



O . C . C . G . E .

O . R . S . T . O . M .

INSTITUT DE RECHERCHES SUR LA TRYPANOSOMIASE
ET L'ONCHOCERCOSE

Evaluation de 48 produits à base de *Bacillus thuringiensis* H14 fournis par la Firme Solvay.
Recherches sur les facteurs conditionnant
l'efficacité des produits primaires*

GUILLET (P.)**, HOUGARD (J.M.)**, ESCAFFRE (H.)***,
PRUD'HOM (J.M.)*** et DUVAL (J.)***

B3513ex1

24 OCT. 1983
O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire
N° : 3513ex1
Cote : B
N° 137/IRTO/RAP/83
29/03/1983

* Ce travail a bénéficié d'une aide financière de l'Organisation Mondiale de la Santé.

** Entomologiste médical de l'O.R.S.T.O.M.

*** Technicien d'entomologie médicale de l'O.R.S.T.O.M.

I.R.T.O. - B.P. 1500 - BOUAKE (Côte d'Ivoire).

1 - INTRODUCTION

Les premiers essais de terrain réalisés avec le *Bacillus thuringiensis* H14 ont permis de mettre en évidence la toxicité remarquable de cette bactérie vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum*. L'intérêt de son utilisation potentielle s'est révélé d'autant plus grand qu'est apparue dans ce complexe *S. damnosum* une résistance croisée aux insecticides organophosphorés limitant considérablement le choix d'alternatifs du té-méphos.

Un programme de criblage des formulations de *B.t.* H14 a été immédiatement mis en place grâce à la participation de l'OMS et à la forte motivation dont ont fait preuve les firmes concernées. Ce programme a rapidement débouché sur la sélection du Teknar^(R) (Sandoz) qui, en quelques mois, a atteint le stade de l'utilisation opérationnelle. Dans le même temps, un programme de recherches a permis d'étudier les avantages et les inconvénients liés à l'utilisation des divers types de formulations produites par l'industrie, et de sélectionner le type le mieux adapté à la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest.

Lors du criblage ultérieur de nombreuses formulations, on s'est heurté à des problèmes analogues à ceux rencontrés dans la sélection des larvicides chimiques. Il était très difficile de prévoir l'efficacité d'un produit et la seule démarche possible consistait à tester le plus de formulations possibles afin d'augmenter les chances d'en sélectionner une ou plusieurs qui soient performantes.

Une consultation avec les responsables du développement du *B.t.* H14 de la Firme Solvay (Bruxelles) nous a permis de discuter les limites de cette démarche et de mettre en oeuvre une approche plus rationnelle du problème. Cette approche consiste à tester systématiquement, étape par étape, les facteurs qui depuis la mise en culture du bacille jusqu'à l'élaboration de la formulation conditionnent l'efficacité vis-à-vis des larves de simules.

La première série d'essais qui fait l'objet de ce rapport porte sur des produits primaires non formulés c'est-à-dire pour lesquels aucun agent de formulation (mouillants, dispersants ...) n'a été utilisé. L'étude

de divers agents de formulation représente la deuxième étape de cette approche et sera présentée ultérieurement. Les produits testés ne sont pas nécessairement représentatifs de ce qu'il est possible de produire industriellement et de commercialiser. Il s'agit d'une étude préliminaire sur la production des produits primaires qui serviront de base à l'élaboration des formulations.

Parallèlement aux tests sur simulies, nous avons réalisé des tests sur *A. aegypti* afin d'étudier le degré de similitude dans les résultats obtenus et de vérifier si l'information obtenue à partir des tests sur moustiques est transposable aux simulies.

2. MATERIEL ET METHODES

Les 48 produits étudiés sont tous du même type : concentrés de suspension à très fines particules. Il n'est pas possible de présenter ici dans le détail les variables étudiées car à divers degrés, elles relèvent du secret industriel. Cependant pour la clarté de l'exposé et en accord avec le producteur, nous en donnerons une description sommaire. Ces variables présentées dans le tableau 1 se répartissent comme suit :

Lignes M_1 , M_2 et M_3 représentent 3 milieux de culture différents.

L_1 , L_2 et L_3 représentent des taux de lyse bactérienne différents c'est-à-dire 3 étapes successives de la culture.

Colonnes A (1 à 3) et B (1 à 3) : les produits de la série B sont enrichis en endotoxine par rapport à ceux de la série A.

1, 2 et 3 appliqués identiquement aux séries A et B représentent 3 conditionnements différents de la culture avant concentration.

