

Dossier 1988

CAMPAGNE PILOTE DE LUTTE ANTILARVAIRE CONTRE CULEX  
QUINQUEFASCIATUS EN MILIEU URBAIN (YAOUNDE, CAMEROUN). UTILISATION  
D'UN INSECTICIDE BIOLOGIQUE.(1)

1. Essais préliminaires sur les insecticides

par

J.M./HOUGARD (2) Jean Marc  
R. MBENTENGAM (3)  
L./LOCHOUARN (4) Laurence  
H./ESCAFFRE (2) Henri  
D./QUILLEVERE (2) Daniel

Document d'Entomologie médicale  
et de parasitologie N°11/88.

- 
- (1) Ce travail a reçu une subvention du PNUD/Banque Mondiale/Programme Spécial  
OMS pour la Recherche et la Formation sur les Maladies Tropicales.  
(2) Entomologiste médical de l'ORSTOM - Centre Pasteur du Cameroun, B.P. 1274  
Yaoundé - CAMEROUN.  
(3) Technicien principal en Génie sanitaire de la Médecine Préventive et de  
l'Hygiène Publique du Cameroun, U.L.A.V.E., BP 2041 Yaoundé, CAMEROUN.  
(4) Allocataire de recherche du Ministère Français de la Recherche et de  
l'Enseignement supérieur, Centre Pasteur du Cameroun.

30 JAN. 1996

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire

N° : 43707

Cote : B ex 1

## Résumé

Les auteurs décrivent dans cet article les expérimentations de Laboratoire et de terrain qui ont permis de sélectionner l'insecticide le plus approprié pour une campagne pilote de lutte contre les larves de Culex quinquefasciatus dans la ville de Yaoundé (Cameroun).

Un début de résistance au chlorpyrifos compromet l'utilisation de cet organophosphoré pour une campagne de lutte à grande échelle et de longue durée.

Un concentré liquide d'un insecticide biologique, Bacillus sphaericus garde son efficacité durant plus de trois mois, dans les eaux polluées, à la dose de 10 g/m<sup>2</sup>. Le titre de cette formulation a été déterminé au laboratoire. Il permettra, tout au long de la campagne pilote, de suivre l'évolution de la sensibilité des moustiques à la toxine bactérienne et de contrôler la stabilité, en milieu tropical, de la formulation industrielle.

## Summary

The authors describe, under laboratory and field conditions, the experiments who conducted to the selection of the more suitable compound for a Culex quinquefasciatus larval control campaign in Yaoundé (Cameroon) :

- a slight level of resistance to chlorpyrifos jeopardizes the use of this organophosphorus compound for operational trials ;
- a liquid concentrate of a biological control agent, Bacillus sphaericus, keeps its toxicity in sewage water during three months at a high dosage (10 g/m<sup>2</sup>);
- the potency of this formulation has been evaluated. Bioassays will be carried out during the two years of larviciding in order to follow the evolution of the susceptibility of C. quinquefasciatus to the bacterial toxin and to control the stability, under tropical conditions, of the industrial formulation. -

## 1. INTRODUCTION

Dans les agglomérations urbaines situées en zone tropicale, les réservoirs d'eaux usées constituent des gîtes particulièrement propices au développement des larves de Culex quinquefasciatus (Say, 1823), moustique vecteur de filariose de Bancroft.

La méthode la plus appropriée pour combattre efficacement ce moustique passe par une lutte antilarvaire. Cependant cette espèce a semble-t-il un patrimoine génétique très riche lui permettant de s'adapter plus ou moins rapidement à des conditions écologiques très variées et notamment de constituer des populations résistantes aux insecticides (Hamon et Mouchet, 1967). C'est ainsi que C. quinquefasciatus est actuellement résistant aux composés organochlorés sur toute l'étendue de son aire de répartition ainsi qu'à un grand nombre de composés organophosphorés. La recherche et l'évaluation de l'efficacité de nouvelles classes d'insecticides sont désormais devenues une priorité dans la mesure où l'arsenal dont disposent les hygiénistes atteint désormais un seuil critique.

