

PRESENTATION DU CENTRE COLLABORATEUR DE L'OMS SUR LA RECHERCHE, L'ISOLEMENT ET L'IDENTIFICATION D'AGENTS DE LUTTE BIOLOGIQUE ENTOMOPATHOGENES EN AFRIQUE CENTRALE (1)

HOUGARD J.-M. (2), F. CHANDRE (3), F. DARRIET (2), M. WOUAFO NDAYO (4), J. LOHOUE PETMY (5), D. PIGNON (6), J.-P. CHIPPAUX (7), I. THIERY (8) ET P.M. GHIPIONI (9)

RESUME

Le Centre Pasteur du Cameroun collabore avec l'Organisation Mondiale de la Santé pour la recherche, l'isolement et l'identification en Afrique Centrale d'agents potentiels de lutte biologique pathogènes de larves aquatiques d'insectes d'intérêt médical. Après avoir exposé les techniques de prélèvements et d'analyses des échantillons, les auteurs font état des premiers résultats obtenus après seulement une année de véritable existence. 350 bactéries sporogènes, dont six *Bacillus sphaericus* présentant une forte toxicité vis à vis des larves de *C. quinquefasciatus* et d'*A. gambiae* s.l. ont déjà été mis en évidence. Dans les prochaines années, le centre collaborateur a l'intention d'intensifier la récolte des prélèvements et d'élargir son aire d'intervention aux pays de la sous-région de l'OCEAC. Des contacts vont être pris en ce sens et une collaboration avec des laboratoires de recherche possédant les conditions requises est envisagée.

Mots clés : Agents entomopathogènes - lutte biologique - Afrique Centrale

1. INTRODUCTION

A l'issue d'une réunion informelle de l'Organisation Mondiale de la Santé, tenue à Genève les 2, 3 et 4 septembre 1987, le comité d'orientation sur la lutte biologique du Programme Spécial pour la Recherche et la Formation sur les Maladies Tropicales (OMS/TDR/BCV) proposait au Centre Pasteur du Cameroun de devenir centre collaborateur de l'OMS en Afrique Centrale pour la recherche, l'isolement et l'identification d'agents de lutte biologique entomopathogènes. Le choix du Cameroun résulte de sa situation géographique exceptionnelle lui conférant d'une part une remarquable diversité de biotopes (depuis la forêt humide au sud jusqu'au sahel au nord en passant par les zones montagneuses de l'ouest et du centre) et d'autre part une position privilégiée d'un pays possédant des frontières communes avec six autres états d'Afrique Centrale (Guinée équatoriale, Gabon, Congo, Tchad, République Centrafricaine et Nigéria). Le Centre Pasteur de Yaoundé a été sélectionné car il possède

(1) Ce travail reçoit une subvention du PNUD/BANQUE MONDIALE Programme spécial OMS pour la Recherche et la Formation sur les Maladies Tropicales (OMS/TDR/BCV).
(2) Entomologiste médical de l'ORSTOM, Centre Pasteur du Cameroun, B.P. 1274 Yaoundé.
(3) Docteur vétérinaire, Centre Pasteur du Cameroun.
(4) Bactériologiste du Centre Pasteur du Cameroun.
(5) Mycologiste du Centre Universitaire des Sciences de la Santé, Centre Pasteur du Cameroun.
(6) Médecin biologiste du Service de Santé des Armées, Centre Pasteur du Cameroun.
(7) Parasitologiste de l'ORSTOM, Centre Pasteur du Cameroun.
(8) Entomologiste de l'Institut Pasteur, 25 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cédex 15.
(9) Directeur du Centre Pasteur du Cameroun.

des laboratoires d'analyses déjà existants et bien équipés, une équipe d'entomologistes médicaux spécialisée dans la lutte biologique contre les vecteurs d'endémies tropicales ainsi que des équipes performantes dans tous les domaines nécessaires à la réalisation de cette étude (bactériologie, mycologie, virologie et parasitologie).

Trois années après l'adoption du projet, le centre collaborateur de l'OMS sur la recherche de nouveaux agents de lutte biologique est pleinement opérationnel. Les deux premières années ont été consacrées à la mise au point de techniques d'études appropriées ainsi qu'à l'initiation des médecins et biologistes du Centre Pasteur aux techniques d'isolement et d'identification de micro-organismes pathogènes d'insectes. La troisième année a permis d'isoler et d'identifier, à partir de prélèvements réalisés sur le territoire camerounais, les premiers agents entomopathogènes.

