

Évaluation de la sensibilité des larves
du complexe *Simulium damnosum*
à la toxine de
Bacillus thuringiensis H 14⁽¹⁾

1. Méthodologie

Pierre GUILLET⁽²⁾⁽³⁾, Jean-Marc HOUGARD⁽²⁾,
Julien DOANNIO⁽⁴⁾, Henri ESCAFFRE⁽⁵⁾, Jacques DUVAL⁽⁵⁾

Résumé

Une méthode est proposée pour évaluer la sensibilité des larves du complexe *S. damnosum* à la toxine de *B. thuringiensis* H 14. Cette méthode, basée sur un temps de contact de 3 heures, est simple, applicable sur le terrain et donne des résultats fiables. Son utilisation permettra la mise en évidence d'un phénomène de résistance à la toxine, dans l'hypothèse où une telle résistance pourrait se développer par suite de l'utilisation massive de *B. thuringiensis* H 14 dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose.

Mots-clés : *B. thuringiensis* H 14 — Complexe *S. damnosum* — Larves — Test de sensibilité — Méthodologie — Côte d'Ivoire.

Summary

A METHOD FOR TESTING SUSCEPTIBILITY OF THE *SIMULIUM DAMNOSUM* COMPLEX LARVAE TO THE *BACILLUS THURINGIENSIS* H 14 TOXIN. 1. METHODOLOGY. The basic requirement for this study was to propose to the Onchocerciasis Control Programme, which is massively using *B. thuringiensis* H 14, a simple method than can be applied in the field and which produces reliable results for the detection of an eventual resistance of the *S. damnosum* complex larvae to the *B. thuringiensis* H 14 toxin. A method which fullfills these requirements was adapted from the standard procedure proposed by Lacey et al, 1982 b.

The influence of several experimental parameters was systematically investigated in order to define a standard protocole :

— Exposure period : the mortality was assessed after 3, 6, 12 and 24 h. The corresponding dose/mortality lines were almost parallel and the ratios exposure period/LC 50 constant just as LC 50 95 % confidence limits. For practical reasons, a 3 h exposure period was selected. No food was added.

(1) Ce travail a bénéficié, dans le cadre des accords conclus entre l'ORSTOM et l'OCCGE, d'une subvention de l'Organisation Mondiale de la Santé.

(2) Entomologiste médical ORSTOM, Institut Pierre Richet (ex-IRTO), B.P. 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire.

(3) Présente adresse : OMS/OCP, B.P. 2279, Bamako, Mali.

(4) Technicien OCCGE, Institut Pierre Richet.

(5) Technicien ORSTOM, même adresse.

— *Water temperature* : the LC 50 observed at 25° C and 30° C, which correspond to the water temperature in the larval breeding sites, were obviously the same. At 20° C, results were erratic and LC 50 much higher. 25° C was selected as a temperature easy to maintain in the field.

— *Larval instar* : the 3-4th and 5-6th instars were respectively four to two times more susceptible than the 7th instar. The ultimate larval instar, which is the only one that can be precisely identified, produces the most accurate data and was consequently selected.

— *Number of larvae per beaker* : with 15 and 30 larvae per beaker (500 ml) results were almost identical and satisfactory. With 60 and 120 larvae, the LC 50 values increased respectively 20 and 150 times and the slope of the regression lines decreased sharply. 30 was the selected number.

— *Pre-exposure acclimatation period* : the best results were obtained without any acclimatation period. With 10 mn only or more, heterogeneous results were systematically obtained with significant increase in the LC 50 and LC 95 values. No explanation was provided for such a phenomenon.

— *Bacterial suspension* : IPS 80, an interim standard was used. Dosages are expressed in mg/l only.

Key words : *B. thuringiensis* H 14 — *S. damnosum* complex — Larvae — Susceptibility test — Methodology — Ivory Coast.

1. Introduction

L'utilisation massive d'insecticides organo-phosphorés dans le cadre du programme OMS de lutte contre l'onchocercose (OCP) en Afrique de l'Ouest a engendré rapidement la sélection de populations résistantes chez deux espèces forestières, *Simulium soubreense* Vajime et Dunbar, 1975 et *Simulium sanctipauli* Vajime et Dunbar, 1975, du complexe *Simulium damnosum* Theobald (Guillet *et al.*, 1980 ; Kurtak *et al.*, 1982 ; Guillet et Kurtak, 1985). L'ampleur de ce phénomène a pratiquement réduit à néant l'arsenal des insecticides utilisables contre les larves des vecteurs forestiers de l'onchocercose. L'utilisation de *Bacillus thuringiensis* H 14 est apparue comme la seule alternative envisageable pour la poursuite des traitements dès qu'une formulation raisonnablement efficace fut sélectionnée (Guillet *et al.*, 1982 ; Lacey *et al.*, 1982a).