De nombreux analogues de régulateurs de croissance sont produits par l'industrie depuis les années 1970. Bien que les insectes soient capables de développer des résistances à ces composés (Georghiou et al., 1974), deux d'entre eux, le méthoprène et le diflubenzuron, ont été utilisés avec succès contre certaines espèces de moustiques et des molécules récemment synthétisées sont encore plus toxiques et plus stables, particulièrement dans les eaux usées (Doannio et al., 1986 ; Darriet et al., 1987).

Parmi les agents de lutte biologique, une bactérie entomopathogène, Bacillus sphaericus (Neide, 1904) semble particulièrement adaptée à la lutte contre C. quinquefasciatus et une formulation commerciale a déjà donné des résultats prometteurs lors d'évaluations à échelle réduite sur le terrain (Hougard et Nicolas, 1986).

Cet insecticide biologique a été retenu pour la campagne pilote de lutte antilarvaire à Yaoundé. La première partie de cette publication décrit les différentes expérimentations de laboratoire et de terrain qui nous ont conduits à sélectionner une formulation de B. sphaericus. Le second article fait état des prospections des gîtes préimaginaux dans la zone d'étude. Le troisième article est consacré aux techniques d'étude relatives à la mise en route des premiers traitements et le dernier article rend compte des résultats de cette campagne après deux années de lutte antivectorielle.

## 2. ESSAIS PRELIMINAIRES SUR LES INSECTICIDES

### 2.1. TESTS DE SENSIBILITE

Avant de mettre en place une campagne de lutte basée sur l'utilisation d'une bactérie entomopathogène, nous avons tenu à faire le point, dans la zone d'étude, sur l'état de la résistance de C. quinquefasciatus au chlorpyrifos (organophosphoré), l'insecticide chimique le plus fréquemment utilisé pour le traitement des eaux polluées.

#### - Méthode

Les tests de sensibilité sont réalisés selon la méthode préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (Anonyme, 1981) sur une souche locale de C. quinquefasciatus prélevée dans la ville de Yaoundé et maintenue en élevage au laboratoire. L'exploitation statistique des résultats permet de définir la concentration du produit technique de cet insecticide qui provoque 50 % de mortalité larvaire (CL 50). Le rapport de la CL 50 d'une souche sensible (souche de référence) avec la CL 50 obtenue lors de nos tests permet de définir le taux de résistance.

#### - Résultats

Afin d'établir le degré de sensibilité de la souche de Yaoundé, nous avons comparé nos résultats avec ceux obtenus avec des souches de différentes origines (tableau 1).

Provenance	CL 50 (mg/l)	Intervalle de confiance	Taux de résistance
Souche sensible (Georghiou <u>et al.</u> , 1966)	0.00094	0.00089 / 0.0010	1.0
Yaoundé (Cameroun)	0.0029	0.0027 / 0.0032	3.1
Bouaké (Côte d'Ivoire) (Magnin <u>et al.</u> , 1988)	0.0033	0.0028 / 0.0037	3.5
Zanzibar (Tanzanie) (Curtis et Pasteur, 1981)	0.0236	-	25.1

Tableau 1 : comparaison de la sensibilité de différentes souches de C. quinquefasciatus au chlorpyrifos (produit technique).  
Détermination du taux de résistance.

- Discussion

La souche de Georghiou fait partie des souches dont la CL 50 n'excède jamais 0.001 mg/l. Elle peut donc être considérée comme souche de référence au même titre que la LONMol de Londres ou la CfCA du Sri Lanka. Les taux de résistance enregistrés à Yaoundé et Bouaké ne sont guère élevés comparativement à celui enregistré en Tanzanie. Cependant, il est fort probable qu'un traitement à grande échelle au chlorpyrifos aggraverait ce phénomène au point de rendre rapidement cet insecticide inefficace, comme c'est le cas actuellement en Tanzanie (Curtis et al., 1984).

2.2. REMANENCE DE B. SPHAERICUS

Pour un insecticide donné, la formulation joue un rôle prédominant lorsqu'il s'agit d'une campagne de lutte de grande envergure, qu'elle soit dirigée contre les larves ou contre les adultes. En ce qui concerne le traitement des eaux polluées, la formulation doit être efficace à faible dose tout en persistant le plus longtemps possible dans la zone de nutrition des larves (rémanence).

Aussi avons nous comparé, dans les conditions naturelles et à échelle réduite, les performances de trois formulations de B. sphaericus : une poudre mouillable de la souche 2362 (ABG-6232) et deux concentrés liquides de la souche 2362 (ABG-6262 et BSP) provenant de deux firmes différentes.

