

O.R.S.T.O.M.
Institut Français de Recherche Scientifique
pour le Développement en Coopération

CENTRE DE NOUMEA

ETUDE DE L'ACTIVITE ACARICIDE DES EXTRAITS
D'ORGANISMES MARINS DE NOUVELLE-CALEDONIE
SUR BOOPHILUS MICROPLUS

L.O. BRUN - C. DEBITUS - C. MARCILLAUD - D. DUHET - D. LAURENT

LABORATOIRE
DE
ZOOLOGIE APPLIQUEE

LABORATOIRE
DES
SUBSTANCES NATURELLES

- 1985 -



INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
POUR LE DEVELOPPEMENT EN COOPERATION
O.R.S.T.O.M.

ETUDE DE L'ACTIVITE ACARICIDE DES EXTRAITS D'ORGANISMES
MARINS DE NOUVELLE-CALEDONIE SUR BOOPHILUS MICROPLUS

L.O. BRUN - C. DEBITUS - C. MARCILLAUD - D. DUHET - D. LAURENT

Laboratoire de Zoologie Appliquée - Laboratoire des Substances Naturelles

S O M M A I R E

	Pages
I INTRODUCTION	1
II MATERIEL ET METHODES	3
II 1 Récolte des organismes	3
II 2 Conservation - Extraction - Préparation des supports	4
- Conservation	
- Extraction	
- Préparation des supports	
II 3 Matériel biologique et test acaricide	6
- Matériel biologique	
- Test acaricide	
III RESULTATS ET DISCUSSION	8
IV CONCLUSION	12
BIBLIOGRAPHIE	14
ANNEXES	17-24

I INTRODUCTION :

En Nouvelle-Calédonie trois espèces de tiques ont jusqu'à présent été signalées sur les mammifères domestiques : Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806), Haemaphysalis longicornis Neumann, 1901 et Boophilus microplus (Canestrini, 1882).

La tique du chien R. sanguineus et H. longicornis, espèce à trois hôtes, n'ont pas d'incidence économique notable. Par contre la tique du bétail B. microplus entrave de façon très importante le développement de l'élevage bien que les agents pathogènes généralement transmis par les Ixodidae (*Babesia* spp., *Theileria* spp. et *Anaplasma* sp.) ne semblent pas présents en Nouvelle-Calédonie.

Depuis son introduction accidentelle vers 1942 (Verges, 1944) les sommes investies dans la lutte contre cet ectoparasite n'ont cessé d'augmenter. La seule part consacrée aux produits acaricides a quintuplé au cours des dix dernières années.

Les recherches actuelles de nouvelles molécules actives sur acariens hématophages sont le prolongement logique des études menées ces dernières décades par l'ORSTOM sur B. microplus.

Les premiers travaux sur les acariens ont porté sur la systématique de ce groupe ainsi que sur l'inventaire des espèces (Rageau, 1958, 1967, Rageau & Vervent, 1959); les recherches se sont ensuite orientées vers la dynamique des populations de la tique du bétail (Daynes & Gutierrez, 1980) ainsi que vers les problèmes liés à l'utilisation des insecticides (Cochereau, 1971 a et b, Brun, 1984 et Brun & Colas, 1986).

Enfin, ces dernières années, les aléas rencontrés en diverses zones d'élevage par la lutte chimique ont incité l'ORSTOM à mettre en place une opération de recherches sur l'étude de la résistance de B. microplus à divers acaricides (Daynes et al., 1980 ; Brun, 1982 ; Brun et al., 1983 ; Brun, 1986).

.../...

Ces phénomènes de résistance sont une composante devenue classique de la lutte contre les Arthropodes. Depuis le premier cas de résistance au DDT signalé en 1946 sur mouche domestique, plus de 432 espèces ont développé des souches résistantes à un ou plusieurs insecticides. Il s'est alors établi une situation de compétition entre l'industrie chimique des insecticides et la sélection par les Arthropodes de souches aptes à survivre à des doses et à des produits jusqu'alors mortels. Ces dernières décades, cette compétition a tourné au désavantage de l'industrie chimique (Day et Georghiou, 1982).

Les principales raisons de cette situation sont les suivantes :

- Les critères de sélection des nouvelles molécules sont devenus plus restrictifs (recherche d'une plus grande spécificité d'action, préservation de la faune non-cible ainsi que de celle des auxiliaires, biodégradation rapide des produits toxiques...).
- Le nombre de produits à tester et la complexité des molécules à synthétiser pour sélectionner un nouveau composé commercialisable, n'ont cessé d'augmenter.
- La durée de vie des nouvelles molécules, qui correspond à la période d'amortissement des recherches qui ont permis de les synthétiser, a tendance à diminuer du fait des phénomènes de résistances croisées.

Comme dans tous les pays où la protection des races bovines améliorées nécessite des traitements fréquents et répétés, il y a eu en Nouvelle-Calédonie sélection de souches de tiques résistantes aux produits successivement utilisés. Cependant les mécanismes qu'utilisent les insectes et acariens pour déjouer l'action nocive des insecticides sont limités.

C'est donc dans l'optique de trouver de nouvelles molécules faisant appel à d'autres modes d'action que le laboratoire d'entomologie collabore aux recherches sur les substances marines du laboratoire des Substances Naturelles du Centre ORSTOM de Nouméa. Ces recherches se poursuivent actuellement dans le cadre du programme commun ORSTOM/CNRS "Substances Marines d'Intérêt Biologique" (S.M.I.B.).

