

UNIVERSITE DE PARIS - SUD
CENTRE D'ORSAY

THESE

présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES
DE L'UNIVERSITE PARIS XI ORSAY

par

Florence FOURNET

Influence de deux régulateurs de croissance sur le développement et le potentiel reproducteur d'*Aedes aegypti* Linné, 1762 ainsi que sur sa réceptivité à la filaire de rongeur *Molinema dessetae* (Bain, 1973).

soutenue le 23 avril 1992
devant la Commission d'Examen :

Melle Ginette LAUGE	Présidente
M. Jean-Marc HOUGARD	Rapporteur
M. Patrick PORCHERON	Rapporteur
Mme Nicole MONTENY	Examineur
M. Bernard PHILIPPON	Examineur

Table des matières

	pages
AVANT PROPOS	6
INTRODUCTION	12
1 - <i>Aedes aegypti</i>	13
1.1 - Données biologiques.....	14
1 - Les stades pré-imaginaux.....	14
2 - Les adultes.....	16
1.2 - Données écologiques.....	16
1.3 - Importance vectorielle.....	17
2 - Les moyens de lutte antivectorielle	20
2.1 - Méthodes chimiques.....	20
2.2 - Méthodes biologiques.....	23
1 - Prédateurs.....	24
2 - Agents pathogènes.....	24
3 - Manipulations génétiques.....	27
2.3 - Méthodes écologiques.....	28
3 - Les régulateurs de croissance	30
3.1 - Présentation.....	30
3.2 - Les hormones du développement.....	32
1 - Les hormones juvéniles.....	33
2 - Les ecdystéroïdes.....	35

3.3 - Les analogues de l'hormone juvénile.....	38
3.4 - Les antagonistes des ecdystéroïdes.....	38
3.5 - Intérêt de leur utilisation.....	40
4 - Présentation de l'étude.....	42
CHAPITRE 1 : Matériel et méthodes.....	44
1 - <i>Aedes aegypti</i> : techniques d'élevage.....	45
1.1 - Les oeufs.....	45
1.2 - Les larves.....	46
1.3 - Les nymphes.....	46
1.4 - Les adultes.....	46
2 - Les régulateurs de la croissance et du développement utilisés.....	47
2.1 - L'OMS 2017.....	47
2.2 - Le diflubenzuron.....	48
3 - Effets des traitements sur la survie adulte.....	49
3.1 - Préparation des solutions insecticides.....	49
3.2 - Choix des larves.....	50
3.3 - Modalités d'exposition.....	50
3.4 - Exploitation des résultats.....	51
4 - Effets des traitements sur le potentiel reproducteur des femelles	52
4.1 - L'appareil génital femelle.....	52
4.2 - Rappel du développement folliculaire et de la dynamique de l'ovogenèse chez <i>A.aegypti</i>	53
4.3 - Effets du traitement sur la ponte.....	56
4.4 - Effets du traitement sur la fertilité.....	56
4.5 - Effets du traitement sur le développement des ovarioles.....	57
5 - Effets des traitements sur la production des ecdystéroïdes	58
5.1 - Principe du dosage des ecdystéroïdes.....	58
5.2 - Mode de prélèvement des moustiques.....	59
1 - Larves.....	59
2 - Nymphes.....	59
3 - Adultes mâles et femelles.....	60

5.3 - Préparation des échantillons.....	60
5.4 - Préparation des plaques.....	60
5.5 - Protocole de dosage.....	61
6 - Techniques histologiques.....	64
7 - Effets des traitements sur la réceptivité	
d'<i>Aedes aegypti</i> à la filaire <i>Molinema dessetae</i>	65
7.1 - <i>Molinema dessetae</i> (Bain, 1973).....	65
7.2 - <i>Proechimys oris</i> Thomas, 1904.....	67
7.3 - Infestation d' <i>Aedes aegypti</i> par <i>Molinema dessetae</i>	68
7.4 - Détermination de la microfilarémie du rat.....	68
7.5 - Evaluation de la quantité de microfilaires ingérées.....	70
7.6 - Répartition des filaires dans le vecteur.....	71
7.7 - Traitement statistique des données.....	72
8 - Effet du traitement sur la faune non-cible.....	73
CHAPITRE 2 : Détermination des doses sublétales.....	74
1 - Résultats.....	75
1.1 - OMS 2017.....	75
1.2 - Diflubenzuron.....	78
2 - Discussion - Conclusion.....	81
CHAPITRE 3 : Potentiel reproducteur des femelles	
d'<i>A. aegypti</i>	86
1 - Traitement des moustiques.....	87
2 - Effets des traitements sur la ponte.....	87
2.1 - Effet de l'OMS 2017.....	87
2.2 - Effet du diflubenzuron.....	88
2.3 - Discussion.....	89
3 - Effets des traitements sur la fertilité.....	91
3.1 - Effet de l'OMS 2017.....	91
3.2 - Effet du diflubenzuron.....	92
3.3 - Discussion.....	92

4 - Effets des traitements sur le développement des ovarioles.....	93
4.1 - Effet de l'OMS 2017.....	93
1 - Essai préliminaire.....	93
2 - Etudes des femelles 24 heures après leur émergence.....	94
3 - Etude des femelles 24 heures après leur premier repas de sang.....	95
4 - Etude des femelles 5 jours après l'oviposition.....	95
4.2 - Effet du diflubenzuron.....	96
4.3 - Discussion.....	97
1 - Corrélations entre les réductions du potentiel reproducteur et d'émergence.....	98
2 - Dégénérescence ou inhibition de la maturation folliculaire.....	100
3 - Rétention des oeufs par les femelles survivantes.....	103
4 - Etude histologique.....	104
5 - Discussion - Conclusion.....	106
CHAPITRE 4 : Taux des ecdystéroïdes au cours de la croissance et du développement d'<i>Aedes aegypti</i>	112
1 - Introduction.....	113
2 - Dosage des ecdystéroïdes chez les larves.....	114
2.1 - Résultats.....	114
1 - Larves témoins.....	114
2 - Larves traitées par le diflubenzuron.....	115
3 - Larves traitées par l'OMS 2017.....	116
2.2 - Discussion.....	116
3 - Dosage des ecdystéroïdes chez les nymphes et les adultes.....	118
3.1 - Résultats.....	119
1 - Mâles.....	119
2 - Femelles.....	121

3.2 - Discussion.....	123
1 - Effets des traitements sur les mâles.....	123
2 - Effets des traitements sur les femelles.....	124
4 - Discussion- Conclusion.....	125
CHAPITRE 5 : Réceptivité d'<i>Aedes aegypti</i> à la filaire	
<i>Molinema dessetae</i>	128
1 - Traitement insecticide des moustiques.....	129
2 - Infestation des moustiques.....	130
3 - Etude du développement des filaires chez	
les moustiques traités.....	131
3.1 - Distribution des L3 intracéphaliques.....	134
3.2 - Distribution des L3 dans le thorax et l'abdomen.....	135
3.3 - Etude de la présence des formes anormales.....	137
4 - Discussion.....	138
5 - Conclusion.....	141
CHAPITRE 6 : Influence des traitements	
sur la faune non-cible.....	144
1 - Introduction.....	145
2 - Résultats.....	146
3 - Discussion - Conclusion.....	148
CONCLUSION GENERALE.....	151
BIBLIOGRAPHIE.....	158
ANNEXES	168
Annexe 1.....	169
Annexe 2.....	177
Annexe 3.....	187
Annexe 4.....	191

AVANT-PROPOS

Avant-Propos

L'entomologie médicale s'attache à l'étude des arthropodes impliqués dans les zoonoses dans le but de prévenir les maladies affectant l'homme et les animaux (James et Harwood, 1969).

Un arthropode vecteur joue un rôle obligatoire dans la transmission d'une affection puisqu'il est le siège de la multiplication ou de la transformation de l'agent pathogène. Il constitue un maillon indispensable de la chaîne épidémiologique sans lequel la transmission de l'affection s'interrompt.

Pour lutter contre les maladies à transmission vectorielle, on fait encore largement appel à des mesures dirigées contre les populations vectrices - soit qu'il n'existe encore aucun moyen thérapeutique efficace contre l'agent pathogène, soit que ces moyens ne suffisent pas.

En outre, les méthodes de lutte antivectorielle représentent souvent le moyen le plus efficace, le plus pratique à mettre en oeuvre et le moins onéreux pour combattre la maladie (Anonyme, 1985).

A cet égard, il est nécessaire d'acquérir une bonne connaissance de la biologie et de l'écologie du vecteur en tenant compte du rôle important que l'homme peut jouer à ce niveau (Anonyme, *op. cit.*).