- Méthode

Pour chaque formulation, neuf gîtes larvaires, permanents et riches en larves de C. quinquefasciatus (puisards), ont été traités à trois concentrations différentes à raison de trois puisards par concentration. La toxicité immédiate de l'insecticide est évaluée 48 heures après le traitement. La rémanence est ensuite déterminée par un suivi de la dynamique de la population préimaginale jusqu'à réapparition des nymphes de C. quinquefasciatus.

- Résultats

Quelles que soient la formulation et la concentration, les gîtes larvaires n'hébergent plus de larves de C. quinquefasciatus, 48 heures après le traitement. Les résultats concernant la rémanence de chaque formulation, pour une concentration et un gîte donnés, figurent dans le tableau 2.

	CONCENTRATION (en gramme de formulation par m <sup>2</sup> de gite)		
	0.1	1	10
Poudre mouillable (ABG-6232)	21 jours - -	18 jours 35 jours -	18 jours 48 jours -
Concentré liquide (ABG-6262)	7 jours 7 jours -	14 jours 14 jours -	14 jours 14 jours 21 jours
Concentré liquide (BSP)	12 jours 12 jours 18 jours	37 jours 32 jours -	> 90-120 jrs < > 90-120 jrs < -

Tableau 2: rémanence de trois formulations de B. sphaericus dans des gites larvaires à C. quinquefasciatus.  
(-) : puisard asséché ou traité par un insecticide chimique

- Discussion

A faible dose (0.1 g/m<sup>2</sup>), la poudre mouillable semble persister plus longtemps que les concentrés liquides. Cependant, la rémanence du BSP augmente avec la concentration (plus de trois mois à 10 g/m<sup>2</sup>) tandis qu'aucune relation ne semble exister entre ces deux facteurs pour les autres formulations.

Le concentré liquide BSP a déjà fait l'objet d'une évaluation à petite échelle, en Côte d'Ivoire (Nicolas et al., 1987), en Tanzanie (Minjas, comm. pers.) et à Mayotte (Hougard, 1988 et Ali Halidi, comm. pers.). La rémanence à 10 g/m<sup>2</sup> est supérieure à 6 semaines en Côte d'Ivoire et à Mayotte et à peu près identique aux résultats de Yaoundé, à Dar es Salaam en Tanzanie (12 semaines).

A une dose opérationnelle dix fois moins élevée (1 g/m<sup>2</sup>), le chlorpyrifos possède également une rémanence d'environ trois mois (Bang et al., 1975). Cependant, la résistance de ce C. quinquefasciatus à cet insecticide augmente considérablement la fréquence des traitements, ce qui est le cas, par exemple, de Dar es Salaam où les services d'hygiène de la ville sont obligés de renouveler les traitements tous les 15 jours (Curtis et al., 1984).

### 2.3. TITRAGE BIOLOGIQUE

Compte-tenu de la nature protéique complexe et mal connue des toxines élaborées par B. sphaericus, il est impossible, contrairement aux insecticides classiques, de doser chimiquement la matière active de cette bactérie. Nous avons alors recours à une méthode basée sur le titrage biologique d'une poudre lyophilisée, ayant statut de standard international, dont le titre est déterminé arbitrairement en Unités Internationales de Toxicité pour un insecte donné (I.T.U./mg).

Dans le cadre de notre étude, l'intérêt du titrage biologique est double : il permet d'une part de déterminer, avant que ne s'exerce la pression insecticide, la sensibilité de base de C. quinquefasciatus à B. sphaericus, d'autre part de contrôler la qualité de la formulation opérationnelle tout au long des deux années de traitement.

#### - Méthode

Le titrage biologique est réalisé selon la méthode préconisée par l'Organisation Mondiale de la Santé (Anonyme, 1985). Les larves sont traitées au stade 3 jeune et la lecture de la mortalité a lieu après 48 heures. Le standard international utilisé est une poudre lyophilisée de B. sphaericus souche 1593, titrant 1 000 I.T.U./mg.

#### - Résultats

L'exploitation statistique des résultats selon la loi gaussio-logarithmique permet d'établir une droite de régression (Fig. 2) et de définir, pour la poudre lyophilisée et le concentré liquide, les concentrations léthales 50 (CL 50) et 95 (CL 95).