II MATERIEL ET METHODES :

Les extraits d'organismes marins de Nouvelle-Calédonie subissent simultanément une série de tests qui visent à déterminer leur spectre d'activité biologique dans divers domaines :

- Antifongique, testé sur Fusarium oxysporum, Penicillium italicum, Phytophthora parasitica.
- Antibactérien, testé sur Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa.
- Toxicité sur les crustacés (Artemia salina) et sur les poissons ("guppies").
- Cytotoxicité sur cellules Kb pour recherche d'activité antitumorale.
- Insecticide, testé sur Aedes aegypti, A. polynesiensis et Culex quinquefasciatus à Papeete.
- Acaricide, sur Boophilus microplus.

Les recherches destinées à déterminer cette dernière activité font l'objet du présent rapport.

II 1 Récolte des organismes :

Les récoltes sont effectuées de façon régulière tout au long de l'année, à raison de 5 à 8 jours de prospection par mois. Ces prospections sont menées soit par plongée autonome dans le lagon Néo-Calédonien à partir de la vedette océanographique "Dawa" à des profondeurs allant jusqu'à 60m, soit par dragage ou chalutage à des profondeurs de 200 à 600m, grâce au navire océanographique "Vauban".

Au cours des derniers mois, trois missions par dragage et chalutage ont eu lieu, d'une part entre les Loyauté et la Grande Terre, (Septembre 1985 - N.O.* Charcot), d'autre part entre les Belep et le Nord de la Grande Terre (Septembre 1985 - N.O. Vauban), enfin dans la zone Sud-Est de la Grande Terre (Février 1986-N.O. Vauban).

Les quantités d'organismes frais recherchées pour une espèce donnée sont de l'ordre du kilo lors des plongées autonomes et de 5 à 15kg lors des dragages et chalutages. Une fois remontés à bord, les organismes sont triés et immédiatement congelés afin d'éviter toute altération des produits instables.

II 2 Conservation - Extraction - Préparation des supports :

Conservation :

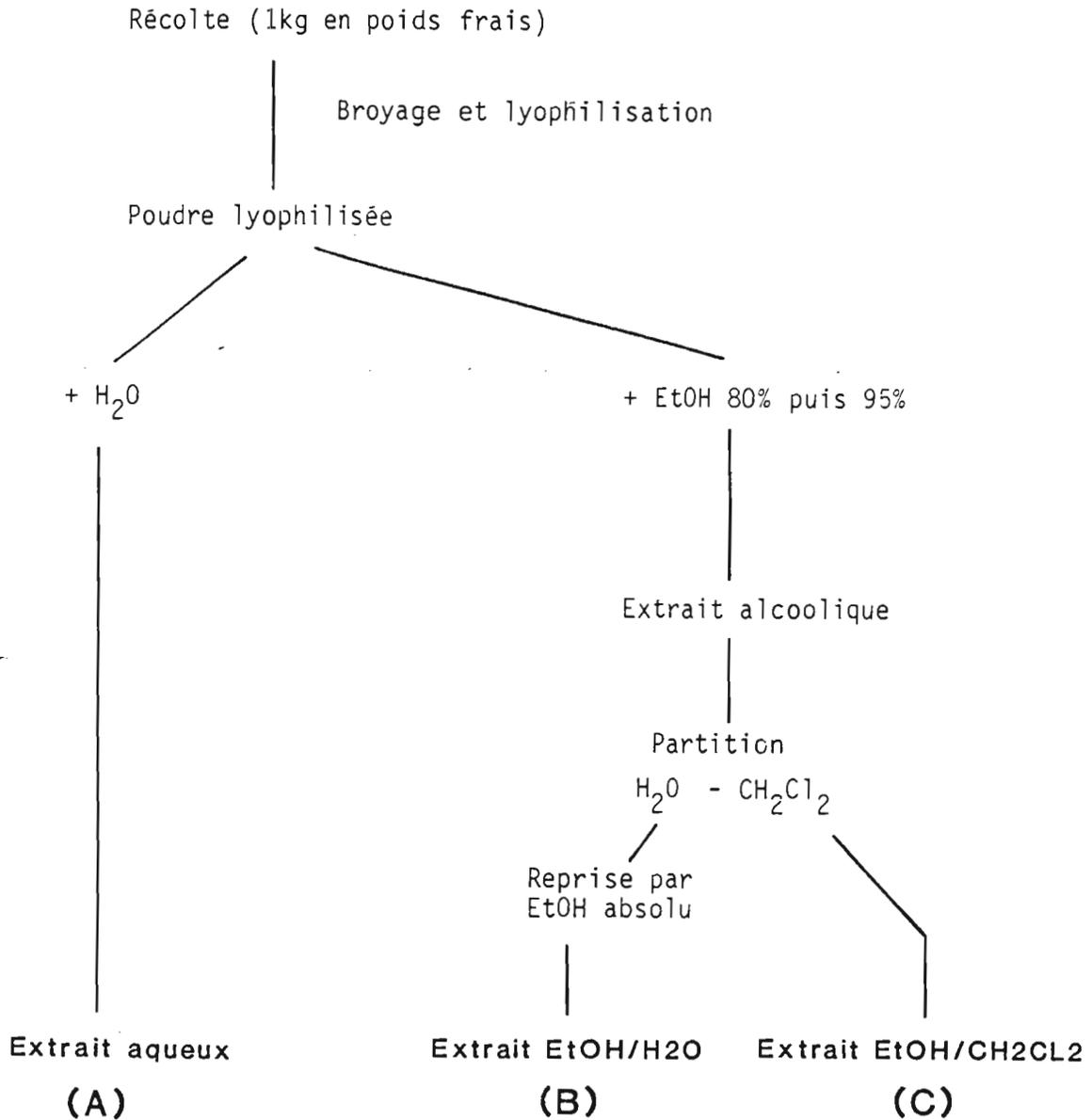
Au laboratoire, les organismes récoltés sont broyés puis lyophilisés afin d'être stockés avant l'extraction des différentes fractions. Cette extraction a généralement lieu au plus dans les deux à trois semaines suivant la récolte. Elle porte, selon les invertébrés, sur des poids de 100 à 250g. d'organismes lyophilisés obtenus à partir d'un kilo en poids frais.