Les lots 153 à 158 ont tous la même concentration par rapport à la culture initiale tandis que les lots F sont concentrés 1,6 fois par rapport à ceux-ci.

Dans un premier temps, nous avons procédé à un criblage sur simulies à la concentration de 0,8 mg/l à l'aide du dispositif des mini-gouttières. Nous avons ensuite sélectionné 16 formulations et avons pro-

cédé à un test complet (4 concentrations testées et 3 répliques par concentration) pour vérifier la validité des résultats obtenus par criblage à dose unique. Certains de ces produits ont fait l'objet d'un test biologique sur larves de stade IV jeunes d'*A. aegypti* souche Bora Bora (méthode standard OMS). Les 48 produits ont également été criblés sur *A. aegypti* à raison de 8 lots de 25 larves pour une concentration de 0,25 mg/l.

Une étude sommaire des propriétés physiques de tous les lots a été réalisée au laboratoire. Nous avons contrôlé les qualités de dispersion du produit, sa fluidité et l'homogénéité de la suspension obtenue. Afin de limiter le nombre de données chiffrées de ce rapport, nous ne mentionnerons que les observations relatives à la dispersion. Cinq critères ont été retenus qui sont : nulle (aucune dispersion), mauvaise (formation d'un nuage avec de gros agglomérats), AB (dispersion correcte mais présence de petits agglomérats), B (très peu d'agglomérats), TB (dispersion parfaite).

3. RESULTATS

Les résultats sont présentés dans 4 tableaux figurant en annexe. A ces 4 tableaux s'ajoutent 18 fiches informatisées de présentation des tests complets avec analyse Log/probit des résultats obtenus. Dans les tableaux 1 et 2, nous ne présentons que les mortalités obtenues sur les larves de stades 6 et 7 car elles sont généralement plus fiables que celles portant sur l'ensemble des stades larvaires. Les résultats détaillés du screening figurent dans les tableaux 3 et 4.

3.1. Influence du milieu de culture :

Globalement, les résultats obtenus tant sur simules que sur moustiques ne font pas apparaître de différence nette entre les milieux M1 et M2. Il est difficile de dire si le milieu M3 est plus efficace car les séries F dans lesquelles il est utilisé sont en fait plus concentrées que les autres. Dans les séries ultérieurement testées, on a constaté que les milieux M2 et M3 donnaient des résultats comparables.

3.2. Influence de la concentration par rapport à la culture initiale :

Le fait de concentrer 1,6 fois de plus procure un gain d'efficacité très significatif. Toutefois, les lots les plus concentrés (séries F) se dispersent généralement moins bien que les autres. Il est quand même possible avec les séries moins concentrées d'obtenir de bons résultats (lots 1 B des séries 153 à 158).

3.3. Influence du taux de lyse bactérienne :

Ce facteur influe différemment lorsqu'il est appliqué aux milieux A et B. Comparé aux taux L1 et L2, le taux L3 donne avec le milieu M₁ des résultats moins bons, aussi bien sur moustiques que sur simules mais ceci ne se vérifie pas avec le milieu M₂. Globalement il semble que le taux de lyse L₂ donne dans tous les cas sur simules de meilleurs résultats. Il est à noter que les différences observées restent assez minimes.

3.4. Comparaison entre lots enrichis (B) et non enrichis (A) :

Les séries B (1 à 3) sont nettement plus efficaces que les A (tableau 1). Ceci est très net pour les lots 153 à 158 et moins net pour les F du fait des forts pourcentages de mortalité observés avec cette série.

3.5. Influence du conditionnement de la culture avant concentration :

Qu'il s'agisse de la série A ou de la B, le conditionnement 3 donne toujours des résultats nettement moins bons sur simules et sur moustiques. Cette différence est particulièrement marquée pour les lots 156 à 158 3 A et 3 B ainsi que sur les lots F11 et F12 3A et 3B. Le conditionnement 1 donne généralement de meilleurs résultats que le 2 sauf dans le cas du milieu M₁, série A où l'on observe nettement l'inverse. Cette différence entre les conditionnements 1 et 2 n'est plus apparente avec les combinaisons F car les pourcentages de mortalité observés sont trop proches (tableau 1).

