa suite. Nous reprendrons quelques exemples de la littérature où le premier point est abordé et ferons état d'une expérimentation menée pour expliciter le second, dans le cas de *B. sphaericus*.

2. ACTION DES INSECTICIDES CHIMIQUES SUR LA FAUNE NON-CIBLE

L'analyse de l'impact d'un traitement chimique sur la faune non-cible a été faite par de nombreux auteurs. Depuis la pollution accidentelle par organophosphorés tuant des canards (DDVP : LUDKE et LOCKE, 1976) ou supprimant pour trois ans toute la microfaune de même que les batraciens et gastéropodes d'un étang (parathion et o.-diméthoate : CHARDEZ, 1968) jusqu'aux épandages aériens de malathion

qui affectent les Homoptères et les Hyménoptères, en particulier les abeilles (HILL *et al.*, 1971), les exemples de "débordement" sont nombreux. L'effet des insecticides chimiques sur le zooplancton, les poissons, les oiseaux, a été étudié dans diverses circonstances. La comparaison des différents travaux se heurte à l'absence de valeur exacte de concentration dans le volume d'eau traité. La plupart du temps, l'information est donnée en termes de quantité appliquée (quantité de produit technique ou de matière active par unité de surface) souvent sans indication de la profondeur des gîtes traités.

Dans une étude de lutte contre *Culex tarsalis* dans des mares expérimentales (en Californie), MULLA *et al.* (1969) observent que, si certains Odonates ne semblent pas affectés par les traitements aux organophosphorés, les populations de Notonectes ne se reconstituent que lentement en deux semaines. C'est le temps nécessaire pour que réapparaisse la population de *C. tarsalis* et l'intervalle normalement choisi entre deux traitements insecticides.

A la suite de traitements des mêmes mares expérimentales au DDT et au méthyl-parathion, HURLBERT *et al.* (1972) constatent la disparition des *Cyclops* sp. et des *Daphnia* sp. suivie d'une prolifération d'*Anabaena* sp. (*Cyanophyceae*). Ces auteurs attirent l'attention sur ce phénomène qu'ils n'ont pas été seuls à signaler et citent les observations de Kiser, Donaldson et Olson, en 1963, sur le résultat du traitement d'un lac avec de la roténone qui a eu pour effet de faire disparaître le zooplancton et augmenter le phytoplancton. La prolifération d'*Anabaena* sp. suite à l'utilisation de chlorpyrifos (HURLBERT *et al.* 1972) est préoccupante car, avec la flore bactérienne qui lui est généralement associée, elle présente une toxicité pour l'eau de boisson de la faune sauvage. La toxicité pour l'environnement est dans ce cas une conséquence secondaire non négligeable.

FORTIN *et al.* (1987) étudient l'effet résiduel du téméphos (O.P.) sur la dynamique du repeuplement des différentes communautés de zooplancton vivant dans des gîtes à *Aedes* spp. L'effet résiduel des O.P. dépend des conditions environnementales qui régissent l'hydrolyse et la photolyse de ces composés. Leur vitesse est fonction de la température et du pH. La concentration de téméphos choisie (30 mg/l) fait

disparaître les *Aedes* sp. et les *Culex* sp. pendant plus de six semaines. Par contre, les *Chaoborus* sp. et *Chironomus* sp. se réinstallent et deviennent abondants dix jours environ après le traitement qui n'a pas eu d'impact sur les Ostracodes et n'a fait baisser que faiblement le niveau des populations de Copépodes (*Cyclops* sp.). Seul le niveau des populations de Cladocères (*Daphnia* sp.) reste plus faible que chez le témoin.

Les mêmes espèces sont observées par APPERSON *et al.* (1978) après un traitement au diflubenzuron (I.G.R.) dirigé contre une population de *Chaoborus astictopus* : la spécificité des I.G.R. semble devoir être élargie aux arthropodes autres que les *Culicidae* car si le diflubenzuron ne présente pas d'action à long terme sur les Copépodes - le niveau des populations se rétablit en 3 à 6 semaines - certaines espèces de daphnies n'ont pas réapparu 6 mois après traitement. Les auteurs constatent que les poissons, non affectés par le produit lui-même, se nourrissent, suite au traitement, plutôt d'insectes terrestres et de chironomides.

A travers ces quelques études choisies pour illustrer le souci de prévoir l'impact d'un traitement insecticide, il apparaît que la situation est préoccupante et que l'action massive n'est pas satisfaisante : en stimulant la prolifération de certaines espèces du phytoplancton et en réduisant les populations de prédateurs, l'insecticide chimique peut créer un déséquilibre écologique apparemment favorable à l'insecte contre lequel il avait été utilisé.

Lorsqu'un insecticide de synthèse est employé pour préparer ou pour seconder une lutte par agent biologique il est indispensable de vérifier s'il existe entre eux des effets synergiques ou antagonistes. Nous avons posé le problème avec *B. sphaericus*.

3. TRAITEMENTS COMBINÉS : Insecticide - agent entomo-pathogène

La mortalité provoquée, dans une population d'insectes, par le traitement simultané avec un insecticide et un agent pathogène peut

représenter la simple addition des effets individuels. Par contre, si les deux produits interagissent, le résultat peut être supérieur (synergie) ou inférieur (antagonisme) au simple effet cumulatif. De tels essais ont été pratiqués dans le but d'utiliser les insecticides à des doses sublétales permettant notamment de diminuer la charge appliquée aux écosystèmes ou de minimiser la sélection d'une résistance.

La synergie recherchée pourrait résulter du fait que le pathogène augmente la sensibilité de l'insecte à l'insecticide ou, à l'inverse, que l'intoxication de l'insecte le rende plus réceptif au pathogène. Le cas contraire est illustré par MOAR et TRUMBLE (1987) qui signalent un effet antagoniste entre un produit nommé Neem¹ et *B. thuringiensis kurstaki*. Le premier produit inhibant l'appétit des larves phytophages, celles-ci¹ absorbent moins de *B. t. kurstaki*. et la mortalité résultante diminue dans les essais. L'effet antagoniste pourrait également provenir de la destruction d'un agent par l'autre : une dégradation accélérée de certains insecticides (carbamates) et d'herbicides (carbofurane) par les bactéries du sol a par exemple été mise en évidence par REED *et al.* (1989).

Dans une synthèse consacrée aux champignons entomopathogènes, RAMARAJE *et al.* (1967), indiquent que le DDT et les organophosphorés ont en général un effet fongicide ou inhibent la sporulation ; au mieux, il y a absence d'interaction selon des conditions expérimentales (milieu liquide ou solide) ou les concentrations.

ALLEGRIINI *et al.* (1972) mettent en évidence l'effet inhibiteur de trois familles d'insecticides (O. chloré : DDT ; O. phosphoré : chlorpyrifos ; carbamate : Sevin) sur des bactéries actives dans l'épuration biologique des eaux. Sur des bactéries entomopathogènes, le même phénomène est décrit par CHEN *et al.* (1974) qui signale la perte de viabilité de spores de *B. t. Berliner* au contact de plusieurs organophosphorés et carbamates, à l'exception toutefois du propoxur (carbamate). Néanmoins, l'effet de ces mélanges sur les larves cibles (*Heliothis virescens*) peut

¹NEEM ® : produit altérant la croissance et inhibant l'appétit des larves phytophages, extrait des graines de *Azadirachta indica* A. Juss.

être synergique ou simplement additif. Nous avons précédemment discuté la distinction qui peut être faite entre viabilité et toxicité de *B. thuringiensis* et *B. sphaericus*, ces deux propriétés relevant de structures et de mécanismes pouvant agir indépendamment. Sachant le rôle croissant qu'est appelé à jouer *B. sphaericus* en lutte anticulicidienne dans des régions où les insecticides chimiques n'ont pas été pour autant abandonnés, il nous a paru intéressant de vérifier leurs interactions.

4. EVOLUTION DU MELANGE Insecticides - *B. sphaericus*

4.1 MATERIEL ET METHODES

4.1.1 Croissance de *B. sphaericus* en présence d'insecticides

0,1 ml d'une suspension de *B. sphaericus* préparée pour contenir environ 10^3 spores dans ce volume sont étalés en boîte de Pétri sur un milieu gélosé spécifique (M.B.S. : KALFON *et al.* 1983). Trois pastilles de papier filtre imbibées de solutions techniques de différents insecticides (chlorpyrifos, téméphos, fénitrothion) ainsi que d'un herbicide commercial (KB[®] dont nous n'avons pu obtenir la composition mais qui est d'un usage courant pour le désherbage des berges de gîtes à *Culex*) sont déposées à la surface de la gélose. Les boîtes sont placées 24 h en incubateur à 35° C.

4.1.2 Toxicité de *B. sphaericus* en présence de fénitrothion

Des suspensions "stock" de quatre litres sont préparées en eau distillée avec les produits suivants :

Téméphos à 0,0004 mg/l

Fénitrothion à 0,006 mg/l

B. sphaericus à 0,007 mg/l

Mélange Téméphos à 0,0004 mg/l et *B. sphaericus* à 0,007 mg/l

Mélange Fénitrothion à 0,006 mg/l et *B. sphaericus* à 0,007 mg/l.

Pendant 5 semaines avec le téméphos et 10 semaines avec le fénitrothion, à raison d'une fois par semaine, après agitation de 10 mn au barreau magnétique, deux fois 200 ml de chacune des suspensions sont placés dans des gobelets en plastique qui reçoivent ensuite chacun 25 larves de *Culex pipiens* (stade III). La lecture de la mortalité larvaire est pratiquée après 48 h et comparée à un témoin en eau distillée.

4.1.3 Viabilité de *B. sphaericus* en présence de fénitrothion

1 ml est prélevé dans les gobelets recevant la suspension de *B. sphaericus* et le mélange *B. s.* - fénitrothion juste avant d'ajouter les larves de moustiques. L'échantillon est partagé en deux aliquots dont l'un est soumis à un choc thermique (12 mn à 80° C) afin de permettre d'évaluer les quantités respectives de cellules végétatives ou thermosensibles et de formes sporulées thermorésistantes. Des dilutions successives sont pratiquées et 0,1 ml de chacune d'elles sontensemencées en boîtes de Pétri sur milieu M.B.S. gélosé. Les boîtes sont placées en incubateur à 35° C. Un comptage du nombre de colonies est pratiqué après 24 heures.