La sensibilité des larves de simuliées à la toxine de *B. thuringiensis* H 14 qui agit exclusivement par ingestion, n'a pu être mise en évidence en utilisant la méthode mise au point par Mouchet *et al.* (1977) pour les insecticides à action de contact rapide. Cette méthode consiste à exposer les larves pendant 3 heures en eau stagnante, et dans ces conditions les larves ne peuvent ingérer les particules en suspension dans l'eau. Une méthodologie nouvelle a donc du être mise au point afin de pouvoir détecter une éventuelle baisse de sensibilité engendrée par l'utilisation massive de cet entomopathogène dans certaines rivières de l'aire du programme OCP.

Diverses contraintes ont du être prises en compte dans la mise au point de cette méthode :

— pour qu'elles puissent se nourrir, les larves doivent être placées en eau courante ; de plus, les mouvements de l'eau doivent être aussi homogènes que possible à l'intérieur de chaque récipient et d'un récipient à l'autre, pour que les larves se nourrissent de façon uniforme ;

— en tenant compte de l'expérience acquise avec le titrage biologique des préparations à base de *B. thuringiensis* H 14, tous les paramètres expérimentaux doivent être rigoureusement standardisés ;

— enfin, cette méthode doit être simple, utilisable sur le terrain et donner des résultats fiables.

Plusieurs méthodes ont déjà été décrites et utilisées en Amérique du Nord pour l'évaluation des préparations de *B. thuringiensis* H 14 avec des larves de simuliées (Colbo et Thompson, 1978 ; Lacey et Mulla, 1977a ; Gaugler *et al.*, 1980 ; Hembree *et al.*, 1980). Par la suite, une procédure standard a été proposée afin de pouvoir comparer directement les résultats obtenus par différents auteurs (Lacey *et al.*, 1982b). La méthode décrite dans le présent travail est une adaptation de cette procédure aux conditions particulières d'utilisation sur le terrain avec des larves du complexe *S. damnosum*.

2. Matériel et méthodes

2.1. DISPOSITIF DE MESURE DE LA SENSIBILITÉ

L'appareil mis au point se compose de deux parties : un caisson isotherme et un couvercle adaptable amovible. Le couvercle comporte 12 axes rota-

tifs munis chacun d'une poulie et entraînés par une courroie solidaire d'un moteur électrique. A chacun des axes est fixée une bouteille plastique (diamètre 7,5 cm, hauteur 15 cm). Le caisson isotherme comporte 12 bechers en Manolène^R d'une capacité de 1 l (diamètre intérieur 10 cm, hauteur 15 cm). Au moment du test, le couvercle est placé sur le caisson et chaque bouteille plonge au centre d'un becher. L'agitation de l'eau est produite par la rotation des bouteilles. Le couvercle est traversé par 12 tubes rigides par où est introduite la suspension bactérienne au moment du traitement. Ces tubes débouchent chacun au niveau d'un becher. Le caisson fermé est isotherme et les variations de température à l'intérieur n'excèdent pas 1°C au bout de 3 heures pour des variations à l'extérieur de 5 à 10°C.

2.2. PRÉPARATION DES SUSPENSIONS BACTÉRIENNES

La plupart des tests ont été réalisés avec l'IPS 80, un standard intérimaire fourni par l'Institut Pasteur de Paris et titrant 15 000 U.I. *Aedes aegypti*/mg par rapport à l'ancien standard IPS 78 (de Barjac et Larget, 1981). La pastille de produit lyophilisé (50 mg environ) est pesée puis disposée dans une fiole jaugée complétée à 1 l d'eau distillée. Un barreau magnétique de 7 cm et 40 g environ de billes de verre de 4 mm sont ensuite ajoutés pour obtenir un brassage vigoureux pendant 2 heures à l'aide d'un agitateur magnétique à la vitesse maximum de rotation. Cette suspension, ajustée à 50 mg/l, est conservée au réfrigérateur et transportée sur le terrain en glacière. Les dilutions préparées extemporanément ne sont jamais conservées. Quelques tests ont été également réalisés avec une formulation, le Teknar^R (Sandoz) titrant 1 100 U.I./mg (lot 21.731).

2.3. RÉALISATION DU TEST

Les larves prélevées dans les gîtes sur leurs supports naturels sont rapidement triées et introduites dans les bechers contenant 480 ml d'eau distillée ou à défaut d'eau filtrée déchlorée. Lorsque les larves ne sont pas utilisées immédiatement, elles sont conservées dans un linge humide au frais. Le couvercle est ensuite fermé, le moteur mis en marche et l'on introduit immédiatement 10 ml de suspension bactérienne. Le tube d'introduction est ensuite rincé avec 10 ml d'eau distillée, ce qui ramène le volume final d'eau dans les bechers à 500 ml.