Extraction :

Le schéma simplifié ci-après montre les différents extraits obtenus :

- Extrait A, obtenu par extraction aqueuse à froid (4°C) et à l'obscurité, après filtration et centrifugation. Cet extrait provient du tiers du poids total traité et comprend les produits très polaires, tels les protéines, peptides, sels... (voir Annexe A).
- Extraits B et C : les deux tiers du lyophilisat sont tout d'abord traités par agitation à température ambiante, successivement dans l'alcool à 80% et 96%. Après évaporation de l'alcool, la phase aqueuse est reprise avec du chlorure de méthylène .

RECOLTE ET EXTRACTION



Les deux phases sont ensuite séparées pour donner :

. l'extrait B (phase aqueuse). Cette fraction, après lyophilisation est reprise par l'alcool absolu qui permet de séparer les sels minéraux des produits à polarité moyenne tels les acides aminés, alcools et phénols, les sucres ainsi que des aminés primaires et secondaires.

.../...

. l'extrait C (phase chlorométhylénique) regroupe tous les produits très peu polaires tels les terpènes, stéroïls, acides gras... (voir Annexe B).

Préparation des supports :

Des papiers filtres (Whatman n° 1) rectangulaires de 25cm² sont utilisés pour les tests. Sur chaque papier sont notées: la référence de l'échantillon, la fraction de l'extrait ainsi que la concentration en produits.

Les extraits bruts sont généralement testés à 5 et 25mg par feuille (soit 0,2 et 1 mg/cm²).

L'imprégnation des papiers nécessite 0,5ml de solution répartie régulièrement sur toute la surface à l'aide d'une micropipette. Après imprégnation les papiers sont séchés à l'étuve (37°C) sur les pointes de planchettes cloutées.

Quand les résultats sont positifs (mortalité constante et supérieure à 60% sur au moins deux expériences) un fractionnement chimique est effectué, l'activité acaricide étant contrôlée à chaque étape du processus de purification.

Par souci d'économie des fractions actives, les derniers tests sont effectués sur des papiers au 1/4 des surfaces utilisées lors des tests sur les organismes eux-mêmes (soit environ 6 cm²).

La conservation des papiers se fait par stockage entre des feuilles d'aluminium, à température ambiante ; les tests acaricides ont généralement lieu 24 à 48h après préparation des papiers.

II 3 Matériel biologique et test acaricide :

Matériel biologique :

Les femelles de tiques gorgées sont récoltées régulièrement sur des bovins, à partir de l'abattoir central de Bourail. A leur récolte les tiques sont placées dans des boîtes isothermes afin d'être ramenées sans

dommage au laboratoire, la chaleur et la dessiccation pouvant provoquer une mortalité importante.

Au laboratoire les femelles sont collées individuellement sous le couvercle de boîtes plastiques, à l'aide d'un ruban adhésif double face. Ce procédé permet une ponte normale et facilite la récolte ultérieure des oeufs pondus. La ponte commence dans les 24 à 72 heures après la récolte et s'échelonne sur une à deux semaines. Pendant cette période chaque femelle pond de 2 000 à 3 000 oeufs.

Avant l'éclosion qui a lieu dans les conditions d'élevage (27°C et 80-90% H.R.) au bout de 28 jours, chaque ponte est transférée au fond d'un tube plastique ouvert et placé verticalement sur une boîte de pétri entourée d'une double barrière d'eau additionnée d'un mouillant. A leur éclosion les larves F1, animées d'un géotropisme négatif montent vers le bord supérieur des tubes où elles se regroupent en grappes. Un comportement semblable peut être noté dans la nature où les jeunes larves montent au bout des tiges d'herbe pour attendre le passage éventuel d'un hôte.

Tests insecticides :

Les recherches menées par Stone et Haydock (1962) ont montré que les tests effectués sur les jeunes larves de première génération donnaient les résultats les plus constants et reproductibles. En effet, les résultats de la technique d'immersion des femelles gorgées sont soumis à des variations imprévisibles et cette technique est à réserver en particulier pour les études qui visent à connaître les actions éventuelles sur la ponte et l'éclosion des oeufs (Van Puyvelde et al., 1985).

Après des essais préliminaires, nous avons donc adopté la technique de Stone et Haydock modifiée de façon à pouvoir noter, à partir des extraits bruts, l'effet acaricide de certains de leurs composés. Cette action a donc été testée par contacts tarsals, sur des lots de 100 à 150 larves enfermées dans des pochettes de papier filtre imprégnés des extraits à étudier. Le temps de contact adopté par la FAO (Anon., 1971) de 24h a été triplé de façon à révéler une efficacité faible ou plus lente du fait de la complexité des extraits bruts testés. C'est donc après 72h de contact que le décompte de la mortalité a été fait.

Le critère de mortalité retenu est l'absence de mouvement de déplacement quand les larves sont touchées avec un pinceau souple. Tous les tests ont été accompagnés de témoins imprégnés des divers solvants utilisés, (H₂O, EtOH - CH₂Cl₂, EtOH - H₂O). Les tests pour lesquels la mortalité témoin est supérieure à 10% sont annulés et refaits.

III RESULTATS ET DISCUSSION :

Les résultats de la présente étude portent sur 165 extraits obtenus à partir de 57 organismes marins de Nouvelle-Calédonie.