2. APPROCHE METHODOLOGIQUE

2.1. Récolte des échantillons

Le centre collaborateur s'intéresse essentiellement aux agents pathogènes de stades préimaginaux aquatiques d'insectes d'intérêt médical. Trois espèces sont particulièrement concernées en raison de leur abondance en Afrique Centrale et de la variété de leur habitat larvaire. Il s'agit de *Culex quinquefasciatus* (eaux usées), *Anopheles gambiae* s.l. (eaux non polluées ensoleillées), *Aedes sp.* (petites collections d'eaux claires) et *Simulium damnosum* s.l. (eau courante). Quelle que soit la nature des prospections, tous les gîtes hébergeant des stades préimaginaux de ou des espèces recherchées (gîtes positifs) font systématiquement l'objet d'un prélèvement, dans les limites toutefois des capacités d'analyse du centre collaborateur.

2.1.1. Bactéries

Pour chaque gîte, les larves vivantes sont réparties en autant de lots que d'espèces dans des tubes stériles de 5 ml contenant un peu d'eau du gîte. L'opération est répétée avec les larves mortes et (ou) moribondes, même si celles-ci sont présentes en très faible quantité. Les échantillons sont conservés temporairement, le temps de la prospection, à environ 4°C puis congelés à -18°C en attendant d'être analysés.

2.1.2. Champignons

La recherche de champignons pathogènes n'est possible que si les prélèvements ont lieu dans les 72 heures précédant le retour au laboratoire car les échantillons ne doivent pas être réfrigérés. Par contre, lorsque le lieu de prospection est peu éloigné du laboratoire, la récolte consiste à prélever un litre d'eau (avec ou sans larve morte) dans tous les gîtes positifs et à le conserver à température ambiante jusqu'à l'analyse au laboratoire.

03 MARS 1992

N° : 35.052 ex 1
Cote : B P63

2.1.3. Virus

Les prélèvements destinés aux analyses virologiques sont réalisés selon le même protocole que celui utilisé en bactériologie et sont conservés temporairement dans les mêmes conditions (4°C puis -18°C) mais ils sont conditionnés dans des tubes de Nunck et congelés, dès le retour au laboratoire, à -70°C.

2.1.4. Nématodes

Les analyses parasitologiques ne se limitent actuellement qu'à la recherche de nématodes parasites. Pour ce faire, les larves mortes et moribondes (ou à défaut les larves vivantes) sont conditionnées en tubes stériles de 5 ml et conservées temporairement à environ 4°C jusqu'à dissection.

Au total, et dans le meilleur des cas, quatre catégories de prélèvements sont réalisées pour chaque gîte positif. Si les larves mortes ou moribondes sont présentes en très petite quantité, la priorité sera donnée aux analyses bactériologiques car les seuls agents entomopathogènes qui aient atteint véritablement le stade de l'utilisation opérationnelle sont des bactéries. Il est important de bien noter les caractéristiques du gîte larvaire dans lequel le prélèvement a été réalisé car ces informations peuvent revêtir la plus grande importance dans l'éventualité d'une découverte intéressante (date et lieu du prélèvement, nature et localisation du gîte, densité larvaire, taux de mortalité naturelle). Il faut enfin veiller à ce que les échantillons soient acheminés au laboratoire d'analyse dans les plus brefs délais et les meilleures conditions de conservation.

2.2. Analyse des échantillons

2.2.1. Bactéries

Bien qu'une bactérie du genre *Clostridium* ait récemment donné des résultats prometteurs (De Barjac et al., 1990), nous ne nous intéresserons pas à ce groupe en raison des risques encourus par leur manipulation et limiterons nos analyses à la recherche des *Bacillus* (bacilles sporulés Gram positif) dont deux espèces, *thuringiensis* et *sphaericus* sont déjà utilisées dans des programmes de lutte antivectorielle (Guillet et al., 1990 ; Hougard, 1990). Les larves mortes présentes dans les échantillons prélevés sur le terrain sont broyées dans l'eau du gîte puis les spores thermorésistantes sont sélectionnées par chauffage à 80°C pendant 10 minutes. Une goutte de l'échantillon estensemencée en boîte de Pétri sur gélose MBS (Kalfon et al., 1983). Après incubation à 30°C pendant 48 heures, les bacilles Gram positif sporulés sont sélectionnés et réensemencés sur le même milieu. Après 48 heures, les colonies isolées pures ainsi obtenues sont mises en culture sur bouillon liquide MBS jusqu'à sporulation.

