

# Potentialités de *Bacillus sphaericus* dans la lutte anti-vectorielle en Afrique tropicale

Luc NICOLAS<sup>(1)</sup>

---

## Résumé

Cet article est une synthèse des essais larvicides réalisés en Afrique tropicale avec *Bacillus sphaericus*. Cette bactérie comprend des souches très toxiques contre les larves de moustiques des genres *Culex* et *Anopheles* mais est très peu toxique contre les larves de la plupart des espèces d'*Aedes*. Les aspects biologiques de *B. sphaericus* sont rappelés en soulignant leur importance pratique dans l'utilisation de cette bactérie sur le terrain et sa production locale.

En Afrique de l'Ouest et en Tanzanie, des traitements antilarvaires contre *Culex quinquefasciatus* en puisards ou en caniveaux ont permis de contrôler ce moustique pendant plus de cinq semaines. L'utilisation de *B. sphaericus* est donc économiquement rentable particulièrement dans les zones où *C. quinquefasciatus* est devenu résistant aux insecticides chimiques. La formulation du produit joue un rôle primordial pour maintenir les spores toxiques de *B. sphaericus* dans la zone de nutrition des larves. Cet agent de lutte biologique présente également l'avantage de ne pas être toxique contre les larves de *Culex cinereus*, espèce compétitrice de *C. quinquefasciatus*.

Par contre, l'efficacité de *B. sphaericus* sur le terrain contre les larves d'*Anopheles gambiae* n'excède pas quelques jours, les spores étant rapidement inactivées par les rayonnements solaires.

**Mots-clés :** Lutte biologique — *Bacillus sphaericus* — Culicidae — *Culex quinquefasciatus* — *Culex cinereus* — *Anopheles gambiae* — Afrique tropicale.

---

## Summary

POTENTIAL USE OF *BACILLUS SPHAERICUS* IN VECTOR CONTROL IN TROPICAL AFRICA. This paper is an attempt to analyse field trials with *Bacillus sphaericus* in tropical Africa. This bacterial species includes several entomopathogenic strains which are very toxic against mosquito larvae belonging to the genera *Culex* and *Anopheles*. However, *Aedes* larvae are poorly susceptible to *B. sphaericus*. Biological aspects of the bacterium are summarized with emphasis on the field application and local production of this larvicide.

In Western Africa and in Tanzania, *B. sphaericus* treatments against *Culex quinquefasciatus* Say larvae breeding in cesspools or in gutters led to total control of this mosquito for up to at least five weeks. Furthermore, *B. sphaericus* is more cost-effective than certain chemical insecticides especially in areas where *C. quinquefasciatus* has developed resistance. The formulation plays a major role in keeping the toxic spores in the larval feeding zone. In addition, *B. sphaericus* is not toxic, even at high doses, against larvae of *Culex cinereus* Theo., a competitor of *C. quinquefasciatus*.

However, the efficacy of *B. sphaericus* against larvae of *Anopheles gambiae* Giles does not exceed few days under field conditions, partly due to a rapid inactivation of the spores caused by solar radiation.

**Key words :** Biological control — *Bacillus sphaericus* — Culicidae — *Culex quinquefasciatus* — *Culex cinereus* — *Anopheles gambiae* — Tropical Africa.

---

(1) Institut Pasteur, Unité de Lutte biologique contre les Insectes II, 28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15.

## 1. Introduction

En 1939, le DDT, premier insecticide réellement efficace, est découvert par le suisse Muller. Les premières applications sur le terrain de cet insecticide, et très rapidement d'autres insecticides de contact, se révèlent très efficaces et permettent la mise en place de vastes programmes de prophylaxie contre les maladies à vecteurs. Toutefois l'utilisation massive de ces insecticides entraîne bientôt l'apparition de résistance parmi les populations d'insectes traités. En 1980, le Comité d'Experts de l'O.M.S. sur la Biologie et le Contrôle des Vecteurs a répertorié dans le monde 51 espèces d'Anophelinae, 42 espèces de Culicinae et 41 autres Arthropodes d'importance médicale ou vétérinaire devenus résistants à un ou plusieurs insecticides chimiques (O.M.S., 1980).

D'autre part, le manque de spécificité de composés tels que les organophosphorés ou les organochlorés a entraîné une disparition de certains ennemis naturels. Ainsi, dans plusieurs villes africaines et du Sud-Est asiatique, les moustiques *Culex cinereus* et *Culex nebulosus* qui entraînent en compétition avec *Culex quinquefasciatus* pour coloniser les gîtes larvaires ont été éliminés, laissant ainsi de nouveaux gîtes à la disposition de ce dernier (Service, 1966).

Bien qu'actuellement les insecticides chimiques demeurent l'outil essentiel de lutte anti-vectorielle, d'autres techniques et d'autres types d'insecticides, parmi lesquels les insecticides biologiques, sont progressivement développés.

Parmi ces derniers, les plus efficaces et les plus prometteurs sur le terrain sont deux bactéries sporulées appartenant au genre *Bacillus* (O.M.S., 1984), ayant pour cibles les larves aquatiques de moustiques et de simules (Diptères). Ces bactéries, *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* et *Bacillus sphaericus*, agissent après ingestion par la larve en libérant dans son intestin une toxine qui entraîne la mort en quelques heures.