Au total, 3 Alcyonaires, 4 Algues, 9 Ascidies, 3 Bryozoaires, 29 Eponges, 3 Etoiles, 3 Gorgones, 1 Holothurie, 1 Mollusque et 1 Oursin ont été testés.

Le tableau I présente, pour chaque groupe d'Invertébrés, les organismes ayant une activité acaricide reproductible ; seuls y figurent les tests qui ont au moins deux résultats homogènes.

Les résultats bruts des tests à 5 et 25mg, dont la mortalité témoin est inférieure à 10% sont regroupés en Annexe C.

Sur les 57 Invertébrés testés, 12 provoquent à 25mg (1mg/cm²) une mortalité sur Boophilus microplus de 19 à 100%. Ces organismes se répartissent comme suit :

- 2 Alcyonaires sur les trois testés sont très actifs (mortalité de 99 et 100%).
- 2 Ascidies sur 9 analysées ont une activité acaricide de 76 à 94%.

.../...

- Tableau 1 -

Activité acaricide sur Boophilus microplus de 10
Groupes d'organismes marins de Nouvelle-Calédonie

ORGANISMES	Nombre d'espèces		Code de l'extrait actif	RESULTATS		Observations
	Etudiées	Actives		M/Nb T.*	Mortalité%	
ALCYONNAIRES	3	2	HA 244C	273/276	99	(1)
			HA 266C	211/212	100	(2)
ALGUES	4	0	-	-	-	
ASCIDIÉS	9	2	UA 29C	373/492	76	(3)
			UA 03C	291/308	94	(4)
BRYOZOAIRES	3	1	BA 04C	231/331	70	
EPONGES	29	4	R 1366C	225/225	100	(5)
			R 1375C	260/263	99	(6)
			R 1376A	78/219	36	(7)
			R 1377A	140/166	84	(8)
ETOILES	3	1	EA 17A	100/186	54	
GORGONES	3	2	HG 14C	15/79	20	(9)
			HG 161C	221/226	98	
HOLOTHURIES	1	0				
MOLLUSQUES	1	0				
OURSINS	1	0				

*M = Nombre de Morts - NbT. = Nombre total testés.

(1), (2), (3), (4) les produits isolés jusqu'à présent ne sont pas insecticides

(5), (6) ces organismes sont en cours d'étude à l'Institut de Chimie des
Substances Naturelles (ICSN - CNRS)

(7), (8) ces extraits sont en cours de dialyse

(9) les produits purs ont été isolés = 3 produits actifs dont 1 majoritaire

- 1 Bryzoaire sur 3 étudiés donne une mortalité de 70%.
- 4 Eponges sur 29 présentent des activités respectivement de 36%, 84%, 99% et 100%.
- 1 extrait "saponique" d'Etoile a une efficacité de 54%.
- 2 Gorgones ont une activité respective de 20% et 99%.

Ces 12 Invertébrés qui ont une activité acaricide marquée représentent 21% des organismes testés.

Parmi eux, les 9 organismes qui ont une activité supérieure à 60% sont en cours d'étude et de purification de leurs différents composés. Jusqu'à présent une seule étude chimique d'un organisme actif, une Gorgone (Code HG 161), a abouti à l'isolement et à la purification de produits acaricides à partir de l'extrait "C" (éthanol-chlorure de méthylène).

Cette gorgone a propriétés insecticides appartient au genre Euplexaura. Elle a été récoltée en Septembre 1984 et soumise au traitement habituel des organismes marins étudiés.

A l'exception du caractère insecticide marqué et reproductible de l'extrait C, celui-ci est dépourvu de toute activité antibiotique, antitumorale ou de toxicité sur Artemia salina.

Afin de confirmer cette propriété intéressante, l'organisme a été récolté et traité une deuxième fois (novembre 1985) avant d'entreprendre l'étude chimique. Les résultats sont les suivants :

Récolte	Poids frais	Poids lyoph.	Extrait C	Rendement ext.C/lyoph.	Activité insecticide 1mg/cm ²
1	1kg	443g	2,2g	0,7%	44%
2	0,25g	100g	0,95g	0,95%	38%

(ext. =extrait ; lyoph. = lyophilisat)

Les deux extraits, identiques en CCM^{*}, sont réunis. Des fractionnements successifs sur colonnes et plaques préparatives de silice permettent d'isoler 2 fractions actives bien distinctes (100% de morts à 1mg/cm²).

- Trois produits actifs sont purifiés à partir d'une fraction peu polaire par CCM préparative (hexane-CH₂Cl₂, 4%, puis 10%). Ces produits sont visibles sans révélation et absorbent très nettement les UV :

! Produit !	! Poids !	! Couleur !	! Activité (0,15mg/cm ²) !
! A !	! 54mg !	! bleu vif !	! 100% !
! B !	! 1mg !	! jaune !	! 80% !
! C !	! 10mg !	! vert !	! 20% !

Le produit A est en cours d'étude structurale.

- L'autre fraction active, plus polaire, montre après une purification grossière (CCM, CH₂Cl₂-MeOH 5%) l'existence d'au moins deux produits minoritaires actifs. Ces composés ne sont visibles ni au UV, ni dans le visible et sont difficilement révélés par la vanilline sulfurique. Leur purification est en cours.

L'excellente et constante efficacité du produit majoritaire A de cette gorgone (100% de mortalité à 0,15 mg/cm²) montre l'intérêt qu'il y a de poursuivre les études structurales et de préciser son activité acaricide.

Les informations complémentaires à rechercher pourraient concerner :

- le spectre d'activité de ce produit (activité sur d'autres espèces hématophages et sur les acariens phytophages Tetranychus sp.).