3.6. Fiabilité des résultats obtenus à partir d'un criblage à dose unique :

Si l'on compare les résultats obtenus à partir du criblage à ceux des tests complets (tableau 2), on constate qu'il existe une corrélation satisfaisante entre les deux informations. Si l'évaluation de ces 48 produits avait été destinée à sélectionner les meilleurs d'entre eux devant ensuite être testés sur le terrain, il aurait été nécessaire de choisir un seuil d'acceptabilité assez large lors du criblage préliminaire. Il aurait fallu dans le cas précis retenir tous les produits donnant environ 95 % de mortalité et plus pour faire un test complet. Au-delà la précision dans le résultat n'est plus suffisante pour justifier un choix. Ainsi le lot F11 IA a donné 94,9 % de mortalité à 0,8 mg/l/10 mn mais figure parmi les 3 premiers pour son efficacité sur simules comme sur moustiques (tableau 2).

3.7. Comparaison des résultats obtenus sur moustiques et sur similies :

Si l'on compare les CL 50 respectives, l'on s'aperçoit qu'il existe pour ce type de produit primaire une bonne corrélation entre les mortalités sur moustiques et sur similies (tableau 2). Le screening à dose unique sur moustiques donne globalement une information qui correspond aux résultats sur similies mais aurait conduit dans certains cas à éliminer des produits intéressants comme les lots 153 IB, 155 IB, ou sélectionner des produits moins efficaces tels que le lot 154 2A.

4. DISCUSSION - CONCLUSION

Cette série d'expérimentations a permis de recueillir un certain nombre d'informations sur la production de produits primaires de *B. thuringiensis* H14 devant servir de base à l'élaboration des formulations antisimulidiennes. Certains facteurs jouent un rôle nettement plus important que d'autres. Il ne semble pas que les 3 milieux de culture étudiés (M_1 , M_2 , M_3) donnent des résultats très différents. Le milieu de culture est un facteur très important dans la production du bacille à deux niveaux. En premier lieu, il permet, en fonction de sa composition et de sa richesse en divers éléments nutritifs, d'obtenir par unité de volume un plus grand nombre de bacilles donc en fin de culture, une concentration plus forte en cristaux (endotoxine). La culture sur milieu riche donne donc de meilleurs résultats mais les coûts de production sont nettement plus élevés. En deuxième lieu la composition du milieu de culture va conditionner la formulation à adopter. Selon les produits utilisés, les résidus de fermentation ou "ballast" qui représentent la fraction la plus importante dans un produit primaire de *B.t.* H14, vont être plus ou moins fluides, se disperser plus ou moins bien et donc influencer beaucoup sur les caractéristiques finales de la formulation. Nous avons vu que globalement, le taux de lyse 2 donnait des résultats légèrement meilleurs que les 1 et 3. Avant la lyse bactérienne, le cristal est inclus dans le sporange avec la spore. La formation du cristal commence avant celle de la spore. Ce cristal, de nature protéinique, présente en fait une structure composite et semble constitué d'un agencement complexe de sous-unités. Il était dès lors intéressant de vérifier d'une part si au cours des divers stades de sa maturation, le cristal présentait une toxicité variable et d'autre part si, inclus dans le sporange, il était aussi toxique pour les larves de similies que lorsqu'il est

à l'état libre dans la culture. En effet, il a été démontré qu'en augmentant artificiellement le temps de transit intestinal des larves de simulies ayant ingéré du *B.t.* H14, on augmentait sensiblement la toxicité de celui-ci. Ceci semble traduire le fait que la digestibilité de la toxine est un facteur limitant la toxicité du *B.t.* H14 pour les larves de simulies chez lesquelles le temps de transit intestinal est généralement court.

La concentration de la culture originale ainsi que l'application d'autres procédés d'enrichissement ont une influence très favorable sur la toxicité des produits. Cela est tout à fait logique dans la mesure où la toxicité dépend étroitement de la teneur en endotoxine. Si la concentration, ainsi que la culture sur milieu riche sont des procédés qui permettent d'obtenir des produits très performants, ils sont souvent difficilement applicables au niveau industriel et s'avèrent généralement onéreux. Ce problème de l'enrichissement des formulations en endotoxine reste le problème clef de la mise au point de produits efficaces dont le coût soit compatible avec l'utilisation à grande échelle dans les pays en voie de développement. C'est dans la mise au point de produits industriels d'élimination du "ballast" que des progrès spectaculaires restent à enregistrer.