*B. thuringiensis israelensis* est très toxique pour les larves de simules et de moustiques, en particulier celles des genres *Aedes* et *Culex* et à un niveau moindre du genre *Anopheles*. Depuis 1980, cette bactérie est utilisée opérationnellement en Afrique de l'Ouest sous forme du produit Teknar<sup>®</sup>, en traitement des rivières contre les larves de simules, dans le cadre du Programme de Contrôle de l'Onchocercose (O.C.P.) lancé par l'O.M.S. Plusieurs formulations sont d'autre part commercialisées pour la lutte anti-moustique.

*Bacillus sphaericus* comprend des souches très toxiques contre les larves de moustiques des genres *Culex* et *Anopheles* mais présente une très faible toxi-

cité sur les larves de la plupart des espèces d'*Aedes* (de Barjac *et al.*, 1985). *B. sphaericus* est également inefficace contre les larves de simules. Le spectre d'action de *B. sphaericus* est donc plus restreint que celui de *B. thuringiensis*. Cependant, contrairement à ce dernier, *B. sphaericus* présente l'avantage d'être efficace en eaux polluées devenant de ce fait un candidat très prometteur dans la lutte contre le moustique urbain *Culex quinquefasciatus*.

La découverte récente de souches de *B. sphaericus* pathogènes au laboratoire et aptes à être produites en masse suscite de nombreux travaux sur cet agent, auxquels participent des équipes de recherche de plusieurs pays, l'industrie et l'O.M.S.

## 2. Aspects biologiques d'importance pratique dans l'utilisation de *B. sphaericus* sur le terrain

### SOUCHES

*B. sphaericus* est une bactérie aérobie sporulée largement distribuée dans les environnements aquatiques et les sols (O.M.S., 1984). La plupart des souches ne sont pas pathogènes pour les insectes. La première souche entomopathogène, *Bacillus sphaericus* var. *fusiformis*, a été isolée à partir de larves moribondes de *Culiseta incidens* en Californie par Kellen *et al.* (1965).

Actuellement, la plupart des travaux sont centrés sur les souches 1593, 1691, 2297 et 2362 isolées respectivement en Indonésie (Singer, 1973), au Salvador (Singer, 1977), au Sri Lanka (Wickremasinghe et Mendis, 1980) et au Nigeria (Weiser, 1984), à partir de larves de Diptères.

### SPECTRE D'ACTION

*B. sphaericus* présente un spectre d'action limité dû à une forte spécificité vis-à-vis des différentes espèces de moustiques. La plupart des espèces de *Culex* testées jusqu'à présent sont très sensibles à cette bactérie, alors qu'elle ne présente pas, ou très peu, de toxicité pour la plupart des espèces d'*Aedes*, en particulier *Aedes aegypti*, vecteur de fièvre jaune en Afrique. La toxicité de *B. sphaericus* varie beaucoup selon les espèces d'*Anopheles* qui d'une manière générale sont moins sensibles que celles de *Culex*. Par exemple, *Anopheles albimanus* et *Anopheles stephensi* sont plus sensibles qu'*Anopheles quadrimaculatus* (Balaraman, 1980 ; Bourgouin et de Barjac, 1980 ; Ramoska et Hopkins, 1981 ; Dagnogo et Coz, 1982 ; Lacey et Singer, 1982). Les genres *Psorophora*, vecteur d'arbo-

virus, et *Mansonia*, vecteur d'arbovirus et de filaires, sont également sensibles.

#### MODE D'ACTION

Chez les souches les plus toxiques, la toxicité apparaît au cours de la sporulation (Myers *et al.*, 1979 ; Yousten et Davidson, 1982 ; Kalfon *et al.*, 1984), et est surtout associée à la présence d'inclusions parasporales de nature protéique, communément appelées cristaux, dont la taille varie selon la souche. Après ingestion par les larves de moustiques, les cristaux sont digérés sous l'action des enzymes intestinaux et libèrent des fragments toxiques, entraînant la destruction des cellules intestinales et la mort des larves (Charles et de Barjac, 1983). L'isolement et l'identification de la toxine responsable de la mort des larves ont montré qu'il s'agirait principalement d'une protéine de 43 kd, présente dans les souches les plus toxiques (Baumann *et al.*, 1985). Cette protéine est résistante à plusieurs protéases et à des températures et des pH fréquemment rencontrés dans la nature. Le mode d'action précis de cette toxine au niveau cellulaire et les causes de la spécificité de *B. sphaericus* vis-à-vis de certains genres de moustiques demeurent inconnus à l'heure actuelle.

#### PRODUCTION

*B. sphaericus* peut être produit suivant les techniques conventionnelles de fermentation ; il est donc très important de connaître les exigences des différentes souches en oxygène, pH, température, quantité d'azote et de carbone, pour obtenir des lots les plus sporulés possible (Yousten *et al.*, 1984). *B. sphaericus* peut être cultivé dans des milieux contenant diverses substances protéiques. Toutefois, cette bactérie n'utilise pas les glucides comme source de carbone et d'énergie. Une souche donnée ne répond pas de la même manière à différentes sources protéiques. Par exemple, la souche 2362 continue à produire de la toxine à des concentrations protéiques élevées, contrairement à la souche 1593. Bien que les connaissances soient encore incomplètes, il semble que la souche 2362 soit particulièrement adaptée à la production en fermenteur. De plus elle peut produire la toxine à une température plus élevée que la souche 1593, devenant ainsi un candidat adapté à la production locale dans les pays tropicaux, où l'approvisionnement en eau de refroidissement peut-être limité (Yousten, 1984a). Plusieurs centres de recherche ont d'ailleurs déjà produit des lots de *B. sphaericus*, notamment en Inde, en Thaïlande et au Nigeria

(Obeta et Okafor, 1983) parfois à partir de résidus industriels ou agricoles locaux.