- l'incidence du temps de contact tarsal et de la concentration sur la mortalité.

*CCM Chromatographie sur couche mince.

- l'étude de la rémanence du produit ainsi que son action éventuelle sur la ponte et l'éclosion.

Ces différentes données permettraient de préciser l'éventuel intérêt économique de cette nouvelle molécule. Bien que deux espèces du même genre que la gorgone HG161 en cours d'étude (Euplexaura sp.) figurent dans la littérature, aucune mention n'est faite jusqu'à présent sur leur activité acaricide.

IV CONCLUSION

Dans le monde les travaux qui portent sur les organismes marins sont abondants (Faulkner, 1984), mais la plupart des études s'intéressent aux seuls aspects biochimique et pharmacologique. Sur environ 2 000 publications, rares sont celles qui concernent l'effet insecticide. Seuls deux organismes sont mentionnés pour cette activité :

- En 1972, Hashimoto et al., isolaient d'une annélide : Lumbriconereis heteropoda, la nêreistoxine qui est à l'origine du "Padan", un thiocarbamate particulièrement actif sur les Coléoptères et les Lépidoptères.

- Plus récemment une activité insecticide a été signalée sur une gorgone : Briaerum polyanthes dont les diterpènes (briantheins) ont une action toxique sur les sauterelles (Grode et al., 1983).

Cependant les recherches qui visent à mettre en évidence l'activité spécifiquement acaricide des organismes marins semblent être l'exception. Pourtant la forte proportion d'Invertébrés qui présentent cette activité dans les tests que nous avons réalisés montrent l'intérêt qu'il y a de poursuivre et d'approfondir de telles observations.

Enfin il est à souhaiter que les molécules actives qui pourront être isolées posséderont de nouveaux modes d'actions permettant de déjouer les processus biochimiques développés par les souches résistantes d'Insectes et d'Acariens.

REMERCIEMENTS :

Nous tenons à remercier vivement MM BARGIBANT G., MENUU J.L. et TIRARD P. pour la récolte des Invertébrés marins ainsi que M. CHANTRAINE J.M., pour la préparation d'une partie des extraits.

BIBLIOGRAPHIE

ANON, (1971). Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides. Tentative methods for larvae of cattle tick Boophilus spp. FAO method n° 7. FAO Plant Protection Bulletin 19 : 15-18.

BRUN, L.O. (1982). Etude de la résistance de la tique du bétail (Boophilus microplus) canestrini au Diethion (Rhodiocide) en Nouvelle-Calédonie. ORSTOM Nouméa, rapp. ronéo., 19 pp. 2 fig.

BRUN, L.O. (1984). Observations sur le dosage en éthion et en matières organiques de 18 piscines et douches de traitements contre la tique du bétail en Nouvelle-Calédonie. Rev. El. Méd. Vét. N.C. (2) 21-27.

BRUN, L.O. (1986). Extension de la résistance à l'Ethion chez Boophilus microplus (CAN.) (ACARI, IXODIDAE) sur la côte Ouest de la Nouvelle-Calédonie de 1980 à 1985. IV Congrès sur la protection de la Santé Humaine et des cultures en Milieu Tropical. Marseille, France 2-4 Juillet 1986. 6 pp., 1 Fig.

BRUN, L.O. et COLAS, F. (1986). Etude en laboratoire et sur le terrain de l'efficacité du Dursban 24E (chlorpyrifos-éthyl) contre une souche de Boophilus microplus résistante à l'ethion. Rev. El. Méd. Vét. N.C. (7) (sous presse).

BRUN, L.O., WILSON, J.T., DAYNES, P. (1983). Ethion resistance in the cattle tick Boophilus microplus (Canestrini) in New Caledonia. Trop. Pest. Manag. 29 (1) : 16-22.

COCHEREAU, P. (1971a). Les problèmes entomologiques liés à l'élevage des bovidés en Nouvelle-Calédonie et aux Nouvelles-Hébrides. ORSTOM, NOUMEA, rapp. ronéo., 10 pp. 2 cart.

COCHEREAU, P. (1971b). Problèmes posés par la lutte chimique contre la tique du bétail Boophilus microplus (Canestrini) - Acarina - Ixodidae - en Nouvelle-Calédonie. Symposium régional sur la conservation de la nature, des récifs et des lagons, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, 4-14 Août 1971. ORSTOM, Nouméa, Rapp. ronéo. 4 pp.

DAY, B.E. et GEORGHIOU, G.P. (1982). The resistance of pests and diseases to control measures. Council for Agricultural Science and Technology. Special Publication N° 9, pp. 30-32. Cast, Ames Iowa.

DAYNES, P., BRUN, L.O., WILSON, J.T. (1980). Note préliminaire sur l'apparition de résistances à l'éthion chez certaines souches de Boophilus microplus en Nouvelle-Calédonie. Rev. Elev. Méd., Vét. Pays Trop., 33 (4) : 399.

DAYNES, P., et GUTIERREZ, J. (1980). Variations saisonnières de l'activité parasitaire de la tique du Bétail Boophilus microplus (ACARI, IXODIDAE), en Nouvelle-Calédonie. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop., 33 (3), 305-10.

FAULKNER, D.J. (1984). "Marine natural products : metabolites of marine invertebrates". Natural Product Reports, 551-598.

GRODE, S.H., JAMES, T.R., CARDELLINA, J. H. and ONAN, K.D. (1983). "Molecular structure of the briantheins, new insecticidal diterpenes from Briareum polyanthes". J. Org. Chem. 48, 5203-5207.