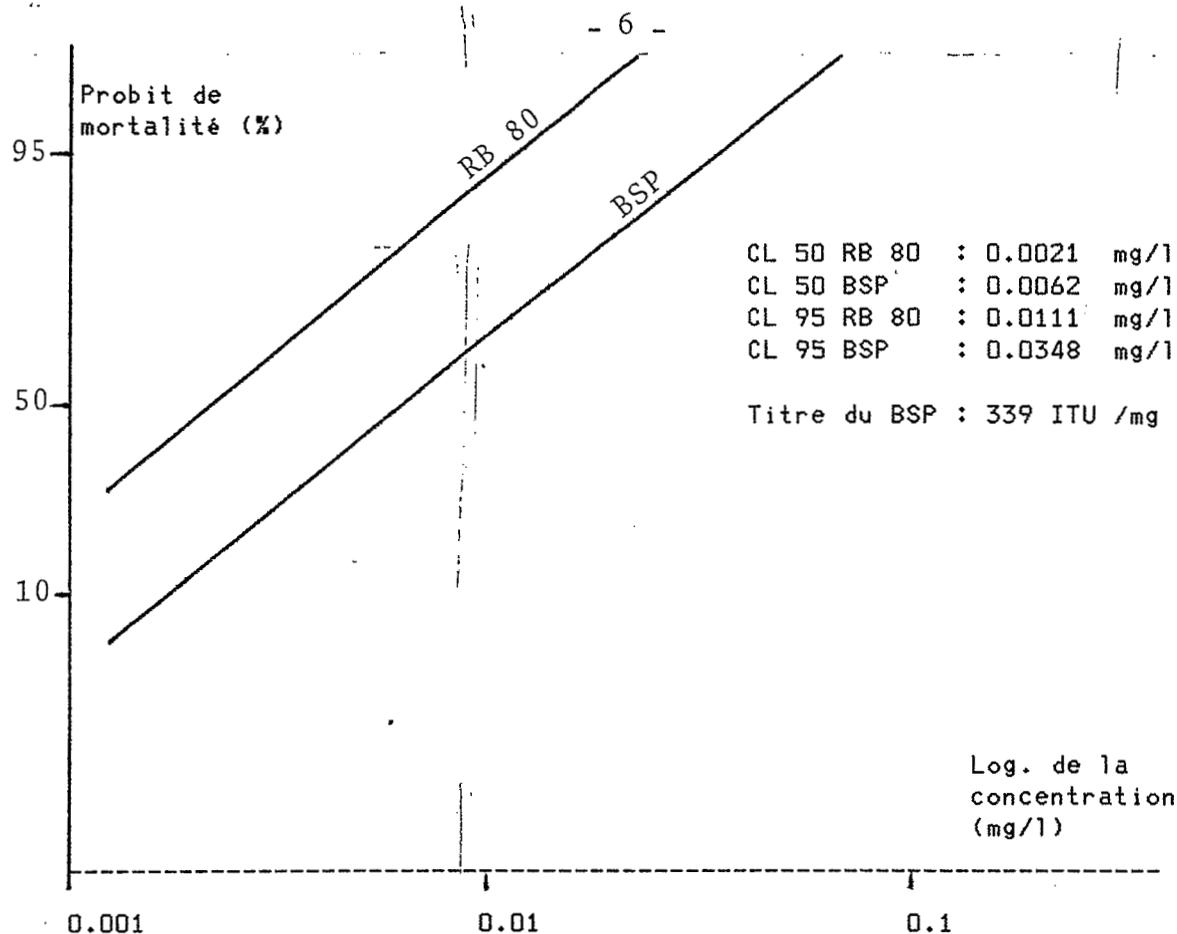


Figure 2 : Représentation graphique des résultats d'un titrage biologique d'une poudre lyophilisée (RB 80) et d'un concentré liquide (BSP) de B. sphaericus sur des larves de C. quinquefasciatus. Yaoundé, décembre 1987.

#### - Discussion

Un titrage biologique réalisé à Bouaké en Côte d'Ivoire, dans les mêmes conditions expérimentales, a permis d'estimer la CL 50 de la poudre lyophilisée RB 80 à 0.00212 mg/l (Hougard et al., 1985), soit une valeur pratiquement identique à celle de Yaoundé (0.00207 mg/l). Par conséquent, les sensibilités des souches "Yaoundé" et "Bouaké" peuvent être considérées comme équivalentes.