Les larves sont maintenues en contact avec la suspension pendant toute la durée du test. Aucune nourriture n'est ajoutée. Pour la lecture,

on dénombre les larves vivantes, moribondes et mortes ainsi que les nymphes en commençant d'abord par celles fixées sur les bouteilles puis celles des bechers préalablement vidés de leur eau. Les larves vivantes sont repliées sur elles-mêmes ou se replient au contact de la pince tandis que les larves moribondes ne réagissent que peu ou pas à ce contact. La lecture doit être effectuée rapidement pour éviter le dessèchement des larves. Chaque test (cinq concentrations et deux répliques par concentration) est répété au minimum trois fois. Les mortalités corrigées (formule d'Abbott) varient généralement entre 15 et 100 %. Les valeurs caractéristiques sont calculées sur ordinateur (programme analyse-probit, Finney, 1971) et l'intervalle de confiance, calculé sur la CL 50, correspond à une probabilité de 95 %. Quand les intervalles de confiance d'une série de tests se chevauchent, les données sont regroupées pour le calcul des valeurs caractéristiques moyennes. Tous les tests ont été réalisés sur le bas Bandama en Côte d'Ivoire, avec des larves de *S. soubrense/sancti-pauli*.

2.4. PARAMÈTRES ÉTUDIÉS

le temps de contact : 2, 3, 6, 12 et 24 heures respectivement à 25°C avec des larves de stade 7 (histoblastes bien développés et longueur moyenne de la postgena 470 µ) ;

la température : 20, 25 et 30°C, temps de contact 3 heures, larves de stade 7 ;

le stade larvaire : les larves ont été regroupées par catégories d'âge à partir de critères morphologiques simples (écailles sur la partie dorsale des segments abdominaux et plaques thoraciques, Kurtak, 1980) : stades 3 et 4 (postgena 210 µ), stades 5 et 6 (340 µ) et enfin stade 7, temps de contact 3 heures à 25°C ;

le nombre de larves par becher : respectivement 15, 30, 60 et 120 larves de stade 7, temps de contact 3 heures à 25°C ;

la vitesse de rotation des bouteilles : 120, 130 et 150 tours/mn correspondant au niveau des bouteilles respectivement à 47, 51 et 59 cm/s, temps de contact 3 heures, 25°C, larves de stade 7 ;

le temps d'adaptation avant le traitement : la suspension bactérienne est introduite dès la mise en marche du moteur ou 10, 20 et 40 mn plus tard, temps de contact 3 heures, 25°C, larves de stade 7.

3. Résultats

Les lignes de régression correspondant aux mortalités obtenues après 3, 6 et 12 heures de contact

sont parallèles. La pente correspondant à 24 heures de contact est plus accentuée, tandis qu'après seulement 2 heures de contact elle est beaucoup plus faible (fig. 1). Après 2 heures de contact les résultats obtenus sont hétérogènes (plus de 100 % d'imprécision sur la CL 50, χ^2 significatif). La précision du résultat est satisfaisante entre 3 heures et 24 heures de contact (10 à 14 % d'imprécision sur CL 50, χ^2 non significatif) et la relation dosage \times temps de contact reste constante (tabl. I).

On n'observe aucune différence significative dans les résultats obtenus à 25 et à 30° C (tabl. II). Les CL 50 observées présentent des variations aléatoires de l'ordre de trois fois (au maximum) qui sont indépendantes de la température. En revanche, à 20° C la CL 50 est dix fois plus élevée, le χ^2 hautement significatif et la pente de la ligne de régression très faible (fig. 2).

Les larves de stades 3-4 et 5-6 sont respectivement quatre et deux fois plus sensibles que les larves de stade 7 (tabl. III). C'est avec le dernier stade que l'on obtient la meilleure corrélation dose-mortalité et donc la plus faible marge d'erreur (fig. 3).

Les résultats obtenus avec 15 et 30 larves par becher sont pratiquement identiques (tabl. IV). En revanche, avec 60 et 120 larves on note une forte augmentation des CL 50 ainsi qu'une diminution très nette de la pente, la ligne de régression correspondant à 120 larves par becher étant pratiquement plate (fig. 4).

La vitesse de rotation entre 120 et 150 tours/mn n'influe pas sur le résultat (tabl. V). La vitesse de 150 tours/mn a été adoptée.

Seule l'introduction immédiate de la suspension bactérienne dès la mise en marche du moteur permet d'obtenir des résultats satisfaisants. Au-delà de 10 mn, on observe une grande hétérogénéité des résultats ainsi qu'une augmentation des valeurs caractéristiques (de trois à cinq fois au niveau de la CL 95) (tabl. VI). Ce phénomène s'observe également avec d'autres espèces comme *S. hargreavesi* Gibbins ainsi qu'avec une suspension bactérienne diffèrente (Teknar au lieu de IPS 80).

4. Discussion — Conclusion

Cette série d'expérimentations a été faite afin de mettre au point une méthode simple et fiable pour réaliser sur le terrain des tests de sensibilité des larves du complexe *S. damnosum* à la toxine de *B. thuringiensis* H 14. L'influence d'un certain nombre de paramètres expérimentaux a dû être étudiée systéma-

tiquement en vue de proposer un protocole d'évaluation standardisé.

