

**Évaluation en milieu naturel
de l'activité larvicide
de *Bacillus thuringiensis* sérotype H-14
sur *Culex quinquefasciatus* Say, 1823
et *Anopheles gambiae* Giles, 1902 s.l.
(Diptera : Culicidae)
en Afrique de l'Ouest ⁽¹⁾**

Jean-Marc HOUGARD ⁽²⁾, Frédéric DARRIET ⁽³⁾
S. BAKAYOKO ⁽⁴⁾

Résumé

*Dans les régions de Bouaké (Côte d'Ivoire) et de Bobo-Dioulasso (Haute-Volta) le traitement des gîtes
mulé en suspension concentrée Sandoz 402 I (Teknar[®]), a donné les résultats suivants : quel que soit le gîte
considéré et quelle que soit la concentration utilisée, l'activité larvicide du Teknar n'excède pas 5 jours. Les auteurs*

active et son « enlèvement » dans le substrat masque l'activité du Teknar.

Mots-clés : *Culex quinquefasciatus* — *Anopheles gambiae* — *Bacillus thuringiensis* H-14 — Utilisation opérationnelle — Afrique occidentale.

Summary

FIELD EVALUATION OF LARVICIDAL ACTIVITY OF *Bacillus thuringiensis* SEROTYPE H-14 AGAINST *Culex quinquefasciatus* SAY, 1823 AND *Anopheles gambiae* GILES, 1902 S.L. (DIPTERA, CULICIDAE) IN WEST AFRICA. At Bouaké (Ivory Coast) and Bobo-Dioulasso (Upper Volta) treatment of *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* breeding sites with Teknar[®] (a suspension concentrate of *Bacillus thuringiensis* H-14) has given the following results : whatever the breeding site and the concentration used, the larvicidal activity does not exceed five days. The authors have attempted to assess the reasons for this low residual effect : the influence of free chlorine and detergents seems to be negligible. The influence of suspended matters proved to be highly signi-

(1) Dans le cadre des accords conclus entre l'O.R.S.T.O.M. et l'O.C.C.G.E., cette étude a bénéficié d'une aide financière du programme spécial PNUD-Banque Mondiale-O.M.S. de Recherche et de Formation concernant les Maladies Tropicales.

(2) Entomologiste médical O.R.S.T.O.M., I.R.T.O., B.P. 1500, Bouaké (Côte d'Ivoire).

(3) V.S.N., Centre Muraz, Laboratoire d'Entomologie Médicale, B.P. 153, Bobo-Dioulasso (Haute-Volta).

(4) Auxiliaire de laboratoire de l'O.C.C.G.E., I.R.T.O., B.P. 1500, Bouaké (Côte d'Ivoire).

ficative in the laboratory, but not in field conditions. However, settling of active ingredients and presence of organic substrate decrease the residual activity of Teknar.

Key words : *Culex quinquefasciatus* — *Anopheles gambiae* — *Bacillus thuringiensis* H-14 — Operational use — West Africa.

1. Introduction

Culex quinquefasciatus est un moustique principalement urbain dont les gîtes préimaginaux sont pour la plupart constitués par des réservoirs d'eau polluée riches en matière organiques (latrines, puisards, citernes ...). En raison de l'importance médicale de ce moustique et de sa résistance à de nombreux insecticides chimiques (Mouchet *et al.*, 1960 ; Hamon et Mouchet, 1967), la lutte larvicide doit faire appel à de nouvelles substances comme les régulateurs de croissance ou les insecticides biologiques.

Parmi ces derniers, le sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis* s'avère très toxique pour la plupart des moustiques anthropophiles. L'efficacité de ce bacille a été évaluée en milieu naturel dans les puisards de Bouaké en Côte d'Ivoire et de Bobo-Dioulasso en Haute-Volta.

Une étude a été également réalisée sur *Anopheles gambiae* s.l. en mares artificielles dans un village de Haute-Volta. La multiplicité et le caractère temporaire des gîtes larvaires de ce moustique (mares, empreintes d'animaux ...) compromettent les chances d'une campagne antilarvaire efficace. L'intérêt de ce traitement n'a donc qu'une valeur expérimentale, à savoir le comportement de la bactérie dans ce type de gîte.

