

**Histopathologie de *Culex pipiens*  
Linné (Diptera, Culicidae)  
soumis à l'activité larvicide de  
*Bacillus sphaericus* 1593-4<sup>(1)</sup>**

Saïd KARCH<sup>(2)</sup>, Jean Coz<sup>(3)</sup>

---

**Résumé**

*L'ingestion de B. sphaericus 1593-4 par les larves de C. pipiens est suivie de lésions importantes au niveau de l'intestin moyen. Les premiers signes d'intoxication commencent après 30 minutes de contact. Le premier signe est une perturbation du flux alimentaire dans le tube digestif, suivie par une hypertrophie ou un ballonnement des cellules mésentériques de l'estomac postérieur. Des vacuoles commencent à envahir les cellules mésentériques dès le début de l'intoxication. Lorsque les cellules sont en état d'infection avancée, la partie apicale se lyse, il se produit ensuite un éclatement suivi d'un rejet du matériel cytoplasmique dans la lumière, entre la membrane péritrophique et l'épithélium intestinal. A ce stade, les cellules paraissent dégénérées avec ou sans débris cytoplasmiques, leur noyau paraissant conserver un aspect normal.*

**Mots-clés :** Histopathologie — Larves de moustique — *Culex pipiens* — *Bacillus sphaericus*.

---

**Summary**

LARVAL HISTOPATHOLOGY OF *Culex pipiens* LINNAEUS (DIPTERA, CULICIDAE) TREATED BY *Bacillus sphaericus* 1593-4. The ingestion of *Bacillus sphaericus* 1593-4 by the larvae of *Culex pipiens* produced important lesions in the midgut. The first signs of intoxication began after 30 minutes of contact. The first sign consisted in a perturbation of alimentary flow in the alimentary canal, followed by an hypertrophy or a swelling of the cells of the midgut posterior part. Some vacuoles invaded the midgut cells at the beginning of the intoxication. When the cells were in an advanced stage of infection, lysosomes appeared in the apical part of the cells; then a bursting occurred, followed by a rejection of the cytoplasmic material into the ectoperitrophic space. At this stage, the cells appeared to be degenerated with or without cytoplasmic debris. However, nuclei seemed to keep a normal appearance.

**Key words :** Histopathology — Mosquito larvae — *Culex pipiens* — *Bacillus sphaericus*.

---

(1) Cette étude a bénéficié d'un appui financier du Programme spécial P.N.U.D./Banque Mondiale/O.M.S. pour la recherche et la formation concernant les maladies tropicales.

(2) O.R.S.T.O.M., 70/74 route d'Aulnay 93140 Bondy, France.

(3) Entomologiste médical O.R.S.T.O.M., même adresse.

## 1. Introduction

La souche de *Bacillus sphaericus* var. *fusiformis* 1593-4 a été isolée à partir de larves moribondes de *Culex pipiens quinquefasciatus* en Indonésie en juin 1974 (O.M.S., 1979). Cette souche aérobie et gram variable est une des souches les plus toxiques pour les larves de moustiques (de Barjac *et al.*, 1980) notamment pour les *Culex* et les *Anopheles* et à un moindre degré pour les *Aedes* (Bourgouin, 1981; Dagnogo et Coz, 1982). La première étude histopathologique de l'activité larvicide de *B. sphaericus* faite par Kellen *et al.* (1965) sur *Culex tarsalis* montrait que les cellules mésentériques de l'estomac postérieur dégénéraient progressivement avec une vacuolisation importante. Les travaux de Davidson (1981) montraient qu'après l'ingestion des spores de la souche 1593 par *Culex quinquefasciatus*, les cellules étaient séparées les unes des autres à la base avec des lysosomes.

La présente étude a pour but de préciser certaines étapes de l'intoxication des cellules mésentériques des larves de *Culex pipiens* soumises à l'action des spores de *B. sphaericus* 1593-4.

