

Réceptivité à *Plasmodium falciparum* d'*Anopheles gambiae* soumis à *Bacillus thuringiensis* sérotype H 14 ou à *Bacillus sphaericus*

Vincent ROBERT⁽¹⁾, Michel BOUSSINESQ⁽¹⁾,
Christian BOUDIN⁽¹⁾, Hervé CONAN⁽²⁾,
Frédéric DARRIET⁽¹⁾, Pierre CARNEVALE⁽¹⁾

Résumé

Des doses de *Bacillus thuringiensis* sérotype H 14-Tecknar[®] ou de *Bacillus sphaericus* souche 2297 sont utilisées sur des jeunes larves au quatrième stade d'*Anopheles gambiae* s.s.

Quelle que soit la dose utilisée et le temps de contact avec *B. sphaericus*, les larves survivantes donnent des adultes dont la réceptivité à *Plasmodium falciparum* n'est pas affectée.

Avec *B. thuringiensis*, un contact de moins de 24 heures réduit l'indice oocystique de 10 % par rapport au témoin. Avec un contact de plus de 24 heures cet indice est réduit de 15 %. Cette réduction de l'indice oocystique est accompagnée d'une réduction du nombre moyen d'oocystes par estomac positif.

Mots-clés : Insecticide — Dose sub létale — Réceptivité — *Plasmodium falciparum* — *Anopheles gambiae* — *Bacillus thuringiensis* H 14 — *Bacillus sphaericus*.

Summary

RECEPTIVITY TO *PLASMODIUM FALCIPARUM* OF *ANOPHELES GAMBIAE* TREATED AS LARVAE BY *BACILLUS THURINGIENSIS* SEROTYPE H 14 AND *BACILLUS SPHAERICUS*. Adults of *Anopheles gambiae* s.s. that had previously been in contact with *Bacillus thuringiensis* H 14 Tecknar[®] or *Bacillus sphaericus* strain 2297 in their fourth larval stage, were fed on human blood naturally infected with *Plasmodium falciparum* gametocytes.

With *B. sphaericus* there was no modification of the receptivity in comparison with the controls.

With *B. thuringiensis* there was a reduction of 10 % of the oocystic index in the batches treated less than 24 hours and a reduction of 15 % in the batches treated more than 24 hours. In the same way a tendency was observed towards the reduction of the oocystes mean number per positive stomach.

The interest of these results is discussed from an epidemiological point of view.

Key words : Insecticide — Sublethal dose — Receptivity — *Plasmodium falciparum* — *Anopheles gambiae* — *Bacillus thuringiensis* H 14 — *Bacillus sphaericus*.

(1) Antenne ORSTOM auprès de l'O.C.C.G.E., Centre Muraz, B.P. 171, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

(2) Ingénieur sanitaire — Boursier OMS, DASS, B.P. 104, Mamoudzou, 97600 Mayotte, France.

Introduction

De nombreux travaux intéressent l'effet létal des insecticides sur une population d'insecte, en agissant soit sur son effectif (effet immédiat), soit sur son espérance de vie (effet retardé).

D'autres travaux, souvent récents, recherchent l'effet que pourraient avoir certains de ces insecticides sur la modification de la réceptivité aux parasites vecteurs soumis à des doses sublétales. En particulier Mohan (1955), Rifaat *et al.* (1974), Prasittisuk et Curtis (1982) et Zharova et Rasnitsyn (1984) n'observent pas d'effet du DDT, du téméphos, du carbaryl, du pyrimphos-méthyl et du malathion sur la réceptivité des anophèles au *Plasmodium*. Par contre Sucharit *et al.* (1984) attribuent un effet inhibiteur de la réceptivité d'*Anopheles dirus* à *Plasmodium falciparum* avec un chimio-stérilisant, le bisazir. De même, Elissa *et al.* (1986) avec la deltaméthrine et Noireau et Karch (1983) avec *Bacillus thuringiensis* sérotype H 14 et *Bacillus sphaericus* observent un effet inhibiteur sur la réceptivité du couple *Anopheles stephensi/Plasmodium yoelii yoelii*.