Des tests biologiques, effectués au laboratoire, parallèlement à ces essais sur le terrain, font l'objet d'un chapitre séparé.

2. Traitement des gîtes larvaires

2.1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1.1. *Culex quinquefasciatus*

Les puisards que nous avons retenus sont d'un accès aisé ; ils permettent ainsi de réaliser un échantillonnage dans de bonnes conditions.

— Échantillonnage des puisards : Subra (1971)

utilise dans le cas particulier des gîtes larvaires à surface réduite, des prélèvements à la louche (dipping). Nous utiliserons cette méthode à raison d'un coup de louche au centre du puisard et de quatre coups de louche à la périphérie. Chaque prélèvement est espacé de deux minutes. Seuls les stades larvaires III et IV, ainsi que les nymphes seront pris en compte.

Nous avons échantillonné 9 puisards en Côte d'Ivoire et 8 en Haute-Volta. Tous les puisards recensés, à l'exception d'un seul, contiennent une forte majorité de *Culex quinquefasciatus*. Un des puisards contient exclusivement *Culex cinereus* Theobald, 1901 en très grande quantité. Bien que cette espèce s'accommode d'eaux plus polluées que *C. quinquefasciatus*, ces deux espèces peuvent cohabiter (Subra, 1971). Ce gîte peut donc être considéré comme gîte potentiel à *C. quinquefasciatus*.

— Formulation et doses utilisées : La formulation de *Bacillus thuringiensis* H-14 utilisée est le Sandoz 402 I sous forme de suspension concentrée (Teknar[®]). Les concentrations sont exprimées en millilitres par mètre carré : les résultats de Sinègre (1981) montrent que les dosages doivent être calculés en fonction de la surface à traiter et non du volume d'eau.

Nous utilisons, à l'exception de la plus forte dose, deux puisards par concentration. Les doses utilisées à Bouaké sont les suivantes : 1, 5, 10, 50 et 100 ml par m². Celles utilisées à Bobo-Dioulasso sont de 0,5 (*), 1 et 2 ml/m²

2.1.2. *Anopheles gambiae* s.l.

Cette étude a été réalisée en mares artificielles dans un village de Haute-Volta à population anophélienne très dense. Nous avons creusé 8 trous en bordure d'un ruisseau (jamais asséché pendant la saison des pluies). Le sol étant très perméable, il a fallu cimenter le fond et le bord des gîtes.

Ces mares sont devenues productives environ deux semaines après leur construction (présence de nombreuses larves d'*Anopheles gambiae* mises en

(* La plus faible concentration (0,5 ml/m²) équivaut environ à une concentration de 0,5-1 mg/l, soit 2 à 3 fois la CL 95

évidence par la méthode du dipping : le protocole expérimental reste le même que pour les puisards). Les dimensions de ces mares sont de 1 m × 1 m × 0,5 m. Les doses utilisées sont de 0,125, 0,250 et 0,5 ml/m² à raison de deux mares par concentration.

2.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette expérimentation s'est déroulée durant la

saison des pluies 1982.

2.2.1. *Culex quinquefasciatus*

L'échantillonnage des puisards a eu lieu toutes les 24 heures et s'est achevé dès réapparition des 4^e stades larvaires et des nymphes. Le tableau I indique l'évolution de la population dans les puisards de Bouaké.