Il ne faut pas oublier en effet que dans de nombreux cas, c'est l'homme lui-même qui s'est créé ses propres problèmes de Santé Publique. Ainsi les moustiques qui vivent normalement dans l'eau des trous de rochers ou d'arbres, ont trouvé dans des pneus de voitures abandonnés, des boîtes de conserves vides et autres abris artificiels, des habitats de choix.

Du fait de l'urbanisation incontrôlée, les populations de *Culex*, le vecteur principal de la filariose de Bancroft, ont augmenté à la fois en Afrique et en Asie.

Le paludisme sévit dans des quartiers mal urbanisés situés à la périphérie des villes, des jardins, les eaux de surface à usage agricole qui y subsistent abritant d'importantes populations vectorielles (Doumenge, 1989).

L'aménagement en eau est également lié à la présence de l'homme : l'irrigation des cultures a augmenté sans que le problème d'évacuation du surplus soit réglé, le stockage de l'eau dans des containers souvent non fermés permet le développement des larves d'*Aedes aegypti* et par voie de conséquence celui des éventuels agents pathogènes que ces vecteurs peuvent transmettre, le virus de la fièvre jaune n'étant pas des moindres.

Il importe aussi d'approfondir nos connaissances en ce qui concerne les effets des traitements sur les populations cibles afin de mieux les contrôler et d'en optimiser les résultats.

Lorsqu'on analyse l'efficacité d'un insecticide sur une population vectrice, on a tendance à en examiner l'effet immédiat mais il est indispensable de s'interroger sur le devenir des individus qui ont pu survivre à une dose supposée létale de produit.

On ne peut faire abstraction de ce problème, tant dans le domaine de l'agriculture que dans celui de la Santé Publique, dans la mesure où tous les traitements ne sont jamais efficaces à 100 % du fait de la perte de l'efficacité du produit liée aux sous-dosages et aux dilutions, dues aux eaux de pluie par exemple.

La destruction totale des insectes n'est pas toujours atteinte.

La fraction survivante peut présenter des désordres fonctionnels plus ou moins profonds et durables désignés sous le nom d'effets sublétaux (Rivière, 1977).

Les doses sublétales semblent pouvoir affecter une population par trois voies : en agissant soit sur la capacité des individus traités à survivre, ou à se reproduire soit sur la constitution génétique de la génération suivante (Moriarty, 1969).

Dans le cadre de la transmission d'un organisme pathogène par un vecteur, la question est de savoir si les désordres fonctionnels provoqués chez l'arthropode par le traitement sont favorables ou non à cet organisme, c'est-à-dire si la capacité vectorielle du vecteur s'en trouve réduite ou bien accrue.

Un certain nombre de facteurs sont susceptibles d'agir dans la détermination de la capacité vectorielle : la réceptivité du vecteur au parasite, les préférences trophiques, la longévité du vecteur, la fréquence des repas, la durée de l'incubation extrinsèque, la densité de la population vectorielle, la dispersion du vecteur et la résistance éventuelle du vecteur aux moyens de lutte mis en oeuvre.

Avec l'apparition puis le développement du phénomène de résistance aux insecticides chez de nombreuses espèces vectrices et du fait de l'inquiétude croissante soulevée par la pollution de l'environnement qu'entraîne l'emploi abusif des insecticides, on a vu se développer un certain nombre de méthodes de lutte nouvelles fondées sur l'utilisation de nouveaux agents chimiques ou biologiques.

Parmi les nouveaux composés qui ont fait leur apparition, citons les régulateurs de croissance qui agissent sur la physiologie de leur cible.

Ces insecticides que l'on a appelés les "pesticides de la troisième génération", possèdent des propriétés écologiques intéressantes qui ont contribué à en répandre l'utilisation dans le domaine de l'agriculture.

Malheureusement leur introduction au sein des stratégies de lutte antivectorielle est lente.

Notre travail constitue une nouvelle approche de l'étude des effets de ces produits sur leur cible. Nous essayons d'apporter des éléments de réflexion quant à la nécessité de mieux connaître l'ensemble des effets des régulateurs de croissance sur l'insecte-cible, en particulier au niveau de sa capacité vectorielle et de son potentiel reproducteur, de sorte que les traitements en soient optimisés.

C'est ainsi que dans une première partie, nous avons analysé les effets d'un traitement à doses sublétales sur le potentiel reproducteur d'un moustique, *Aedes aegypti*, vecteur majeur de la fièvre jaune et de la dengue.

L'intérêt de notre travail réside davantage dans la perspective de montrer que, sur l'ensemble d'une population traitée, la fraction qui survit pourrait présenter un potentiel reproducteur réduit contribuant au fil des générations à en abaisser le niveau en-dessous d'un seuil où la transmission ne présente plus un risque d'épidémisation, que dans le simple fait de pouvoir confirmer l'existence de troubles fonctionnels.

Nous avons ensuite abordé la question des effets du traitement sur la compétence vectorielle d'*A. aegypti* vis-à-vis d'une filaire de rongeur, *Molinema dessetae* afin d'évaluer l'intérêt général des effets combinés de ces produits sur la capacité vectorielle de ce moustique.

Nous avons vérifié, dans une dernière partie, l'innocuité des traitements sur certaines espèces non-cibles présentes dans une mare naturelle située dans l'enceinte du centre de recherches de l'ORSTOM à Bondy.

Il m'aurait été difficile de mener ce travail à bien sans l'aide de ceux qui m'ont aidée et soutenue.

Je tiens tout d'abord à remercier :

Mademoiselle G. LAUGE, qui me fait l'honneur de bien vouloir présider le jury et dont les conseils dispensés avec tant de gentillesse m'ont été très précieux, en particulier lors de l'achèvement de ce travail.

Madame N. MONTENY, qui a dirigé ces recherches pendant près de quatre ans et auprès de qui j'ai toujours trouvé les meilleurs conseils, l'aide la plus appréciable et la volonté d'aller plus loin.

Monsieur P. PORCHERON, qui a accepté de faire partie de ce jury. Il m'a toujours apporté son aide aussi bien pour résoudre les problèmes auxquels j'ai pu être confrontée lors des dosages enzymo-immunologiques dont il m'a enseigné la technique que lors de la rédaction de ce travail.

Monsieur J.M. HOUGARD, qui a bien voulu me consacrer une partie précieuse de son temps et m'a permis de faire mes premiers pas d'entomologiste en Afrique.

Monsieur B. PHILIPPON, qui a accepté d'examiner mon travail, me permettant de bénéficier de sa haute compétence et de sa longue expérience.

Monsieur G. PICHON, qui a suivi le déroulement de mes recherches avec intérêt, participant aux différentes analyses statistiques avec un esprit toujours critique, m'ouvrant même les portes du monde de la "chiralité". Son sens de l'humour m'a été d'un grand réconfort.

Monsieur J. PROD'HON, pour l'attention chaleureuse dont il m'a toujours entourée et la confiance qu'il m'a accordée.

Madame CH. SANNIER, qui a participé de façon essentielle à toutes les expérimentations, me faisant bénéficier de son expérience, toujours prête à m'aider, y compris lors des longues dissections et des manipulations délicates des rongeurs. Qu'elle me permette de lui témoigner toute mon affection.

Madame M. MORINIERE, qui m'a fait partager son expérience du dosage enzymo-immunologique, je la remercie pour sa disponibilité et sa présence chaleureuse.

Mes amis, P. CAUBERE, N. ELISSA, J. GUSTAVE et J.M. PRUD'HOM, qui m'ont apporté une aide précieuse grâce aux discussions animées que nous avons eues et qui m'ont souvent permis de clarifier mes observations.

J'exprime toute ma gratitude à mes collègues du Laboratoire de Lutte contre les Insectes Nuisibles, J. BARATHE, P. LE FUR, M.F. RIANDEY, B. ROZE et D. BOUCHARINC, pour m'avoir toujours apporté leur soutien.

Je tiens à témoigner ma reconnaissance à Monsieur J. COZ, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire lors de mon DEA ainsi qu'à Monsieur Ch. NOIROT, pour m'avoir prodigué ses conseils à un moment difficile de mes recherches.

Certaines parties de ce travail n'auraient pu être réalisées sans une collaboration avec d'autres équipes :

celle de Monsieur DELACHAMBRE, responsable du Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Faculté des Sciences de Dijon, au sein de laquelle, grâce à Madame QUENNEDEY, j'ai pu acquérir les techniques histologiques,

celle de Monsieur GAYRAL, responsable du Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry, où Monsieur BORIES a mis à ma disposition la souche de *Molinema dessetae* et m'a initiée aux techniques d'infestation,

je leur renouvelle mes remerciements.