4.2 RESULTATS

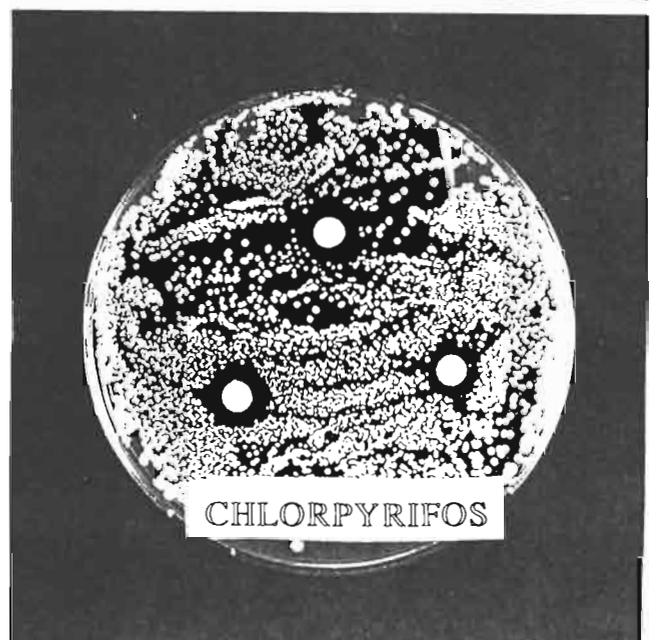
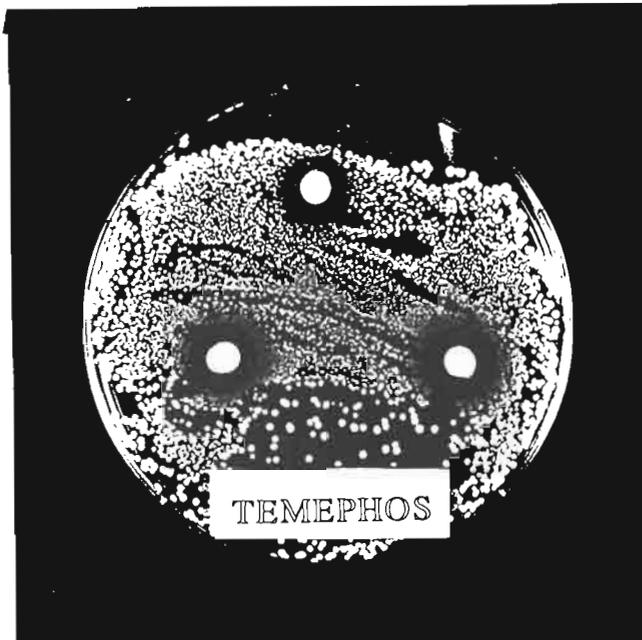
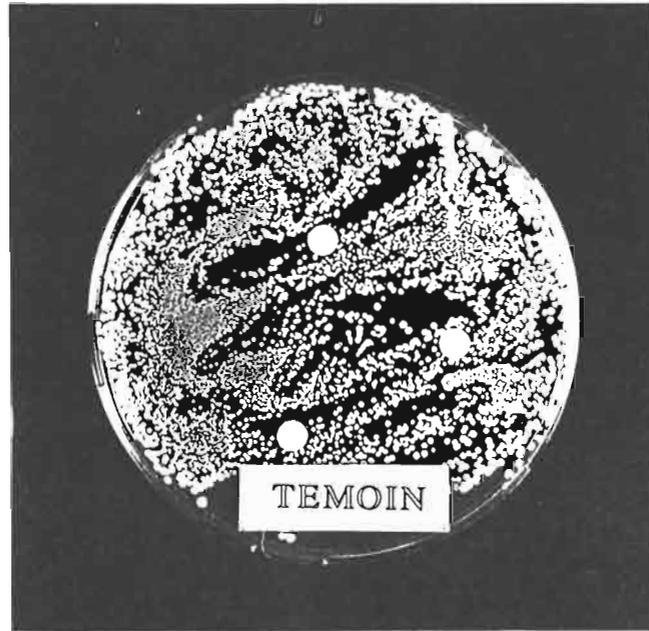
4.2.1 Croissance de *B. sphaericus*

Les photos de la planche V.1 illustrent un essai réalisé avec trois insecticides et un herbicide. L'anneau correspondant à l'inhibition provoquée par le téméphos et le chlorpyrifos est manifeste alors que le fénitrothion ne présente pas cet effet. L'observation faite ici ne permet pas de préciser s'il s'agit d'une action bactériostatique ou bactéricide.

4.2.2 Toxicité du mélange *B. sphaericus* -insecticide

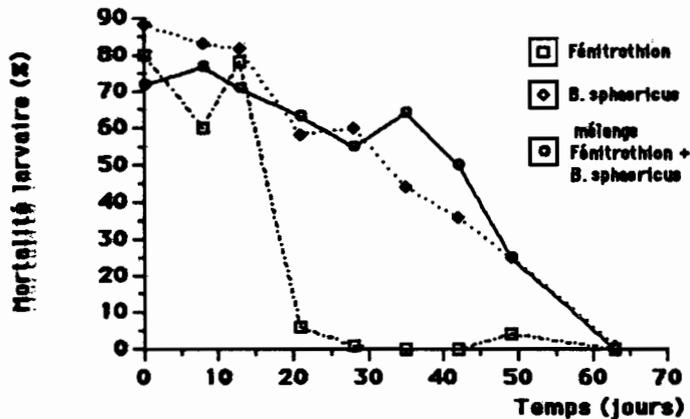
Les résultats (non figurés) obtenus pendant 5 semaines avec le mélange téméphos-*B. sphaericus* indiquent un simple effet additif des deux produits. Par contre, avec le fénitrothion (Fig. V.1) il semble y avoir un effet synergique temporaire (ici entre J30 et J50 mais qui a été

PLANCHE V.1 : Croissance sur milieu gélosé d'unités formant une colonie de *B. sphaericus* et inhibition de cette croissance par plusieurs insecticides et un herbicide.



retrouvé dans les différents essais préliminaires non rapportés) qui pourrait provenir des produits de dégradation par hydrolyse.

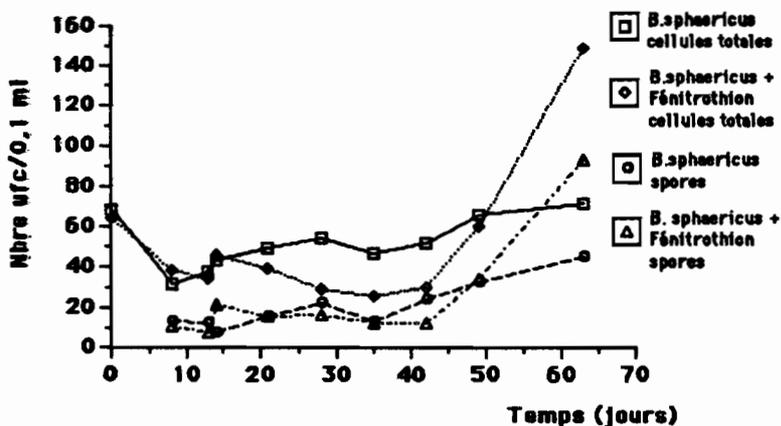
FIGURE V.1 : Evolution de la toxicité comparée de suspensions de *B. sphaericus*, de fénitrothion et de leur mélange.



4.2.3 Viabilité de *B. sphaericus*

Le rapport entre cellules thermorésistantes et thermosensibles est de l'ordre de 1/2 tout au long de l'expérience. Le nombre total de cellules varie peu dans les mélanges de *B. sphaericus* avec le téméphos (résultats non figurés) et avec le fénitrothion (Fig. V.2). Cette observation apporte un éclaircissement à l'interprétation de l'inhibition présentée en 4.2.1 : il s'agit donc d'une action bactériostatique du téméphos et du chlorpyrifos.

FIGURE V.2 : Evolution du nombre d'unités de *B. sphaericus* formant une colonie (ufc) après un séjour prolongé en présence de fénitrothion (et témoin en eau distillée).



5. CONCLUSION

Les données disponibles sur la compatibilité entre les bactéries entomopathogènes et les insecticides chimiques sont déjà anciennes en ce qui concerne *B. thuringiensis*. Elles s'appliquent généralement aux souches ayant un intérêt pour l'industrie agricole ou forestière (MORRIS, 1977). *B. sphaericus*, apparu plus récemment en lutte anticulicidienne n'a pas encore été aussi largement étudié.

L'action "intégrée" en lutte antivectorielle est un concept fluctuant. Le milieu dans lequel elle va se dérouler est complexe. Le nombre de facteurs pouvant intervenir n'est pas seulement variable pour des raisons abiotiques ou des causes biotiques mais il augmente encore en fonction des interactions entre ses différentes composantes. Il est très difficile dans ces conditions d'établir une prévision fiable des résultats par extrapolation d'observations expérimentales. Ceci implique une surveillance constante ou du moins régulière, qui ne peut être envisagée qu'en milieu proche des centres opérationnels.

CONCLUSION GENERALE

Malgré les progrès de la recherche entomologique et médicale consacrée depuis plusieurs décennies à l'étude de maladies tropicales parasitaires, aucun succès définitif n'a été obtenu. On ne dispose pas de vaccin qui pourrait, à l'instar des maladies virales, offrir une protection de la population humaine, qu'elle soit totale, jusqu'à l'éradication de la maladie, comme ce fut le cas de la variole, ou au moins satisfaisante, pour autant que la vaccination soit correctement pratiquée (fièvre jaune, poliomyélite, rougeole).

L'échec de l'obtention d'un vaccin antiparasitaire tient à la complexité de la relation qui s'établit entre l'organisme récepteur et son parasite. A mesure que l'on progresse dans la compréhension des réactions immunitaires, on découvre qu'il existe chez les parasites des mécanismes d'évitement, qu'il s'agisse des modifications des épitopes antigéniques bien connus maintenant chez les schistosomes (LAGRANGE et CAPRON, 1979) ou des motifs antigéniques hautement répétés chez le sporozoïte du *Plasmodium* (GODSON, 1985). Cet agent du paludisme échappe par ailleurs très rapidement au système immunitaire humoral dès sa phase intracellulaire. Il est indéniable que chaque espèce parasite a développé au cours de l'évolution une stratégie qui a permis sa pérennité.

Les tentatives de mise au point de vaccins antiparasitaires sont loin d'aboutir à un résultat applicable et d'apporter pour le moment une solution au problème.

La chimioprophylaxie, quand elle existe, est parfois contraignante, en général trop coûteuse pour des populations démunies, et souvent mal acceptée, surtout si des effets secondaires indésirables surviennent. En cela, la filariose de Bancroft ne diffère pas beaucoup des autres maladies parasitaires tropicales.

Par ailleurs, le risque existe de voir s'étendre une population de parasites qui présente une résistance accrue au produit. L'exemple

actuel du paludisme vient malheureusement en illustration de ce phénomène.

Un autre chaînon du cycle du parasite permet d'envisager une action : le vecteur. Il s'agit soit de l'éliminer, soit d'invalider son pouvoir vecteur intrinsèque. Dans la première hypothèse, une connaissance parfaite de son écologie est indispensable pour déterminer les moyens de lutte et évaluer les chances de réussite d'une campagne ou d'un ensemble de mesure antilarvaires, adulticides ou anticontact avec l'homme. Dans le second cas l'étude portera sur la physiologie de la relation qui s'établit entre les deux organismes. Les progrès des techniques en biologie permettent d'aborder le problème sous cet angle mais ce type de recherche est d'un développement trop récent pour trouver déjà des applications.