L'utilisation de *B. thuringiensis* s'est avérée décevante contre *Anopheles gambiae* dans les conditions naturelles (Hougard *et al.* 1983). Dans le présent travail nous recherchons alors un éventuel effet de *B. thuringiensis* H 14 et de *B. sphaericus* sur la modification des rapports vecteur-parasite d'un des couples les plus redoutables en matière de paludisme humain : *Anopheles gambiae/Plasmodium falciparum*.

Les expériences rapportées ont été effectuées entre décembre 1985 et mai 1986.

Matériel et méthodes

LES ANOPHÈLES

Ce sont des *Anopheles gambiae* s.s. forme chromosomique Mopti avec une forte prévalence de l'inversion bc (Petrarca et Coluzzi, com. per.). Cette souche d'insectarium provient de la rizière de la Vallée du Kou, située à 30 km au nord de Bobo-Dioulasso (Burkina Faso). Des individus sauvages sont réintroduits dans l'élevage chaque année.

Des larves jeunes au quatrième stade sont aléatoirement réparties par lots d'à peu près 700 individus dans des plateaux d'élevage. Certains lots sont mis en contact avec l'insecticide ; d'autres servent de témoins.

Les nymphes provenant des larves survivantes sont introduites dans des cages d'élevage maintenues en insectarium à 27° C, 80 % d'humidité relative avec une photopériode de 12 heures de jour par 24 heures. Ces

cages contiennent du jus sucré sous forme de solution glucosée à 10 %.

Un lapin est placé sur les cages le lendemain des dernières émergences pour que les femelles prennent une alimentation sanguine avant le repas infectant.

LES LARVICIDES

On a utilisé le *B. thuringiensis* sérotype H 14 Teknar® et le *B. sphaericus* souche 2297 formulation SPH 84. Pour les deux insecticides une solution mère à 100 mg/l a été préparée pour obtenir la concentration finale souhaitée.

LE TRAITEMENT DES ANOPHÈLES AUX INSECTICIDES

La concentration et le temps de contact de l'insecticide ont été choisis pour que les moustiques survivants aient été effectivement en contact avec l'insecticide et aient ingérés des particules actives. Le manque de reproductibilité des effets des formulations employées sur le taux de mortalité larvaire contraint de choisir des doses différentes d'insecticide pour chaque série expérimentale et parfois de modifier ces doses en cours de traitement.

Les quelques nymphes apparues dans les 24 heures suivant le début du contact avec l'insecticide sont éliminées. On recueille les nymphes des trois ou quatre jours suivants.

Pour chaque série expérimentale la mortalité est déterminée en dénombrant les nymphes survivantes dans les lots traités et le lot témoin ; elle est exprimée par le rapport des nymphes survivantes traitées/ témoins. Comme il existe un délai entre la nymphose et le recueil des nymphes cette mortalité observée concerne la mortalité larvaire plus la mortalité nymphale dans les plateaux d'élevage.

Certaines séries subissent un traitement « court » avec un contact unique de moins de 24 heures avec l'insecticide ; d'autres subissent un traitement « prolongé » pendant plus de 24 heures, à des concentrations souvent croissantes (tableau I).

LES PARASITES

Il s'agit de *Plasmodium falciparum* prélevés chez des enfants de la région de Bobo-Dioulasso (de trois à dix ans) naturellement impaludés.

Le choix de l'enfant se fait sur des sujets dont la gamétocythémie est supérieure à 50 gamétocytes par mm³ de sang (tableau I), qui autorise une infection réussie chez plus de 30 % des moustiques (Lusetti-Lyannaz, 1985). Les sujets porteurs de gamétocytes d'une autre espèce que *P. falciparum* sont éliminés.