Je ne pourrais oublier mes parents, Paul, Jean-Luc et Véronique, qui ont su comprendre les joies, les doutes et les sautes d'humeur que provoquent l'élaboration d'une thèse.

INTRODUCTION

Introduction

1 - *Aedes aegypti*

L'ensemble des moustiques constitue parmi les Diptères Nématocères la famille des *Culicidae*. Il s'agit d'une famille bien homogène comprenant 2 800 à 3 000 espèces réparties dans le monde entier.

Les Culicidés constituent le groupe de vecteurs le plus important en Santé Publique. Ils sont impliqués dans la transmission du paludisme, de la fièvre jaune et de la dengue, de nombreuses encéphalites arbovirales, des filarioses lymphatiques. Ces maladies, et le paludisme en premier, constituent de véritables fléaux dans les pays en voie de développement.

Les conséquences de l'activité des moustiques sur l'histoire de l'humanité sont considérables et il convient en outre de leur ajouter un poids économique non moins considérable.

Aedes aegypti Linné, 1762, que nous nous proposons d'étudier, appartient à la sous-famille des *Culicinae*. Celle-ci regroupe des vecteurs de maladies virales, de filarioses humaines et animales ainsi que des espèces piqueuses pas forcément vectrices de maladies.

Le genre *Aedes* comprend environ 870 espèces réparties dans le monde entier.

A. aegypti est l'espèce vectrice majeure du virus de la fièvre jaune. Elle est aussi vectrice des virus de la dengue, du virus Chikungunya en Afrique et en Asie tropicales, qui entraîne des syndromes voisins de ceux de la dengue. Elle est impliquée dans la transmission de quelques filarioses lymphatiques.

1.1 - Données biologiques

Les stades immatures et adultes du moustique évoluent dans deux milieux totalement différents : les formes immatures (oeufs, larves et nymphes) ont besoin d'un milieu aquatique tandis que le moustique adulte a une vie terrestre et aérienne. La morphologie des différents stades est en rapport direct avec ces modes de vie. Les moustiques colonisent tous les types d'eau : fraîche, salée, potable, polluée. Les femelles seules sont hématophages.

Nous illustrons le cycle biologique général du moustique par la figure 1 suivante.

1.1.1 - Les stades pré-imaginaux

La femelle pond ses oeufs à la surface de l'eau ou sur les bords des gîtes. Les oeufs d'*Aedes* présentent une particularité intéressante : ils supportent la dessiccation. Les femelles pondent sur les bords des gîtes ou en pleine eau et quand le gîte est asséché, les oeufs restent accrochés sur les parois ou au fond. Quand le gîte est remis en eau, les oeufs éclosent.

Cela permet le maintien de l'espèce dans des régions où la durée de la saison sèche est plus grande que l'espérance de vie des femelles.

Les larves éclosent donc simultanément après une période de "dormance" plus ou moins longue.

Les larves, détritiphages, ont une croissance discontinue et subissent quatre mues. Comme pour toutes les espèces de moustiques, la durée du développement larvaire dépend de la température, de l'abondance de la nourriture et de la densité des larves au sein du même gîte. En effet les larves sont perturbées par la surpopulation par leur propre espèce, la vitesse de leur développement se réduit ainsi que la taille moyenne des adultes qui en résultent (Rivière, 1988).

La croissance à 28°C dure environ 7 jours.

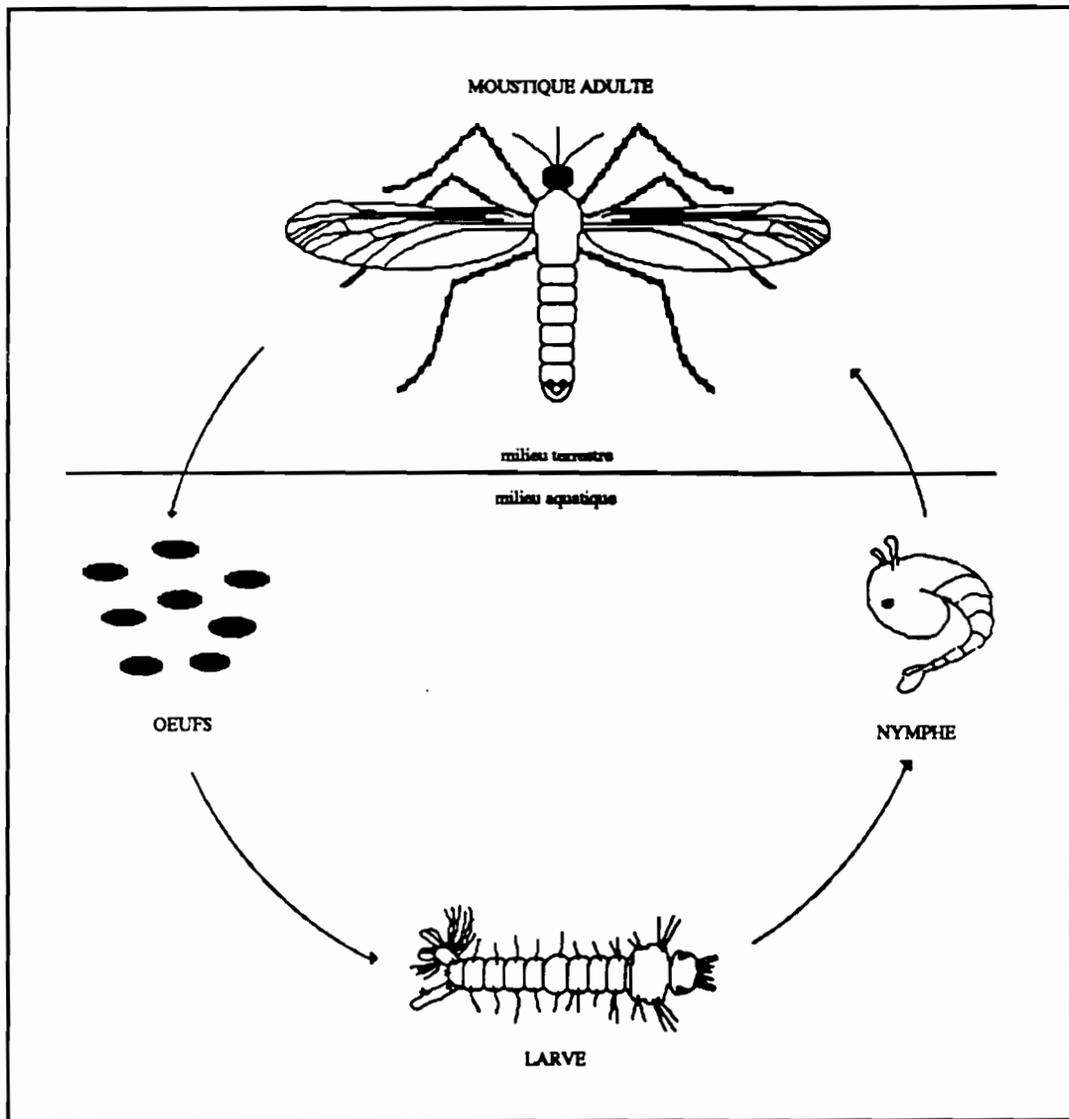


Figure 1 : Cycle biologique général du moustique.

Les larves sont munies de siphons respiratoires postérieurs qui leur permettent de respirer l'air extérieur.

Elles se nourrissent sur le fond des gîtes contrairement aux larves d'anophèles .

Au cours de la dernière mue, la nymphe apparaît. C'est un stade qui ne se nourrit pas, qui est très mobile et qui engendre l'adulte après environ 48 heures.

1.1.2 - Les adultes

Les mâles émergent d'abord au cours des premières 24 heures qui suivent la nymphose. Ils copulent 14 à 24 heures après l'émergence lorsque la rotation de 180° de leur *genitalia* est achevée (Clements, 1963).

Les femelles bien que réfractaires à l'insémination pendant 48 à 72 heures s'accouplent dès le premier jour de leur émergence et les spermatozoïdes sont stockés dans les spermathèques qui sont au nombre de trois chez *Aedes aegypti*.

Les mâles et les femelles se nourrissent de sucs végétaux mais cette seule nourriture ne permettrait pas aux femelles de pondre. Il leur faut prendre un repas sanguin lors de chaque cycle ovarien. Seul ce repas apporte aux femelles les protéines nécessaires à l'élaboration des oeufs (Detinova, 1963 ; Clements, 1963).