## 2. Matériel et méthodes

La souche de *B. sphaericus* 1593-4 utilisée se présente sous la forme d'une poudre lyophilisée, conditionnée en flacon de 100 mg provenant de l'Institut Pasteur (Paris). Les larves de *Culex pipiens* Linné, 1758 viennent des élevages de notre laboratoire (1). L'étude histopathologique a été effectuée sur les larves au stade III élevées en insectarium (26°C, 80 % H.R., 12 h de jour). La technique consiste à mettre les larves en contact avec la suspension de spores dans un gobelet en plastique transparent contenant 150 ml et à effectuer systématiquement des prélèvements de larves après des temps donnés. Les larves sont ensuite fixées (Bouin ou Carnoy II).

Parallèlement des témoins placés dans de l'eau distillée sont prélevés et fixés.

Les pièces, après déshydratation et passage dans un mélange de benzoate de méthyl et celloïdine, sont incluses dans la paraffine. Les coupes sériées d'une épaisseur de 5 µm sont colorées selon la technique de l'Azan de Heiden Hain (*in* Martoja et Martoja, 1967).

(1) Souche « Montpellier », laboratoire d'entomologie médicale, O.R.S.T.O.M., Bondy, France.

## 3. Résultats

La concentration utilisée (0,01 ppm) de *B. sphaericus* 1593-4 représente approximativement

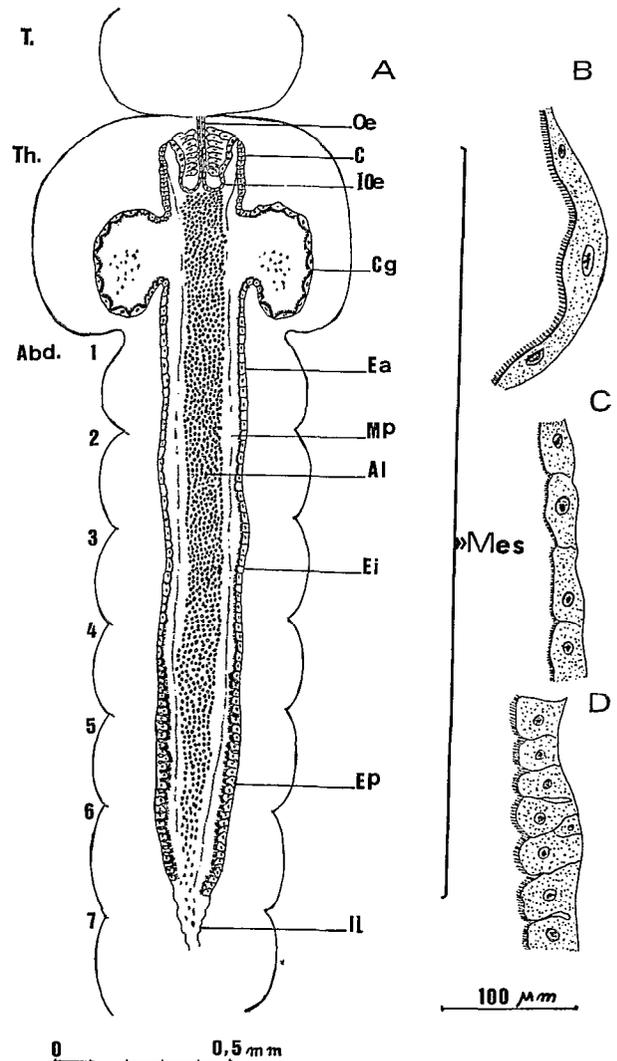


FIG. 1. — Tube digestif d'une larve au stade III de *Culex pipiens*. A : Organisation générale; B : Cellules des caeca gastriques (détail); C : Cellules de l'estomac antérieur (détail); D : Cellules de l'estomac postérieur (détail). C : Cardia, Cg : Caeca gastriques, Ea : Estomac antérieur, Ei : Estomac intermédiaire, Ep : Estomac postérieur, Il : Iléon, IOe : Invagination œsophagienne, Mes : Mésentéron, Mp : membrane péritrophique, Oe : Œsophage, T : Tête, Th : Thorax, Abd : Abdomen.

la DL 80 après 48 heures de contact avec les larves de stade III de *Culex pipiens*. Elle permet d'étudier les modifications histopathologiques au niveau des cellules mésentériques lors des différentes étapes du processus réactionnel. En effet, seul l'intestin moyen subit un profond changement (Davidson, 1979).