Le temps de contact minimal pour obtenir des résultats satisfaisants est de 3 heures. C'est également la durée retenue par Mouchet *et al.* (*op. cit.*) pour les insecticides de contact. Un contact de 24 heures serait théoriquement préférable, mais il présente deux inconvénients : d'une part il est difficile d'obtenir sur le terrain une alimentation électrique continue, et d'autre part, la proportion de nymphoses (lorsqu'on utilise des larves de stade 7) qui ne dépasse pas généralement 5 % après 3 heures, atteint 20 à 30 % après 24 heures. Comme cela sera démontré ultérieurement, la solution ne réside pas dans l'utilisation de larves plus jeunes. Entre 3, 6 et 12 heures de temps de contact, il s'est avéré préférable pour des raisons pratiques, d'opter pour un temps de 3 heures. La proportionnalité entre le temps de contact et la mortalité est comparable à ce qui est observé avec les insecticides chimiques conventionnels (Mouchet *et al.*, *op. cit.*) pour lesquels un temps de contact de 3 heures donne également entière satisfaction. Frommer *et al.* (1980) démontrent au contraire, qu'au-delà de 60 mn de contact, la mortalité des larves de *S. vittatum* (lue après 24 heures de mise en observation) n'augmente plus significativement.

Le nombre de larves utilisées doit être constant. Toutefois, ce qu'il importe de respecter, c'est le rapport entre le nombre de larves et le volume de la suspension. Avec 8 ou 4 ml d'eau par larve correspondant respectivement à 60 et 120 larves par becher, toute la fraction accessible de la toxine est probablement ingérée par les larves ; de ce fait, la mortalité n'augmente plus proportionnellement à la concentration (pente très faible des lignes de régression obtenues). Ce phénomène ne se produit plus avec 30 larves par becher et c'est ce nombre qui a été retenu.

La température entre 25 et 30° C, qui correspond à celle généralement observée dans les gîtes larvaires (Ocran *et al.*, 1982) n'influe pas significativement sur la sensibilité des larves à *B. thuringiensis* H 14. Les variations observées dans les CL 50 dépendent plutôt de la variabilité naturelle de la réponse des larves collectées sur le terrain à la toxine de *B. thuringiensis* H 14. Il en est de même chez les larves d'*A. aegypti* pour une gamme de températures comprises entre 19 et 33° C (Sinègre *et al.*, 1980). En revanche, lorsque les larves sont placées dans des conditions de température inférieures à celles dans lesquelles elles se développent normalement, leur activité trophique est ralentie, ce qui entraîne une

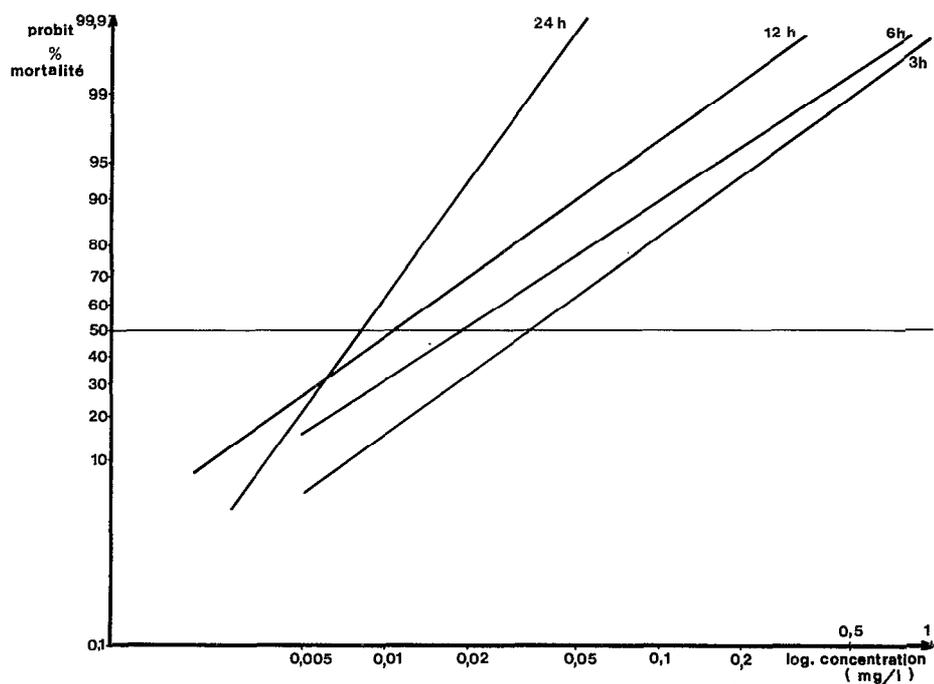


FIG. 1. — Influence du temps de contact (température : 25° C ; larves de stade 7 ; IPS 80)