#### ÉVALUATION AU LABORATOIRE ET SUR LE TERRAIN

En général, à la fois lors des essais au laboratoire et sur le terrain, la souche 2362 s'est révélée la plus efficace contre toutes les espèces sensibles et les différents stades larvaires traités, suivie par la souche 1593 puis par la souche 2297 (Yousten, 1984b ; Davidson *et al.*, 1984 ; Dossou-Yovo, comm. pers.).

*B. sphaericus* a été évalué sur le terrain dans différents types d'habitats, en eaux claires ou polluées organiquement, dans des gîtes ensoleillés ou au contraire ombragés, contre des populations naturelles de *C. quinquefasciatus*, *Culex nigripalpus*, *An. quadrimaculatus* et *Psorophora columbiae*.

*B. sphaericus* est en général plus efficace dans les gîtes ombragés car ses spores sont rapidement altérables par les rayons ultra-violet (Burke *et al.*, 1983 ; Lacey et Smittle, 1985).

*B. sphaericus* est capable de persister dans l'environnement pendant plusieurs mois après le traitement. La persistance de *B. sphaericus* est définie par l'O.M.S. comme la présence dans l'environnement de spores non germées contenant la toxine larvicide. De plus les spores de *B. sphaericus* peuvent se recycler dans les larves de *C. quinquefasciatus* : c'est-à-dire germer dans l'intestin moyen de la larve, s'y multiplier végétativement et produire un nouveau stock de spores dans les larves mortes pouvant atteindre  $10^5$  à  $10^6$  spores par larve, soit 10 à 1 000 fois la quantité ingérée. Ces spores sont ensuite relâchées dans l'environnement lors de la décomposition des cadavres larvaires (Davidson, 1981 ; Silapanantakul *et al.*, 1983 ; Davidson *et al.*, 1984 ; Mulla *et al.*, 1984). Une activité insecticide résiduelle dans les gîtes peut être due à la persistance d'un inoculum suffisant et/ou à un recyclage des spores dans les larves ou dans l'environnement, si les spores de *B. sphaericus* se maintiennent dans la zone de nutrition des larves de *C. quinquefasciatus*. Même si la quantité de toxine accessible aux larves diminue, le contrôle prolongé des populations larvaires peut être dû à la sensibilité des larves nouvellement écloses plus forte que celle des larves âgées.

#### FORMULATIONS

L'efficacité des souches de *B. sphaericus* dépend de l'espèce de moustique, de l'environnement, de la quantité de toxine présente dans la préparation de

spores, mais aussi de la formulation et de la technique d'application utilisées. Le principal objectif des formulations est de maintenir les spores toxiques dans la zone de nutrition des larves de moustiques. Récemment, plusieurs poudres primaires, un concentré liquide et diverses formulations sous forme de granules ou de briquettes ont été produits par l'industrie et par différents laboratoires. Le concentré liquide a permis de pratiquer des pulvérisations en ULV sur des rizières contre des larves d'*Anopheles* et de *Psorophora*. Les différentes formulations ont donné des résultats plus ou moins satisfaisants selon les types d'habitats larvaires.

### 3. Résultats obtenus en Afrique

#### 3.1. VECTEURS CIBLES

En Afrique tropicale, les principaux Diptères contre lesquels *B. sphaericus* doit être évalué sont *Culex quinquefasciatus* et dans une moindre mesure *Anopheles gambiae*, un des quatre vecteurs majeurs de paludisme dans la zone afrotropicale (Carnevale et Mouchet, 1980). *B. sphaericus* est en effet inefficace contre les larves de simulies et d'*Aedes aegypti*, qui par contre sont fortement sensibles à *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.

#### 3.2. *CULEX QUINQUEFASCIATUS*

##### *Biologie et contrôle du vecteur*

*Culex quinquefasciatus* (décrit aussi sous le nom de *Culex pipiens fatigans* Wiedemann) est largement répandu dans les zones tropicales et subtropicales. Il joue un rôle majeur dans la transmission de la filariose de Bancroft principalement en Afrique de l'Est, à Madagascar et dans les Iles de l'Océan Indien. De plus, il cause une nuisance considérable aux populations humaines exposées à ses piqûres nocturnes. Dans la plupart des villes africaines, on observe fréquemment plusieurs centaines de piqûres par nuit et par homme (Subra, 1981). *C. quinquefasciatus* se développe dans tous les types de gîtes artificiels, surtout lorsque l'eau est chargée en matières organiques (gouttières, puisards, fosses septiques, latrines, caniveaux) où les larves peuvent pulluler. L'accroissement anarchique des agglomérations et l'insuffisance des réseaux d'assainissement des eaux usées ont conduit à une augmentation importante des gîtes à *C. quinquefasciatus* dans de nombreuses villes. D'autre part, l'utilisation répétée de larvicides chimiques peu

spécifiques a souvent éliminé des espèces de moustiques compétitrices de *C. quinquefasciatus* et non dangereuses pour l'homme, telles que *Culex cinereus* ou *Culex nebulosus* (Service, 1966 ; Subra, 1981).

*C. quinquefasciatus* est une espèce difficile à contrôler bien que l'utilisation d'insecticides ait souvent donné des résultats satisfaisants. Sa tolérance au DDT et à d'autres organochlorés (Brown et Pal, 1973) nécessite des doses élevées de pesticides. Dans certains cas, la résistance croissante aux organochlorés et aux organophosphorés a conduit à réutiliser les huiles de pétrole. Quatre organophosphorés sont toujours utilisés comme larvicides : chlorpyrifos, fenitron, fénitrothion et téméphos (Subra, 1981).