La maturation des oeufs a lieu au cours de la digestion du repas de sang pour les espèces anautogènes et les oeufs sont fécondés au moment de leur passage dans l'oviducte.

Chaque repas est suivi 48 heures après environ d'une ponte. L'intervalle séparant deux pontes est appelé cycle gonotrophique.

1.2 - Données écologiques

Aedes aegypti existe ou a existé dans un passé récent dans toutes les régions tropicales et subtropicales du monde. Originellement forestier de l'Afrique de l'ouest, ayant ses gîtes larvaires dans les creux des arbres, les plantes à feuilles engainantes et les creux des rochers, il doit sa très large distribution mondiale à son adaptation étroite à l'homme, à sa capacité d'évolution dans des gîtes artificiels à faible teneur en matières organiques et à l'extraordinaire résistance de ses oeufs à survivre hors de l'eau.

On le trouve dans toute l'Afrique au sud du Sahara mais aussi en Asie, en Amérique du sud et en Océanie. En fait ce moustique est actuellement présent dans des zones où la pluviométrie annuelle moyenne est supérieure à 400 mm.

C'est une espèce sténotope et elle est donc présente dans une grande variété de gîtes domestiques et sauvages. Cependant les gîtes naturels ne semblent pas être générateurs de populations très importantes et ce sont donc le plus souvent des facteurs liés à l'anthropisation qui sont à l'origine des plus gros foyers stégomyens.

La présence des gîtes domestiques est liée au stockage dans des jarres de l'eau de boisson ou de macérations médicamenteuses extrêmement favorables aux larves.

Les gîtes péri-domestiques correspondent à toutes sortes d'objets présents autour des habitations et des décharges.

Quant aux gîtes sauvages, ce sont les trous d'arbres, les noix de coco, les coquilles vides, les terriers de crabes et tout autre endroit dont l'activité est étroitement liée au régime hydrique (Cordelier *et al.*, 1974). Il semble qu'une eau peu polluée soit nécessaire et que la présence d'éléments végétaux soit attractive.

L'espèce se répartit dans des zones où le climat permet son existence dans des gîtes naturels, hors de tout contact humain et aussi d'une répartition dans des zones où les coutumes de stockage de l'eau des populations présentes assurent en quelque sorte l'élevage familial du vecteur.

C'est donc l'homme qui assure la survie d'*A. aegypti* (Hamon *et al.*, 1971).

1.3 - Importance vectorielle

Un vecteur naturel peut être plus ou moins efficace dans la transmission d'un agent pathogène. La capacité vectorielle d'un vecteur donné est le résultat de plusieurs phénomènes : aptitude à s'infecter, à assurer le développement du parasite, à le transmettre et d'un certain nombre de facteurs extrinsèques et intrinsèques qui conditionnent chacun des trois phénomènes cités.

La réceptivité du vecteur pour le parasite, ses préférences trophiques, la fréquence des repas, sa longévité, la densité de la population vectorielle ou encore son éventuelle résistance aux insecticides sont autant de facteurs qui vont intervenir dans la détermination de la capacité vectorielle.

La présence du parasite dans l'hémolymphe est un élément nécessaire mais non suffisant. Interviennent en outre deux facteurs, l'un plus qualitatif tenant à l'infectivité de l'agent pathogène pour l'arthropode, l'autre plus quantitatif, qui introduit la notion de seuil d'infectivité, au-dessous duquel un vecteur néanmoins compétent ne pourra s'infecter.

La "barrière intestinale" est un obstacle important qui tend à limiter le passage du parasite vers l'hémolymphe du vecteur.

D'autres barrières peuvent ensuite intervenir pour bloquer la transmission, comme la "barrière salivaire" : si la transmission se fait par injection de salive, le vecteur ne devient infectant que si le parasite à la fin de son développement envahit les glandes salivaires. Il arrive que ce passage ne puisse se faire. La transmission d'un agent pathogène par un vecteur dépend d'un certain nombre de facteurs. En agissant sur la physiologie du vecteur, les traitements insecticides pourraient modifier la capacité vectorielle.

Nous aborderons plus particulièrement ici, l'importance des filarioses humaines. Ce sont des affections causées par la présence dans les tissus des vertébrés, de vers parasites nématodes, les filaires.

Ces parasitoses atteignent 200 millions de personnes dans le monde et sont très diverses.

Citons :

- l'onchocercose, deuxième cause de cécité dans le monde, liée à la présence d'*Onchocerca volvulus* ;
- la filariose de Bancroft, filariose lymphatique due à *Wuchereria bancrofti* à laquelle sont exposés 10 millions de personnes ;
- la loase induite par *Loa loa* dont la manifestation la plus impressionnante est le passage du vers adulte sous la conjonctive oculaire ;
- la dracunculose, helminthiase afro-asiatique, due à *Dracunculus medinensis*, qui est responsable de longues immobilisations en milieu rural.

Les vecteurs des filarioses appartiennent à différents genres d'insectes. *Culex*, *Anopheles*, transmettent la filariose de Bancroft ainsi qu'*Aedes* et *Mansonia* mais dans d'autres zones géographiques, le *Chrysops* (*Tabanidae*), transmet la loase et les simulies, l'onchocercose.

En ce qui concerne la dracunculose, l'homme se contamine en buvant de l'eau contenant des *Cyclops* (crustacés) parasités

Nous rappellerons brièvement le cycle général des filaires.

Les vers adultes vivent dans le système lymphatique (*W. bancrofti*) ou la peau (*O. volvulus* et *Loa loa*) tandis que les embryons ou microfilaires circulent dans le sang ou la peau selon les espèces.

En fait, l'apparition des microfilaires dans le sang est le plus souvent périodique. Lorsque le vecteur prend un repas de sang sur un sujet filarien, il absorbe dans le même temps les microfilaires (mf) circulantes.

Les microfilaires effectuent un cycle obligatoire à l'intérieur du vecteur qui les conduit à maturation dans la trompe de ce dernier. Lors d'un repas ultérieur, ces filaires devenues infestantes seront injectées dans un nouvel hôte vertébré.

Le nombre de filaires qui atteignent la tête du vecteur à maturité ne dépend pas seulement du nombre de microfilaires ingérées. Il existe en effet un certain nombre d'obstacles au développement des filaires chez le vecteur.

Tout d'abord, les microfilaires peuvent être dilacérées par les pièces buccales de l'insecte au moment de la piqure.

Ensuite, la coagulation rapide du sang ingéré et la formation de la membrane péritrophique peuvent empêcher celles qui ont atteint l'estomac du vecteur, de traverser la paroi stomacale. Brengues et Bain (1972) montrent que chez *Wuchereria bancrofti*, les deux tiers des microfilaires restent bloqués dans l'estomac d'*Anopheles gambiae*.

Selon la filaire et le vecteur, le rendement parasitaire (RP), défini comme la proportion de microfilaires qui passent dans l'hémocèle (MP) par rapport au nombre de microfilaires qui ont essayé de traverser la paroi stomacale (MI), varie.

On peut observer une augmentation du RP, traduisant le phénomène de facilitation décrit pour le couple *Anopheles gambiae* - *Wuchereria bancrofti*.

Au contraire, chez les couples *Aedes aegypti* - *W. bancrofti* et *Simulium damnosum* - *O. volvulus*, le nombre de MI augmente mais le RP diminue et on parle de limitation. Ce processus de régulation a été étudié en prenant comme modèle expérimental, le couple *A. aegypti* - *Molinema dessetae* (Bain et Chabaud, 1975) que nous envisagerons par la suite.

Dans le cas de la limitation, Pichon *et al.* (1975) ont démontré que le nombre moyen de MP ou de stades infestants (L3) tendait vers une limite supérieure notée H, quelque soit le nombre de MI.

Cette valeur mesure la réceptivité du vecteur pour son parasite à un stade de son développement. Par exemple, pour le couple *Aedes polynesiensis* - *W. bancrofti*, la valeur de H pour les L3 est 20 alors que pour le couple *Culex quinquefasciatus* - *W. bancrofti*, cette valeur est 0,3.

Les microfilaires qui ont atteint l'hémocèle gagnent les muscles alaires, les tubes de Malpighi ou le tissu adipeux pour poursuivre leur développement.

Celui-ci peut alors encore être bloqué par des phénomènes encore mal expliqués. Dans certains cas, comme celui de *W. bancrofti* chez *Culex quinquefasciatus*, les filaires subissent des processus de dégénérescence ou d'encapsulation qui font avorter leur maturation en larves infestantes. Cela n'a pas été observé dans le cas d'*O. volvulus*.