Le choix d'une stratégie de lutte antivectorielle prend en considération un ensemble de critères scientifiques, économiques et même politiques. Souvent coûteuse, elle n'est par forcément le moyen de prévention adapté. Dans les pays les moins favorisés les problèmes éco-politiques sont tels qu'il est bien difficile de progresser sans une aide internationale.

Les succès de la lutte chimique se tarissent, la lutte intégrée demande une surveillance particulière car ses résultats ne peuvent raisonnablement être extrapolés. La lutte par agents biologiques présente les inconvénients d'une efficacité contestable et d'un coût de production de l'agent qui dépasse largement celui des insecticides de synthèse pour ce qui est des virus, champignons et nématodes.

B. thuringiensis et *B. sphaericus* sont produits par fermentation. Certaines petites industries locales (Indes, Thaïlande) utilisent des résidus agricoles (soja notamment) comme substrat de base amenant la production à un niveau rentable. On peut donc espérer voir s'étendre l'utilisation des bactéries entomopathogènes dont la sélectivité pour leur cible et l'innocuité pour l'environnement font des agents de lutte tout à fait concurrentiels des insecticides chimiques. Les améliorations techniques ont généralement porté sur la formulation pour adapter les

doses aux gîtes, sur la fréquence et les méthodes d'épandage, sur la formation des équipes opérationnelles.

Après les succès de *B. t. israelensis* contre les simulies (Onchocerciasis Control Programme), des résultats encourageants sont obtenus avec *B. sphaericus* dans divers essais à grande échelle. Sur *Culex quinquefasciatus* à Yaoundé (HOUGARD, comm. pers.) et à Kinshasa (KARCH, comm. pers.) mais aussi sur le littoral méditerranéen en France (SINEGRE, comm. pers.).

L'analyse que nous avons faite de quelques facteurs qui interviennent dans l'efficacité de *B. sphaericus* amènent les commentaires suivants :

En zone tropicale, la hauteur d'eau condensable dans l'atmosphère est élevée (jusqu'à 7 cm). Il en résulte une forte absorption dans les courtes longueurs d'onde, en particulier les ultra-violets. La bande spectrale inactivante située dans les U.V.B est affaiblie. L'inactivation photique de *B. sphaericus* est donc moins marquée qu'en région sèche (hauteur d'eau condensable 1 à 2 cm). Nos observations indiquent que l'on peut agir pour limiter encore plus l'inactivation photique en adjoignant à la formulation de *B. sphaericus* un photophore ayant un pic d'absorption dans la bande 560 à 580 nm. Comme le suggèrent les résultats de MORRIS (1983), que nous avons discutés, sa présence suffirait à améliorer la restauration de la toxicité altérée par la lumière de plus courte longueur d'onde.

En climat tempéré, pour améliorer le rendement des traitements avec *B. sphaericus*, il est possible d'agir sur les facteurs intervenant dans le recyclage :

choisir une date de début des traitements précoce, lorsque le cycle des *Culex* spp. est saisonnier, c'est-à-dire anticiper le traitement sur la prolifération des moustiques quand les circonstances le permettent (pas dans les bouches d'égout urbain par exemple) et augmenter la charge des premiers

traitements, surtout si les espèces syntrophiques sont nombreuses.

Ceci permet d'initier le processus de recyclage assez tôt pour amener à une limitation du nombre d'applications ultérieures. Les observations faites par les équipes de démoustication de l'E.I.D. Montpellier confirment qu'un effet cumulatif de *B. sphaericus* a été très sensible au cours de la saison d'été 1989 (SINEGRE, comm. pers.).

Quant au problème de la résistance à *B. sphaericus*, nos connaissances sont insuffisantes pour en prévoir ou non l'apparition. Si nous nous appuyons sur ce qui est décrit pour *B. thuringiensis*, nous pouvons rester optimistes. Mc GAUGHEY (1985) obtient une résistance à la toxine de *B. thuringiensis* (souche non précisée) sur des lépidoptères (*Plodia interpunctella*) de 30 fois en deux générations et qui plafonne à 100 fois en 15 générations soumises à une pression de sélection constante d'une CL 70 à 90. GEORGHIOU et VASQUEZ (1983) soumettent des *C. quinquefasciatus* à une pression de sélection d'une CL 95 avec *B. t. H 14* et obtiennent un facteur de résistance de 10 après 32 générations. Quand la pression est levée, le niveau de sensibilité initial est retrouvé en six générations.

La production de micro-organismes génétiquement transformés et synthétisant les toxines de plus d'une bactérie entomopathogène est proposée (BOURGOUIN, 1988) comme prévention au développement de phénomènes de résistance. Comme nous l'avons vu, avec un exemple (chapitre IV), le problème se pose du devenir tant quantitatif que qualitatif de tels organismes dans l'environnement. Leur dissémination, qu'elle soit accidentelle au cours de la phase expérimentale, par la suite d'une défaillance d'un conditionnement physique, ou volontaire dans une optique de lutte biologique, n'est pas sans soulever des craintes, si pas une nette opposition. Les travaux récents sur les séquences d'ADN mobiles (transposons) ont mis en évidence l'existence de très nombreuses familles de ces éléments. Leur grande mobilité est une propriété favorable à leur utilisation pour les transferts génétiques. Elle présente cependant le danger qu'un transfert "latéral" s'opère, c'est-à-dire le passage, incontrôlé cette fois, vers un organisme d'une autre espèce. Ce risque, d'une très faible probabilité, n'est théoriquement pas

nul. Le gène recombiné pourrait alors persister dans l'environnement, même après que l'organisme "donneur" ait disparu. Une précaution qui s'impose donc est l'insertion simultanée d'un "gène suicide" conditionnel minimisant la survie en conditions hors contrôle. Dans l'exemple que nous avons analysé, un tel gène était présent, instaurant une dépendance à un antibiotique (différent selon les souches fournies). Ce choix présente un autre inconvénient : en l'absence de l'antibiotique correspondant, au bout de quelques divisions cellulaires, la cyanobactérie perd son plasmide (porteur du gène des toxines). Pour palier cet inconvénient il faudrait construire une souche en insérant les gènes des toxines en position chromosomique plutôt que plasmidique, ce qui est techniquement plus délicat à réaliser.

Nous concluons ce travail sur une note volontairement optimiste. *B. sphaericus* est une bactérie entomopathogène efficace sur des espèces vectrices de maladies humaines graves ou présentant un niveau de nuisance pouvant avoir une incidence économique indéniable pour certaines régions. Ses capacités de recyclage naturel existent, sans toutefois avoir pu être largement exploitées jusqu'à présent. En adaptant les quantités et les fréquences d'application, on peut, dans certains gîtes, profiter de la participation des espèces syntrophiques à *Culex* spp. pour améliorer rendement et persistance du traitement. La multiplicité des facteurs pouvant intervenir dans cette persistance suggère le danger qu'il y aurait à extrapoler les résultats d'une observation trop limitée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADAM, J. P., BINSON, G., BAILLY, H., EYRAUD M., HAMON, J. - 1958.**
Présence du gène de résistance au dieldrin chez *Anopheles gambiae* Giles, en Basse Côte d'Ivoire (A.O.F.)
Bull. Soc. Path. exot., 50 : 822-831.
- ADANG, M. J., STAVAR, M. J., ROCHELEAU, T. A., LEIGHTON, J., BARKER, R. F., THOMPSON, V. - 1985.**
Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and their toxicity to *Manduca sexta*.
Genetica, 36 : 289-300.
- AKASHI, A., SHIMADA, M., OHMORI, I. - 1988.**
Expression of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* d-endotoxin genes on multicopy plasmid and on chromosome in *B. subtilis*. *Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology*, San Diego, U.S.A., p 61.
- ALLEGRI J., SIMEON de BUOCHBERG, M., ZUCCARELLI, M., SOULIE, B. - 1972.**
Etude de la toxicité de trois types de pesticides sur quelques bactéries actives dans l'épuration biologique des eaux usées.
Soc. Pharm. de Montpellier., 32 (1) : 65-74.
- ALY, C., MULLA M. S., FEDERICI, B. A. - 1989.**
Ingestion, dissolution and proteolysis of the *Bacillus sphaericus* toxin by mosquito larvae.
J. Invert. Path., 53 : 12-20.
- Anonyme - 1967.**
Safe use of pesticides in public health
Wld Hlth Org. techn. Rep. Ser., 356 : 68.
- Anonyme - 1987.**
Report of an informal consultation on the role of molecular biology and genetic engineering in the development of biocontrol of disease vectors.
TDR/VBC/MB-GE/87.3.
- Anonyme - 1988.**
Meeting of directors of WHO collaborating centers on the evaluation and testing of new pesticides.
WHO/VBC/88.957. : 42.
- APPERSON, C. S., SCHAEFFER, C. H., COLWELL, A. E., WERNER, G. H., ANDERSON, N. L., DUPRAS, E. F. Jr, LONGANECKER, D. R. - 1978.**
Effects of diflubenzuron of *Chaoborus astictopus* and nontarget organisms and persistence of diflubenzuron in lentic habitats.
Ent. Soc. of Am., 71 (3) : 521-527.

- ARAPINIS, C., de la TORRE, F., SZULMAJSTER, J. - 1988.**
Nucleotide and deduced aminoacid sequences of the *B. sphaericus* 1593 M gene encoding a 51.4 kKa polypeptide which acts syner-gistically with the 42 kDa protein for expression of the larvicidal toxin.
Nucleic. Acid. Res., 16 : 7731.
- de BARJAC, H., CHARLES, J. F. - 1983.**
Une nouvelle toxine active sur les moustiques, présente dans des inclusions cristallines produites par *Bacillus sphaericus*.
C. R. Acad. Sci. Paris, 296 (3) : 905-910.
- de BARJAC, H., LARGET-THIERY, I., COSMAO DUMANOIR, V., RIPOUTEAU, H. - 1985.**
Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains on the basis of toxicity to mosquito larvae.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 21 : 85-90.
- de BARJAC, H., VERON, M., COSMAO DUMANOIR, V. - 1980.**
Caractérisation biochimique et sérologique de souches de *B. sphaericus* pathogènes ou non pour les moustiques.
Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 131 (b) : 191-201.
- BAUMANN, L., BROADWELL, A. H., BAUMANN, P. - 1988.**
Sequence analysis of the mosquitocidal toxin genes encoding 51.4 and 41.9 kDa proteins from *Bacillus sphaericus* 2362 and 2297.
J. Bacteriol., 170 : 2045-2050.
- BAUMANN, P., UNTERMAN, B. A., BAUMANN, L., BROADWELL, A. H., ABBENE, S. J., BOWDITCH, R. D. - 1985.**
Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high molecular weight precursors.
J. Bacteriol., 163 : 738-747.
- BELL, J. D. - 1967.**
Patterns of cross resistance to organophosphates and carbamates in *Musca domestica*.
Bull. Ent. Res., 58 : 137-151.
- BOURGOUIN, C., 1988.**
Les toxines de *Bacillus thuringiensis israelensis* et de *Bacillus sphaericus*. Leur utilisation en lutte biologique contre les vecteurs de maladies tropicales.
Thèse de Doctorat d'Etat. Université de Paris XI-ORSAY. Microbiologie.
Décembre 1988. pp. 213.
- BOURGOUIN, C., KLIER, A., RAPOPORT, G. - 1986.**
Characterization of the genes encoding the haemolytic toxin and the mosquitocidal delta-endotoxin of *B. thuringiensis israelensis*.
Mol. Gen. Genet., 205 : 390-397.
- BRAND, R. J., PINNOCK, D. E., JACKSON, K. L., MILSTEAD, J. E. - 1975.**
Methods for assessing field persistence of *Bacillus thuringiensis* spores.
J. Invert. Path., 25 : 199-208.