TABLEAU I

Détails du protocole des traitements pour les huit séries expérimentales

N° série expérimentale	Traitement	Concentration utilisée en mg/l	Durée de contact	Dose létale observée	Nombre de gamétocytes par mm ³ de sang	
1	a	B.t. prolongé	0,75	0-24h	?	1000
			1,5	24-36h		
			1,5	36-48h		
			2,2	48-72h		
	b	B.s. prolongé	0,003	0-24h	?	
			0,006	24-36h		
			0,006	36-48h		
			0,009	48-72h		
2	a	B.t. prolongé	0,75	0-24h	?	350
			1,5	24-36h		
			1,5	36-48h		
			2,2	48-60h		
	b	B.s. prolongé	0,003	0-24h	?	
			0,006	24-36h		
			0,006	36-48h		
			0,009	48-60h		
3	B.t. prolongé	1,6	0-24h	33	100	
		2,0	24-60h			
4	a	B.t. court	2,5	0-12h	82	75
			0,020	0-20h		
	b	B.s. prolongé	0,025	20-32h	23	
0,035			32-44h			
5	a	B.t. court	2	0-12h	65	75
	b	B.s. court	0,05	0-12h	87	
6	B.t. court	1,8	0-24h	44	200	
7	a	B.s. court	0,030	0-24h	53	100
	b	B.s. court	0,035	0-24h	72	
8	a	B.t. court	2,0	0-3h	21	100
			1,4	0-24h		
			1,2	24-48h		
b	B.t. prolongé	1,2	24-48h	88		
		1,0	48-72h			

L'INFECTION DES ANOPHÈLES

Le sang veineux est prélevé dans un vacutainer[®] hépariné. Il est maintenu à 37° et ramené au plus vite, en moins d'une heure, à notre insectarium. Le sang est aussitôt distribué dans des cellules en verre où circule de l'eau maintenue à 37°. Ces cellules sont installées sur les cages de lot témoin et les cages de lots traités

contenant des moustiques âgés de trois jours après le repas sur lapin. Les anophèles femelles se gorgent à travers une membrane artificielle de Parafilm[®] légèrement tendue selon la technique de Rutledge *et al.* (1964). La plupart des femelles sont déjà gorgées après 15 minutes ; le repas de sang infecté dure au maximum 30 minutes. Après ce délai les femelles non gorgées sont éliminées.

Neuf ou dix jours après le gorgement, chaque femelle est individuellement disséquée. Par observation microscopique au grossissement 100 on note la présence et le nombre d'oocystes sur la paroi externe de l'estomac frais, non coloré.

Résultats

Au total 689 moustiques sont disséqués dans les séries expérimentales témoins, 525 dans les six séries

traitées par *B. sphaericus* et 519 dans les huit séries traitées par *B. thuringiensis* (tabl. II).

B. SPHAERICUS

Indice oocystique : il semble légèrement supérieur dans le lot traité (62 % contre 58 %), mais la différence n'est pas significative au risque 5 % (tabl. II).

Nombre d'oocystes par estomac positif : cinq des six séries expérimentales ne présentent pas de variations significa-

TABLEAU II

Analyse comparative des indices oocystiques pour les séries traitées et témoins. Le traitement est court ou prolongé s'il dure moins ou plus de 24 heures. Les totaux dans la série témoin ne comptabilisent qu'une seule fois chaque série expérimentale (série 1 à 8)

	T R A I T E				T E M O I N				Différence entre indice oocystique traité-témoin en%	P		
	Traitement	N° série expérimentale	Nb estomacs disséqués	Nb estomacs positifs	Indice oocystique en %	N° série expérimentale	Nb estomacs disséqués	Nb estomacs positifs			Indice oocystique en %	
<i>Bacillus sphaericus</i>	court	5b	22	11	50	5	62	27	44	+6	NS	
		7a	82	59	72	7	128	93	73	-1	NS	
		7b	67	51	76					+3	NS	
		Tot	171	121	70.8	Tot	190	120	63.1	+7.7	NS	
	prolongé	1b	82	66	80	1	52	38	73	+7	NS	
		2b	92	38	41	2	54	17	31	+10	NS	
		4b	180	102	57	4	148	84	57	0	NS	
		Tot	354	206	58.2	Tot	254	139	54.7	+3.5	NS	
Total	525	327	62.3		444	259	58.3	+4	NS			
<i>Bacillus thuringiensis</i>	court	4a	74	43	58	4	148	84	57	+1	NS	
		5a	47	27	57	5	62	27	44	+13	NS	
		6	137	44	32	6	69	24	35	-3	NS	
		8a	62	22	35	8	78	52	67	-32	<0.001	
		Tot	320	136	42.5	Tot	357	187	52.4	-9.9	<0.02	
	prolongé	1a	45	27	60	1	52	38	73	-13	NS	
		2a	37	4	11	2	54	17	31	-20	<0.05	
		3	90	56	62	3	98	76	78	-11	<0.05	
		8b	27	12	44	8	78	52	67	-23	<0.05	
		Tot	199	99	49.7	Tot	282	183	64.9	-15.2	<0.001	
		Total	519	235	45.3		561	318	56.7	-14.4	<0.001	
Total	1044	562	-		689*	411*	59.6					

tives entre les lots traités et témoins. Dans la série 2b on observe un accroissement significatif ($p < 0,01$) dans le lot traité par rapport au lot témoin (+ 62 %).