Nous limitons notre propos à la présentation de l'histopathologie de quatre régions du mésentéron de *C. pipiens* au stade larvaire III : le cardia, les caeca gastriques, l'estomac antérieur, et l'estomac postérieur, qui sont schématisées (fig. 1) et détaillées (photos 1 et 2).

Le premier signe de la maladie consiste en une perturbation du flux alimentaire dans le tube digestif et un ballonnement des cellules. L'évolution morphologique de l'intoxication est différente selon la région : caeca gastriques, estomac antérieur, estomac postérieur. Des symptômes d'intoxication apparaissent après 30 minutes de contact, ce qui correspond aux résultats de Davidson (1981), surtout dans quelques cellules de l'estomac postérieur qui se ballonnent (photo 3) et à un moindre degré dans les cellules de l'estomac intermédiaire. Après 6 heures de contact, des cellules de l'estomac postérieur commencent à éclater ; il se produit alors un rejet du matériel cytoplasmique qui s'accumule dans la lumière du mésentéron entre la membrane péritrophique et l'épithélium intestinal (photo 4).

Après 24 heures, l'observation des caeca gastriques montre un éclatement de quelques cellules et des rejets de débris cytoplasmiques dans la lumière des caeca ; les cellules de l'estomac antérieur se ballonnent (photo 5), tandis que celles de l'estomac postérieur continuent à dégénérer et à éclater. Leurs microvillosités apicales paraissent perdre leur aspect normal. La dégénérescence des cellules continue jusqu'à la mort des larves qui se produit dans nos observations après 48 heures de contact. A ce stade, les cellules mésentériques (à l'exception de celles du cardia) sont dégénérées. Certaines cellules de l'estomac postérieur paraissent vides, d'autres sont détruites (photo 6), gardant toutefois leur noyau.

#### 4. Discussion-Conclusion

La pathologie cellulaire est liée à la digestion du bacille par la larve hôte. Le mécanisme peut s'expliquer par la libération par les cellules de *B. sphaericus* d'un produit qui serait toxique (Davidson *et al.*, 1975 ; Davidson, 1979), car il n'y a passage de bactéries à travers la membrane péritrophique pour envahir les cellules intestinales qu'après la mort de la larve (Kellen *et al.*, 1965 ; Davidson, 1982).

Les cellules végétatives de la souche SS II 1 utilisée par Davidson *et al.* (1975) sont rapidement dégradées dans le tube digestif de la larve ; par contre, les spores de la souche 1593 ne sont pas dégradées et une germination a été observée (Davidson, 1981). Les modifications histopathologiques de l'intestin moyen de *C. pipiens* sont comparables à celles observées par Kellen *et al.*, (1965) sur *C. tarsalis*, notamment la dégénérescence cellulaire de l'estomac postérieur et la vacuolisation qui envahit les cellules pendant toutes les étapes de l'intoxication des *Culex* ; à l'inverse de ces auteurs, nos observations ne nous montrent pas de modifications notables au niveau des noyaux. Les travaux de Davidson (1979, 1981 et 1982) confirment que les cellules mésentériques sont séparées à la base. Ce phénomène existe toutefois, mais à un moindre degré, chez les témoins (photo 2), dans la région de l'estomac postérieur. L'aspect du ballonnement puis de l'éclatement de l'épithélium intestinal diffère d'une région à l'autre. Ceci semblerait lié aux fonctions physiologiques différentes des divers types cellulaires, ou à des conditions enzymatiques variant avec la région du tube digestif. Toutes ces hypothèses indiquent un certain nombre de problèmes à résoudre pour permettre de trouver une explication claire au mode d'action de ce bacille.