Le titre du concentré liquide de BSP évalué à Yaoundé (339 ITU/mg) est sensiblement le même que celui de Bouaké (355 ITU/mg, Nicolas et Dossou-Yovo, comm. pers.). Compte-tenu des sensibilités équivalentes des deux souches de moustiques, il semblerait que la formulation de BSP produite en 1987 ait la même efficacité que celle produite en 1984. Cependant, la plus grande rémanence observée à Yaoundé, dans les conditions naturelles, incite à penser que les caractéristiques physiques de la récente formulation soient mieux adaptées à la lutte contre Culex quinquefasciatus dans les eaux usées.

- stabilité de la formulation BSP

Guillet et al. (1982) montre qu'un concentré liquide de Bacillus thuringiensis H-14 peut être emmagasiné plus de 12 mois en milieu tropical sans altération de sa toxicité et qu'il peut être produit industriellement tout en gardant une efficacité constante. Le titrage biologique que nous venons de réaliser sera répété environ une fois tous les six mois afin de contrôler la stabilité du concentré liquide de B. sphaericus par comparaison du titre des échantillons prélevés.

- détection précoce de la résistance

En santé publique, aucun cas de résistance à des bactéries entomopathogènes n'a été signalé, si ce n'est au laboratoire, à la delta endotoxine de B. thuringiensis (Georghiou et al., 1983 ; Goldman et al., 1986).

A l'heure actuelle, aucune formulation de B. sphaericus n'a été utilisée pour une campagne de lutte à grande échelle et de longue durée. Cependant, bien qu'une résistance paraisse improbable, nous allons suivre l'évolution, durant les deux années de traitement, de la sensibilité de C. quinquefasciatus à cette bactérie. Le titrage biologique que nous avons réalisé sur une souche sensible sera répété tous les six mois avec des moustiques issus de pontes prélevées dans la zone d'étude. La comparaison de la pente de la droite de régression et de la CL 95, dite dose diagnostique, seront les indicateurs les plus sensibles pour détecter un éventuel début de résistance.

#### 4. CONCLUSIONS

Le chlorpyrifos est à l'heure actuelle le larvicide chimique le plus couramment utilisé pour la lutte contre C. quinquefasciatus dans les eaux polluées. Cependant, un début de résistance a été constaté à Yaoundé et l'utilisation de cet organophosphoré est compromise pour une campagne de grande envergure.

Lors de traitements à grande échelle nécessitant un personnel nombreux et des moyens logistiques importants, il est beaucoup plus rentable d'avoir recours à des traitements espacés dans le temps même si cela doit augmenter la dose opérationnelle (Hougard et Nicolas, 1986).

Aussi les traitements opérationnels seront réalisés avec le concentré liquide BSP de B. sphaericus. La campagne pilote de lutte entreprise à Yaoundé représente la dernière étape de l'évaluation de cet agent de lutte biologique qui, jusqu'à présent, n'a jamais fait l'objet d'essais à si grande échelle et de si longue durée. Après plusieurs cycles de traitements, nous serons alors en

mesure de déterminer un certain nombre de paramètres impossibles à déterminer au cours des essais préliminaires tels que l'impact des traitements larvicides sur la nuisance culicidienne et sur la faune non-cible, l'évolution de la sensibilité de C. quinquefasciatus à B. sphaericus, et la stabilité d'une formulation produite industriellement et stockée en milieu tropical.

Après ces essais préliminaires sur les insecticides, il s'agit maintenant de sélectionner une zone d'étude présentant les meilleures conditions d'expérimentation et de réaliser une prospection détaillée des gîtes préimaginaux. Ces données, préalables à toute campagne de lutte de grande envergure, font l'objet du second article de cette publication.

#### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier tout particulièrement:

- le Ministère de la Santé Publique et la Direction de la Médecine Préventive et de l'Hygiène Publique du Cameroun pour l'intérêt et le soutien qu'ils nous ont apportés ;
- le personnel du service d'entomologie médicale du Centre Pasteur du Cameroun ainsi que les agents en Génie Sanitaire de l'Unité de Lutte Antivectorielle et d'Entomologie (U.L.A.V.E.) pour leur collaboration technique.
- les firmes SOLVAY et ABBOTT pour les échantillons d'insecticides biologiques qu'ils ont bien voulu nous faire parvenir.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANONYME, 1981. - Instructions à suivre pour déterminer la sensibilité ou la résistance des larves de moustiques aux insecticides. Doc. miméo. non publié WHO/VBC/81.807, 5 p.