TABLEAU I

Évolution dans le temps de la population préimaginale de moustiques après traitement avec une suspension concentrée de *Bacillus thuringiensis H-14* (++ : population préimaginale abondante ; l : larve stade I ou II ; L : larve stade III ou IV ; N : nymphe)

Puisard n°	Nombre de jours après traitement							
	1	2	3	4	5	8	9	10
1 (1 ml/m ²)	+ (2 N)	+ (1 L)	—	—	+ (2 l)	+ (25 L)	++	++
2 (1 ml/m ²)	+ (2 L)	—	—	—	—	+ (8 l)	+ (16 L)	++
3 (5 ml/m ²)	—	—	—	—	—	+ (3 l)	+ (3 L)	+
4 (5 ml/m ²)	—	—	—	—	—	+ (13 L)	+ (12 L) (2 N)	++
5 (10 ml/m ²)	—	—	—	—	+ (1 l)	+ (11 L)	++	++
6 (10 ml/m ²)	—	—	—	—	—	—	—	+ (1 L) (1 N)
7 (50 ml/m ²) (<i>Culex cinereus</i>)	—	—	++	—	++	+ (6 N) (1 L)	++	++
8 (50 ml/m ²)	—	—	—	—	—	+ (2 L)	+ (2 L)	+
9 (100 ml/m ²)	—	—	—	—	—	+ (18 L)	++	++

Nous constatons une réapparition des jeunes larves au bout de 5 jours de traitement dans les puisards n° 1, 5 et 7. Huit jours après, la population initiale s'est totalement reformée à l'exception du puisard n° 6 où elle ne se reconstitue que dix

jours après : cette réapparition plus tardive des larves n'est pas imputable à une persistance du produit dans le milieu puisqu'un test biologique au laboratoire s'est révélé négatif. Des pontes survenues deux jours après le traitement du puisard n° 7,

expliquent l'apparition momentanée, durant le troisième jour, de jeunes larves retrouvées mortes le jour suivant.

Les essais réalisés en Haute-Volta confirment les résultats de Côte d'Ivoire. La réapparition des jeunes stades larvaires est cependant plus précoce : 24 à 48 heures après le traitement à 0,5, 1 et 2 ml/m².

Quelle que soit la concentration choisie (de 0,5 à 100 ml/m²), l'activité larvicide du Teknar ne se manifeste plus 5 jours après le début du traitement (début de réapparition des jeunes larves). Ces résultats confirment donc ceux de Sudomo *et al.* (1981) qui ont testé l'activité du Teknar en Indonésie sur *C. quinquefasciatus* dans des gîtes artificiels (trous tapissés de sédiments organiques et remplis de dix litres d'eau polluée) : quelle que soit la dose utilisée, les auteurs observent une réapparition des échantillons dix jours après le traitement.

L'échantillonnage des mares a eu lieu toutes les 24 heures et s'est achevé dès réapparition des 4^e stades larvaires et des nymphes.

Quelle que soit la dose utilisée, les larves de premier stade réapparaissent 48 heures après le début du traitement, se développent normalement jusqu'au stade IV (le 5^e jour), puis se nymphosent.

3. Essais au laboratoire

Le produit Teknar ne semble pas constituer une formulation convenable tant pour le traitement des gîtes larvaires à *C. quinquefasciatus* que de ceux à *An. gambiae*. En effet, les résultats précédents montrent qu'un traitement tous les 5 à 7 jours est impératif pour éviter l'émergence des adultes.

Nous avons alors effectué quelques tests au laboratoire afin de déterminer le ou les facteurs responsables de la faible rémanence du Teknar. Les eaux stagnantes et polluées des gîtes à *Culex quinquefasciatus* représentent un biotope particulier sur lequel portera la suite de cette étude.

3.1. MATÉRIELS ET MÉTHODES

Le titre *Aedes aegypti* ⁽¹⁾ du lot de Teknar utilisé dans cet essai est de 375 Unités Internatio-

nales par milligramme. Le standard international est l'IPS 80. L'analyse statistique des résultats est effectuée par ordinateur selon la méthode de Finney (1962).

3.1.1. Sensibilité comparée de *C. quinquefasciatus* et de *C. cinereus*

C. quinquefasciatus et *C. cinereus* sont les deux principales espèces de moustiques rencontrées dans les puisards de Bouaké. Le choix des doses utilisées lors du traitement a nécessité au préalable une connaissance de la sensibilité de ces deux moustiques au bacille. La solution mère de Teknar est obtenue par pesée de 5 grammes de Teknar complétés à un litre d'eau distillée.