La réalisation du développement complet du parasite requiert finalement une dernière condition : la longévité du vecteur doit être suffisante. On observe parfois un phénomène paradoxal : si le parasite est peu abondant, sa présence semble induire l'augmentation de la longévité du vecteur (Pichon *et al.*, 1980 b). Il ne semble donc pas que la présence du parasite nuise à son vecteur mais cela reste à vérifier car la pathogénécité d'un parasite pour son vecteur est difficile à mettre en évidence expérimentalement.

La modélisation de ces phénomènes permet de quantifier les relations hôte-parasite et de rendre compte de certaines caractéristiques fondamentaux de l'épidémiologie des filarioses. Ceci est très important si l'on veut ensuite évaluer les effets des traitements insecticides sur le développement d'un parasite et sa transmission.

2 - Les moyens de lutte antivectorielle

Classiquement en matière de lutte antivectorielle on distingue les méthodes de lutte chimiques, biologiques ou écologiques selon que l'on fait appel à des agents chimiques, biologiques ou encore à l'aménagement de l'environnement.

2.1 - Méthodes chimiques

Bien que le terme "insecticide" n'ait été créé que depuis une centaine d'années, nos ancêtres n'avaient pas attendu pour lutter efficacement contre les insectes.

Le jus de tabac était déjà utilisé au XVIIIème siècle en Europe de l'ouest pour lutter contre les insectes ravageurs des cultures.

Les Perses découvrirent très tôt les propriétés insecticides des fleurs de *Chrysanthemum roseum*, à la base des pyréthrinoïdes actuels, mais c'est seulement au XIXème siècle que le secret de la "poudre persane" fut importé en Europe (Busvine, 1966).

Ces méthodes traditionnelles qui suffisent à un usage domestique, présentent l'avantage d'être peu toxiques pour les vertébrés.

En 1892 l'américain Howard constate que l'application d'un film de pétrole sur l'eau tue les larves de moustiques. D'autres traitements à base de substances d'origine minérale comme le vert de Paris, de sels de métaux lourds ou de composés à base d'arsenic, furent également exécutés .

Grâce aux progrès techniques, il fut ensuite possible d'isoler le principe actif des composés d'origine végétale, d'en analyser les propriétés et de synthétiser des molécules analogues. Ainsi le principe actif du pyrèthre a été isolé au début de notre siècle (Busvine, 1966).

Depuis lors, de nombreuses molécules ont été synthétisées dont la plus connue est le DDT (Figure 2).

Nous devons la découverte de cette molécule au chimiste Ziedler en 1870 mais c'est seulement en 1940 que Müller met en évidence son pouvoir insecticide.

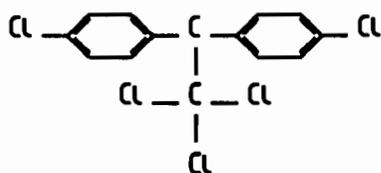


Figure 2 : Formule développée d'un organochloré, le DDT.

Les premiers succès spectaculaires de cet organochloré ont conduit à la fabrication d'un grand nombre de composés de ce type comme la dieldrine et le γ HCH. Peu coûteux, relativement stables et d'utilisation facile, leur application en Santé Publique s'est intensifiée et généralisée avec le lancement en 1956-1957 du programme mondial d'éradication du paludisme. Entre 1938 et 1961, la production d'insecticides a été multipliée par 100 aux Etats-Unis.

Malheureusement dès 1946 Wiesmann signale l'apparition d'individus résistants chez *Musca domestica* L. en Suède et rapidement le nombre des espèces résistantes augmente. La synthèse de molécules nouvelles devenait donc indispensable.

Les insecticides organophosphorés succèdent aux organochlorés entre 1950 et 1960. Les plus connus sont le téméphos, le chlorpyrifos ou encore le malathion (Figure 3). Dégradables, ils possèdent néanmoins une rémanence importante.

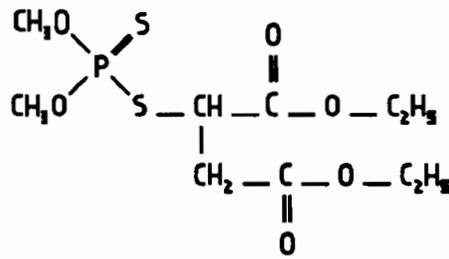


Figure 3 : Formule développée d'un organophosphoré, le malathion.

En 1963, les carbamates viennent élargir la gamme des insecticides. Le propoxur appartient à cette nouvelle famille qui agit par effet de "knock-down" c'est-à-dire en paralysant immédiatement l'insecte (Figure 4).

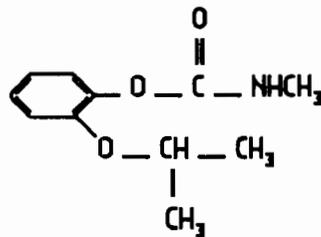


Figure 4 : Formule développée d'un carbamate, le propoxur.

Pourtant la résistance aux organophosphorés et aux carbamates fait progressivement son apparition parallèlement à la meilleure connaissance de la toxicité de ces composés sur les vertébrés. En effet, dans l'ensemble, les insecticides chimiques que nous venons de voir ont tous pour cible le système nerveux des invertébrés mais aussi celui des vertébrés.

Devant l'augmentation croissante du nombre des espèces résistantes aux insecticides et les problèmes écologiques liés à l'utilisation abusive d'insecticides rémanents liée à l'agriculture, la 23ème assemblée mondiale de la Santé recommande en 1970 la mise au point de nouvelles méthodes de lutte antivectorielle (Anonyme, 1982).

De nouveaux produits viennent renforcer l'arsenal : ce sont les pyréthrinoïdes, dérivés de synthèse de la pyréthrine, et les régulateurs de croissance.

Les pyréthrinoïdes présentent eux aussi une toxicité importante pour les mammifères mais ils sont utilisés contre les insectes à des doses très nettement inférieures à celles qui auraient des conséquences graves d'où leur succès actuel tant au niveau des insectes "domestiques" que des poux par exemple (Figure 5).

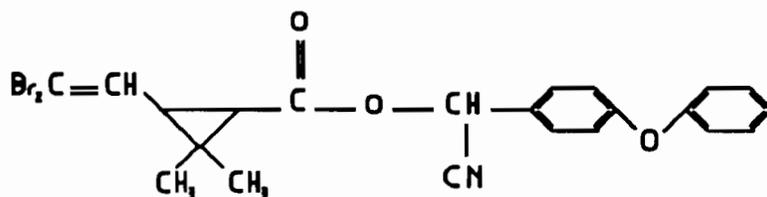


Figure 5 : Formule développée d'un pyréthriinoïde, la deltaméthrine.

Les régulateurs de croissance représentent quant à eux, l'espoir d'une stratégie de lutte nouvelle en raison de leur spectre d'action étroit. Nous envisagerons plus longuement l'intérêt de ces produits au cours du paragraphe 3.

En réalité, plus que de nouvelles molécules dont la synthèse représente un énorme effort financier, il devient nécessaire de mettre au point de nouvelles stratégies de lutte.

Ainsi, il est possible d'utiliser plusieurs insecticides chimiques en rotation ou en mélange de sorte que l'apparition de nouvelles résistances soit ralentie.

Il existe maintenant également de nouvelles techniques d'application comme les pulvérisations en aérosols à volume ultra-faible (VUF) ou les brouillards thermiques qui sont particulièrement efficaces lorsque le vecteur est exophile, exophage et péridomestique (Anonyme, 1985).

2.2 - Méthodes biologiques

Les techniques biologiques sont connues depuis très longtemps. Elles sont fondées sur l'existence d'ennemis naturels des vecteurs tels que les prédateurs, les compétiteurs ou les agents pathogènes qui régulent les populations.

D'autres techniques faisant appel à des manipulations génétiques ouvrent aussi des perspectives nouvelles en matière de lutte contre les vecteurs.

La connaissance d'insectes prédateurs d'autres insectes est ancienne, le travail bénéfique pour les cultures que les coccinelles accomplissent vis-à-vis des pucerons n'est pas un fait nouveau, mais leur utilisation expérimentale n'a commencé qu'au siècle dernier.

Ces techniques ne peuvent être appliquées avec efficacité que si les espèces entomophages et les agents pathogènes sont bien déterminés ainsi que leur biologie.

Leur utilisation dans le domaine de l'agriculture est déjà très importante et elle a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux. Nous limiterons notre propos au seul cas des moustiques.