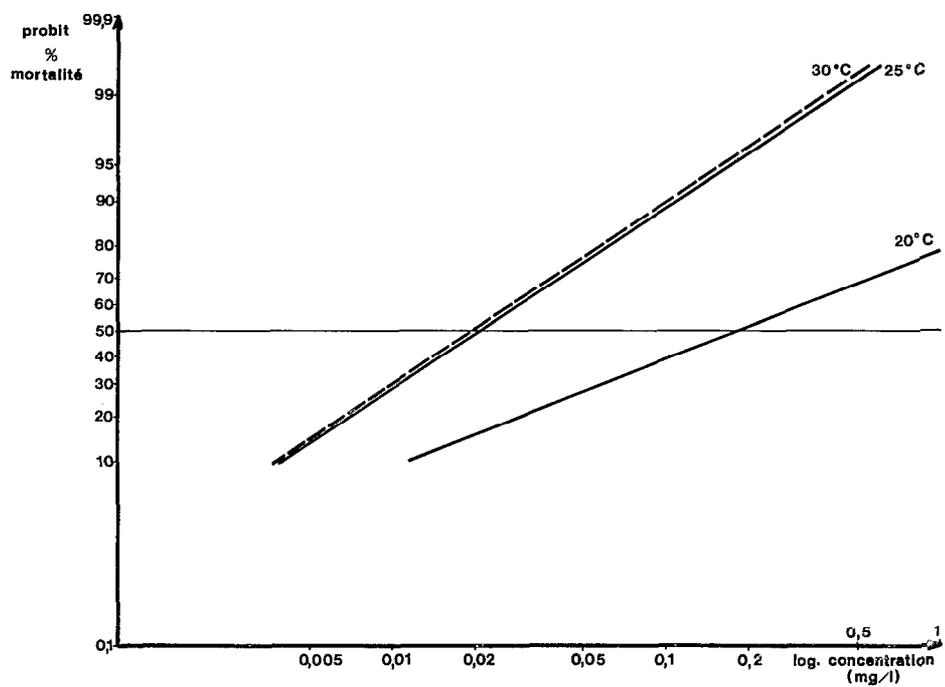


FIG. 2. — Influence de la température (temps de contact : 3 h ; larves de stade 7 ; IPS 80)

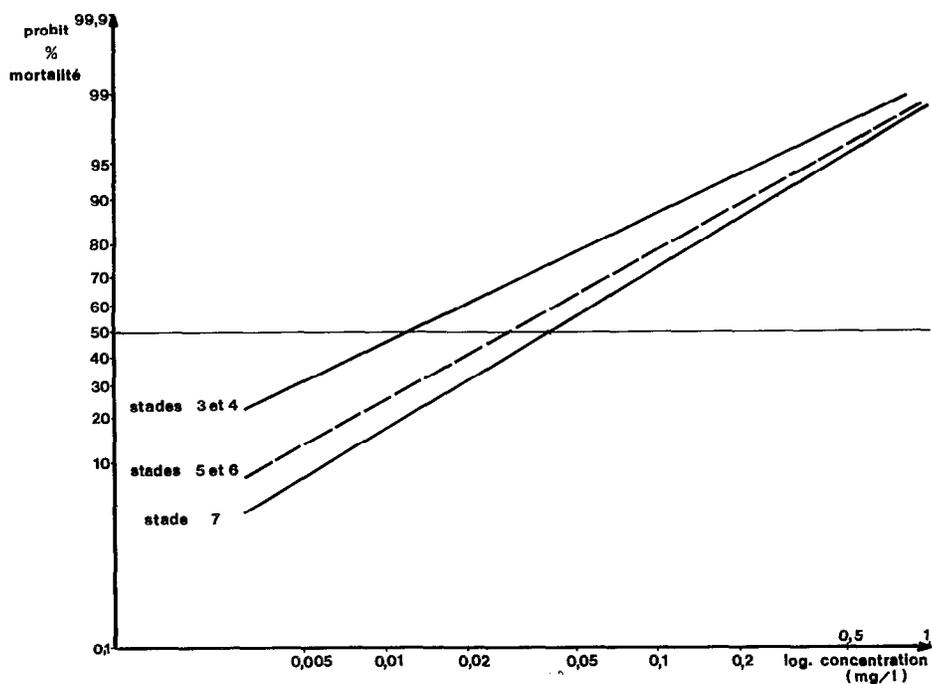


FIG. 3. — Influence du stade larvaire (temps de contact : 3 h ; température : 25° C ; IPS 80)