Nous utilisons pour chaque essai 5 concentrations et un témoin à raison de 4 × 25 larves

mortalité est faite après 24 heures de contact. Les CL 50 et 95 sont déterminées par ordinateur.

3.1.2. Effet de la pollution sur l'activité du Teknar

Mise en évidence de cet effet

Cent larves d'*Aedes aegypti* (4 gobelets de 25 larves) sont mises au contact d'une suspension de Teknar à 0,2 mg par litre d'eau distillée. Neuf autres séries sont réalisées dans les mêmes conditions expérimentales, à la même concentration, mais avec de l'eau prélevée dans chacun des neuf puisards.

Isolement des facteurs polluants

Influence de la nourriture

Cent larves de moustiques sont mises au contact d'une suspension de Teknar à 0,3 mg par litre d'eau distillée. Quatre autres séries sont réalisées dans les mêmes conditions expérimentales, mais avec addition dans l'eau distillée de quantités croissantes de nourriture (mélange levure-aliment 1^{er} âge).

Nous avons choisi pour cette expérimentation *Culex cinereus* qui peut supporter de très fortes concentrations de matières en suspension.

Influence du chlore libre

Deux séries de larves d'*Aedes aegypti* sont mises au contact d'une suspension bactérienne à 0,3 mg/l.

(1) Nous avons utilisé la méthode standard proposée par l'O.M.S. (5^e réunion du groupe scientifique de travail sur le contrôle biologique des vecteurs. O.M.S., Genève, 1981, T.D.R./V.B.C.-S.W.G. (5)/81.3, p. 17).

Ces séries diffèrent uniquement par la nature de l'eau distillée :

- série n° 1 : eau prélevée dans un puisard
- série n° 2 : eau prélevée dans un puisard et déchlorée par simple agitation pendant 24 heures.

Influence des détergents

Cent larves d'*Aedes aegypti* sont mises au contact d'une suspension de Teknar à 0,3 mg par litre d'eau distillée. Quatre autres séries sont réalisées dans les mêmes conditions expérimentales, mais avec addition dans l'eau de quantités croissantes de savon (type « savon de Marseille »).

Un deuxième test identique au précédent est effectué avec du Teepol[®].

3.2. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.2.1. Sensibilité comparée de *Culex quinquefasciatus* et de *Culex cinereus*

La comparaison des CL 50 et des CL 100 met en évidence une plus grande sensibilité de *Culex cinereus* au *Bacillus thuringiensis* H-14 :

- CL 50 *cinereus* : 0,04 mg/l CL 100 : 0,25 mg/l
- CL 50 *quinquefasciatus* : 0,10 mg/l CL 100 : 0,50 mg/l

La réapparition des larves de *Culex cinereus* dans le puisard n° 7 traduit donc d'autant mieux le fait que la toxine a disparu dans le milieu.

La plus faible dose utilisée pour le traitement des puisards (environ 0,5-1 ml/l) correspond à 2 à 3 fois la CL 95 de *Culex quinquefasciatus* (0,32 mg/l).

3.2.2. Effet de la pollution sur l'activité du Teknar

Le tableau II montre une différence significative de la mortalité larvaire d'une part entre l'eau distillée et l'eau polluée, d'autre part entre l'eau de chaque puisard (présentant différents degrés de pollution).

TABLEAU II

Comparaison des pourcentages de mortalité à 0,2 mg/l de Teknar chez les larves d'*Aedes aegypti* en fonction des puisards ; lecture après 24 heures de contact avec la suspension bactérienne

Puisard n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Eau distillée
% de mort. corrigée à 0,2 mg/l	40	18	11	25	3	19	8	19	6	57

Nous avons également réalisé une série de dilutions de l'eau du puisard n° 7 avec de l'eau distillée : l'efficacité du produit formulé Teknar augmente lorsque le degré de pollution de l'eau diminue. Sinègre (1981) trouve des résultats analogues avec la poudre primaire R 153.78.

3.2.3. Influence de la quantité de matières nutritives

Les résultats figurés dans le tableau III mettent en évidence une corrélation négative entre le pourcentage de mortalité corrigé et la quantité de nourriture.