Le pouvoir pathogène de chaque colonie est évalué par des bioessais sur larves de *Culex quinquefasciatus* (souche Yaoundé), *Aedes aegypti* (souche Bora-Bora), *Anopheles gambiae* (souche Bobo-dioulasso) et, si les résultats sont encourageants, sur *Simulium damnosum* s.l. Une première série de tests est réalisée avec des cultures diluées à 1%. Si une forte activité insecticide se manifeste, on effectue un comptage des spores présentes dans le bouillon de culture en même temps que l'on réalise une seconde série de tests avec des dilutions supplémentaires du bouillon liquide MBS contenant la souche pathogène incriminée. La culture obtenue est

ensuite examinée entre lame et lamelle au microscope à contraste de phase pour tenter de mettre en évidence les éventuels cristaux responsables du pouvoir pathogène. Les isolats bactériens les plus prometteurs sont conservés sur du papier filtre stérile dans des tubes stériles placés à l'obscurité dans un endroit frais et sec puis expédiés en France au centre de référence de l'OMS sur les bactéries entomopathogènes (Unité des bactéries entomopathogènes, Institut Pasteur, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris Cédex 15).

2.2.2. Champignons

Afin de prouver l'origine fongique d'une infection, des larves saines d'*A. aegypti* et de *C. quinquefasciatus* sont introduites dans un bac contenant l'eau du gîte (susceptible de contenir les spores d'un champignon pathogène) et observées tous les jours pendant 72 heures. Les larves mortes ou moribondes ayant une couleur opaque et présentant des mouvements lents seront examinées sous le microscope afin de rechercher sur le tégument la présence éventuelle de points de pénétration des spores (mélanisation de la cuticule) et de gros filaments caractéristiques des champignons entomopathogènes, visibles surtout dans la tête, le siphon respiratoire et les parties situées entre les segments de l'abdomen.

Après avoir stérilisé la surface des larves suspectées, celles-ci sont ensemencées sur milieu PYG puis incubées pendant 24 heures à température ambiante (Brey et Remaudière, 1985). Si une culture se développe, une petite portion de sa périphérie est transférée sur un tube frais de ce même milieu. Les cultures fongiques pures obtenues après 3 à 4 jours d'incubation sont mises en contact avec des larves saines afin de confirmer leur pathogénicité. Dans l'affirmative, elles sont expédiées en France pour identification au laboratoire des champignons entomopathogènes de l'Institut Pasteur et seront ensuite réexpédiées au Centre Pasteur du Cameroun pour des tests biologiques complémentaires.

2.2.3. Virus

Nos recherches en matière de virus entomopathogènes se limitent actuellement à apporter la preuve de l'origine virale de l'infection car les techniques d'études relatives à leur isolement et leur identification demandent un matériel particulier (un microscope électronique notamment) et des connaissances qui diffèrent radicalement des techniques utilisées en pathologie humaine (Federici et Lacey, 1987 ; Federici, 1980). De plus, les virus entomopathogènes ont un rôle mineur dans la régulation des populations d'insectes vecteurs et il est peu probable qu'ils soient utilisés dans un avenir immédiat en tant qu'agent de lutte biologique même si leur utilisation n'est pas à exclure.

Les larves prélevées sur le terrain sont broyées dans un milieu PBS puis filtrées sur membrane millipore de 0,22 µm. En mettant au contact le filtrat avec des larves saines de moustiques (*A. aegypti* et *C. quinquefasciatus*), une mortalité larvaire anormale peut signifier ainsi qu'il y a eu réinoculation d'un virus. Si la mortalité est insuffisante, on broie les larves issues de l'expérience précédente afin de réaliser un nouveau test biologique

. Dans l'hypothèse où une infection virale est suspectée, les larves sont conservées à 4°C dans une solution glycinée à 50% qui permet aux virus de garder leur pouvoir pathogène pendant plus de dix mois. Ce conditionnement facilite le transport des échantillons au centre de référence sur les virus entomopathogènes situé aux Etats-Unis (Department of Entomology, University of California, Riverside, California 92521). Ils seront dans un premier temps déterminés (baculovirus, rhéovirus, iridovirus, parvovirus...) puis éventuellement renvoyés au Centre Pasteur du Cameroun pour des tests biologiques plus poussés.