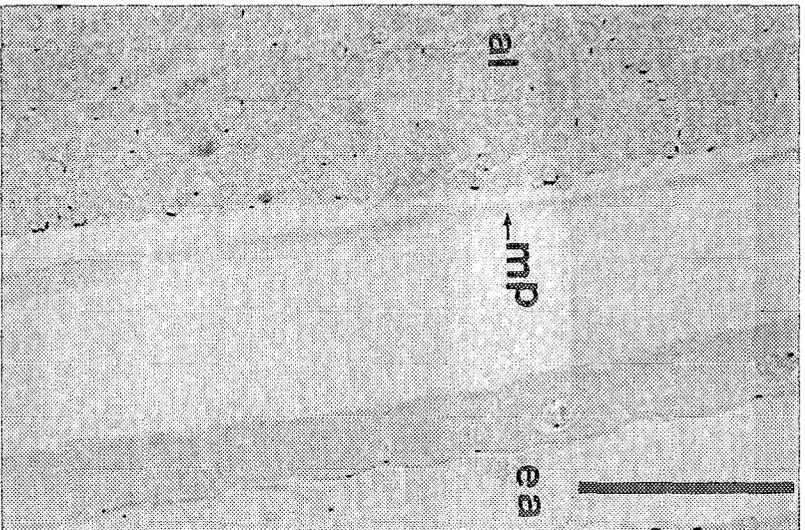
Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M.  
le 15 décembre 1983

#### BIBLIOGRAPHIE

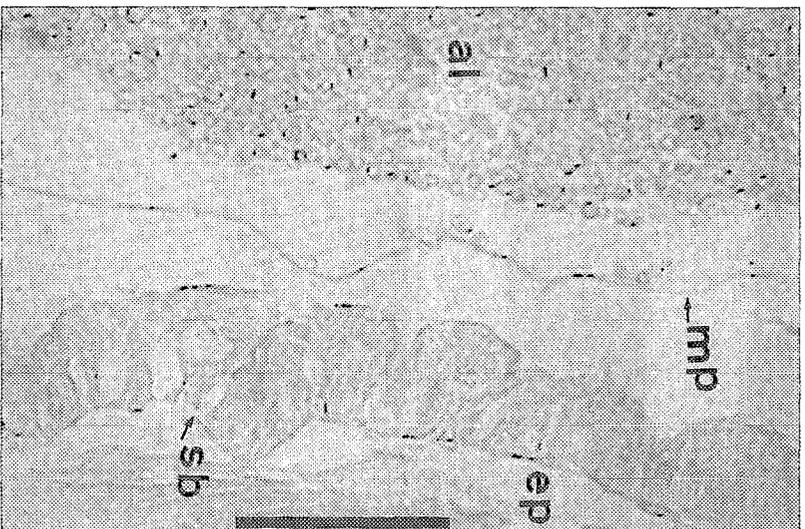
BARJAC (H. de), VÉRON (M.) et COSMAO DU MANOIR (V.), 1980. — Caractérisation biochimique et sérologique de souches de *Bacillus sphaericus* pathogènes ou non pour les moustiques. *Ann. Microbiol. (Institut Pasteur)*, 131 B : 191-201.

BOURGOUIN (C.), 1981. — Étude de l'activité larvicide vis-à-vis d'*Anopheles stephensi*. Essai d'isolement et de caractérisation d'un facteur toxique. Rapport thèse 3<sup>e</sup> cycle, Univer. Paris-Sud-Orsay.

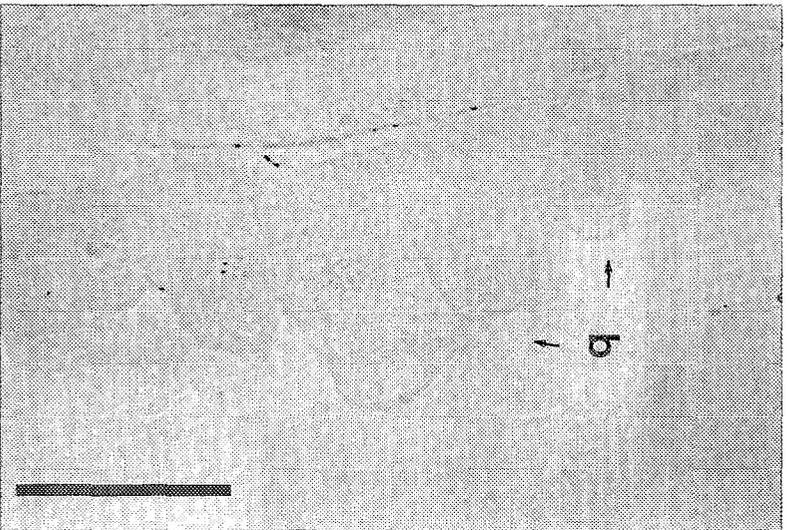
DAGNOGO (M.) et Coz (J.), 1982. — Un insecticide biolo-