TABLEAU III

Influence de la quantité de nourriture sur le pourcentage de mortalité des larves de *Culex cinereus* à 0,3 mg/l de Teknar ; lecture après 24 heures de contact avec la suspension bactérienne

Quantité de nourriture (mg/l)	0	10	100	1 000	2 000
% de mortalité corrigé à 0,3 mg/l	92	97	57	33	32

Remarque : à 10, 100, 1 000 et 2 000 mg/l de nourriture, aucune mortalité n'est observée chez les témoins.

Cette corrélation négative entre la mortalité et la quantité de nourriture est le résultat d'une compétition trophique entre les particules de levure-aliment 1^{er} âge et la toxine.

La quantité de matière en suspension dans l'eau de chaque puisard (mesurée par spectrophotométrie) varie de 15 à 320 mg/l : la richesse en matière organique de l'eau de puisard est sans doute un facteur limitant l'efficacité de l'endotoxine bactérienne.

3.2.4. Influence du chlore libre

La lecture de la mortalité après 24 heures de contact ne révèle pas de différence significative entre les deux séries (66 % de mortalité pour l'eau de puisard contre 60 % pour la même eau « déchlorée »). Pour Sinègre (1981), il existe une corrélation négative très marquée entre la teneur en chlore libre et l'efficacité de l'endotoxine. La quantité de chlore libre dissoute dans l'eau de puisard n'est donc pas assez importante pour motifier l'effet du Teknar.

Toutefois, un apport important de chlore peut

survenir à l'occasion d'une opération de nettoyage (désinfection de sanitaires par exemple) et altérer ainsi la toxine bactérienne.

3.2.5. Influence des détergents

La mortalité larvaire baisse significativement à 100 mg/l de savon de Marseille (tabl. IV).

TABLEAU IV

Pourcentage de mortalité à 0,3 mg/l de Teknar chez les larves d'*Aedes aegypti* en fonction de la concentration de savon (savon de Marseille) ; lecture après 24 heures de contact avec la suspension bactérienne

Concentration de savon (mg/l)	0	1	10	100	1 000
% de mortalité corrigé à 0,3 mg/l	84	82	84	39	100

Remarquons qu'à 1, 10 et 100 mg/l de savon de Marseille, aucune mortalité n'est observée chez les témoins. Par contre, les larves ne peuvent survivre à 1 000 mg/l de savon (100 % de mortalité dans le témoin).

Le deuxième test relatif au produit Teepol n'a pas confirmé les résultats précédents : quelle que soit la concentration de Teepol dissous dans l'eau, il n'y a pas de diminution de la mortalité larvaire.

La présence de certains détergents modifie donc, à forte dose, l'activité du Teknar. Cependant, la teneur en savon dans l'eau des puisards ne semble pas suffisante pour justifier une baisse de la mortalité préimaginale.

4. Conclusion

Parmi les facteurs susceptibles de modifier l'activité de *Bacillus thuringiensis* H-14, la sédimentation de la matière active et la présence d'un substrat ne sont pas mentionnées dans cet exposé. En effet, nous n'avons pas jugé utile de refaire des expériences abondamment décrites dans plusieurs publications.

— Guillet *et al.* (1980) ont étudié, pour plusieurs formulations, la perte de toxicité du *Bacillus thuringiensis* H-14 par sédimentation de la matière active. Pour ces auteurs, les concentrés aqueux

donnent lieu à une sédimentation quasi-totale en éprouvette au bout de 48 heures (à une concentration de 40 mg/l).

— Pour Sinègre *et al.* (1981), la présence au fond de l'eau d'un substrat de terre « masque » la poudre primaire. Les CL 50 et 90 obtenues en présence d'un substrat, par rapport à celles observées en l'absence de substrat, sont 20 à 22 fois plus élevées dans le cas de *Culex pipiens*.