2.2.4. Nématodes

Quelques heures après la récolte des échantillons, 4 ou 5 larves vivantes de chaque gîte sont disséquées sous microscope stéréoscopique afin de rechercher la présence de nématodes parasites. Si un parasite est mis en évidence, on tentera une première identification afin de déterminer les conditions de son maintien en survie puis on colorera et fixera une partie du matériel pour une identification plus poussée auprès des spécialistes.

3. PREMIERS RESULTATS

Près de 250 gîtes à moustiques ont été échantillonnés sur le territoire camerounais depuis la création du centre collaborateur. Jusqu'à présent, les prospections ont eu lieu principalement en milieu urbain où les gîtes préimaginaux sont constitués pour l'essentiel par des réservoirs d'eaux polluées riches en larves de *C. quinquefasciatus* (puisards, caniveaux, flaques et puits souillés) et dans une moindre mesure par des collections d'eaux claires renfermant, selon le type de gîtes (pneus, jarres, mares, fontaines), d'autres espèces appartenant aux genres *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* et *Toxorhynchites*. En ce qui concerne les simulies, nos premières prospections ont eu lieu sur le fleuve Sanaga où une dizaine de prélèvements a été effectuée au niveau d'un important gîte larvaire situé à moins d'une centaine de kilomètres de Yaoundé.

Aucun champignon, virus et nématode parasite n'a été découvert à ce jour mais 350 bactéries sporogènes ont été isolées. Six d'entre elles, prélevées dans des collections d'eaux usées, présentent une forte toxicité vis à vis des larves de *C. quinquefasciatus* et d'*A. gambiae* et une faible toxicité vis à vis des larves d'*A. aegypti*. L'observation microscopique, après coloration de ces 6 souches, a montré qu'elles étaient toutes constituées de bacilles Gram positif possédant une spore subterminale, ronde et déformante. Le microscope à contraste de phase a permis de mettre en évidence pour chacune d'entre elles la présence d'inclusions cristallines, liées aux spores, caractéristiques des souches de *B. sphaericus*. Une analyse plus poussée, réalisée par I. Thiéry et collaborateurs à l'Institut Pasteur de Paris, a montré que toutes ces souches appartenaient au sérotype H5 (taux d'agglutination flagellaire: 25600) et que deux d'entre elles présentaient, vis à vis des larves de *Culex pipiens*, une toxicité supérieure à la souche 2362, autre souche du sérotype H5 qui a déjà atteint le stade de l'utilisation opérationnelle.

4. DISCUSSION

Bien que la toxicité des deux souches isolées soit supérieure à la souche 2362, la différence constatée n'est pas suffisante pour justifier un investissement de la part des firmes industrielles qui désireraient poursuivre des recherches en vue de leur formulation. Cependant, l'isolement de six souches toxiques de *B. sphaericus* confirme l'intérêt porté aux bactéries sporogènes en tant qu'agents potentiels de lutte biologique et le bien-fondé de la création du centre collaborateur qui, après seulement un an de véritable existence, est en mesure de fournir des résultats encourageants avec un rendement qui est en passe d'égaliser celui du "Vector Control Research Centre" de Pondichery en Inde. Le fait que nous n'ayons pas encore isolé d'autres groupes pathogènes ne veut pas dire que ces agents soient inexistantes mais qu'il sont plus rares dans la nature ou encore que les méthodes de prospection ne sont pas optimales. C'est pourquoi, plutôt que d'abandonner ce type de recherches, nous devons intensifier la récolte des prélèvements, afin d'augmenter les chances de leur découverte.

5. CONCLUSIONS

Jusqu'à une époque récente, les agents de lutte biologique n'étaient découverts qu'accidentellement, tels le sérotype H-14 de *B. thuringiensis*, isolé en Israël à partir de larves mortes de moustiques (Margalit, 1990) ou encore la souche 2362 de *B. sphaericus*, isolé au Nigéria à partir d'une simulie adulte (Weiser, 1984). La mise en place de centres de recherche situés en régions endémiques et se consacrant spécifiquement à ce type d'activités devenait par conséquent une nécessité compte-tenu de l'intérêt croissant que manifeste la communauté scientifique pour la lutte biologique. En Afrique intertropicale, quatre autres projets portant sur la recherche et l'identification de nouveaux agents entomopathogènes sont financés par l'OMS (Nigéria, Ghana, Ouganda et Côte d'Ivoire). De notre côté, nous allons tenter dès cette année d'établir des premiers contacts avec les centres de recherche ou (et) de santé de la sous région de l'OCEAC (Gabon, Congo, Guinée Equatoriale, Centrafrique et Tchad) qui manifesteront de l'intérêt pour ce projet et posséderont un personnel qualifié et un minimum d'équipement adapté au travail demandé.