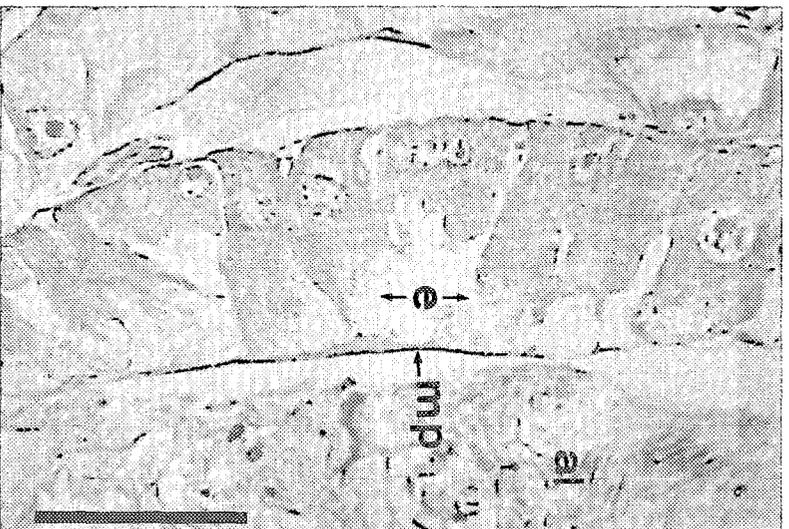
1



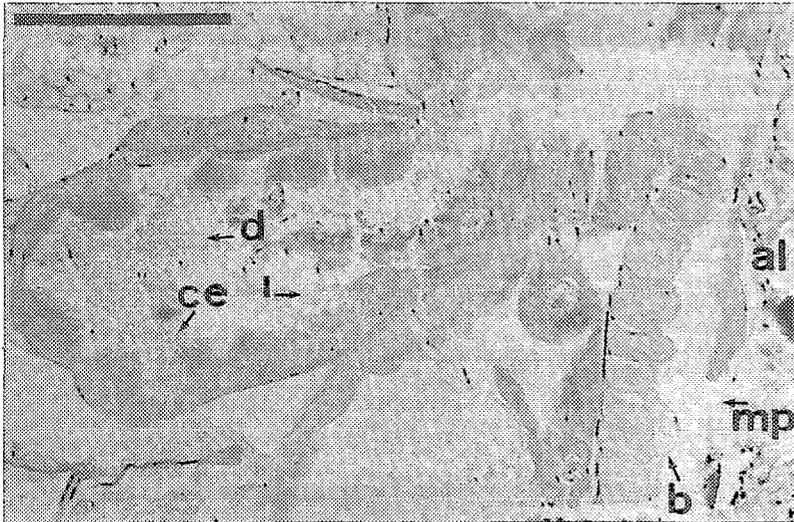
2



3



4



5

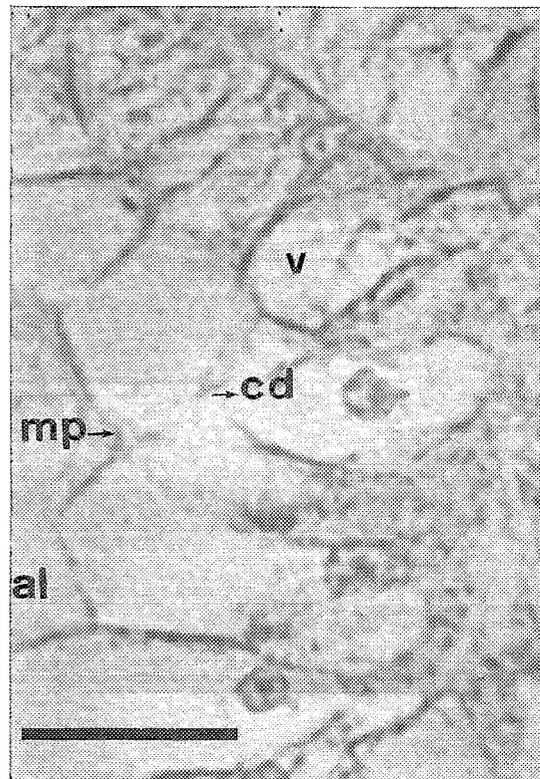
PHOTOS 1 et 2 : Coupes longitudinales au niveau de l'estomac antérieur et de l'estomac postérieur chez les larves témoins. Coloration de l'Azan de Heiden Hain. Le trait représente 100  $\mu$ m (al : colonne alimentaire, ea : cellules de l'estomac antérieur, ep : cellules de l'estomac postérieur, mp : membrane péritrophique, sb : séparation à la base des cellules)

PHOTO 3 : Coupe longitudinale au niveau de l'estomac postérieur (après 30 minutes de contact) montrant le ballonnement cellulaire (b). Même échelle

PHOTO 4 : Coupe longitudinale au niveau de l'estomac postérieur (après 6 heures de contact) montrant l'éclatement des cellules suivi d'un rejet important du matériel cytoplasmique (al : colonne alimentaire, mp : membrane péritrophique, e : éclatement cellulaire).  
Même échelle.

PHOTO 5 : Coupe longitudinale au niveau des caeca gastriques et de l'estomac antérieur (après 24 heures de contact) montrant l'éclatement cellulaire (ce) et une lyse à la partie apicale des cellules (l) : des débris cellulaires (d) se trouvent dans la lumière des caeca ; ballonnement cellulaire (b) au niveau de l'estomac antérieur. Même échelle.