Outre l'utilisation de ces insecticides, des essais commencent à voir le jour en Afrique sur l'efficacité de nouveaux insecticides, tels que les régulateurs de croissance ou les bactéries.

##### *Lutte biologique avec B. sphaericus*

###### *Localisation des essais*

Des essais de lutte antilarvaire sur le terrain contre ce moustique à l'aide de *B. sphaericus* ont été menés essentiellement à Bouaké (Côte d'Ivoire) et à Dar es-Salaam (Tanzanie). Dans la ville de Bouaké, *C. quinquefasciatus* se reproduit surtout dans des puisards. Ces fosses creusées dans le sol recueillent les eaux ménagères usées et de faibles quantités d'eaux de pluies. D'une surface variant de 0,4 m<sup>2</sup> à 2 m<sup>2</sup> environ, elles peuvent atteindre jusqu'à 5-6 mètres de profondeur. Rarement vidés, les puisards constituent donc des gîtes quasi permanents et localisés. Selon l'origine ethnique des habitants, le puisard peut être creusé au bord de la rue, dans la cour ou même sous la maison, d'où un accès plus ou moins aisé pour traiter, selon les quartiers. Par sécurité, les puisards sont recouverts d'une dalle ou de matériaux plus ou moins hétéroclites. L'eau des gîtes est de ce fait à l'ombre.

###### *Efficacité et persistance*

Les évaluations réalisées à Bouaké ont porté sur deux formulations des souches 1593 et 2362.

Hougard *et al.* (1985) ont montré que la rémanence de la souche 1593, utilisée en poudre primaire, était fonction de la dose appliquée. Dans cette étude, la réapparition des derniers stades larvaires (stades 3 et 4), qui indique la fin de la rémanence du larvicide, a eu lieu entre le 8<sup>e</sup> et 16<sup>e</sup> jour dans les puisards traités à 1 g/m<sup>2</sup>, entre le 20<sup>e</sup> et le 26<sup>e</sup> jour à 10 g/m<sup>2</sup> et entre le 32<sup>e</sup> et le 36<sup>e</sup> jour à 50 g/m<sup>2</sup>.

Une étude plus complète, basée principalement

sur des analyses bactériologiques, a été alors entreprise pour évaluer l'efficacité, la persistance et le recyclage de *B. sphaericus* dans les gîtes à *C. quinquefasciatus*.

En mai 1985, quatre puisards ont été traités à 10 g/m<sup>2</sup> d'un concentré liquide de *B. sphaericus* souche 2362 (BSP1) contenant un traitement à  $2 \times 10^{10}$  spores/g, fourni par la firme Solvay, et entraînant une mortalité larvaire de 100 % après 48 h dans tous les puisards (Nicolas *et al.*, sous presse).

Les derniers stades larvaires et les nymphes ne sont réapparus dans les gîtes que cinq à six semaines après le traitement. Toutefois, pendant ce temps, des pontes et des larves néonates étaient présentes dans l'eau mais sont mortes avant d'atteindre le stade 2. Parallèlement au suivi des populations préimaginales, la sédimentation des spores de *B. sphaericus* dans l'eau et leur persistance dans le gîte ont été étudiées en prélevant de l'eau à différentes profondeurs et du substrat constituant le fond du gîte. La quantité de spores viables présentes dans ces échantillons a été dénombrée au laboratoire par étalement en boîtes de Pétri sur milieu MBS (Kalfon *et al.*, 1983) contenant 100 mg/l de streptomycine. Ce milieu est sélectif de *B. sphaericus*. En moins de 6 h après le traitement les spores de *B. sphaericus* se sont dispersées uniformément dans tout le volume d'eau des puisards. Puis les spores restées en surface ont sédimenté très lentement, leur concentration baissant de 10<sup>4</sup> spores/ml 24 heures après le traitement à 10<sup>2</sup> spores/ml deux mois plus tard.

Les derniers stades larvaires de *C. quinquefasciatus* sont réapparus quand la concentration en spores dans la zone de nutrition des larves est devenue inférieure à un seuil de 100 à 500 spores/ml. Ce seuil avait également été mis en évidence par d'autres auteurs aux États-Unis avec les souches 1593 et 2362 (Hornby *et al.*, 1981 ; Davidson *et al.*, 1984).

La persistance des spores viables dans le fond des gîtes dépend de la nature du substrat. Ainsi dans les puisards dont le fond est cimenté, la concentration en spores dans le substrat est restée constante pendant plus de cinq mois ( $7 \text{ à } 8 \times 10^3$  spores/ml), alors que dans les puisards à fond argileux, les spores se sont progressivement enfoncées dans le sol.

#### Recyclage de *B. sphaericus*

Il ne semble pas que les spores puissent se recycler dans l'eau ou le substrat des gîtes. Par contre, l'aptitude des spores à se recycler à l'intérieur des larves présentes dans les gîtes a été démontrée (Nicolas *et al.*, sous presse). Quel que soit le gîte, le recyclage des spores a eu lieu dans les larves selon le

schéma général suivant, observé sur le terrain et au laboratoire. Dans une première phase, les spores ingérées ( $5 \times 10^2$  à  $1 \times 10^3$  spores/larve) germent dans le tube digestif des larves encore vivantes, produisant ainsi un stock de cellules végétatives, dont une partie est détruite dans l'intestin de la larve. Lorsque les larves meurent, les cellules végétatives ayant subsisté (souvent moins de 100 bactéries par larve) se multiplient activement et entrent en sporulation, produisant en 72 heures entre  $5 \times 10^4$  et  $5 \times 10^5$  spores/larve, selon les gîtes, soit 50 à 1 000 fois la quantité de spores ingérées. Les spores recyclées sont aussi toxiques sur les larves de *C. quinquefasciatus* que les spores du produit formulé. Parallèlement, des études menées au laboratoire ont montré d'une part que le seuil maximal de spores produites par larve diminuait avec la quantité de matières en suspension présente dans l'eau, et que d'autre part la lessive Hélios, couramment utilisée en Côte d'Ivoire, et donc présente en solution dans certains gîtes, n'influçait pas (à 100 mg/l) le recyclage (Nicolas *et al.*, sous presse).