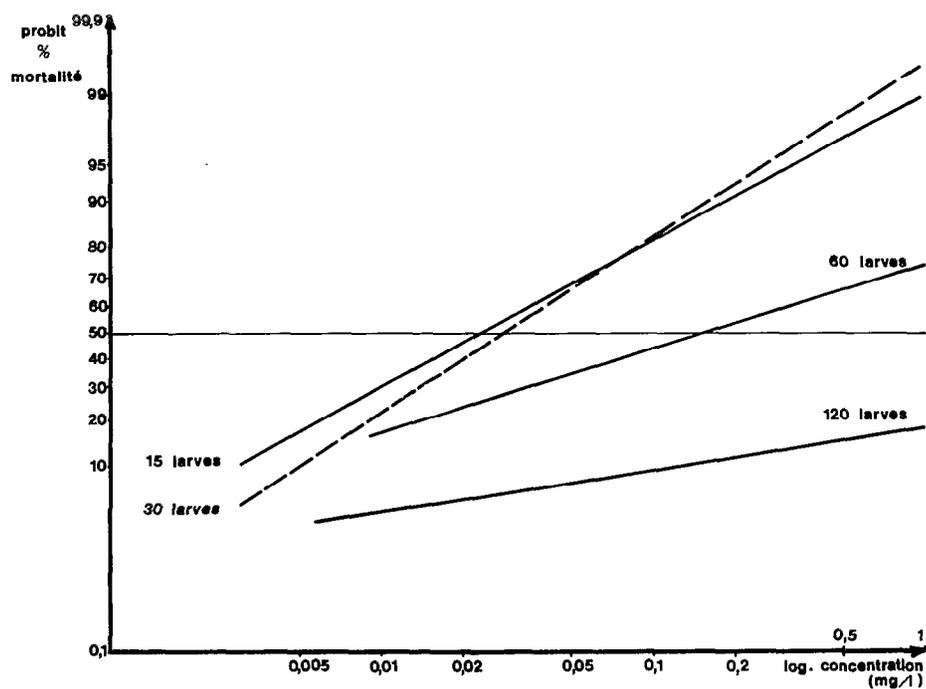


FIG. 4. — Influence du nombre de larves par becher (temps de contact : 3 h ; larves de stades 7 ; température : 25° C ; IPS 80)

TABLEAU I

Influence du temps de contact (température 25° C, stade larvaire 7, IPS 80). *Probabilité de 95 %

Temps de contact	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	χ ²
2 h	81	40 - 162	102,0	--	0,94	S
3 h	33	29 - 37	13,8	230	1,9	NS
6 h	19	17 - 21	11,7	160	1,8	NS
12 h	11	10 - 13	10,0	78	1,9	NS
24 h	8	7 - 9	14,3	22	3,7	NS

TABLEAU II

Influence de la température (temps de contact 3 h, stade larvaire 7, IPS 80). *Probabilité de 95 %

Température	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	χ ²
20° C	180	41 - 780	336,0	6300	1,1	S
25° C	21	18 - 23	16,7	180	1,7	NS
30° C	21	17 - 23	17,7	170	1,8	NS

TABLEAU III

Influence du stade larvaire utilisé (temps de contact 3 h, température 25° C, IPS 80). *Probabilité de 95 %

Stade larvaire	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	χ ²
3 et 4	12	10 - 14	20,0	250	1,2	NS
5 et 6	28	22 - 36	27,7	400	1,4	S
7	40	35 - 46	14,3	450	1,6	NS

TABLEAU IV

Influence du nombre de larves par becher (temps de contact 3 h, température 25° C, stade larvaire 7, IPS 80). *Probabilité de 95 %

Nombre de larves par becher	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	χ ²
15	23	19 - 28	21	320	1,4	NS
30	28	25 - 32	12	250	1,7	NS
60	150	100 - 220	44,2	16 920	0,8	NS
120	4 120	710 - 23900	480,0	42 500	0,4	NS

TABLEAU V

Influence de la vitesse de rotation des bouteilles (temps de contact 3 h, température 25° C, stade larvaire 7, IPS 80). *Probabilité de 95 %

Vitesse de rotation	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	X ²
120 trs/mn	32	24 - 42	33,3	258	1,7	S
130 trs/mn	28	25 - 31	12,0	250	1,7	NS
150 trs/mn	28	24 - 32	14,2	210	1,7	NS

TABLEAU VI

Influence du temps d'adaptation avant traitement (temps de contact 3 h, température 25° C, stade larvaire 7, Teknar lot 21.731). *Probabilité de 95 %

Temps d'adaptation	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	X ²
0 mn	36	31 - 41	13,7	337	1,7	NS
10 mn	63	48 - 82	31,2	879	1,4	S
20 mn	49	30 - 81	63,3	1 763	1,1	S
40 mn	85	73 - 98	15,4	932	1,6	NS

moins ingestion de la toxine et donc une mortalité plus faible. Dans le cas des larves du complexe *S. damnosum* testées à 20° C, la brusque variation de température explique également en partie les résultats observés. Les auteurs travaillant avec des larves se développant en eaux plus froides notent généralement une nette corrélation entre la température et la mortalité (Molloy *et al.*, 1981; Lacey et Mulla, 1977b; Lacoursière *et al.*, 1982). Il en est de même avec les larves de moustiques (Wraight *et al.*, 1981). Toutefois, il n'a pas encore été démontré si la température agissait sur le rythme d'ingestion des particules par les larves et/ou sur leur sensibilité intrinsèque à la toxine.

Les larves jeunes sont plus sensibles que les larves âgées. Ce phénomène a déjà été observé chez les larves de simulies (Guillet et de Barjac, 1979; Molloy *et al.*, *op. cit.*) ou de moustiques (Wraight *et al.*, *op. cit.*). Il en est de même pour la plupart des insecticides chimiques, même si, dans le cas des larves du complexe *S. damnosum*, les différences observées avec le téméphos sont plus fortes qu'avec

le *B. thuringiensis* H 14. Aucun critère morphologique acceptable ne permet de différencier les stades larvaires 3, 4, 5 et 6. Seul le stade 7 peut être identifié avec certitude, ce qui explique que son utilisation entraîne un gain de précision dans les résultats obtenus. Le stade pharate qui précède la nymphose et au cours duquel les larves de moustiques cessent de s'alimenter, semble à peu près inexistant chez les larves du complexe *S. damnosum* ⁽¹⁾. Les larves de stade 7 ont donc été retenues.