- BRENGUES, J. - 1978.**
Culex pipiens fatigans Wiedemann, en Afrique tropicale : son importance et son contrôle.
Méd. Trop., 38 (6) : 691-694.
- BRENGUES, J., COOSEMANS, M. - 1977.**
 Sensibilité et résistance des insectes aux insecticides en Afrique tropicale.
WHO/IVBC/77.680. pp 8.
- BRUHNES, D., RAKOTO, D., RANAIVOSON, S., VENARD, P. - 1972.**
 La filariose de Bancroft dans l'île de Mayotte. II. Transmission de la maladie et méthodes de lutte.
 Rapport d'enquête du Centre O.R.S.T.O.M. de Tananarive.
- BRUN, L. O., SALES, S. - 1976.**
 Stage IV evaluation of four organophosphorous insecticides, OMS 43, OMS 1155, OMS 1197 and LMS 1424 applied at 0,2 gr/m² to cotton mosquito nets.
WHO/IVBC/6.630. pp 5.
- BRUNO, D. W., LAURENCE, B. R. - 1979.**
 The influence of the apical droplet of *Culex* egg rafts on oviposition of *Culex pipiens fatigans* (Diptera : Culicidae).
J. Med. Entomol., 16 (4) : 300-305.
- BURGES, H. D., HILLYER, S., CHANTER, D. O. - 1975.**
 Effect of ultraviolet and gamma rays on the activity of d-endotoxin protein crystals of *Bacillus thuringiensis*.
J. Invert. Path., 25 : 5-9.
- BURKE, W. F. Jr, Mc DONALD, K. O., DAVIDSON, E. - 1983.**
 Effect of U.V. light on spore viability and mosquito larvicidal activity of *B. sphaericus* 1593.
Appl. Environ. Microbiol., 46 (4) : 954-956.
- BURLEY, S.K., PETSKO, G.A. - 1985.**
 Aromatic-aromatic interaction : a mechanism of protein structure stabilization.
Science., 229 : 23-28.
- BUSVINE, J. R. - 1967.**
 Insecticide-Resistance in *Culex pipiens fatigans*
Bull. Wld Hlth Org., 37 : 287-292.
- BUSVINE, J. R., PAL. R. - 1969.**
 The impact of insecticide-resistance on control of vectors and vector-born diseases.
Bull. Wld Hlth Org., 40 : 731-744.
- CANTWELL, G. E. - 1967.**
 Inactivation of biological insecticides by irradiation.
J. Invert. Path., 9 : 138-140.
- CANTWELL, G. E., FRANKLIN, B. A.- 1966.**
 Inactivation by irradiation of spores of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* .
J. Invert. Path., 8 : 256-258.

- CARNEVALE, P., ROBERT, V., BOUDIN, C., HALNA, J. M., PAZART, L., GAZIN, P., RICHARD, A., MOUCHET, J. - 1988.**
La lutte contre le paludisme par des moustiquaires imprégnées de pyréthroides au Burkina Faso.
Bull. Soc. Path. exot., **81** : 832-846.
- CAUBERE, P. - 1989.**
Chrysops dimidiata et *Chrysops silacea* : activité nyctémérale de deux vecteurs de loase humaine dans le massif du Chaillu.
D.E.A. - Université Paris XI-Paris VI.
- CHARDEZ, D. - 1968.**
Observations sur le repeuplement par les Thécamoebiens d'un étang fortement pollué par des insecticides.
Bull. Rech. Agron. de Gembloux., **3** (3) : 389-391.
- CHARLES J.-F., NICOLAS, L. - 1986.**
Recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 in mosquito larvae : a laboratory study.
Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., **137 B** : 101-111.
- CHEN, K. S., FUNKE, B. R., SCHULZ, J. T., CARLSON, R. B., PROSHOLD, F. I. - 1974.**
Effects of certain organophosphate and carbamate insecticides on *Bacillus thuringiensis*.
J. Econ. Entomol., **67** (4) : 471-473.
- COZ, J., EYRAUD, P., VENARD, P., ATTIOU, B., SOMDA, D., OUEDRAOGO, V. - 1965.**
Expériences en Haute-Volta sur l'utilisation de cases pièges pour la mesure de l'activité du DDT contre les moustiques.
Bull. Wld Hlth Org., **33** : 435-452.
- COZ, J., VENARD, P., EYRAUD, M. - 1967.**
Expérimentation en Haute-Volta d'un tissu imprégné de Baygon, OMS 33.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., **5** : 217-221.
- DAGNOGO, M., COZ, J. - 1982.**
Un insecticide biologique : *Bacillus sphaericus* . 1. Activité larvicide de *B. sphaericus* sur quelques espèces et souches de moustiques.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., **20** (2) : 133-138.
- DARRIET, F., ROBERT, V., CARNEVALE, P. - 1986.**
Nouvelles perspectives de lutte contre *Culex quinquefasciatus* dans la ville de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). Congrès "L'eau, la ville et le développement", I.S.T.E.D., Marseille, 9-11 juin 1986.
- DAVIDSON, E. W. - 1981.**
A review of the pathology of bacilli infecting mosquitoes, including an ultrastructural study of larvae fed *Bacillus sphaericus* 1593 spores.
Devel. Industr. Microbiol., **22** : 69-81.
- DAVIDSON, E. W. - 1989.**
Variation in binding of *Bacillus sphaericus* toxin and wheat germ agglutinin to larval midgut cells of six species of mosquitoes.
J. Invert. Path., **53** : 251-259.

- DAVIDSON, E. W., BIEBER, A. L., MEYER, M., SHELLABARGER, C. - 1987.**
Enzymatic activation of the *B. sphaericus* mosquito larvicidal toxin.
J. Invert. Path., 50 : 40-44.
- DAVIDSON, E. W., URBINA, M., PAYNE, J., MULLA, M. S., DARWAZEH, H., DULMAGE, H. T., CORREA, J. A. - 1984.**
Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment.
Appl. Environ. Microbiol., 47 (1) : 125-129.
- DAVIDSON, G. - 1956.**
Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* Giles.
Nature, 178 : 705-706.
- DES ROCHERS, B., GARCIA, R. - 1984.**
Evidence for persistence and recycling of *Bacillus sphaericus*.
Mosq. News, 44 (2) : 160-165.
- DONOVAN, W. P., DANKOCSIK, C. C., GILBERT, M. P., GAWRON-BURKE, M. C., GROAT, R. G., CARLTON, B. C. - 1988.**
Aminoacid sequence and entomocidal activity of the P2 crystal protein : an insect toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.
J. Biol. Chem., 263 : 561-567.
- DORVAL, C., BROWN, A. W. A. - 1970.**
Inheritance of resistance to fenthion in *Culex fatigans* Wied.
Bull. Wld Hlth Org., 43 : 727-734.
- DUMAS, J. L., PARIEROK, B. - 1989.**
Virulence de l'entomophthorale *Zoophthora radicans* (Zygomycetes) à l'égard des adultes d'*Aedes aegypti* (Dipt. : Culicidae).
Entomophaga, 34 (3) : 321-330.
- EARP, D. J., ELLAR, D. J. - 1987.**
Bacillus thuringiensis var. *morrisoni* strain PG 14 : nucleotide sequence of a gene encoding a 27 kDA crystal protein.
Nucleic. Acid. Res., 15 : 3619.
- EL-GAYAR, F., EL-SHAZLI, A., KHAFAGY, S., WATSON, W. - 1975.**
Studies on the alkaloid contents of *Nicotiana rustica* var. *Brasilia*, and its insecticidal activity against *Culex pipiens* L. (Dipt. : Culicidae) and *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep. : Noctuidae).
Zeitschrift für angewandte Entomologie, 1 : 49-55.
- FARAH, A. - 1978.**
Sensibilité à la dècamèthrine d'une souche de mouches domesti-ques résistantes aux insecticides organophosphorés dans la région parisienne.
C. R. Séances Acad. Agric. France : 918-923.
- FARGUES, J. - 1975.**
Etude expérimentale dans la nature de l'utilisation combinée de *Beauveria bassiana* et d'insecticides à dose réduite contre *Leptino-tarsa decemlineata*.
Ann. Zool. Ecol. anim., 7 (2) : 247-264.

- FARGUES, J., ROUGIER, M., GOUJET, R., ITIER, B. - 1988.**
Effet du rayonnement solaire sur la persistance des conidiospores de l'hyphomycète entomopathogène *Nomuraea rileyi*, à la surface d'un couvert végétal.
Entomophaga, 33 (3) : 357-370.
- FARLEY, D. G., YOUNCE, L. C. - 1977.**
Effects of *Gambusia affinis* (Baird et Girard) on selected non-target organisms in Fresno country rice fields.
Proc. Calif. Mosq. Control Assoc., 45 : 87-94.
- FEDERICI, B. A. ET ROBERTS, D. W. - 1976**
Experimental laboratory infection of mosquito larvae with fungi of the genus *Coelomomyces*. II. Experiments with *C. punctatus* in *Anopheles quadrimaculatus*.
J. Invertebr. Pathol., 27 : 333-341.
- FORTIN, C., MAIRE, A., LECLAIR, R. - 1987.**
The residual effect of temephos (Abate 4-E) on nontarget communities.
J. Amer. Mosq. Contr. Assoc., 3 (2) : 282-288.
- FRYE, R. D., SCHOLL, C. G., SCHOLZ, E. W., FUNKE, B. R. - 1973.**
Effect of wether on a microbial insecticide.
J. Invert. Path., 22 : 50-51.
- GALJART, N. J., SIVASUBRAMANIAN, N., FEDERICI, B. A. - 1987.**
Plasmid location, cloning, and sequence analysis of the gene encoding a 27.3 Kd cytolitic protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. (PG14).
Curr. Microbiol., 16 : 171-174.
- GALLOWAY, T. D., BRUST, R. A. - 1977.**
Effects of temperature and photoperiod on the infection of two mosquito species by the mermithid *Romanomermis culicivorax*.
J. Nematol., 9 (3) : 218-221.
- GANESAN, S., KANDAR, H., JAYARAMAN, K., SZULMAJSTER, J. - 1983.**
Cloning and expression in *E. coli* of a DNA fragment from *B. sphaericus* coding for the biocidal activity against mosquito larvae.
Mol. Gen. Genet., 189 : 181-183.
- McGAUGHEY - 1985.**
Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*.
Science, n° 4 709, 299 : 193.
- GEORGHIOU, G. P. - 1980.**
Insecticide resistance and prospects for its management.
Residue Reviews, 76 : 131-145.
- GEORGHIOU, G. P., ARIARATNAM, V., PASTERNAK, M. E., CHI S. LIN - 1975.**
Organophosphorous multiresistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* in California.
J. Econ. Entomol., 68 (4) : 461-467.
- GEORGHIOU, G. P., GARCIA-VASQUEZ, M., 1982 -**
Assessing the potential for development of resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxin (BTI) by mosquitoes.
Annual Report. Mosquito Control Research, University of California, U S. A.: pp 80-81.