Toutefois l'intérêt opérationnel du recyclage est négligeable dans des gîtes profonds comme les puisards. En effet, moins de 48 h après le traitement, la plupart des cadavres larvaires sédimentent vers le fond des gîtes, où ils se décomposent. De ce fait, les spores recyclées sont libérées en dehors de la zone de nutrition de larves néonates.

#### Action sur la faune auxiliaire

Pendant la saison des pluies, la plupart des puisards de Bouaké, y compris ceux traités en mai avec *B. sphaericus* 2362, étaient colonisés par *C. cinereus* à de très fortes densités pouvant atteindre plusieurs milliers de larves par litre d'eau.

Dans certaines zones rurales d'Afrique, *C. quinquefasciatus* est souvent remplacé par *C. cinereus* dans les latrines où ensuite ce dernier se développe intensivement (Subra *et al.*, 1984).

D'autre part, les larves de *C. cinereus* sont plus sensibles aux détergents que celles de *C. quinquefasciatus* (Subra et Dransfield, 1984). Dans les zones urbaines, où l'usage de détergents est très répandu, les puisards sont généralement colonisés par *C. quinquefasciatus* pendant la saison sèche puis par *C. cinereus* pendant la saison des pluies. Ce phénomène, observé à Bouaké, peut s'expliquer par la dilution des détergents par les pluies. *C. cinereus* étant une espèce inoffensive pour l'homme et jouant un rôle dans la régulation des populations de *C. quinquefasciatus*, nous avons comparé la toxicité de *B. sphaericus* 2362 sur ces deux espèces (Nicolas et Dossou-Yovo, sous

presse). Au laboratoire, les larves de *C. cinereus* supportent une dose aussi élevée que  $2 \times 10^5$  spores/ml, entraînant seulement 6 % de mortalité après 72 h de contact. Cette concentration de spores est voisine de celle trouvée dans la zone de nutrition des larves après un traitement à  $10 \text{ g/m}^2$ . Par contre dans les mêmes conditions, la mortalité des larves de *C. quinquefasciatus* est de 98 % après seulement 24 h de contact avec le larvicide. Cependant, les quantités de spores ingérées par les larves des deux espèces sont très proches.

Sur le terrain deux puisards fortement colonisés par *C. cinereus* et deux puisards non colonisés ont été traités à  $10 \text{ g/m}^2$  de *B. sphaericus* 2362. Les populations larvaires de *C. cinereus* ont subi des fluctuations semblables à celles de populations témoins non traitées. De plus, l'analyse bactériologique de l'eau de surface des puisards montrent que dans les puisards colonisés par *C. cinereus*, plus de 99 % des spores appliquées ont été ingérées par les larves en moins d'une semaine.

Ces essais montrent donc que *C. cinereus* est très peu sensible à *B. sphaericus* 2362 à des doses aussi élevées que  $2 \times 10^5$  spores/ml.

### 3.3. ANOPHELES GAMBIAE

Plusieurs souches de *B. sphaericus* montrent au laboratoire une bonne efficacité contre les larves d'*Anopheles*, notamment celles d'*An. stephensi* et d'*An. quadrimaculatus*. Cependant, les larves de *Culex* sont généralement plus sensibles que celles d'*Anopheles* (Mulla *et al.*, 1984).

Des essais préliminaires de terrain, réalisés aux États-Unis ont montré une rémanence faible de *B. sphaericus* sur les larves d'*Anopheles* traitées, due essentiellement à une sédimentation rapide des spores et à leur forte sensibilité aux rayonnements UV (Davidson *et al.*, 1984). Disposant d'une formulation (BSP1) dont les spores sédimentaient lentement dans les gîtes à *Culex quinquefasciatus*, nous l'avons également testée au laboratoire et sur le terrain contre les larves d'*Anopheles gambiae* (Darriet *et al.*, 1985). Au laboratoire, *An. gambiae* s'est révélé 20 à 25 fois moins sensible que *C. quinquefasciatus* (respectivement 1,807 mg/l à 48 h ; 0,571 mg/l à 72 h et 0,08 mg/l à 48 h ; 0,025 mg/l à 72 h sur des larves de stade 3 jeunes). Les essais de terrain ont été menés à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). Des mares de 0,25 à 0,95 m<sup>2</sup> et de 0,3 à 0,6 m de profondeur, situées dans une zone ensoleillée, et colonisées par des populations naturelles d'*An. gambiae*, ont été traitées à des doses allant

de 10 à 0,001 g/m<sup>2</sup>. Une dose minimale de 0,01 g/m<sup>2</sup> s'est avérée nécessaire pour obtenir 100 % de mortalité larvaire. La rémanence d'activité du larvicide a été proportionnelle à la dose utilisée : 10 à 15 jours à  $10 \text{ g/m}^2$ , 3 à 10 jours à 1 g et 0,1 g/m<sup>2</sup> et 1 à 2 jours à 0,01 g/m<sup>2</sup>. Les sites ont été recolonisés par les larves de stades 3 et 4 lorsque la concentration en spores dans l'eau de surface était comprise entre  $10^2$  et  $2 \times 10^3$  spores/ml. Il faut souligner que, les gîtes étant à ciel ouvert et donc soumis aux pluies, les spores peuvent être remises partiellement en suspension lors de fortes averses. Cependant, une inactivation d'une partie des spores due aux rayonnements solaires a été observée dès 48 h après le traitement.