Des tests de sédimentation effectués par Klein *et al.* (1981) dans des bidons de 200 litres d'eau, sur *Aedes polynesiensis*, montrent que le Teknar, à une concentration supérieure ou égale à la CL 100, sédimente totalement au bout de huit jours.

Dans la première partie de notre étude, nous avons observé que l'activité larvicide du Teknar ne se manifestait plus cinq jours après le début du traitement, quel que soit le type de gîte considéré (eau riche ou pauvre en matière organique) et quelle que soit la concentration utilisée. Cette durée correspond au temps de sédimentation au-delà duquel la matière active, enlisée dans le substrat, n'est plus accessible aux larves.

Certains facteurs comme le chlore ou les détergents ne semblent pas responsables de la faible rémanence du Teknar. Le rôle de la quantité de matière en suspension, bien que clairement démontré au laboratoire, ne semble pas non plus être important sur le terrain (même temps de rémanence entre une eau riche ou pauvre en matière en suspension). La sédimentation de la matière active est donc le facteur limitant essentiel.

Dans ces conditions, un traitement à grande échelle s'avère irréalisable, tant du point de vue coût (utilisation de grandes quantités) que du point de vue opérationnel (fréquence trop rapprochée).

La faible rémanence du Teknar[®] tient donc plus à des problèmes de formulation que de stabilité de l'endotoxine bactérienne. C'est pourquoi il serait intéressant de tester de nouvelles formulations.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. P. Guillet, Responsable de l'équipe insecticide de Bouaké, M. D. Quilléveré, Directeur de l'IRTO et M. G. Quélenec, OMS/VBC, pour les conseils qu'ils ont bien voulu nous prodiguer lors de l'accomplissement de ce travail et la rédaction de ce manuscrit.

Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M.
le 28 juin 1983.

BIBLIOGRAPHIE

- FINNEY (D. J.), 1962. — Probit analysis — a statistical treatment of the sigmoid response curve. University press, Cambridge, second edition.
- GUILLET (P.), DEMPAN (J.) et COZ (J.), 1980. — Évaluation 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. *Mimeo. doc. WHO/VBC/80.756*, Geneva, 9 p.
- HAMON (J.) et MOUCHET (J.), 1967. — La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wiedeman. *Bull. Wld Hlth Org.*, 37 : 277-286.
- KLEIN (J. M.), DUVAL (J.), RIVIÈRE (F.) et FAARUIA (M.), 1981. — Évaluation de *Bacillus thuringiensis* sérotype H-14 de Barjac pour la lutte antilarvaire contre les moustiques de la Polynésie française. *Rap. ronéo*.
- MOUCHET (J.), ELLIOT (R.), GARIOU (J.), VOELCKE (J.) et VARRIERAS (J.), 1960. — La résistance aux insecticides chez *Culex pipiens fatigans* Wied. et les problèmes d'hygiène urbaine au Cameroun. *Méd. trop.*, 20, 4 : 447-456.
- SINÈGRE (G.), 1981. — Contribution to the study of environmental factors which might influence the mortality of mosquito larvae. The development of a standardized bioassay method for the serotype H-14 of *Bacillus thuringiensis*. *TDR/BCV/IC.81/I/WP. 7 bis*.
- SINÈGRE (G.), 1981. — Contribution à la normalisation des épreuves de laboratoire concernant des formulations expérimentales et commerciales du sérotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XIX, n° 3 : 143-163.
- SUBRA (R.), 1971. — Études écologiques sur *Culex pipiens fatigans* Wiedemann, 1828 (Diptera, Culicidae) dans une zone urbaine de savane soudanienne ouest-africaine. Dynamique des populations préimaginales. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. IX, n° 1 : 73-102.
- SUBRA (R.), 1980. — Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicidae) with special reference to Africa. *Mimeo. doc. WHO/VBC/80.781*, Geneva, 40 p.
- SUDOMO (M.), AMINAH (S.), MATHIS (H.) et BANG (Y. H.), 1981. — Small-scale field trials of *Bacillus thuringiensis* H-14 against different mosquito vector species in Indonesia. *Mimeo. doc. WHO/VBC/81.836*, Geneva, 10 p.