B. THURINGIENSIS

Indice oocystique : il est significativement réduit de 10 % dans le lot traité (42 % contre 52 %) lorsque le contact avec l'insecticide dure moins de 24 heures. Il est significativement réduit de 15 % dans le lot traité (50 % contre 65 %) lorsque le contact avec l'insecticide dure plus de 24 heures (tabl. II).

Nombre d'oocystes par estomac positif

Dans les quatre séries expérimentales présentant une réduction significative de l'indice oocystique, il est nettement réduit d'un facteur 1,2 à 5,3 fois (tabl. III).

Dans les quatre séries expérimentales ne présentant pas de réduction significative de l'indice oocystique :

— deux ne présentent pas de variation significative de ce paramètre (3,2 oocystes par estomac positif dans le lot témoin et 3,0 dans le lot traité, série 4a et respectivement 1,6 et 2,0, série 6) ;

— deux présentent une augmentation significative ($p < 0,05$) de ce paramètre dans les lots traités (respectivement 9,4 et 16,1, série 1a ; 1,4 et 2,1, série 5a).

Discussion

Aux doses employées, *B. sphaericus* ne possède pas d'effet inhibiteur de la réceptivité d'*An. gambiae* à *P. falciparum*. Il n'est pas exclu qu'un très léger effet facilitant existe, mais il n'a pas été mis en évidence de façon significative ; de toute façon, il serait très faible.

Par contre *B. thuringiensis* paraît posséder un effet inhibiteur sur la réceptivité d'*An. gambiae* à *P. falciparum*. Cet effet est faible ; il n'est bien marqué que lorsque le contact avec l'insecticide est prolongé et lorsque la concentration est importante. C'est pourquoi l'intérêt épidémiologique de cette action, du moins dans la lutte antipaludique, est extrêmement limité. Une étude similaire à la nôtre, menée jusqu'au stade sporozoïte, modifierait peut-être ces conclusions.

Le mode d'action de *B. thuringiensis* à l'origine de cet effet inhibiteur de la réceptivité reste inconnu. On peut concevoir que l'action spécifique des toxines sur des cellules épithéliales du mésentéron de la larve (Charles et de Barjac, 1981) occasionnerait des lésions durables qui persisteraient sur la paroi stomacale de l'adulte, perturbant la pénétration de cette paroi par les ookinètes de plasmodiums. À l'inverse, on peut supposer que ce puissant insecticide occasionne un stress général et durable, qui diminuerait de façon non spécifique l'ensemble des aptitudes du vecteur, en

TABLEAU III

Nombre d'oocystes et analyse comparative du nombre moyen d'oocystes par estomac positif pour les séries expérimentales à indice oocystique réduit par un traitement avec *Bacillus thuringiensis* H 14

N° série expérimentale	Traitement	Nombre d'oocystes par estomac															Nombre total			Nombre moyen d'oocyste/estomac positif	Rapport entre nombre moyen d'oocyste par estomac positif témoin/traité	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	17	de moustiques disséqués	positifs			d' oocystes
2 2a	témoin	37	4	3	1	3					2	1	1	1	1			54	17	90	5,3	
	prolongé	33	4															37	4	4	1,0	5,3 < 0,001
3	témoin	22	9	14	14	10	8	4	4	3	2	2	2		2	1	1	98	76	355	3,7	
	prolongé	34	17	16	3	5	5	4	3	1	1				1			90	56	177	3,2	1,5 < 0,01
8 8a 8b	témoin	26	10	14	7	6	6	1	5	1						2		78	52	184	3,5	
	court	40	12	6	3					1								62	22	41	1,9	1,8 NS
	prolongé	15	5	2	1	3							1					27	12	34	2,8	1,2 < 0,01

particulier l'alimentation sanguine ; le repas de sang serait donc moins important chez les adultes issus de larves traitées. Nous avons observé en cours d'expérimentation une surmortalité des nymphes et une surmortalité à l'émergence dans les lots traités par rapport aux lots témoins. Il est probable que la fragilisation de l'insecte traité se poursuive jusqu'à l'âge adulte et que ce phénomène se concrétise notamment par une réduction de la longévité du moustique.