ANONYME, 1985. - Informal consultation on the development of Bacillus sphaericus as a microbial larvicide. Doc. miméo. non publié WHO/VBC/85.3, 24 p.

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.

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.

DARRIET (F.), ROBERT (V.) et CARNEVALE (P.), 1987. - Evaluation de trois inhibiteurs de croissance, deux ecdysoides et un juvénoïde, dans la lutte contre Culex quinquefasciatus. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 25(3-4) : 119-126.

DOANNIO (J.M.C.), HOUGARD (J.M.), DOSSOU-YOVO (J.) et DUVAL (J.), 1986. - Evaluation en milieu naturel de l'activité de trois analogues de régulateurs de croissance, l'OMS 3007, l'OMS 3010 et l'OMS 3019, sur Culex quinquefasciatus en Afrique de l'Ouest. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 24(4) : 287-291.

GEORGHIOU (G.P.), BAKER (J.), AL-KHATIB (Z.), MELLON (R.), MURRAY (C.), TRAN (C.), VASQUEZ (H.), PELSUE (F.) et HAZELRIGG (J.), 1983. - Insecticide resistance in mosquitoes : research on new chemicals and techniques for management. In "Mosquito Control Research, Annual Report 1983, University of California".

GEORGHIOU (G.P.), LIN (C.S.) et PASTERNAK (M.E.), 1974. - Assessment of potentiality of Culex tarsalis for development of resistance to carbamate insecticides and insect growth regulators. Proc. Papers Calif. Mosq. Control Assoc., 42 : 117-118.

GEORGHIOU (G.P.), METCALF (R.L.) et GIDDEN (F.E.), 1966. - Carbamate resistance in mosquitoes : 1. Selection of Culex quinquefasciatus Say for resistance to Baygon. Bull. W.H.O., 35 : 691-708.

GOLDMAN (I.F.), ARNOLD (J.) et CARLTON (B.C.), 1986. - Selection for resistance to Bacillus thuringiensis subspecies israelensis in field and laboratory populations of the mosquito Aedes aegypti. J. Invertebr. Pathol., 47 : 317-324.

GUILLET (P.), ESCAFFRE (H.) et PRUD'HOM (J.M.), 1982. - L'utilisation d'une formulation de Bacillus thuringiensis H-14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. II - Stabilité dans les conditions de stockage en milieu tropical. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 20(3) : 181-185.

HAMON (J.) et MOUCHET (J.), 1967. - La résistance aux insecticides chez Culex pipiens fatigans Wiedemann. Bull. Org. mond. Santé, 37 : 277-286.

HOUGARD (J.M.), 1988. - Lutte antilarvaire contre Culex quinquefasciatus dans l'île de Mayotte : utilisation d'une formulation commerciale de Bacillus sphaericus. Doc. Ent. méd et Parasitol. du Centre Pasteur du Cameroun N°2/88, 9 p.

HOUGARD (J.M.), DOANNIO (J.M.C.), DUVAL (J.) et ESCAFFRE (H.), 1985. - Titrage biologique, en Afrique de l'Ouest, de différentes souches de Bacillus sphaericus Neide, 1904 sur une souche locale de Culex quinquefasciatus Say, 1823. Doc. miméo. O.C.C.G.E. N°7/IRTO/Rap/85.

HOUGARD (J.M.) et NICOLAS (L.), 1986. - Evaluation de Bacillus sphaericus dans les gîtes larvaires à Culex quinquefasciatus en Afrique tropicale. IVème Congrès sur la Protection de la Santé Humaine et des Cultures en Milieu Tropical. Marseille, 2 juillet 1986.

MAGNIN (M.), MARBOUTIN (E.) et PASTEUR (N.), 1988. - Insecticide resistance in Culex quinquefasciatus (Diptera : Culicidae) in West Africa. J. Med. Entomol., 25 (2) : 99-104.

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. Applied Microbiology and Biotechnology, 25 : 341-345.