- GEORGHIOU, G. P., METCALF, R. L., GIDDEN, F. E. - 1966.**
Carbamate-resistance in mosquitoes. Selection of *Culex pipiens fatigans* Wiedemann (= *C. quinquefasciatus* Say) for resistance to Baygon.
Bull. Wld Hlth Org., 35 : 691-708.
- GERBERICH, J. B. - 1985.**
Update and annotated bibliography of papers relating to the control of mosquitoes by the use of fish for the years 1965-1981.
WHO/VBC/85.917 - pp 34.
- GODSON, N. - 1985.**
A la recherche d'un vaccin antipaludique.
Pour la Science - Juillet 1985 : 24-31.
- GOLDBERG, L. J., MARGALIT, J. - 1977.**
Potential application of a bacterial spore, ONR-60A to mosquito larvae control : demonstrated rapid larval activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* (complex).
Mosq. News, 37 : 355-358.
- GRANUM, P. E., PINNAVAIA, S. M., ELLAR, D. J. - 1988.**
Comparison of the *in vivo* and *in vitro* activity of the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *morrisoni* (HD-12) and two of its constituent proteins after cloning and expression in *Escherichia coli*.
Eur. J. Biochem., 172 : 731-738.
- GRIEGO, V. M., SPENCE, K. D. - 1978.**
Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light.
Appl. Environ. Microbiol., 35 (5) : 906-910.
- GROSSWEINER, L. I. - 1976.**
Photochemical inactivation of enzymes.
Current Topics in radiation research quarterly, 11 : 141-199.
- GUILLET, P. - 1976.**
Présence dans la région parisienne d'un haut niveau de résistance des mouches domestiques aux insecticides organophosphorés.
C. R. Séances Acad. Agric. France : 1008-1015.
- GUILLET, P., DEMPAN, J., COZ, J. - 1980.**
Evaluation de *Bacillus thuringiensis* sérotype H 14 de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s. l.
III. Données préliminaires sur la sédimentation de l'endotoxine dans l'eau et sur sa stabilité en zone tropicale.
WHO/VBC/80.756.
- HAMON, J. - 1953.**
Apparition à La Réunion d'une résistance au DDT chez *Culex fatigans* Wiedemann principal vecteur de la filariose à *Wuchereria bancrofti* dans l'île.
Bull. Soc. Path. exot., 46 : 454-463.
- HAMON, J., EYRAUD, M., SALES, S., ADAM, J. P. - 1958.**
Observations sur le niveau de sensibilité au D.D.T., au dieldrin et au H.C.H. de *Culex pipiens* ssp. *fatigans* dans la région de Bobo-Dioulasso Haute Volta, Afrique Occidentale française.
Bull. Soc. Path. exot., 51 : 393-403.

- HAMON, J., MOUCHET, J. - 1967.**
La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wiede-mann.
Bull. Wld Hlth Org., **37** : 277-286.
- HAYES, M. M. M., VAN DER WESTHUIZEN, N. G., GELFAND, M. - 1978.**
Organophosphate poisoning in Rhodesia. A study of the clinical features and management of 105 patients.
S.A. Medical Journal. 5 août 1978 : 230-234.
- HERTLEIN, B. C., LEWY, R., MILLER Jr T. W. -1979.**
Recycling potential and selective retrieval of *Bacillus sphaericus* from soil in a mosquito habitat.
J. Invert. Path., **33** : 217-221.
- HILL, E. F., ELIASON, D. A., KILPATRICK, J. W. - 1971.**
Effects of ultra-low volume applications of malathion in hale country, Texas.
J. Med. Entomol., **8** (2) : 173-179.
- HINDLEY, J., BERRY, C. - 1987.**
Identification, cloning and sequence analysis of the *Bacillus sphaericus* 1593 41,9 kDa larvicidal toxin gene.
Med. Microbiol., **1** : 187-194.
- HOFTE, H., de GREVE, H., SEURINCK, J., JANSSENS, S., MAHILLON, J., AMPE, C., VANDEKERCKHOVE, J., VANDERBREGGEN, H., VAN MONTAGU, M., ZABEAU, M., VAECK, M. - 1986.**
Structural and functional analysis of a cloned delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis berliner* 1715.
Eur. J. Biochem., **161** : 273-280.
- HOFTE, H., SEURINCK, J., Van HOUTVEN, A., VAECK, M. - 1987.**
Nucleotide sequence of a gene encoding an insecticidal protein of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* toxic against Coleoptera.
Nucl. Acid. Res., **15** : 7183.
- HORNBY, J. A., HERTLEIN, B. C., MILLER, T. W. jr - 1984.**
Persistent spores and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593 in well water and sewage.
J. Georgia ent. Soc., **19** (2) : 165-167.
- HOUGARD, J. -M., KOHOUN, G., GUILLET, P., DOANNIO, J., DUVAL, J., ESCAFFRE, H. - 1985.**
Evaluation en milieu naturel de l'activité de *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 souche 1593-4 dans des gîtes larvaires à *Culex quinquefasciatus* Say, 1823, en Afrique de l'Ouest.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., **23** (1) : 35-44.
- HURLBERT, S. H., MULLA, M. S., WILLSON, H. R. - 1972.**
Effects of an organophosphorus insecticide on the phytoplankton, zooplankton, and insect populations of fresh-water ponds.
Ecological monographs, **42** : 269-299.
- ISHIGURO, T., MIYAZONO, M. - 1982.**
Fate of viable *Bacillus thuringiensis* spores on leaves.
J. Pest. Sci., **7** : 111-116.

- JAHN, N., SCHNETTER, W., GEIDER, K. - 1987.**
Cloning of an insecticidal toxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis* and its expression in *Escherichia coli* cells.
FEMS Microbiol. Lett., 48 : 311-315.
- JAQUES, R. P. - 1972.**
The inactivation of foliar deposits of viruses of *Trichoplusia ni* (Lepidoptera : Noctuidae) and *Pieris rapae* (Lepidoptera : Pieridae) and tests on protectant additives.
Can. Entomol., 104 : 1985-1994.
- KALFON, A., LARGET-THIERY, I., CHARLES, J. -F., de BARJAC, H. - 1983.**
Growth sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*.
Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18 : 168-173.
- KARCH, S., CHARLES, J.F. - 1987.**
Toxicity, viability and ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 spore/crystal complex used in the field.
Ann. Inst. Pasteur/Microbiol., 138 : 485-492.
- KARCH, S., COZ, J. - 1983**
Histopathologie de *Culex pipiens* Linné (Diptera, Culicidae) soumis à l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* 1593-4.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 21 (4) : 225-230.
- KARCH, S., COZ, J. - 1986.**
Recycling of *Bacillus sphaericus* in dead larvae of *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae).
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 24 (1) : 41-43.
- KARCH, S., HOUGARD, J. -M. - 1986.**
Etude comparative en laboratoire du devenir de la matière active et des spores de *Bacillus sphaericus* 2362 et du *Bacillus thuringiensis* H-14 en milieu aqueux.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 24 (3) : 175-179.
- KARCH, S., MONTENY, N., COZ, J. - 1988.**
Persistence de *Bacillus sphaericus* dans un gîte à moustiques quatre ans après son introduction en vue de lutte biologique.
C. R. Acad. Sci. Paris, 307 (III) : 289-292.
- KELLEN, W. R., CLARK, T. B., LINDEGREN, J. E., HO, B. C., ROGOFF, M., SINGER, S. - 1965.**
Bacillus sphaericus Neide as a pathogen of mosquitoes.
J. Invert. Path., 7 : 442-448.
- KLIER, A., BOURGOUIN, C., RAPOPORT, G. - 1983.**
Mating between *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis* and transfer of cloned crystal genes.
Mol. Gen. Genet., 191 : 257-262.
- KLIER, A., FARGETTE, F., RIBIER, J., RAPOPORT, G. - 1982.**
Cloning and expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain *berliner* 1715.
EMBO J., 1 : 791-799.

- KLIER, A., LERECLUS, D., RIBIER, J., BOURGOUIN, C., MENOUE, G., LECADET, M.-M., RAPOPORT, G. - 1985.**
Cloning and expression in *Escherichia coli* of the crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* strain aizawa 7-29 and comparison of the structural organization of genes from different serotypes.
In : Molecular Biology of Microbial Differentiation. J.A. HOCH and P. SETLOW (Eds.).
American Society of Microbiology, Washington DC. pp. 217-224.
- KONDRATYEV, K. Y. - 1972.**
Radiation processes in the atmosphere.
World meteorological organization.
WMO, 309 : 13-29.
- KRAMER, V. L., GARCIA, R., COLWELL, A. E. - 1988.**
An evaluation of *Gambusia affinis* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as mosquito control agents in California wild rice fields.
J. Amer. Mosq. Control Assoc, 4 (4) : 470-478.
- KRYCH, V. K., JOHNSON, J. L., YOSTEN, A. A. - 1980.**
Desoxyribonucleic acid homologies among strains of *Bacillus sphaericus*.
Int. J. Syst. Bacteriol., 30 : 476.
- KUHLEMEIER, C. J., BORRIAS, W. E., VAN DEN MONDEL, C.A.M.J.J., VAN ARKEL, G. A. - 1981.**
Vectors for cloning in cyanobacteria : construction and characterization of two recombinant plasmids capable of transformation to *E. Coli* K12 and *A. nidulans* R2.
Mol. Gen. Genet., 184 : 249-254.
- KURSTAK, E. - 1978.**
Microbial insecticides : viral and bacterial insecticides, safety considerations.
In *Microbial Ecology*. Loutit M. W. and J. A. R. Miles editions - Verlag - Berlin Heidelberg New York 1978.
- LACEY, L. A., SMITTLE, B. J. - 1985.**
The effects of gamma radiation on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.
Bull. Soc. Vector Ecol., 10 (2) : 98-101.
- LAGRANGE, Ph., CAPRON, A. - 1979.**
Réponses immunitaires vis-à-vis des agents infectieux et parasitaires.
in Immunologie. Ed. Flammarion Médecine-Sciences : 435-474.
- LAIRD, D. M. - 1962.**
Les champignons *Coelomomyces*, importants parasites du moustique.
WHO/EBL-1/MAL-334/Fil-42 - pp 5.
- LAIRD, D. M. - 1977.**
Biological control by protozoa.
Proceedings of the Fifth International Congress of Protozoology U.S.A. : 172-175.