2.2.1 - Prédateurs

L'emploi des poissons larvivores contre les Culicidés est fortement encouragé. *Gambusia affinis* a été introduit en Europe, au Moyen Orient, aux Etats Unis et en Afghanistan où il est largement utilisé contre les Anophèles dans les rizières. Ce poisson est capable de consommer une grande quantité de larves et de survivre en leur absence. Le guppy, *Poecilia reticulata*, a été utilisé avec succès en Italie, en Grèce, en Iran et aux Etats Unis (Quellenec, 1974). Cependant il faut rester conscient des limites de ces agents de lutte, leur pleine efficacité n'étant réelle que dans des points d'eau permanents de petite taille de préférence. Ils seraient peu performants contre un vecteur comme *Anopheles gambiae* dont la plupart des gîtes sont très temporaires. En revanche, certains *Cyprinodontidae* dont les oeufs supportent la dessiccation seraient utilisables dans des gîtes temporaires.

D'autres Culicidés sont considérés comme des prédateurs. Ce sont les *Toxorhynchites* sp. dont les adultes ne piquent pas mais se nourrissent du nectar des plantes tandis que leurs larves sont carnivores à tous les stades et dévorent les larves des autres moustiques. Les essais réalisés jusqu'à présent en ce qui concerne la lutte contre *Aedes polynesiensis*, vecteur de filariose de Bancroft en Polynésie, n'ont pas eu tout le succès que l'on espérait (Rivière *et al.*, 1979).

2.2.2 - Agents pathogènes

L'identification d'agents pathogènes des insectes remonte à 1602 avec la découverte d'un parasite interne chez *Pieris rapae* (L.) interprété comme tel seulement en 1706 (Doutt, 1964). Dans le domaine de la lutte biologique, les plus prometteurs sont les champignons et les nématodes qui sont tous des parasites obligatoires des vecteurs chez lesquels on les trouve. Ils regroupent également les protozoaires, les virus et les bactéries.

Les champignons

De nombreux types de champignons sont utilisables en lutte antivectorielle. Les plus efficaces appartiennent au genre *Coelomomyces*. Ils ont été isolés principalement chez des moustiques et certaines espèces présentent une spécificité très étroite.

Les larves de moustiques subissent une forte mortalité consécutive à l'apparition dans l'hémocèle des sporanges détruisant massivement certains organes et le tissu adipeux. Ces sporanges proviennent d'un mycélium cloisonné qui envahit toute la larve (Laird, 1962).

Le développement de *Coelomomyces* est intéressant car ce champignon peut se propager, entretenant un niveau modéré à élevé de destruction des larves. Lors de certains essais, on a observé des mortalités supérieures à 90 % (Anonyme, 1982).

Cependant ces champignons ont un cycle biologique complexe qui exige la présence d'un crustacé (ostracode ou copépode), infecté par les zoospores, forme de propagation, en plus de celle d'un moustique rendant ainsi l'étude et l'évaluation de leur activité plus difficiles.

Les nématodes

Tous les nématodes dont on envisage actuellement l'utilisation comme agents de lutte biologique contre les moustiques et les simulies appartiennent à la famille des Mermithidés. Trois espèces font actuellement l'objet de recherches dont la plus connue est *Romanomermis culicivorax*. Les essais sur le terrain ont montré que pour être efficace à long terme, *R. culicivorax* doit être appliqué plusieurs fois pour que son recyclage soit possible.

L'étude d'un autre nématode *Mesomermis fluminalis* efficace contre les larves de *Simulium venustum* a été conduite aux Etats-Unis. Le taux de parasitisme enregistré au laboratoire n'a jamais dépassé 80 % or on sait que dans la nature un taux de parasitisme de 50 % n'a aucun effet sur une situation hyperendémique d'onchocercose.

Les traitements fondés sur l'utilisation de cet agent ont donc peu de chances d'être efficaces (Molloy et Jamnback, 1977).

Les protozoaires

Les protozoaires qui offrent des perspectives pour la lutte antivectorielle appartiennent essentiellement à la classe des microsporidies.

Au laboratoire de Bondy, les oeufs d'*Anopheles stephensi* sont lavés au formol 0,01 % avant d'être mis en élevage afin d'éliminer les microsporidies qui s'y trouvent naturellement et qui augmentent la mortalité larvaire (Elissa, 1990).

Les virus

L'utilisation des virus comme agents de lutte biologique est possible. On a isolé plus de 600 virus chez les ravageurs des cultures mais seulement quelques douzaines chez les vecteurs de maladies. Des progrès ont été accomplis ces dernières années pour améliorer les méthodes de production.

Les bactéries

L'intérêt de l'utilisation des bactéries comme agents toxiques repose sur les spores et les toxines qu'elles produisent et sur leur caractère de spécificité.

Ces toxines agissent sur les insectes par ingestion mais sont inoffensives pour la faune non-cible en particulier pour l'homme. On peut les appliquer pratiquement dans tous les types d'habitat où il est possible d'épandre des insecticides.

En matière de lutte contre les vecteurs de maladies, on connaît deux espèces : *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus*.

Il existe plusieurs variétés de *Bacillus thuringiensis*. Ainsi dans le domaine de la lutte contre les moustiques c'est *B. thuringiensis* var. *israelensis* qui se montre la plus efficace.

Dans l'espèce *B. sphaericus*, on ne connaît jusqu'à maintenant que des variétés efficaces contre les moustiques.

Ils ont été utilisés tous les deux plusieurs fois avec succès sur des populations de moustiques et de simules (Karch, 1987 ; Hougard, 1988).

Ces deux bactéries produisent au cours de leur sporulation une ou plusieurs protéines toxiques qui s'assemblent généralement en cristaux. Après ingestion de la spore par les larves de moustiques, les cristaux sont progressivement dissous.

Les cellules du mésentéron des larves sont la cible des toxines. Elles dégènèrent progressivement avec une forte vacuolisation du cytoplasme qui aboutit à l'éclatement de la cellule dans la lumière de l'intestin.

La dégradation du tissu épithélial, la modification de la perméabilité membranaire ainsi que les altérations cytologiques du système nerveux et de la structure musculaire entraînent la mort de l'insecte (Monteny, 1990).

La production de ces bactéries peut être facilement résolue dans des installations typiques de fermentation en milieu liquide ou solide stérile.

Un seul problème subsiste, celui de leur sédimentation au fond des gîtes traités qui tend à être un facteur limitant à leur utilisation optimale. Des améliorations de leur formulation sont donc nécessaires.

Leur emploi est plus délicat que celui des insecticides conventionnels et notamment en raison de l'importance des contrôles de qualité qui doivent être des plus rigoureux. Il importe à ce sujet, de mettre au point des normes adéquates pour les produits commerciaux contenant des agents biologiquement actifs. Les techniques de titrages biologiques doivent être standardisées car il est nécessaire de pouvoir comparer les résultats.

Il faut également accorder une attention toute particulière au comportement et à la bionomie du vecteur par rapport aux populations ennemies naturelles, au potentiel de recyclage de certains agents qui doit être favorisé tout en étant contrôlé afin d'assurer la permanence de la lutte. En outre, il est toujours délicat d'introduire un nouvel élément dans un écosystème naturel et, par ailleurs, il est toujours possible que l'agent de lutte biologique trouve un équilibre avec celui qu'il doit éliminer.

Ces dernières années, des travaux ont été entrepris concernant la biologie moléculaire des protéines de toxines afin de déterminer les gènes responsables de leur synthèse et de trouver les conditions de transformation de différents organismes hôtes susceptibles d'exprimer ces protéines et de subsister dans le milieu, améliorant ainsi l'efficacité des insecticides biologiques.

S'il reste encore beaucoup de progrès à faire en ce qui concerne la production de masse de ces agents, les résultats obtenus avec *B. thuringiensis* et *B. sphaericus* pour lutter contre les moustiques, sont d'ores et déjà très prometteurs.

2.2.3 - Manipulations génétiques

Des croisements interspécifiques entre membres d'un complexe d'espèces peuvent aboutir à la production d'hybrides stériles mâles et femelles.

Il est possible d'envisager l'utilisation de telles hybridations dans la nature à condition que les hybrides soient plus compétitifs, ce qui *a priori* n'est pas évident comme en témoigne la tentative effectuée en Haute-Volta en 1968 : environ 300 000 mâles hybrides d'*Anopheles gambiae* B et *Anopheles melas* avaient été lâchés sans réel succès (Queleennec, 1974).

On peut plus simplement procéder à des lâchers de mâles préalablement stérilisés par irradiations aux rayons gamma par exemple, par le froid, ou encore avec certains produits chimiques (Quelennec, 1974).