La dispersion des gîtes à *An. gambiae* et l'inactivation rapide des spores de *B. sphaericus* par les UV sont les principaux facteurs limitants à l'utilisation prochaine de ce larvicide contre ce vecteur en Afrique. Cependant, dans les régions où la lutte antilarvaire contre d'autres espèces d'*Anopheles* est envisageable, il est nécessaire de continuer l'évaluation de *B. sphaericus* contre les espèces de ce genre.

## 4. Conclusions et perspectives

Bien que les souches de *B. sphaericus* à pouvoir entomopathogène élevé aient été isolées récemment, l'intérêt et le nombre de travaux suscités par cet agent sont impressionnants. Plusieurs industries et organismes de recherche produisent des lots expérimentaux de *B. sphaericus* en poudre primaire ou formulés. De nombreux essais de terrain ont été menés sur tous les continents dans différents types de gîtes larvaires à *Culex* spp., *Anopheles* spp., *Mansonia* spp. et *Psorophora columbiae* ; jusqu'à présent les meilleurs résultats ont été obtenus contre les larves de *C. quinquefasciatus* (O.M.S., 1985).

En Afrique tropicale, l'efficacité de cinq à six semaines observée contre *C. quinquefasciatus* en Côte d'Ivoire a été confirmée à Dar es-Salaam (Tanzanie) en zone de filariose de Bancroft, en traitant des caniveaux colonisés par ce moustique (Hougard, comm. pers.). Dans ces deux études, le même concentré liquide de *B. sphaericus* 2362 (BSP1) a été testé à la dose de  $10 \text{ g/m}^2$ . Cette dose est certes très élevée ; cependant, si le prix des formulations proposées par l'industrie est similaire à celui des larvicides à base de *B. thuringiensis israelensis* déjà commercialisés, l'utilisation de telles formulations de *B. sphaericus* est économiquement rentable dans les zones où *C. quinquefasciatus* est devenu résistant aux insecticides chimiques. Par exemple, à Dar es-Salaam, avec une

rémanence de six semaines, *B. sphaericus* peut concurrencer, d'un point de vue coût, le chlorpyrifos utilisé actuellement par les services d'hygiène de la ville (Hougard, comm. pers.). Compte tenu de la résistance de *C. quinquefasciatus* à ce composé, la fréquence des traitements est passée ces dernières années de 12 semaines (Bang *et al.*, 1975) à deux semaines (Curtis et Pasteur, 1981 ; Curtis *et al.*, 1984).

Contrairement aux cristaux de *B. thuringiensis*, la toxine de *B. sphaericus* est protégée par les enveloppes de la spore. De ce fait, les spores peuvent persister dans l'eau des gîtes, en conservant leur toxicité pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois. D'autre part, *B. sphaericus* peut se recycler dans les cadavres de *C. quinquefasciatus* dans la nature, produisant ainsi une quantité de spores supplémentaires. Toutefois les larves sédimentent quelques heures après leur mort. A la suite d'un traitement, il s'accumule donc dans le fond des gîtes une quantité non négligeable de spores toxiques. Dans des gîtes profonds et non agités, ces spores sont hors de portée des larves. Par contre dans des gîtes peu profonds et soumis aux précipitations elles peuvent être remises en suspension, du moins partiellement. Il est donc nécessaire de prendre en compte les paramètres propres à chaque type de gîtes (précipitations, turbulences, profondeur, couvert végétal...) et d'évaluer leur influence éventuelle sur la rémanence des traitements.

La formulation et la méthode d'application sont parmi les facteurs essentiels de l'efficacité de *B. sphaericus*. Les efforts à développer dans ce domaine portent sur la dispersibilité des spores dans l'eau et sur leur aptitude à demeurer le plus longtemps possible dans la zone de nutrition des larves. Les équipes travaillant à la production locale de *B. sphae-*

*ricus* doivent également prendre en compte non seulement le coût et la fiabilité des lots de *B. sphaericus* mais aussi faire porter leurs efforts sur les propriétés physiques du produit obtenu.

La lutte antilarvaire demeure une des composantes majeures de la lutte contre le moustique urbain *C. quinquefasciatus*, responsable de plus de 80 millions de cas de filariose de Bancroft dans le monde. *B. sphaericus* est l'un des larvicides les plus prometteurs dans une stratégie de lutte intégrée, notamment dans les zones où *C. quinquefasciatus* est devenu résistant aux insecticides courants. Il associe en effet efficacité en eau claire et en eau polluée, rentabilité et innocuité tant sur les mammifères (de Barjac *et al.*, 1979) que sur la faune auxiliaire dont le moustique compétiteur *C. cinereus*.

Le Comité d'Experts de l'O.M.S. sur la Biologie et le Contrôle des Vecteurs s'est d'ailleurs fixé comme priorité immédiate de poursuivre l'évaluation de *B. sphaericus* et de ses possibilités d'utilisation dans des programmes de lutte intégrée.