LARGET-THIERY, I. - 1989.

Evaluation et contrôle au laboratoire du pouvoir entomopathogène de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* et de *Bacillus sphaericus* sur larves de Culicidae (Diptères, Nématocères).

Thèse de Doctorat.. Université de Paris-Sud-ORSAY. Mai 1988.

LERECLUS, D., MAHILLON, J., MENU, G., LECADET, M.-M. - 1986.

Identification of Tn4430, a transposon of *Bacillus thuringiensis* functional in *Escherichia coli*.

Mol. Gen. Genet., 204 : 52-57.

LHOSTE, J. - 1960.

Les insecticides d'origine végétale.

Journées françaises d'études et d'information consacrées aux insecticides agricoles.

Paris 24-26 août 1960. Tome 1 : 69-79.

LOUIS, J., JAYARAMAN, K., SZULMAJSTER, J. - 1984.

Biocide gene(s) and biocidal activity in different strains of *Bacillus sphaericus*.

Expression of the gene(s) in *E. coli* maxicells.

Mol. Gen. Genet., 195 : 23-28.

LUDKE, J. L., LOCKE, L. N. - 1976.

Duck deaths from accidental ingestion of anthelmintic.

Avian Diseases, 20 (3) : 607-608.

MAIRE, A. - 1983.

Sélectivité des femelles de moustiques (Culicidae) pour leurs sites d'oviposition : état de la question.

Rev. Can. Biol. Exptl., 42 (2) : 235-241.

MIURA, T., TAKAHASHI, R. M., MULLIGAN, F. S. - 1981.

Impact of the uses of candidate bacterial mosquito larvicides on some selected aquatic organisms.

Proc. Calif. Mosq. Control Assoc., 49 : 45-48.

MOAR, W., TRUMBLE J. T. - 1987.

Toxicity, joint action, and mean time of mortality of dipel 2X, ivermectin B₁, neem, and *thuringiensis* against beet armyworms (Lepidoptera : Noctuidae).

J. Econ. Entomol., 80 (3) : 588-592.

MORRIS, O. N. - 1977.

Compatibility of 27 chemical insecticides with *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

Can. Entomol., 109 : 855-864.

MORRIS, O. N. - 1983.

Protection of *Bacillus thuringiensis* from inactivation by sunlight.

Can. Ent., 115 : 1215-1227.

MOUCHET, J., ELLIOT, R., GARIOU, J., VOELCKEL, J., VARRIERAS, A. - 1960.

La résistance aux insecticides chez *Culex fatigans* Wied. et les problèmes d'hygiène urbaine au Cameroun.

Méd. trop. (Marseille) 20 : 447-456.

- MULLA, M. S., H. A., DARWAZEH, H. A., AXELROD, H. - 1969.
Activity of new mosquito larvicides against *Culex* and some nontarget organisms.
Thirty-seventh annual conference of the California Mosquito control association : 81-87.
- MULLA, M. S., DARWAZEH, H. A., DAVIDSON, E. W., DULMAGE, H. T. - 1984-bis.
Efficacy and persistence of the microbial agent *Bacillus sphaericus* against mosquito larvae in organically enriched habitats.
Mosq. News, 44 (2) : 166-173.
- MULLA, M. S., DARWAZEH, H. A., DAVIDSON, E. W., DULMAGE, H. T., SINGER, S. - 1984.
Larvicidal activity and field efficacy of *Bacillus sphaericus* strains against mosquito larvae and their safety to nontarget organisms.
Mosq. News, 44 (3) : 336-342.
- MULLIGAN, III F. S., SCHAEFER, C. H., WILDER, W. H. - 1980.
Efficacy and persistence of *Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* H 14 against mosquitoes under laboratory and field conditions.
J. Econ. Entomol., 73 (5) : 684-688.
- NAKAGAWA, P. Y., IKEDA, J. - 1969.
Biological control of mosquitoes with larvivorous fish in Hawaiï.
WHO/VBC/69.173 - pp 25.
- NICOLAS, L., DOSSOU-YOVO, J. - 1987.
Differential effects of *Bacillus sphaericus* strain 2362 on *Culex quinquefasciatus* and its competitor *Culex cinereus* in West Africa. *Medical and Veterinary Entomology*, 1 : 23-27.
- NICOLAS, L., DOSSOU-YOVO, J., HOUGARD, J. -M. - 1987.
Persistence and recycling of *B. sphaericus* 2362 spores in *Culex quinquefasciatus* breeding sites in West Africa.
Appl. Microbiol. Biotechnol., 25 : 341-345.
- OBUKOWICZ, M. G., PERLAK, F. J., KUSANO-KRETMER, K., MAYER, E. J., BOLTEN, S. L., WATRUD, L. S. - 1986.
Tn5-mediated integration of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root colonizing *Pseudomonas*.
J. Bacteriol., 168 : 982-989.
- PARIS, R. R., MOYSE, H. - 1967.
Précis de Matière médicale. Tome II : Pharmacognosie spéciale spermaphytes (suite) : angiospermes monocotylédones - dicoty-lédones.
Masson et C^{ie}, Editeurs.
- PASTEUR, N. - 1989.
La résistance croissante aux pesticides.
Le courrier du CNRS, 72 : 74-75.
- PETERSEN, J. T., WILLIS, O. R. - 1972.
Preliminary field applications of *Reesemermis nielsenii* (Mermithidae : Nematoda) to control mosquito larvae.
WHO/VBC/72.357 - pp 4.

PICHON, G. - 1981.

Migrations des microfilaires et des peuples océaniens. Une approche de la spéciation chez les filaires de Bancroft et de Malaisie, par l'étude de la périodicité des microfilaires en fonction de la densité ; contribution à la préhistoire du Pacifique.
Ann. Parasit., **56** (1) : 107-120.

PICHON, G., RIVIERE, F. - 1979.

Observations sur la biologie préimaginale du moustique prédateur *Toxorhynchites amboinensis* (Diptera, Culicidae).
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., **27** (4) : -221-224.

PINNOCK, R., DUDLEY, E., BRAND, J., MILSTEAD, J. E. - 1971.

The field Persistence of *Bacillus thuringiensis* spores.
J. Invert. Path., **18** : 405-411.

PLESTINA, R. - 1984.

Intoxication par les insecticides : prévention, diagnostic et traitement.
WHO/VBC/84.889 - pp 72.

POZSGAY, M., FAST, P., KAPLAN, H., CAREY, P. R. - 1987.

The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD1 and NRD12 : a raman spectroscopic study.
J. Invert. Path., **50** : 246-253.

PRIESTER, T. M., GEORGHIOU, G. P. - 1978.

Induction of high resistance to permethrin in *Culex pipiens quinquefasciatus*.
J. Econ. Entomol., **71** : 197-208.

QUELENNEC, G. - 1978.

Lutte chimique contre les arthropodes d'intérêt médical. Evaluation des nouveaux insecticides. Insecticides opérationnels. Insecticides nouveaux.
Médecine tropicale, **38** (6) : 643-650.

RAGEAU, J., DELAVEAU, P. - 1979.

Effets toxiques d'extraits de végétaux sur les larves de moustiques.
Bull. Soc. Path. exot., **72** (2) : 168-171.

RAMADE, F. - 1990.

Des pesticides aux armes chimiques.
La Recherche n° 219 : 382-390.

RAMARAJE U. N. V., GOVINDU, H. C., SHIVASHANKARA SHASTRY, K. S. - 1967.

The effect of certain insecticides on the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*.
J. Invert. Path., **9** : 398-403.

RAUM, E. S., JACKSON, R. D. - 1966.

Encapsulation as a technique for formulating microbial and chemical insecticides.
J. Econ. Entomol., **59** : 620-622.

RAUM, E. S., SUTTER, G. R., REVELLO, M. - 1966.

Ecological factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* to the european corn borer and fall armyworm.
J. Invert. Path., **8** : 365-375.

- REED, J. P., KEASTER, A. J., KREMER, R. J., KERR, H. D. - 1989.**
Microbial degradation of some soil-applied insecticides, herbicides, and insecticide-herbicide combinations.
Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42 : 676-681.
- RIPPKA, R., DERUELLES, J., WATERBURY, J. B., HERDMAN, M., STANIER, R. Y. - 1979.**
Genetic assignment strain history and properties of pure cultures of cyanobacteria.
J. Gen. Microbiol., 111 : 1-61.
- RIVIERE, F., PICHON, G., DUVAL, J., THIREL, R., TOUDIC, A. - 1979.**
Introduction de *Toxorhynchites amboinensis* (Doleschall 1857) (Diptera : Culicida) en Polynésie française.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 27 (4) : 225-234.
- ROBINSON, N. - 1963.**
Global solar and sky radiation.
CCOE - ELSEVIER, Amsterdam. pp 55-71.
- ROBINSON, N. - 1966.**
Solar radiation.
Elsevier Publishing Cy. Amsterdam - London - New York - éd.
- ROMAN, E., NETIEN, G. - 1939.**
Action physiologique sur les larves de moustiques de *Derris elliptica* Benth.
Bull. Soc. linnéenne de Lyon, 3 : 74-79.
- ROUBAUD, E. - 1945.**
L'hybridation, facteur régulateur naturel des populations culicidiennes chez le Moustique commun.
C. R. Acad. Sci. Paris, 220 : 229-231.
- ROZENDAAL - 1989**
Impregnated mosquito nets and curtains for self-protection and vector control.
Tropical Diseases Bull., 86 (7) : 1-41.
- SARASIN, A., RENAULT, G., BLANCHE-BARDON, C., VOUE, Y., DUMEZ, Y. - 1988.**
Le Xeroderma pigmentosum : caractéristiques cliniques, génétiques et cellulaires.
Développement d'un test anténatal.
Médecine Sciences, 4 (10) : 608-617.
- SILAPANUNTAKUL, S., PANTUWATANA, S., BHUMIRATANA, A., CHAROENSIRI, K. - 1983.**
The comparative persistence of toxicity of *Bacillus sphaericus* strain 1593 and *Bacillus thuringiensis* sérotype H-14 against mosquito larvae in different kinds of environments.
J. Invert. Path., 42 : 387-392.
- SINEGRE, G. - 1985.**
Evaluation en laboratoire et sur le terrain, de l'efficacité de trois souches de *B. sphaericus* vis-à-vis des larves de *C. pipiens*. Entente Interdépartementale pour la Démoustication du Littoral Méditerranéen (document de travail).
- SINGER, S. - 1973.**
Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae.
Nature, 244 : 110-111.