Le succès d'un programme de lutte contre une myiase du bétail provoquée par *Cochliomyia hominivorax* aux Etats Unis a contribué à lancer un grand nombre d'études. La destruction de ce vecteur en Floride avait été obtenue par des lâchers répétés de mâles stérilisés aux rayons X (Mouchet, 1978).

Il faut noter que *C. hominivorax* ne semble s'accoupler qu'une seule fois et que les conditions géographiques se prêtaient bien à un tel succès.

D'autres techniques reposent sur l'introduction de souches réfractaires à un agent pathogène. Les lâchers de telles souches pourraient introduire dans une population sauvage une incapacité à transmettre l'agent pathogène.

Des souches présentant des gènes létaux pour les descendances pourraient être introduites de la même façon.

2.3 - Méthodes écologiques

Les méthodes écologiques font appel à des manipulations visant à modifier les facteurs environnementaux ou leurs interactions avec l'homme. Leur finalité est de prévenir ou de réduire au minimum la propagation des vecteurs ainsi que les contacts homme - vecteur - agent pathogène (Anonyme, 1985).

De telles méthodes présentent un grand nombre d'avantages à condition que les ouvrages mis en place soient utilisés et entretenus convenablement et qu'ils ne causent pas d'effets préjudiciables à la qualité de l'environnement.

Elles supposent une parfaite connaissance de l'écologie des moustiques et de la dynamique de leurs populations ainsi que de l'épidémiologie des maladies transmises.

Il convient donc d'étudier l'habitat des moustiques si on entend les attaquer efficacement.

En Polynésie, on a limité l'extension des gîtes à Cératopogonidés en construisant des digues à la jonction eau de mer-eau de ruissellement, empêchant ainsi l'accumulation des sédiments saumâtres, gîtes de prédilection de ces insectes (Mouchet et Bellec, 1990).

Une expérience se poursuit dans l'état de Kerala en Inde, dans le cadre d'une campagne de lutte contre *Brugia malayi*. Au cours de celle-ci, le traitement des malades a été couplé à l'élimination des plantes aquatiques qui servent de support aux *Mansonia* vecteurs de la maladie, ce qui témoigne de l'importance de l'organisation qui doit entourer ces campagnes de lutte (Mouchet et Bellec, 1990).

La protection des maisons par moustiquaires, les mesures individuelles d'hygiène, la mise en place d'obstacles mécaniques et des équipements nécessaires à l'approvisionnement en eau et à son évacuation sont, quant à elles, des mesures qui tendent à limiter le contact homme-vecteur.

En ce qui concerne les moustiquaires, leur utilisation est ancienne mais leur imprégnation par des pyréthrinoïdes est une méthode nouvelle qui donne de bons résultats comme le montrent les résultats obtenus au Burkina-Faso avec une baisse de 90 % de la transmission du paludisme et des effets durables (Carnevale *et al.*, 1988).

L'apparition des phénomènes de résistance des espèces aux insecticides et les préoccupations écologiques font que ces méthodes qui avaient pratiquement disparu avec l'avènement des insecticides chimiques, sont à nouveau utilisées et intégrées aux stratégies de lutte.

Les inconvénients des opérations d'aménagement de l'environnement tiennent principalement au coût élevé des investissements et à la durée nécessaire à leur mise en oeuvre.

En outre la modification des caractéristiques topographiques, hydrologiques et biologiques d'un biotope ne peut pas être sans influence sur le milieu. Or il n'est pas possible de déterminer avec exactitude quelles en seront les conséquences.

3 - Les régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance, comme nous l'avons déjà mentionné, appartiennent à la catégorie des nouveaux insecticides, dits de remplacement, dans lesquels de grands espoirs ont été placés.

Le principe de la lutte au moyen de régulateurs de croissance ou IGR (Insect Growth Regulators) est fondé sur la connaissance du mode d'action des hormones qui contrôlent le développement de tout organisme.

Les hormones agissent à de très faibles doses et on sait que l'apport exogène d'hormone dans un organisme entraîne des déséquilibres de la balance hormonale à l'origine de très importantes perturbations physiologiques.

On peut alors espérer que l'introduction dans l'environnement de substances agonistes d'hormones pourra avoir des effets comparables.

C'est l'entomologiste Williams qui, en 1956 après la célèbre démonstration par Wigglesworth de l'existence d'un contrôle endocrine de la mue chez *Rhodnius prolixus*, suggère le premier que les hormones pourraient présenter un potentiel insecticide (Stockel, 1975).

La bonne utilisation de ces produits va dépendre de la connaissance que l'on a pu acquérir quant à la physiologie et l'endocrinologie des moustiques car, il importe que les étapes au cours desquelles il est possible d'appliquer ces produits soient bien déterminées.

3.1 - Présentation

Il existe deux familles de régulateurs de croissance :

- les analogues des hormones juvéniles (AHJ) ;
- les inhibiteurs de la mue.

Contrairement aux insecticides conventionnels qui agissent généralement sur le système nerveux, les régulateurs de croissance ont pour site d'action les tissus-cibles des hormones.

Dans les deux cas, ce sont des substances qui permettent de lutter contre les insectes grâce aux interactions qu'ils provoquent avec la croissance et le développement.

Ils sont principalement actifs sur les stades larvaires et surtout par ingestion de matière active adsorbée sur des particules en suspension.

Plus que par leur toxicité directe, ils se caractérisent par leur effet retard : ils ne provoquent pas de mortalité immédiatement après le traitement mais plutôt au cours des mues suivantes.

Les régulateurs de croissance n'agissent pas selon un mode d'action unique, et en outre, leurs effets finaux aussi sont différents : effets morphogénétiques (Arias et Mulla, 1975), prolongation des stades larvaires (Akai et Kobayashi, 1971), inhibition de l'entrée en diapause (Bowers et Blickenstaff, 1966), stérilité permanente des femelles (Slama, 1971), inhibition du processus de mélanisation des nymphes (Busvine *et al.*, 1976).

Ces produits présentent un certain nombre d'avantages parmi lesquels on peut citer en premier lieu leur caractère non polluant : généralement biodégradables, ils interviennent en outre à des doses très faibles, de sorte que le problème de leur accumulation dans la nature ne se pose pas.

L'activité de ces produits ne se manifesterait que dans l'embranchement des Arthropodes ce qui implique *a priori* l'absence de risques pour l'homme et les mammifères. La spécificité des inhibiteurs de croissance est encore plus importante dans la classe des insectes et selon le produit, elle peut même aller jusqu'à l'ordre, la famille ou encore l'espèce (Stockel, 1975).

Rappelons tout d'abord les points les plus importants du contrôle hormonal de la croissance et du développement.

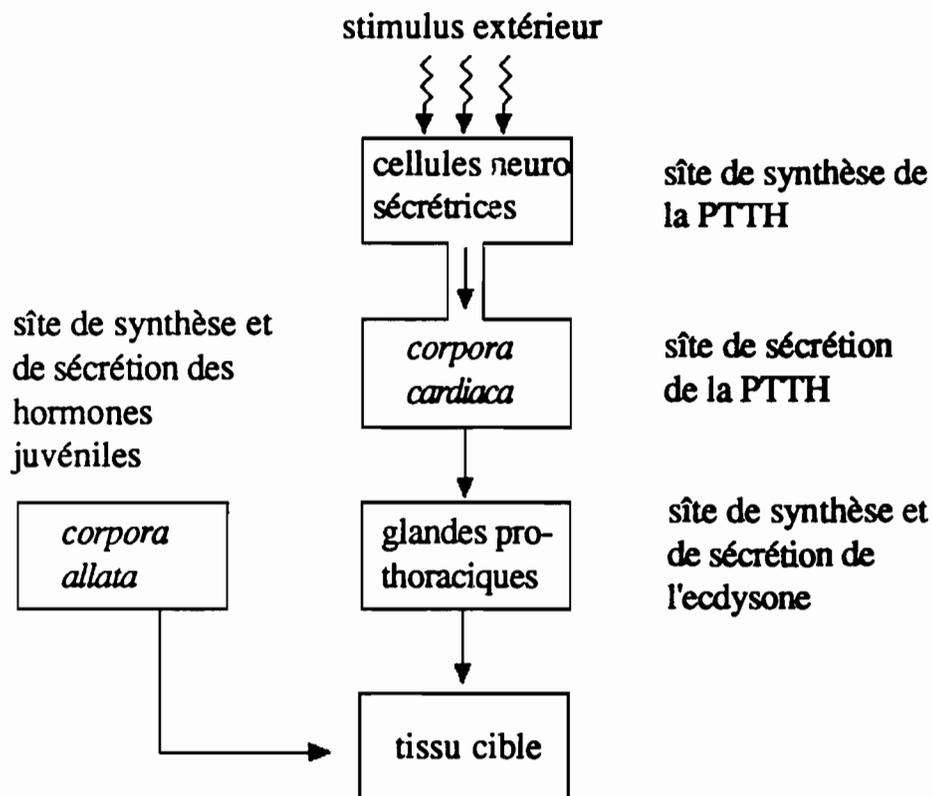
3.2 - Les hormones du développement

Le développement des insectes est sous le contrôle d'un système neuroendocrine qui comprend des centres neurosécréteurs au sein du système nerveux central, associés à des organes neurohémaux, les *corpora cardiaca* et à des glandes endocrines, les *corpora allata* et les glandes prothoraciques (Raccaud-Schoëller, 1980 ; Jennings, 1983 ; Stockel, 1975 ; Slama, 1971).