HASHIMOTO, Y., SAKAI, M. and KONISHI, K. (1972). A new insecticide developed from nereistoxin. Food drugs from the sea, proceedings edited by Worthen, p. 129-138.

RAGEAU, J. (1958). Insectes et autres arthropodes d'intérêt médical ou vétérinaire en Nouvelle-Calédonie et aux Iles Loyauté. Etudes mélanésiennes, Nouméa, 60-104.

RAGEAU, J. et VERVENT, G. (1959). Les tiques (Acariens Ixodidae) des Iles Françaises du pacifique. Bull. Soc. Path. exo., 52 (6), 819-35.

RAGEAU, J. (1967). Observations biologiques sur les tiques (Acari, Argasidae et Ixodidae) des îles Françaises d'Océanie. Viadomosci Paraz., XIII (4-5), 547-53.

ROULSTON, W.J., WHARTON, R.H., NOLAN, J., KERR, J.D., WILSON, J.T., THOMPSON, P.G. and SCHOTZ, M. (1981). A survey for resistance in cattle ticks to acaricides. Australian Veterinary Journal 57 : 362-371.

STONE, B.F., and HAYDOCK, K.P. (1962). A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick Boophilus microplus (Can.). Bull. Entomol. Res., 53 : 563-78.

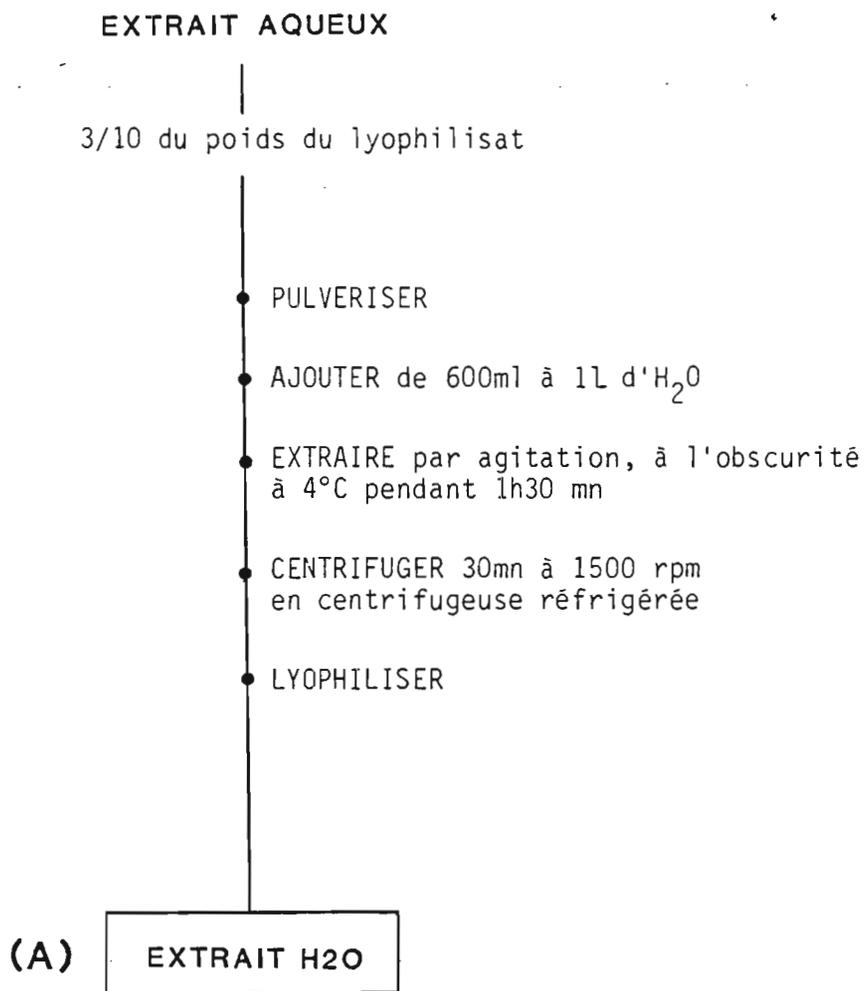
VAN PUYVELDE, L., GEYSEN, D., AYOBANGIRA, F.X., HAKIZAMUNGU, E., NSHIMIYIMANA, A. and KALISA, A. (1985). Screening of Medicinal Plants of Rwanda for acaricidal activity. Journal of Ethnopharmacology, 13, 209-215.

VERGES, J. (1944). Les tiques du bétail. Méthodes d'éradication. Imprimeries réunies, Nouméa, 72 pp.

ANNEXE A

PREPARATION DE L'EXTRAIT AQUEUX

Pour 1kg en poids frais d'organisme broyé puis lyophilisé.