Le temps d'adaptation joue incontestablement un rôle important. Ce phénomène, qui, avant d'être mis en évidence, avait conduit au rejet de nombreuses séries de tests, pourrait éventuellement être évité en ajoutant de la nourriture dans l'eau. Toutefois, l'apport de nourriture est difficile à standardiser et, en interférant avec le comportement trophique des larves (Gaugler et Molloy, 1980), il peut modifier le résultat des tests. Les bons résultats obtenus sans temps d'adaptation ont permis de résoudre ce problème.

La stabilité des standards conservés en réfrigéra-

(1) L'utilisation d'une poudre fluorescente a permis de démontrer que la proportion des larves de stade 7 à ébauches branchiales noires qui ne se nourrissent pas est toujours très faible et comparable à celle observée chez les autres stades larvaires (Guillet, non publié).

teur est suffisante pour qu'ils puissent servir de nombreuses années comme produit de référence pour les tests de sensibilité à *B. thuringiensis* H 14 (de Barjac et Larget-Thiéry, 1984).

Les conditions expérimentales peuvent se résumer ainsi :

Temps d'acclimatation : néant.
 Temps de contact : 3 h.
 Stade larvaire : 7.
 Température : 25° C.
 Vitesse de rotation : 150 trs/mn.
 Eau : distillée, permutée ou filtrée.
 Nourriture : néant.
 Suspension bactérienne : IPS 80.

Cette méthode, en tant que test de sensibilité, doit permettre de définir aussi précisément que possible, le ou les critères qui aideront à mettre en évidence le développement éventuel d'un mécanisme de résistance. Ces critères peuvent être : la CL 50, la CL 95, la pente de la droite (ou le rapport CL 95/CL 50) et enfin, la limite supérieure de la CL 100. La valeur relative de chacune de ces valeurs caractéristiques dépend de la nature du ou des mécanismes de résistance. Il n'est actuellement pas possible de prédire lequel serait le plus significatif dans le cas de *B. thuringiensis* H 14. La CL 100 représente une valeur importante dans le cas des insecticides chimiques conventionnels. La matière active, une fois dissoute, affecte également toutes les larves d'un lot traité par une action de contact. Au contraire, la toxine de *B. thuringiensis* H 14 est insoluble (donc

particulière) et n'agit que par ingestion. Sa répartition dans les différents lots traités ne peut pas être parfaitement homogène, surtout si les cristaux sont agglomérés ou s'ils ont tendance, une fois individualisés, à adhérer aux parois des récipients. De plus, seules les larves qui se nourrissent activement au cours du test peuvent être affectées par la toxine. Il est fréquent d'obtenir 2 à 3 % de larves qui ne se nourrissent pas et survivent après 24 heures de contact (*A. aegypti*) tout aussi bien que 3 heures (*S. damnosum* s.l.) à des concentrations de deux à huit fois supérieures à la CL 100 généralement enregistrée. La limite supérieure de la CL 100 de *B. thuringiensis* H 14 est donc une valeur variable et peu précise. Elle ne devra par conséquent pas être retenue comme un critère fiable pour la mise en évidence d'une éventuelle baisse de sensibilité à la toxine. En revanche, la CL 50 et surtout la CL 95, ainsi que la pente de la ligne de régression sont définies avec une relative précision. Leur suivi et la comparaison avec les données obtenues avant le traitement devraient permettre de mettre en évidence cette éventuelle baisse de sensibilité qui se traduira vraisemblablement par un déplacement de la ligne de régression vers les forts dosages et/ou une augmentation significative de la pente.

La possibilité de définir une dose diagnostique, ainsi que l'étude de la sensibilité relative des différents groupes d'espèces du complexe *S. damnosum* feront l'objet de la deuxième partie de ce travail.

Manuscrit accepté par le Comité de Rédaction le 8 novembre 1985.