Le principe du criblage à dose unique présente, nous l'avons vu, certaines limites mais permet de sélectionner très rapidement les produits les plus efficaces. En comparant les résultats du criblage à ceux des tests complets pratiqués sur 16 produits différents, nous avons constaté qu'avec une fourchette de l'ordre de 5 % les résultats étaient aussi fiables dans les deux cas. Ceci est intéressant dans le contexte actuel de cette série d'expérimentations où nous recevons un grand nombre de formulations pour lesquelles les firmes veulent une réponse aussi rapide que possible. De plus si la CL 50, calculée à partir d'une série de 3 essais, est une donnée beaucoup plus précise, il faut garder présent à l'esprit que l'information principale pour apprécier l'efficacité d'un larvicide destiné à la lutte contre l'onchocercose reste la limite supérieure de la CL 100. Les produits n'ayant pas tous des pentes parallèles, il est préférable pour le criblage de choisir une concentration donnant une mortalité aussi proche que possible de 100 % avec les formulations les plus efficaces.

.../...

Pour les produits primaires comme ceux ayant fait l'objet de cette étude, il existe une bonne corrélation entre l'activité biologique sur larves de moustiques et de simulies. Un premier tri sur moustiques au niveau de la firme aurait permis d'éliminer les produits les moins efficaces. Ce tri devrait toutefois reposer sur un titrage normal et non sur un criblage à dose unique qui, dans le cas des moustiques ne donne pas des résultats suffisamment fiables.

Les 48 produits qui ont fait l'objet de cette étude ne représentent pas des formulations que l'industrie peut dès maintenant produire. Leur mise au point et leur évaluation étaient destinées à mieux connaître les facteurs qui permettent d'améliorer les produits primaires de *B.t.* H14. Si certains d'entre eux peuvent probablement être utilisés tels quels, comme les lots 154 1B et FII 3B, la plupart doivent être formulés pour être utilisables comme larvicides antisimulidiens. Cette étude a donc été suivie d'une démarche similaire concernant les formulations. Les résultats feront l'objet d'un rapport ultérieur.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les Responsables du Département "Recherches Biologiques" de la Firme SOLVAY qui nous ont accueillis dans leurs laboratoires et avec lesquels nous avons pu mettre sur pied un plan de travail pour la mise au point de formulations de *B. thuringiensis* H14 destinées à la lutte contre les vecteurs d'onchocercose.

Nous remercions également Mr. Daniel COURET, technicien d'entomologie médicale de l'ORSTOM, qui a bien voulu réaliser le traitement informatique des résultats figurant dans ce rapport.

Lot	Milieu	Taux de lyse	Nord enrichi : série A			enrichi : série B		
			Conditionnement 1	Conditionnement 2	Conditionnement 3	Conditionnement 1	Conditionnement 2	Conditionnement 3
153	M ₁	L ₂	67 : Simulies*	94,8	85	98,1	87,4	67,4
			59 : Moustiques**	87,5	79,5	55,5	98,5	62,9
154	M ₁	L ₁	62,9	86,4	64,7	98,5	89,3	56,9
			63,3	99,5	43	54,3	65	46,9
155	M ₁	L ₃	46,9	90,1	45,6	93,9	83,3	79,7
			51,5	47,2	17,8	36,5	46,5	18
156	M ₂	L ₂	97,3	69	28	100	80,2	23,6
			93,5	58	42,9	95,5	71	45,7
157	M ₂	L ₁	94,3	85,9	15,9	98,9	57,9	18,2
			100	89	41,5	99,5	88	68
158	M ₂	L ₃	96,2	50	4,6	98,6	61,4	4,8
			94,5	59,8	53,5	99,5	92,5	73
F 11	M ₃	L ₃	94,9	98,5	74,3	99,2	100	91,5
			84,5	87,3	52,5	88	96,5	54,5
F 12	M ₃	L ₂	100	100	57	100	100	73,3
			88,5	93	42,7	89,5	97	56

Tableau 1 - Mortalités comparées sur simulies et sur moustiques.

* pourcentages de mortalité des larves de stades 6 et 7 du complexe *S. damnosum* à 0,8 mg/l/10 mn

** pourcentages de mortalité des larves de stade IV jeunes d'*A. aegypti* souche Bora-Bora à 0,25 mg/l.

Produit	Mortalité sur similies		Mortalité sur moustiques	
	CL 50 stades 6-7 en mg/l/10'	% mortalitéstades 6-7 à 0,8 mg/l/10'	CL 50 en mg/l	% de mortalité à 0,25 mg/l
F 11 1B	0,076	99,2	0,067	88
156 1B	0,076	100		95,5
F 11 1A	0,083	94,9	0,082	84,5
F 12 1A	0,099	100	0,10	
157 1B	0,103	98,9		97,5
F 12 2A	0,109	100		
158 1B	0,116	98,6		99,5
158 1A	0,118	96,2		94,5
153 2A	0,139	94,8	0,10	87,5
F 11 2A	0,154	100	0,097	87,3
157 1A	0,167	94,3		100
153 1B	0,168	98,1	0,159	55
156 1A	0,188	97,3		93,5
155 1B	0,189	93,9	0,222	36,5
155 3B	0,39	79,7	0,19	18
F 11 3B	0,672	91,6	0,223	54,5