#### REMERCIEMENTS

Les travaux réalisés en Côte d'Ivoire et rapportés dans cette étude ont été effectués au sein de l'ORSTOM que l'auteur remercie.

Ils ont été soutenus financièrement par le Programme spécial O.M.S./PNUD/Banque Mondiale de Recherche et de Formation concernant les Maladies tropicales. L'auteur tient à remercier tout particulièrement MM. J.-M. Hougard (ORSTOM), J. Dossou-Yovo (OCCGE), H. Escaffre, J. Duval et F. Darriet (ORSTOM) pour leur collaboration ainsi que le Dr. J. Coz (ORSTOM) et le Pr. H. de Barjac (Institut Pasteur, Paris) pour leurs conseils lors de la rédaction de cet article.

*Manuscrit accepté par le Comité de Rédaction le 24 septembre 1986*

#### BIBLIOGRAPHIE

- BALARAMAN (K.), 1980. — Comparative studies on the virulence of three strains of *Bacillus sphaericus* Myers and Neide against mosquito larvae. *Indian J. Med. Res.*, 72 : 55-59.
- BANG (Y. H.), SABUNI (I. B.) et TONN (R. J.), 1975. — Integrated control of urban mosquitoes in Dar-es-Salaam using community sanitation supplemented by larviciding. *E. Afr. med. J.*, 52 : 578-588.
- BARJAC (H. de), LARGET (I.), COSMAO (V.), BÉNICHOU (L.) et VIVIANI (G.), 1979. — Innocuité de *Bacillus sphaericus* souche 1593 pour les mammifères. Doc. mimeo. O.M.S., WHO/VBC/79.731, 20 p.
- BARJAC (H. de), LARGET-THIÉRY (I.), COSMAO-DUMANOIR (V.) et RIPOUTEAU (H.), 1985. — Serological classification of *Bacillus sphaericus* strains in relation with toxicity to mosquito larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21 : 85-90.
- BAUMANN (P.), UNTERMAN (B. M.), BAUMANN (L.), BROAD-