BIBLIOGRAPHIE

- BARJAC (H. de) et LARGET (I.), 1981. — Properties of the interim standard IPS 78 and proposal of a new reference preparation IPS 80 for the establishment of an international standard. Doc. mimeo. OMS, TDR/BCV/IC.81.1/WP.5 (non publié).
- BARJAC (H. de) et LARGET-THIÉRY (I.), 1984. — Characterization of IPS 82 as a standard for bioassays of *Bacillus thuringiensis* H 14 preparations. Doc. mimeo. OMS, WHO/VBC/84.892.
- COLBO (M. H.) et THOMPSON (B. H.), 1978. — An efficient technique for laboratory rearing of *Simulium verocundum* S. et J. (Diptera : Simuliidae). *Can. J. Zool.*, 56 : 507-510.
- FINNEY (D. J.), 1971. — Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 333 p.
- FROMMER (R. L.), HEMBREE (S. C.), NELSON (J. H.), REMINGTON (M.) et GIBBS (P. H.), 1980. — The susceptibility of *Simulium vittatum* larvae (Diptera : Simuliidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the laboratory. *Mosq. News*, 41 : 339-347.
- GAUGLER (R.) et MOLLOY (D.), 1980. — Feeding inhibition in black fly larvae (Diptera : Simuliidae) and its effects on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Environ. Entomol.*, 9 : 704-708.
- GAUGLER (R.), MOLLOY (D.), HASKINS (T.) et RIDER (G.), 1980. — A bioassay system for the evaluation of black fly (Diptera : Simuliidae) control agent under simulated stream conditions. *Canad. Ent.*, 112 : 1271-1276.
- GUILLET (P.) et BARJAC (H. de), 1979. — Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves de simulies vectrices de l'onchocercose. *C. R. Acad. Sc. Paris*, 289, D : 549-552.
- GUILLET (P.), ESCAFFRE (H.), OUEDRAOGO (M.) et QUILLÉVÉRE (D.), 1980. — Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire (Zone du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta). *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 18, 3 : 291-299.
- GUILLET (P.), ESCAFFRE (H.) et PRUD'HOM (J.-M.), 1982. — L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H 14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. I. Efficacité et modalités d'application. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 20, 3 : 175-180.

- GUILLET (P.) et KURTAK (D. C.), 1985. — Cross-resistance to chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl in the larval populations of the *Simulium damnosum* complex already resistant to temephos in West Africa and its operational significance. Soumis pour publication à *Tropenmed. Parasit.*
- HEMBREE (S. C.), FROMMER (R. L.) et REMINGTON (M. P.), 1980. — A bioassay apparatus for evaluating larvicides against black flies. *Mosq. News*, 40 : 647-650.
- KURTAK (D. C.), 1980. — Notes on the selection of larvae of *Simulium damnosum* s.l. for insecticide susceptibility tests with particular reference to the cytospecies *Simulium soubrense* and *Simulium squamosum*. WHO unpublished document.
- KURTAK (D. C.), OUEDRAOGO (M.), OCRAN (M.), BARRO TELE et GUILLET (P.), 1982. — Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae already resistant to temephos (Abate). Doc. mimeo. OMS, WHO/VBC/82.850.
- LACEY (L. A.), ESCAFFRE (H.), PHILIPPON (B.), SÈKÉTÉLI (A.) et GUILLET (P.), 1982a. — Large river treatment with *Bacillus thuringiensis* H 14 for the control of *Simulium damnosum* s.l. in the onchocerciasis control programme. *Tropenmed Parasit.*, 33 : 97-101.
- LACEY (L. A.) et MULLA (M. S.), 1977a. — A new bioassay unit for evaluating larvicides against blackflies. *J. Econ. Ent.*, 70 : 453-456.
- LACEY (L. A.) et MULLA (M. S.), 1977b. — Evaluation of *Bacillus thuringiensis* as a biocide of blackfly larvae (Diptera : Simuliidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 30 : 46-49.
- LACEY (L. A.), UNDEEN (A. H.) et CHANCE (M. M.), 1982b. — Laboratory procedures for the bioassay and comparative efficacy evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype 14) against black flies (Simuliidae). *Miscell. Publ. Ent. Soc. Amer.*, 12, 4 : 19-23.
- LACOURSIÈRE (J.), BOISVERT (J.) et CHARPENTIER (G.), 1982. — Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against black fly larvae (Diptera : Simuliidae). Abst. IIIrd Int. coll. Invertebr. Pathol., Brighton, U.K. : 58.
- MOLLOY (D.), GAUGLER (R.) et JAMNBACK (H.), 1981. — Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of black fly larvae. *J. Econ. Ent.*, 74 : 61-64.
- MOUCHET (J.), QUÉLÉNNEC (G.), BERL (D.), SÉCHAN (Y.) et GRÉBAUT (S.), 1977. — Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de *Simulium damnosum* s.l. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 15, 1 : 55-66.
- OCRAN (M.) et al., 1982. — Water temperatures in *Simulium damnosum* breeding rivers of the onchocerciasis control programme area. Doc. mimeo. OMS, WHO/VBC/82.848.
- SINÈGRE (G.), GAVEN (B.) et VIGO (G.), 1980. — Contribution à la normalisation des épreuves de laboratoire concernant des formulations expérimentales et commerciales du sérotype H 14 de *Bacillus thuringiensis*. — II. — Influence de la température, du chlore résiduel, du pH et de la profondeur de l'eau sur l'activité biologique d'une poudre primaire. Doc. mimeo. OMS, WHO/VBC/80.770.
- WRAIGHT (S. P.), MOLLOY (D.), JAMNBACK (H.) et Mc COY (P.), 1981. — Effect of temperature and instar on the efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 against *Aedes stimulans* larvae. *J. Invert. Path.*, 38 : 78-87.