De surcroît, dans les conditions naturelles, les pressions sélectives (compétition intra et inter-spé-

cifique) sont très fortes. Ces pressions s'exercent particulièrement sur les individus affaiblis par une dose sublétale d'insecticide et entraînent le plus souvent l'élimination de ces dernières. Ainsi, les larves qui reçoivent dans la nature une forte dose sublétale d'insecticide sont susceptibles de développer une réduction de leur réceptivité au stade imaginal, mais leur espérance de vie serait très réduite et la plus grande partie de ces larves n'atteindrait pas le stade adulte.

Manuscrit accepté par le Comité de Rédaction le 19 mars 1987.

BIBLIOGRAPHIE

- CHARLES (J. F.) et BARJAC (H. de), 1981. — Histopathologie de l'action de la δ endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur les larves d'*Aedes aegypti* (Dipt. : Culicidae). *Entomophaga*, 26, 2 : 203-212.
- ELISSA (N.), SANNIER (CH.) et RICHARD (A.), 1986. — Étude de la réceptivité à *Plasmodium falciparum* d'anophèles soumis à des doses sublétales d'un insecticide pyrèthroïde. Communication au 4^{ème} Congrès sur la protection de la santé humaine et des cultures en milieu tropical, Marseille, France, 2-4 juillet 1986 : 599-604.
- HOUARD (J. M.), DARRIET (F.) et BAKAYOKO (S.), 1983. — Évaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de *Bacillus thuringiensis* sérotype H 14 sur *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles gambiae* en Afrique de l'Ouest. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 21, 2 : 111-117.
- LUSSETTI-LYANNAZ (J.), 1985. — Les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum*. Obtention par infections artificielles d'*Anopheles gambiae* s.s. et utilisation comme antigène en immunofluorescence. Thèse de pharmacie, Université de Grenoble, 30 septembre 1985.
- MOHAN (B. N.), 1955. — Sporogonic cycle of malaria parasites in resistant and non-resistant strains of mosquitoes after exposure to DDT. *Indian J. Malaria*, 9 : 287.
- MOREAU (F.) et KARCH (S.), 1983. Réceptivité à *P. y. yoelii* d'anophèles soumis à *B. thuringiensis* sérotype H 14 et *Bacillus sphaericus*. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 21, 4 : 221-224.
- PRASITISUK (C.) et CURTIS (C. F.), 1982. — Absence of effects of insecticides on susceptibility of Anophelines to *Plasmodium yoelii*. *J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 13, 1 : 127-132.
- RIFAAT (M. A.), KHALIL (H. M.), GAD (A. M.) et SADEX (S.), 1974. — Effect of sublethal concentrations of the insecticides DDT, Abate and Sevin applied to 3rd stage larvae of *Anopheles pharoensis* on malaria cycle in the adult mosquito. *J. Egypt. Publ. Hlth. Ass.*, 49 : 329.
- RUTLEDGE (L. C.), WARD (R. A.) et GOULD (D. J.), 1964. — Studies on the feeding response of mosquitoes to nutritive solutions in a new membrane feeder. *Mosq. News*, 24 : 407-419.
- SUCHARIT (S.), KERDPIBULE (V.), CHOMCHARN (Y.) et LIMSUWAN (S.), 1984. — *Plasmodium falciparum* in bisazir chemosterilised *Anopheles dirus* in laboratory studies. *Sth. As. J. Trop. Med. Pub. Hlth.*, 15, 2 : 228-233.
- ZHAROVA (A. N.) et RASNITSYN (S. P.), 1984. — (Persistence of the agent of malaria in mosquitoes treated with sublethal doses of insecticides). *Med. Parasitol. Bolezni*, 5 : 82-84.