Tableau 2 - Comparaison des résultats obtenus sur similies et sur moustiques
(larves du complexe *S. damnosum* et d'*A. aegypti* souche Bora-Bora,
stade IV jeunes).

Lot	Mortalité sur simules				Dispersion du produit		
	Stades 7		Tous stades		Spontanée	Après retournement	
153	1A	67,03	(182)*	78,43	(343)	nulle	AB
	2A	94,8	(154)	96,15	(312)	"	TB
	3A	85	(180)	89,3	(346)	"	AB
	1B	98,13	(160)	98,76	(323)	nulle	B
	2B	87,41	(143)	93,26	(341)	"	TB
	3B	67,42	(132)	74,89	(223)	"	AB
154	1A	62,91	(213)	74,79	(349)	nulle	mauvaise
	2A	86,42	(162)	91,72	(302)	"	AB
	3A	64,71	(153)	74,69	(241)	"	mauvaise
	1B	98,51	(67)	98,13	(375)	AB	B
	2B	89,29	(168)	92,24	(464)	nulle	B
	3B	56,93	(202)	63,74	(524)	"	B
155	1A	46,94	(98)	77,32	(529)	mauvaise	TB
	2A	90,05	(191)	95,10	(694)	nulle	AB
	3A	45,58	(147)	69,85	(471)	"	AB
	1B	93,94	(99)	98,76	(647)	bonne	TB
	2B	83,33	(66)	95,24	(420)	mauvaise	TB
	3B	79,71	(69)	98,85	(435)	nulle	TB
156	1A	97,30	(74)	83,82	(649)	nulle	TB
	2A	69,01	(71)	92,57	(471)	"	TB
	3A	28	(75)	34,50	(403)	"	TB
	1B	100	(159)	99,65	(575)	nulle	TB
	2B	80,23	(193)	87,42	(445)	"	B
	3B	23,61	(72)	39,10	(335)	"	TB

* entre parenthèses : le nombre de larves testées.

Tableau 3 - Résultats du criblage à 0,8 mg/l exprimés en pourcentages de mortalité et observations sur la dispersion des produits dans l'eau.

Lot	Mortalité sur similies				Dispersion du produit		
	Stades 7		Tous stades		Spontanée	Après retournement	
157	1A	94,29	(105)*	97,32	(448)	mauvaise	TB
	2A	85,88	(85)	94,89	(724)	nulle	TB
	3A	15,86	(145)	18,85	(992)	mauvaise	TB
	1B	98,85	(87)	99,81	(518)	mauvaise	TB
	2B	57,89	(57)	88,76	(507)	nulle	B
	3B	18,18	(22)	46,21	(264)	nulle	B
158	1A	96,15	(52)	99,59	(723)	nulle	TB
	2A	50	(34)	92,20	(513)	"	"
	3A	4,55	(66)	13,29	(617)	"	"
	1B	98,59	(79)	99,83	(602)	nulle	B
	2B	61,36	(88)	90,76	(671)	"	"
	3B	4,84	(124)	14,67	(709)	"	"
F 11	1A	94,95	(218)	97,05	(647)	mauvaise	TB
	2A	98,52	(203)	99,38	(487)	nulle	"
	3A	74,27	(241)	81,44	(501)	"	mauvaise
	1B	99,19	(124)	99,11	(451)	AB	B
	2B	100	(120)	100	(412)	nulle	"
	3B	91,55	(142)	95,31	(384)	"	"
F 12	1A	100	(60)	100	(394)	nulle	mauvaise
	2A	100	(94)	100	(509)	"	AB
	3A	57,02	(114)	78,16	(467)	"	AB
	1B	100	(73)	100	(476)	nulle	nulle
	2B	100	(99)	100	(814)	"	B
	3B	73,33	(105)	85,71	(490)	"	B

* entre parenthèses : le nombre de larves testées

Tableau 4 - Résultats du criblage à 0,8 mg/l exprimés en pourcentages de mortalité et observations sur la dispersion des produits dans l'eau.