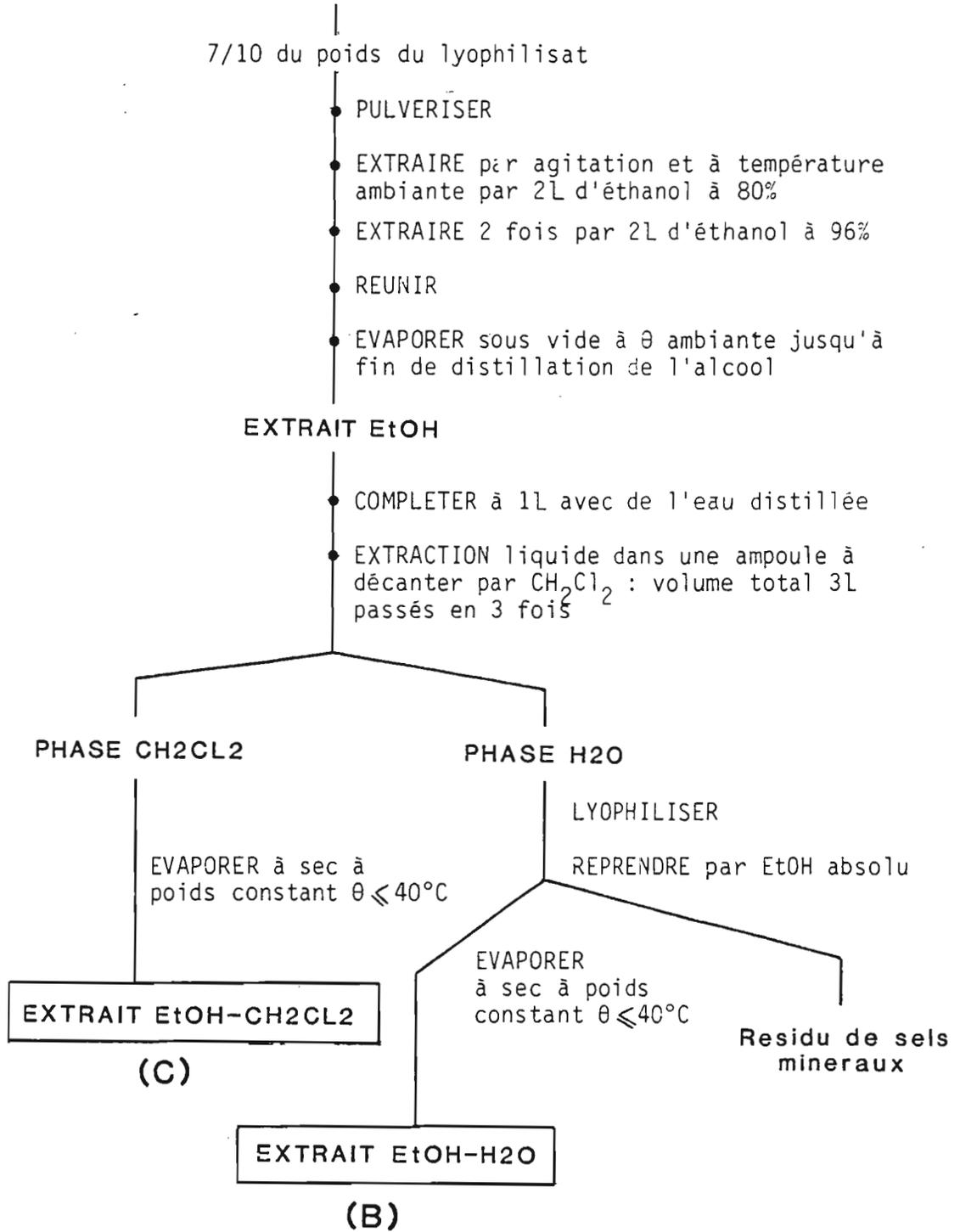
: extrait conservé pour les tests.

ANNEXE B

PREPARATION DE L'EXTRAIT ETHANOLIQUE

Pour 1kg en poids frais d'organisme broyé puis lyophilisé.

EXTRAIT ETHANOLIQUE



extraits conservés pour les tests

ACTIVITE DES ORGANISMES TESTES SUR BOOPHILUS MICROPLUS

ORGANISMES	EXTRAITS						
	A ⁽¹⁾		B		C		
CONCENTRATION	M ⁽²⁾	Nb T. ⁽³⁾	M%	M/Nb. T.	M%	M/Nb T.	M%
<u>ALCYONNAIRES</u>							
<u>HA 240</u>							
5 000						13/232	-
25 000				5/133	-	5/307	-
<u>HA 244</u>							
5 000				47/230	20	86/278	31
25 000				90/224	40	339/376	90
<u>HA 266</u>							
5 000		48/144	33	56/168	33	132/243	54
25 000		63/131	48	39/108	36	249/322	77
<u>ALGUES</u>							
<u>AL 106</u>							
5 000				3/68	-		
25 000				6/106			
<u>AL 108</u>							
5 000		0/110	-	2/119	-	1/80	-
25 000		0/66	-	0/103	-	4/70	-
<u>AL 123</u>							
5 000		5/90	-	1/77	-	3/188	-
25 000		1/79	-	0/85	-	1/117	-
<u>AL 209</u>							
5 000		26/119	22	31/135	23	36/281	13
25 000		29/146	-	38/156	24	235/429	55

(1) Extraits : A = aqueux B = EtOH/H₂O C = EtOH/CH₂Cl₂

(2) M = morts

(3) NbT. = Nombre total testé

.../...

ORGANISMES CONCENTRATION	EXTRAITS								
	A		B		C				
	M/Nb	T.	M%	M/Nb	T.	M%	M/Nb	T.	M%
<u>ASCIDIES</u>									
<u>UA 03</u>	5 000								
	25 000	0/101	-	0/106	-	31/75	41	136/156	87
<u>UA 08</u>	5 000	1/129	-	5/145	-	33/256	13		
	25 000	13/147	-	3/136	-	7/200	-		
<u>UA 23</u>	5 000					47/115	-		
<u>UA 29</u>	5 000	9/79	-	10/92	-	51/216	24		
	25 000	4/80	-	8/98	-	433/1064	41		
<u>UA 38</u>	5 000	4/129	-	4/69	-	1/249	-		
	25 000	11/136	-	6/161	-	148/274	54		
<u>UA 79</u>	5 000	2/56	-	11/102	-	12/132	-		
	25 000	7/78	-	29/127	-	13/486	-		
<u>UA 101</u>	5 000	0/59	-	0/92	-	0/54	-		
	25 000	0/105	-	1/78	-	0/93	-		
<u>UA 119</u>	5 000	4/133	-	2/145	-	12/217	-		
	25 000	2/178	-	3/149	-	150/342	44		
<u>UA 120</u>	5 000	0/78	-	0/123	-	0/89	-		
	25 000	0/121	-	0/112	-	0/94	-		
<u>UA 121</u>	5 000	0/89	-	0/111	-	0/109	-		
	25 000	0/116	-	0/89	-	0/120	-		

.../...