C'est à cette condition que le centre collaborateur de l'OMS sur la recherche, l'isolement et l'identification d'agents de lutte biologiques entomopathogènes en Afrique Centrale méritera véritablement son appellation. Pour chaque pays, la récolte des échantillons s'effectuera en collaboration avec une équipe locale et une première sélection sera réalisée dans le laboratoire d'accueil avant de faire des analyses plus poussées à Yaoundé. Les prélèvements destinés à la recherche de champignons et de virus entomopathogènes ne seront ramenés au centre collaborateur que si l'on possède la preuve de l'origine fongique ou virale de l'infection (les larves nécessaires à l'inoculation peuvent être obtenues à partir de pontes sauvages). La dissection des larves pour la recherche de nématodes parasites

pourra être réalisée sur place pourvu que le laboratoire soit équipé d'un microscope stéréoscopique. Les échantillons destinés à la recherche de bactéries pathogènes seront les seuls à être ramenés à Yaoundé car ils sont faciles à conditionner et le temps nécessaire à leur analyse dépasserait sans doute très largement la durée de la mission.

Il n'y a nul doute qu'il existe dans la nature d'autres agents entomopathogènes que ceux actuellement utilisés ou en passe de devenir opérationnels (*B. thuringiensis*, *B. sphaericus*, *Metarhizium anisopliae*, *Lagenidium giganteum* ...). La recherche de nouveaux agents de lutte biologique doit par conséquent s'intensifier et on ne peut que féliciter toutes initiatives visant à créer des centres de recherche spécialisés dans ce type d'étude. Ce n'est qu'au prix de cet effort que nous pourrions enrichir l'arsenal des micro-organismes entomopathogènes et contribuer à l'essor de la lutte biologique.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier tout particulièrement les autorités sanitaires et administratives du Cameroun pour les facilités qu'elles nous ont accordées au cours des missions que nous avons réalisées à Yaoundé, Ngaoundéré, Garoua, Maroua, Mora et Mokolo.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 BARJAC (H. de), SEBALD (M.), CHARLES (J.-F.), CHEONG (W.H.) et LEE (H.L.), 1990. *Clostridium bifermentans* serovar malaysia, une nouvelle bactérie anaérobie pathogène des larves de moustiques et de simuliés. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 310 (3) : 383-387.
- 2 BREY (P.T.) et REMAUDIÈRE (G.), 1985. Recognition and isolation of *Lagenidium giganteum* Couch. *Bull. Soc. Vector Ecol.*, 10(2) : 90 - 97.

- 3 FEDERICI (B.A.), 1980. Mosquito baculovirus : sequence of morphogenesis and ultrastructure of the virion. *Virology*, 100 : 1-9.
- 4 FEDERICI (B.A.) et LACEY (L.A.), 1987. Intranuclear disease of uncertain etiology in larvae of the blackfly, *Simulium vittatum*. *J. Invertebr. Pathol.*, 50 : 184-190.
- 5 GUILLET (P.), KURTAK (D.C.), PHILIPPON (B.) et MEYER (R.), 1990. Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* for Onchocerciasis control in West Africa. Bacterial control of mosquitoes and black flies, Eds H. de Barjac et D.J. Sutherland. *Rutgers University Press.*, New Brunswick, 11 : 187 - 201.
- 6 HOUGARD (J.M.), 1990. Formulations and persistence of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* larval sites in Tropical Africa. Bacterial control of mosquitoes and black flies, Eds H. de Barjac et D.J. Sutherland. *Rutgers University Press.*, New Brunswick, 19 : 295 - 306.
- 7 KALFON (A.), LARGET-THIERY (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.
- 8 MARGALIT (J.), 1990. Discovery of *Bacillus thuringiensis israelensis*. Bacterial control of mosquitoes and black flies, Eds H. de Barjac et D.J. Sutherland. *Rutgers University Press.*, New Brunswick, 1 : 3 - 9.
- 9 NICOLAS (L.), DOSSOU-YOVO (J.) et HOUGARD (J.M.), 1987. Persistence and recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 spores in *Culex quinquefasciatus* breeding sites in West Africa. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25 : 341-345.
- 10 WEISER (J.), 1984. A mosquito-virulent *Bacillus sphaericus* in adult *Simulium damnosum* from Northern Nigeria. *Zbl. Mikrobiol.*, 139 : 57 - 60.