- WELL (A. H.), ARBENE (S. J.) et BOWDICH (R. D.), 1985. — Purification of the larvicidal toxin of *Bacillus sphaericus* and evidence for high-molecular weight precursors. *J. Bacteriol.*, 163 : 738-747.
- BOURGOUIN (C.) et BARJAC (H. de), 1980. — Évaluation du potentiel de *Bacillus sphaericus* comme larvicide antimoustiques. Doc. mimeo. O.M.S., WHO/VBC/80.792, 24 p.
- BROWN (A. W. A.) et PAL (R.), 1973. — Insecticide resistance in arthropods. Org. mond. Santé, série monogr., n° 38, 541 p.
- BURKE (W. F. Jr.), McDONALD (K. O.) et DAVIDSON (E. W.), 1983. — Effect of UV light on spore viability and mosquito larvicidal activity of *Bacillus sphaericus* 1593. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 : 954-956.
- CARNEVALE (P.) et MOUCHET (J.), 1980. — Le paludisme en zone de transmission continue en région afrotropicale. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 18, 2 : 162-171.
- CHARLES (J.-F.) et BARJAC (H. de), 1983. — Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur l'intestin moyen des larves de *Aedes aegypti* L., en microscopie électronique. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 134A : 197-218.
- CURTIS (C. F.) et PASTEUR (N.), 1981. — Organophosphate resistance in vector populations of the complex of *Culex pipiens* L. (Diptera : Culicidae). *Bull. ent. Res.*, 71 : 153-161.
- CURTIS (C. F.), KETO (A.), RAMJI (B. D.) et IOSSON (I.), 1984. — Assessment of the impact of chlorpyrifos resistance in *Culex quinquefasciatus* on a control scheme. *Insect Sci. Applic.*, 5 : 263-267.
- DAGNOGO (M.) et COZ (J.), 1982. — Un insecticide biologique : *Bacillus sphaericus*. 2. Influence de la température et du temps de contact sur l'activité larvicide de *B. sphaericus*. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 20, 2 : 139-144.
- DARRIET (F.), NICOLAS (L.) et HOUGARD (J.-M.), 1985. — Évaluation de l'activité larvicide au laboratoire et sur le terrain de *Bacillus sphaericus* 2362 sur *Anopheles gambiae* s.l. Giles 1902 en Afrique de l'Ouest. Doc. multigr. OCCGE/IPR, n° 27/ IPR/Rap. 85.
- 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.), URBINA (M.), PAYNE (J.), MULLA (M. J.), DARWAZEH (H.), DULMAGE (H. T.) et CORREA (J. A.), 1984. — Fate of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 spores used as larvicides in the aquatic environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47 : 125-129.
- HORNBY (J. A.), HERTLEIN (B. C.), LEVY (R.) et MILLER Jr. (T. W.), 1981. — Persistent activity of mosquito larvicidal *Bacillus sphaericus* 1593 in fresh water and sewage. Doc. mimeo. O.M.S., WHO/VBC/81.830.
- HOUGARD (J.-M.), KOHOUN (G.), GUILLET (P.), DOANNIO (J.), DUVAL (J.) et ESCAFFRE (H.), 1985. — Évaluation en milieu naturel de l'activité larvicide 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.
- KALFON (A.), CHARLES (J.-F.), BOURGOUIN (C.) et BARJAC (H. de), 1984. — Sporulation of *Bacillus sphaericus* 2297 : an electron microscope study of crystal-like inclusion biogenesis and toxicity to mosquito larvae. *J. Gen. Microbiol.*, 130 : 893-900.
- KALFON (A.), LARGET-THIÉRY (I.), CHARLES (J.-F.) et BARJAC (H. de), 1983. — Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18 : 168-173.
- KELLEN (W. R.), CLARCK (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. Path.*, 7 : 442-448.
- LACEY (L. A.) et SINGER (S.), 1982. — Larvicidal activity of new isolates of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis* (H14) against anopheline and culicine mosquitoes. *Mosq. News*, 42 : 537-543.
- LACEY (L. A.) et 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 : 98-101.
- MULLA (M. S.), DARWAZEH (H. A.), DAVIDSON (E. W.) et DULMAGE (H. T.), 1984. — Efficacy and persistence of the microbial agent *Bacillus sphaericus* against mosquito larvae in organically enriched habitats. *Mosq. News*, 44 : 166-173.
- MYERS (P.), YOUNSTEN (A. A.) et DAVIDSON (E. W.), 1979. — Comparative studies of the mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus* SSII-1 and 1593. *Can. J. Microbiol.*, 25 : 1221-1231.
- NICOLAS (L.) et DOSSOU-YOVO (J.). — Differential effects of *Bacillus sphaericus* strain 2362 on *Culex quinquefasciatus* and its competitor *Culex cinereus* (Diptera, Culicidae) in West Africa. *Med. Vet. Entomol.*, sous presse.
- NICOLAS (L.), DOSSOU-YOVO (J.) et HOUGARD (J.-M.). — Persistence and recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 spores in *Culex quinquefasciatus* breeding sites in West Africa. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, sous presse.
- OBETA (J. A. N.) et OKAFOR (N.), 1983. — Production of *Bacillus sphaericus* strain 1593 primary powder on media made from locally obtainable nigerian agricultural products. *Can. J. Microbiol.*, 29 : 704-709.
- O.M.S., 1980. — Resistance of vectors of disease to pesticides. Fifth Report of the WHO Expert Committee on Vector Biology Control. O.M.S., sér. Rapp. techniques, n° 655.
- O.M.S., 1984. — Report of the seventh meeting of the Scientific Working Group on Biological Control of Vectors, Geneva, 5-9 March, 1984. Doc. TDR/BVC/SWG-7/84.3.
- O.M.S., 1985. — Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Doc. mimeo. O.M.S., WHO/TDR/BVC/SPHAERICUS/85.3.
- RAMOSKA (W. A.) et HOPKINS (T. L.), 1981. — Effects of mosquito larval feeding behavior on *Bacillus sphaericus* efficacy. *J. Invert. Path.*, 37 : 269-272.
- SERVICE (M. W.), 1966. — The replacement of *Culex nebulosus* Theobald by *Culex pipiens fatigans* Wiedemann (Diptera, Culicidae) in towns in Nigeria. *Bull. ent. Res.*, 56 : 407-415.
- SILAPANANTAKUL (S.), PANTUWATANA (S.), BHUMIRATANA (A.) et CHAROENSIRI (K.), 1983. — The comparative persistence of toxicity of *Bacillus thuringiensis* serotype H14 against mosquito larvae in different kinds of environments. *J. Invert. Path.*, 42 : 387-392.
- SINGER (S.), 1973. — Insecticidal activity of recent bacterial isolates and their toxins against mosquito larvae. *Nature, Lond.*, 244 : 110-111.
- SINGER (S.), 1977. — Isolation of bacterial pathogens of vectors : 3-18, in : Biological regulation of vectors. DHEW publication n° 77 (NIH), 1180.
- SUBRA (R.), 1981. — Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicidae) with special reference to Africa. *Insect Sci. Applic.*, 1 : 319-338.
- SUBRA (R.) et DRANSFIELD (R. D.), 1984. — Field observations on competitive displacement, at the preimaginal stage of *Culex quinquefasciatus* Say by *Culex cinereus* Theobald (Diptera : Culicidae) at the Kenya Coast. *Bull. ent. Res.*, 74 : 559-568.
- SUBRA (R.), SERVICE (M. W.) et MOSHA (F. W.), 1984. — The effect of domestic detergents on the population dynamics of

- the immature stages of two competitor mosquitoes, *Culex cinereus* Theobald and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera, Culicidae) in Kenya. *Acta tropica*, 41 : 69-75.
- WEISER (J.), 1984. — A mosquito virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from Northern Nigeria. *Zbl. Mikrobiol.*, 193 : 57-60.
- WICKREMESINGHE (R. S. B.) et MENDIS (C. L.), 1980. — *Bacillus sphaericus* spore from Sri Lanka demonstrating rapid larvicidal activity on *Culex quinquefasciatus*. *Mosq. News*, 40 : 387-389.
- YOUSTEN (A. A.), 1984a. — *Bacillus sphaericus* : Microbiological factors related to its potential as a mosquito larvicide. *Adv. Biotechnol. Proc.*, 3 : 315-343.
- YOUSTEN (A. A.), 1984b. — Bacteriophage typing of mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus*. *J. Invert. Path.*, 43 : 124-125.
- YOUSTEN (A. A.) et DAVIDSON (E. W.), 1982. — Ultrastructural analysis of spores and parasporal crystals formed by *Bacillus sphaericus* 2297. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 1419-1455.
- YOUSTEN (A. A.), MADHEKAR (N.) et WALLIS (D.), 1984. — Fermentation conditions affecting growth, sporulation and mosquito larval toxin formation by *Bacillus sphaericus*. *Devel. Industr. Microbiol.*, 25 : 757-762.