ORGANISMES CONCENTRATION	EXTRAITS								
	A		B		C				
	M/Nb	T.	M%	M/Nb	T.	M%	M/Nb	T.	M%
<u>BRYOZOAIRE</u>									
<u>BA 04</u>	5 000						49/97		51
	25 000	0/174	-	5/216	-	231/331		70	
<u>BA 08</u>	25 000	0/81	-	0/87	-	0/78			-
<u>BA 13</u>	5 000	4/162	-	6/178	-	31/208			-
	25 000	3/186	-	6/127	-	98/297		33	
<u>EPONGES</u>									
<u>R 870</u>	5 000	2/118	-	3/138	-	15/69			22
	25 000	3/89	-	43/329	-	48/262			18
<u>R 1328</u>	5 000	1/92	-	2/103	-	5/150			-
	25 000	3/119	-	0/133	-	2/198			-
<u>R 1352</u>	5 000	0/142	-	0/98	-	5/103			-
	25 000	0/142	-	0/160	-	16/216			-
<u>R 1353</u>	5 000	1/122	-	1/169	-	1/96			-
	25 000	3/118	-	0/20	-	0/139			-
<u>R 1354</u>	5 000	4/108	-	0/112	-	6/206			-
	25 000	2/156	-	2/121	-	1/107			-
<u>R 1355</u>	5 000	1/93	-	1/97	-	0/90			-
	25 000	0/70	-	0/127	-	1/89			-
<u>R 1356</u>	5 000	1/79	-	2/117	-	0/79			-
	25 000	0/60	-	1/86	-	5/101			-
<u>R 1358</u>	5 000	2/133	-	1/113	-	2/117			-
	25 000	6/88	-	1/109	-	62/373			-
<u>R 1359</u>	5 000	0/109	-	0/149	-	0/134			-
	25 000	1/142	-	1/111	-	5/166			-

ORGANISMES CONCENTRATION	EXTRAITS					
	A		B		C	
	M/Nb T.	M%	M/Nb T.	M%	M/Nb T.	M%
<u>EPONGES</u>						
<u>R 1361</u> 25 000	0/94	-	0/108	-	0/92	-
<u>R 1362</u> 25 000	0/92	-	0/77	-	0/119	-
<u>R 1363</u> 25 000	0/86	-	0/80	-	0/126	-
<u>R 1364</u> 25 000	0/79	-	0/99	-	0/131	-
<u>R 1365</u> 25 000	0/109	-	0/96	-	0/120	-
<u>R 1366</u> 5 000 25 000					124/132 225/225	94 100
<u>R 1368</u> 25 000	0/14	-	0/102	-	0/96	-
<u>R 1369</u> 25 000	0/4	-	0/87	-	0/131	-
<u>R 1371</u> 25 000	0/90	-	0/113	-	0/80	-
<u>R 1372</u> 25 000	0/89	-	0/91	-	1/108	-
<u>R 1373</u> 25 000	0/122	-	0/102	-	2/86	-
<u>R 1374</u> 25 000	0/91	-	0/97	-	0/96	-
<u>R 1375</u> 5 000 25 000					142/234 260/263	61 99
<u>R 1376</u> 5 000 25 000	14/117 78/219	36	19/94	-	10/142	-

ORGANISMES	CONCENTRATION	EXTRAITS					
		A		B		C	
		M/Nb T.	M%	M/Nb T.	M%	M/Nb T.	M%
<u>EPONGES</u>							
<u>R 1377</u>	25 000	140/166	84	60/137	44	5/122	-
<u>R 1378</u>	25 000	24/143	-	10/147	-	0/166	-
<u>R 1379</u>	25 000	0/148	-	0/147	-	0/195	-
<u>R 1380</u>	25 000	0/131	-	0/192	-	23/172	-
<u>R 1387</u>	25 000	0/172	-	0/158	-	31/138	-
<u>R 1388</u>	25 000	0/122	-	0/133	-	1/121	-
<u>ETOILES</u>							
<u>EA 13</u>	25 000	0/103	-				
<u>EA 17</u>	25 000	100/360	28				
<u>EA 65</u>	5 000	0/115	-	0/169	-	-	
	25 000	0/106	-	0/129	-		
<u>GORGONES</u>							
<u>HGP 14</u>	25 000	0/78	-	0/120	-	15/79	-
<u>HGP 41</u>	5 000					0/101	-
	25 000	0/124	-	0/128	-	0/236	-

ORGANISMES	EXTRAITS								
	A		B		C				
	M/Nb	T.	M%	M/Nb	T.	M%	M/Nb	T.	M%
<u>GORGONES</u>									
<u>HGP 161</u>									
5 000	1/79	-	1/114	-	5/290	-			
25 000	5/91	-	3/112	-	359/423	85			
<u>HOLOTHURIES</u>									
<u>EH 194</u>									
5 000	6/144	-							
25 000	93/299	31	6/127	-	0/177	-			
<u>MOLLUSQUES</u>									
<u>ML 30</u>									
5 000	58/123	47	34/131	26	26/194	-			
25 000	86/237	36	93/289	32	81/233	35			
<u>OURSINS</u>									
<u>EE 92</u>									
25 000	2/91	-	0/96	-	0/105	-			