SINGER, S. - 1980.

Bacillus sphaericus for the control of mosquitoes.
Biotechnology and bioengineering, 22 : 1135-1355.
John Wiley Sons Inc. - éd.

SINGH, G. J. P., GILL, S. S. - 1988.

An electron microscope study of the toxic action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larvae.
J. Invert. Path., 52 : 237-247.

STANIER, R. Y., COHEN-BAZIRE, G. - 1977.

Phototrophic prokaryotes : the cyanobacteria.
Ann. Rev. Microbiol., 31 : 225-274.

STOFFOLANO, J. G. Jr - 1967.

The synchronization of the life cycle of diapausing face flies, *Musca autumnalis*, and of the nematode, *Heterorhynchus autumnalis*.
J. Invert. Path., 9 : 395-397.

SUBRA, R. - 1981.

Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say 1823 (Diptera, Culicidae) with special reference to Africa.
Insect Sci. Appl., 1 : 319-338.

TANDEAU de MARSAC, N., de la TORRE, F., SZULMAJSTER, J. - 1987.

Expression of larvicidal gene of *Bacillus sphaericus* 1593 M in the cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2.
Mol. Gen. Genet., 209 : 396-398.

de la TORRE, F., BENNARDO, T., SEBO, P., SZULMAJSTER, J. - 1989.

On the respective roles of the two proteins encoded by the *B. sphaericus* 1593 M toxin genes expressed in *E. coli* and *B. subtilis*.
Biochem. and Biophys. Res. Comm., 164 (3) : 1417-1422.

TOUMANOFF, C., ROMBAUT, J. - 1965.

Action de certains champignons entomophages, cultivés sur les milieux appropriés attractifs, sur le termite de Saintonge *Reticulitermes santonensis* (de Feytaud).
Ann. Parasit. hum. comp., 40 (5) : 605-609.

WALD, G. - 1956.

Visible and near-visible light.
in *Radiation Biology*. Volume III. Edited by Alexander Hollaender. Mc Graw-Hill. Book Company, Inc.

WARD, E.S. ; ELLAR, D.J. - 1988.

Cloning and expression of two homologous genes of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* which encode 130-kilodalton mosquito-cidal proteins.
J. Bacteriol., 170 : 727-735.

WARD, E. S., ELLAR, D. J., TODD, J. A. - 1984.

Cloning and expression in *Escherichia coli* of the insecticidal d-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis israelensis*.
FEBS Lett., 175 : 377-382.

- WARD, E. S., RIDLEY, A. R., ELLAR, D. J., TODD, J. A. - 1986.**
Bacillus thuringiensis var. *israelensis* d-endotoxin. Cloning and expression of the toxin in sporogenic and asporogenic strains in *Bacillus subtilis*.
J. Mol. Biol., **191** : 13-22.
- WEIL, J. M. - 1987.**
Biochimie Générale.
Masson éd.
- WEISER, J. - 1984.**
A mosquito virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from Nigeria.
Zbl. Mikrobiol., **193** : 57-60.
- WICKREMESINGHE, R. S. B., MENDIS, C. L. - 1980.**
Bacillus sphaericus spora from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*.
Mosq. News, **40** : 387-389.
- WORTHING, Ch. R. - 1979.**
The Pesticide Manual. 6th Edition.
- WU, D., CHANG, F.N. - 1985.**
Synergism in mosquitocidal activity of 26 and 65 kDA protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystal.
FEBS Lett., **190** : 232-236.
- YOUSTEN, A. A. - 1984.**
Bacillus sphaericus : microbiological factors related to its potential as mosquito larvicide.
Adv. Biotechnol., **3** : 315-343.

ANNEXE I. : Liste chronologique de la mise sur le marché des insecticides chimiques les plus largement utilisés.

Famille	Nom commun	Propriétés décrites	Principales espèces sensibles					Nom déposé	1ère mise sur le marché
			Moustiques	Mouches	Poux	Phytophages	Divers		
Organo-chlorés	DDT	1942	x	x	x	x	x	Gesarol Neocid	J.R. Geigy S.A.
	γ -HCH (lindane)	1942	x	x	x	x	x	Gammexane	I.C.I. Plant Protection Ltd
	Dieldrine	1949	x	glossines			criquets termites	Octalox	J. Hyman & Co
	Méthoxychlore	1944		x		x	x	Marlate	du Pont de Nemours
Organo- et Thiophosphorés	Parathion	1946	x	x		x	x	Bladan	American Cyanamid Co.
	Malathion	1950	x	x	x		x	Malathion divers	American Cyanamid Co.
	Diméthoate	1951	x	x			x	Neocidol	plusieurs
	Diazinon	1953	x	x		x	x	Vapona	J.R. Geigy S.A.
	Dichlorvos	1955	x	x			abeilles oiseaux	Devecap	Shell Chemical Co.
	Trichlorphon	1957	x	x	x	x	x	Dipterex	Bayer A.G.
	Naled	1960	adultes	x		x		Dibrom	Bayer A.G.
	Fénitrothion	1960	x			x	criquets tisserin	Sumithion	Chevron Chemical Co.
	Fenthion	1960				x		Baytex	Sumitomo Chemical Co.
	Bromophos	1964	x	x		x	x	Nexion	Bayer A.G.
	Téméphos	1965	larves	x	x	x	x	Abate	C.H. Boehringer Sahn
	Chlorpyrifos	1965	x	x	x	x	x	Dursban	American Cyanamid Co.
	Iodofenphos	1969	x	x	x		x	Nuvanol N	Dow Chemical Co.
Chlorphoxim	1972	x	x				Baythion C	Ciba A.G.	
Carbamates	Carbaryl	1957				x	x	Sevin	Union Carbide Corp.
	Propoxur	1963	x	x		x	x	Baygon	Bayer A.G.
Pyréthri-noïdes	Alléthrine	1949	x	x	x		x	Pynamin	Sumitomo Chemical Co.
	Bioallethrine	1967	x	x	x		x	Bioallethrine	Roussel Uclaf
	Resméthrine	1967	x	x	x	x	x	Benzylfurdine	Sumitomo Chemical Co.
	Phénothrine	1973			x	x	x	Sumithrin	Sumitomo Chemical Co.
	Perméthrine	1973		x	x	x	x	divers	plusieurs
	Deltaméthrine	1974	x	x		x	x	Decis K-Othrine	Roussel Uclaf
I.G.R.	Diflubenzuron	1972	x	x		x	x	Dimilin	Philips-Duphar
	Méthoprene	1973	x	x		x	x	Altosiol	Zoecon Corp.

ANNEXE II : Organigramme résumant les interactions possibles en milieu naturel entre les différentes espèces de la faune aquatique et *Bacillus sphaericus*, bactérie entomopathogène susceptible d'être recyclée ou inactivée en fonction des différents paramètres biotiques et abiotiques.