PHOTO 6 : Coupe transversale au niveau de l'estomac postérieur (après 48 heures de contact) montrant la détérioration des cellules cytoplasmiques qui gardent néanmoins leur noyau ; cd : cellule détruite, v : grande vacuolisation qui recouvre toute la surface de la cellule.  
Même échelle



6

- gique : *Bacillus sphaericus*. Activité larvicide de *B. sphaericus* sur quelques espèces et souches de moustiques. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol.*, vol. XX, n° 2 : 133-138.
- DAVIDSON (E. W.), 1979. — Ultrastructure of midgut events in the pathogenesis of *Bacillus sphaericus* strain SS II-1 infections of *Culex pipiens quinquefasciatus* larvae. *Can J. Microbiol.*, 25 : 178-184.
- 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.), 1982. — Insecticidal factors from *Bacillus sphaericus* and production of biocides from this organism. *Working paper*, WHO, Genève, April 1982, 11 p.
- DAVIDSON (E. W.), SINGER (S.) et BRIGGS (J. D.), 1975. — Pathogenesis of *Bacillus sphaericus* strain SS II-1 infections in *Culex pipiens quinquefasciatus* (= *C. pipiens fatigans*) larvae. *J. Invert. Pathol.*, 25 : 179-184.
- KELLEN (W. R.), CLARK (T. B.), LINDEGREN (J. E.), HO (C. B.), ROGOFF (M. H.) et SINGER (S.), 1965. — *Bacillus sphaericus* Neide as a pathogen of mosquitoes. *J. Invert Pathol.*, 7 : 442-448.
- MARTOJA (R.) et MARTOJA (M.), 1967. — Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie éd., Paris, 345 pp.
- O.M.S., 1979. — *Bacillus sphaericus*, strain 1593-4. *Doc. miméo.*, V.B.C./BC/DS/ 79-09.