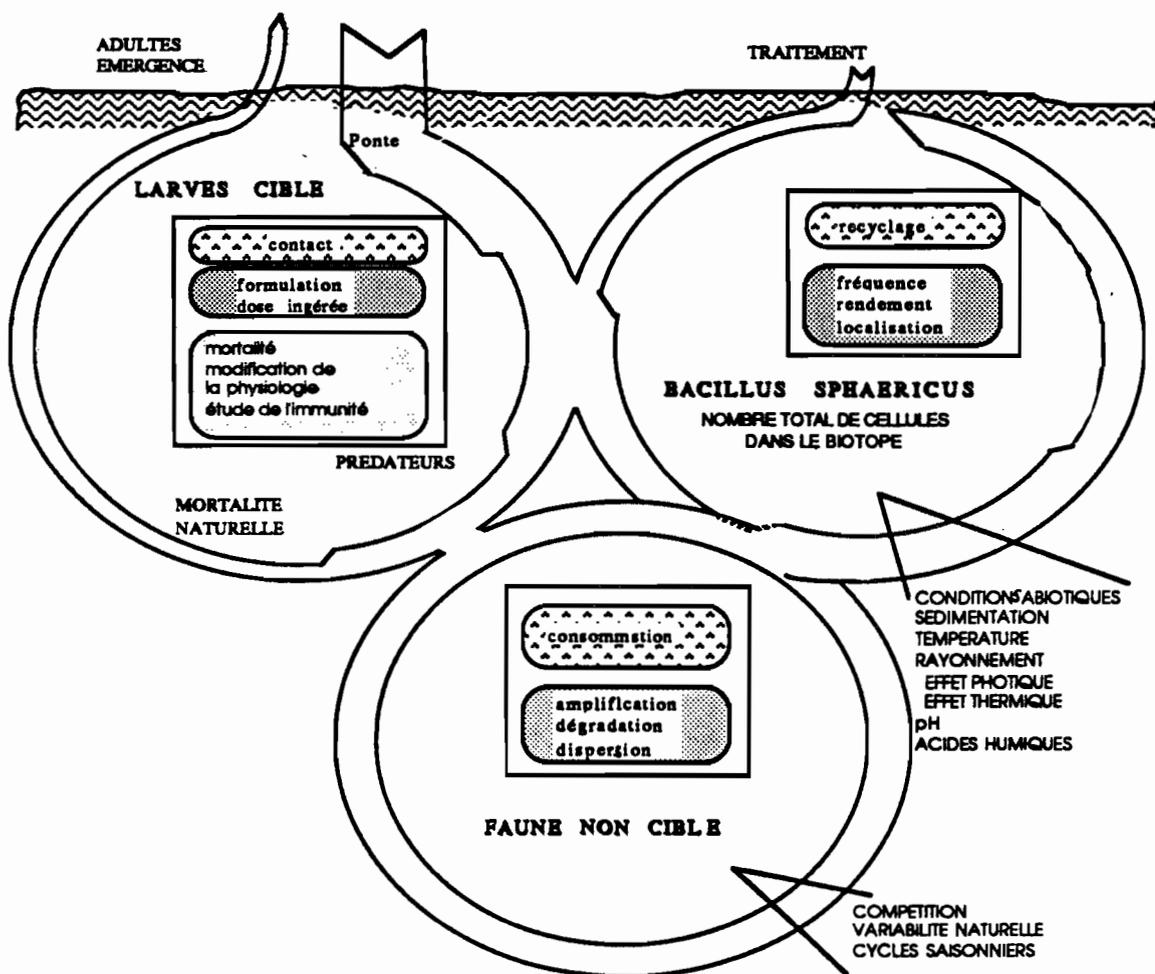


TABLE DES MATIERES

AVANT PROPOS	2
CHAPITRE I - LA LUTTE ANTIVECTORIELLE	5
1. INSECTICIDES CHIMIQUES	6
1.1 INSECTICIDES NATURELS	6
1.2 INSECTICIDES DE SYNTHESE	8
1.2.1 Organochlorés	
1.2.2 Organophosphorés-Carbamates	
1.2.3 Pyrétrinoïdes	
1.2.4 Inhibiteurs de croissance	
1.3 LE PROBLEME DE LA RESISTANCE	12
1.4 MISE SUR LE MARCHÉ D'UN INSECTICIDE NOUVEAU	16
2. LUTTE BIOLOGIQUE	18
2.1 INTRODUCTION	18
2.2 PREDATEURS	19
2.2.1 Poissons larvivores	
2.2.2 <i>Toxorhynchites amboinensis</i> Doleschall 1857	
2.3 PARASITES	21
2.3.1 Champignons	
2.3.2 Nématodes	
2.4 PATHOGENES	23
2.4.1 Protozoaires	
2.4.2 Virus	
2.4.3 Bactéries	
2.5 CONCLUSION	27
3. <i>BACILLUS SPHAERICUS</i> - AGENT BIOLOGIQUE DE LUTTE ANTICULICIDIENNE	28
3.1 DIVERSITE DES SOUCHES	28
3.2 TOXINE ET MODE D'ACTION	29
4. <i>CULEX PIPIENS</i> VECTEUR DE LA FILARIOSE DE BANCROFT	31
4.1 LE COMPLEXE <i>CULEX PIPIENS</i>	31
4.1.1 <i>C. pipiens</i> et <i>C. autogenicus</i>	
4.1.2 <i>Culex quinquefasciatus</i> Say 1823	
4.2 REMARQUES CONCERNANT LA FILARIOSE DE BANCROFT	33
CHAPITRE II - ACTION DU RAYONNEMENT SOLAIRE SUR <i>B. SPHAERICUS</i>	35
1. INTRODUCTION	35
2. CARACTERISTIQUE DU RAYONNEMENT SOLAIRE	36
2.1 Spectre	36
2.2 INTENSITE HORS ATMOSPHERE	37
2.3 EFFET DE L'ATMOSPHERE	38
2.4 L'ALBEDO D'UNE SURFACE D'EAU LIBRE	40
2.5 CHOIX EXPERIMENTAL	41

3. INACTIVATION PHOTOCHEMIQUE	41
3.1 INACTIVATION DES ADN PAR LES U.V.C	41
3.2 INACTIVATION PHOTOCHEMIQUE DES PROTEINES	42
4. EFFET DU RAYONNEMENT SOLAIRE SUR LES ORGANISMES ENTOMOPATHOGENES	44
5. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX ET METHODES	48
5.1 SOURCES DE RAYONNEMENT ET FILTRES	48
5.1.1 Rayonnement ultra-violet	
5.1.2 Rayonnement visible	
5.2 ECHANTILLONS IRRADIES	52
5.3 PURIFICATION DE LA TOXINE DE <i>B. SPHAERICUS</i>	53
5.3.1 Extraction	
5.3.2 Chromatographie	
5.3.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	
5.3.4 Immunoélectrophorèse	
6. RESULTATS	56
6.1 OBTENTION D'UN EXTRAIT PURIFIE DE TOXINE	56
6.1.1 Purification par gel-filtration	
6.1.2 Caractérisation des protéines	
6.2 IRRADIATION PAR LE RAYONNEMENT ULTRA-VIOLET	58
6.2.1 Spores de <i>Bacillus sphaericus</i>	
6.2.2 Toxine purifiée	
6.3 IRRADIATION PAR LE RAYONNEMENT VISIBLE	60
6.3.1 Spores de <i>Bacillus sphaericus</i>	
6.3.2 Toxine purifiée	
6.4 ANALYSE DES RESULTATS	62
6.4.1 Rayonnement ultra-violet	
6.4.2 Rayonnement visible	
7. DISCUSSION	64
CHAPITRE III - FACTEURS BIOTIQUES IMPLIQUES DANS LE POTENTIEL DE RECYCLAGE DE <i>B. SPHAERICUS</i>	68
1. INTRODUCTION	68
1.1 PERSISTANCE	70
1.2 RECYCLAGE DE <i>B. SPHAERICUS</i>	72
1.3 RECYCLAGE ET FAUNE AQUATIQUE	75
2. MATERIEL ET METHODES EXPERIMENTALES	76
2.1 ESPECE ELEVEE EN LABORATOIRE	76
2.2 ESPECES SAUVAGES	76
2.3 SOUCHES DE <i>B. SPHAERICUS</i>	77
2.4 GITES LARVAIRES	78
2.4.1 REGION PARISIENNE	

2.4.2 REGION MIDI-MEDITERRANEEN	
2.5 COMPTAGE BACTERIOLOGIQUE DE <i>B. SPHAERICUS</i>	80
2.6 CARACTERISATION ET IDENTIFICATION DE <i>B. SPHAERICUS</i>	80
2.7 MISE EN CONTACT POUR L'ETUDE DE L'INGESTION DE <i>B. SPHAERICUS</i>	81
3. RESULTATS	82
3.1 PERSISTANCE DE <i>B. SPHAERICUS</i>	82
3.1.1 Gîte E : canal de drainage d'un ancien vignoble.	
3.1.2 Gîte D : vide sanitaire	
3.1.3 Gîtes A et B : mare expérimentale semi-naturelle	
3.2 ROLE DE LA FAUNE SYNTROPHIQUE DE <i>CULEX PIPIENS</i> DANS LE RECYCLAGE DE <i>B. SPHAERICUS</i> - Etude en laboratoire	85
3.2.1 Le recyclage par <i>Culex pipiens</i>	
3.2.2 Evolution du nombre de bactéries chez <i>Culiseta annulata</i>	
3.2.3 Devenir et évolution chez <i>Chironomus plumosus</i>	
3.2.4 Crustacés filtreurs	
3.3 ETUDE DYNAMIQUE EN MILIEU NATUREL DE L'INTERACTION <i>CULEX PIPIENS</i> - <i>B. SPHAERICUS</i> - faune non cible	89
3.3.1 Efficacité de <i>B. sphaericus</i> sur <i>C. pipiens</i>	
3.3.2 Faune non-cible	
3.3.3 Devenir de <i>B. sphaericus</i> dans le gîte	
3.3.4 <i>B. sphaericus</i> et les arthropodes associés à <i>C. pipiens</i>	
4. DISCUSSION	95
5. CONCLUSION	96
CHAPITRE IV - EXEMPLE D'APPLICATION DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE A LA LUTTE BIOLOGIQUE : ETUDE D'UNE CYANOBACTERIE TRANSFORMEE	97
1. INTRODUCTION	97
2. TESTS D'INNOCUITE SUR PETIT MAMMIFERE	100
2.1 MATERIEL ET METHODE	100
2.2 RESULTATS	101
3. ETUDE DE LA TOXICITE DE <i>ANACYSTIS NIDULANS</i> R2 PORTANT OU NON LES GENES DE LA TOXINE	102
3.1 TOXICITE SUR MOUSTIQUES DE <i>A. nidulans</i> pGsp 12	103
3.2 EFFET DES VESICULES GAZEUSES SUR LA TOXICITE	104
4. ESSAIS EN MARES SEMI-NATURELLES	105
4.1 MATERIEL ET METHODE	105
4.2 RESULTATS	107
4.2.1 Eté 1988 : comparaison de la dose appliquée	
4.2.2 Eté 1989 : comparaison des transformants	
5. CONCLUSION	112

CHAPITRE V - ETUDE DE L'INTERVENTION DE B. SPHAERICUS DANS UN SCHEMA DE LUTTE INTEGREE	1 1 5
1. INTRODUCTION	115
2. ACTION DES INSECTICIDES CHIMIQUES SUR LA FAUNE NON-CIBLE	116
3. TRAITEMENTS COMBINES : INSECTICIDE-AGENT PATHOGENE	117
4. EVOLUTION DU MELANGE INSECTICIDES-B.SPHAERICUS	119
4.1 MATERIEL ET METHODES	119
4.1.1 Croissance de <i>B. sphaericus</i> en présence d'insecticides	
4.1.2 Toxicité de <i>B. sphaericus</i> en présence de fénirothion	
4.1.3 Viabilité de <i>B. sphaericus</i> en présence de fénirothion	
4.2 RESULTATS	120
4.2.1 Croissance de <i>B. sphaericus</i>	
4.2.2 Toxicité du mélange <i>B. sphaericus</i> -insecticide	
4.2.3 Viabilité de <i>B. sphaericus</i>	
5. CONCLUSION	123
CONCLUSION GENERALE	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	129
ANNEXES	145
TABLE DES MATIERES	147
Liste des annexes	
Liste des illustrations	

LISTE DES ANNEXES

- ANNEXE I** : Liste chronologique de la mise sur le marché des insecticides chimiques les plus largement utilisés. 145
- ANNEXE II** : Organigramme résumant les interactions possibles en milieu naturel entre les différentes espèces de la faune aquatique et *Bacillus sphaericus*, bactérie entomopathogène susceptible d'être recyclée ou inactivée en fonction des différents paramètres biotiques et abiotiques. 146

LISTE DES ILLUSTRATIONS

- PLANCHE V.1** : Croissance sur milieu gélosé d'unités formant une colonie de *B. sphaericus* et inhibition de cette croissance par plusieurs insecticides et un herbicide. 121

**Influence de facteurs biotiques et abiotiques, induits et naturels, sur l'efficacité larvicide de *Bacillus sphaericus*,
Neide 1904**

Après les problèmes apparus suite à l'utilisation des insecticides chimiques (résistance, pollution), l'alternative de la lutte biologique s'est imposée.

Bacillus sphaericus est une bactérie entomopathogène active essentiellement sur des larves du genre *Culex*. Son utilisation en milieu naturel révèle une perte d'efficacité imputable à des facteurs environnementaux. L'analyse de l'effet inactivant de diverses bandes spectrales de l'énergie solaire attribue ce rôle aux rayons U.V.A (315 à 380 nm) et U.V.B (290 à 315 nm) ainsi qu'à la lumière bleue par l'intermédiaire d'une substance photophore (non identifiée). La protéine toxique purifiée est photostable. Une bande spectrale restauratrice est mise en évidence entre 560 et 580 nm.

Le recyclage de *B. sphaericus* peut être potentialisé par certaines espèces syntrophiques de *Culex* sp. qui participent à la redissémination des spores dans le milieu. Plusieurs types d'intervention (prédateurs, filtreurs) sont étudiés.

L'avenir d'une cyanobactérie transformée pour coder la toxine de *B. sphaericus* est discuté en termes de lutte biologique.

Un exemple d'implication de *B. sphaericus* dans des programmes de lutte intégrée est analysé.

Mots clé : *Bacillus sphaericus* - *Culex pipiens* - rayonnement solaire - inactivation - recyclage - faune non-ciblée - *Anacystis nidulans* - lutte intégrée.