Quand les conditions de croissance et les conditions écologiques nécessaires sont à leur optimum, certaines cellules de la *pars intercerebralis* du cerveau élaborent un neuropeptide : l'hormone prothoracotrope (PTTH) qui est stockée dans les *corpora cardiaca*. Sa libération permet une activation des glandes prothoraciques qui produisent l'hormone de mue ou ecdysone.

Les *corpora allata* sécrètent une hormone responsable du maintien des caractères larvaires, l'hormone juvénile, dont la synthèse et la libération sont contrôlées par des neuropeptides d'origine cérébrale, les allatotropines. L'ecdysone et l'hormone juvénile sont à leur tour libérées dans l'hémolymphes où elles iront stimuler leur tissu cible.

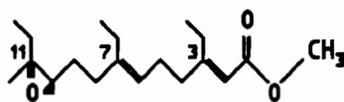
Cette succession d'événements peut être schématisée comme suit (d'après Koolman, 1990) :



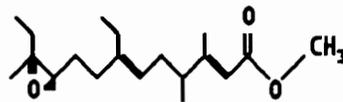
3.2.1 - Les hormones juvéniles

Les hormones juvéniles (HJ) sont apparentées au farnésol, dérivé terpénique en C15. Elles présentent une fonction époxy en C10, C11 et un radical méthyl ester en C1.

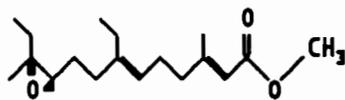
Actuellement, on connaît 5 hormones juvéniles qui diffèrent les unes des autres par la longueur des chaînes fixées sur les carbones 3, 7 et 11 (Figure 6).



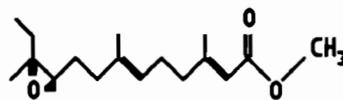
HJ0 (C19)



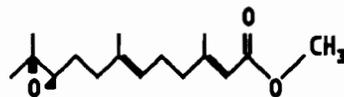
iso JH0 : 4 - méthyl JHI



HJI (C18)



HJII (C17)



JHIII (C16)

Figure 6 : Formules développées des cinq hormones juvéniles mises en évidence jusqu'à l'heure actuelle.

La production de ces hormones est cyclique comme nous pouvons le voir sur la figure 7 qui illustre la situation observée en particulier chez *Manduca sexta*.

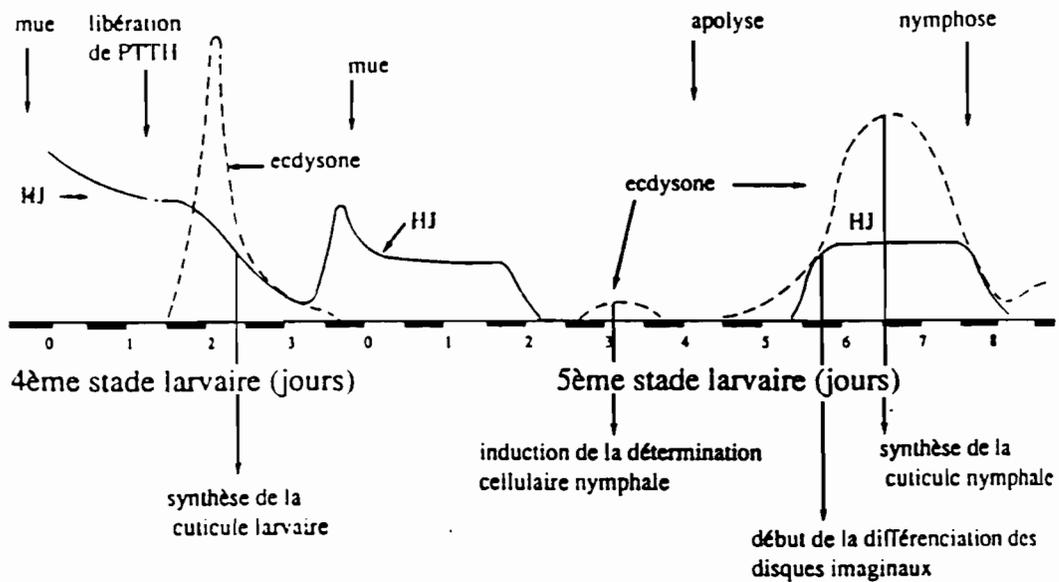


Figure 7 : Représentation des variations des titres de l'ecdysone et de la HJ et des événements épidermiques résultants au cours des 4ème et 5ème stades larvaires chez *Manduca* (d'après Riddiford, 1981).

Elle est forte au début de chaque stade larvaire puis elle s'abaisse sans devenir nulle sauf au cours du dernier stade, ce qui provoque la différenciation des structures nymphales ou adultes correspondant à la métamorphose.

La qualité de la mue est donc déterminée par la présence ou l'absence de l'hormone juvénile.

Le rôle des HJ dans le contrôle de la reproduction a été suggéré par Larson et Bodenstein en 1959 (Fuchs et Kang, 1981).

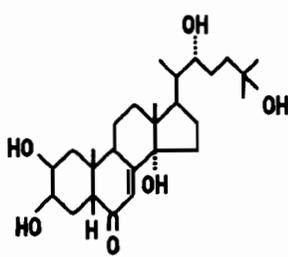
Chez les moustiques, où la vitellogénèse a lieu au stade adulte, les *corpora allata* sécrètent une HJ juste après l'émergence qui est nécessaire à la maturation ovarienne (Lea, 1963) : elle permet aux follicules d'atteindre le stade dit quiescent dans lequel ils resteront jusqu'au repas de sang (Gwadz et Spielman, 1973).

Après le repas de sang, on observe à nouveau une sécrétion de HJ impliquée dans la synthèse des protéines nécessaires au développement des oeufs par le tissu adipeux (Flanagan et Hagedorn, 1977).

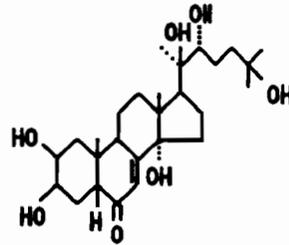
3.2.2 - Les ecdystéroïdes

L'hormone de mue ou ecdysone a été extraite en 1954 par Butenandt et Karlson à partir de chrysalides de *Bombyx mori*, sa structure chimique a été déterminée 10 ans plus tard par les rayons X.

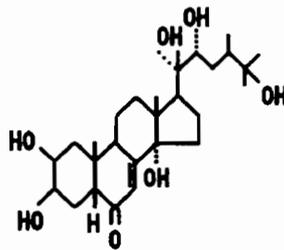
L'ecdysone est un stéroïde particulier qui présente le squelette complet du cholestérol et plusieurs fonctions hydroxyles ainsi qu'une fonction cétone (Figure 8 (1)).



(1) : Ecdysone



(2) : 20 - hydroxyecdysone



(3) : Makisterone

Figure 8 : Formules développées de quelques ecdystéroïdes présentant une fonction hormonale semblable parmi les arthropodes.

Les glandes prothoraciques élaborent l'ecdysone qui est sécrétée dans l'hémolymphe.

L'ecdysone est hydroxylée en position C20 par de nombreux tissus où elle donne naissance à la 20-hydroxyecdysone (20E) (Figure 8 (2)).

La concentration de ces hormones chez les insectes est très variable selon l'espèce, mais au sein d'une même espèce, elle varie également en fonction du stade de développement (Horn, 1971). La figure 7 présentée dans le paragraphe précédent illustre bien ce phénomène.

Chez certains Hémiptères, Hyménoptères et Diptères phytophages, la makistéronone A dérivée du campestérol (Figure 8 (3)) remplace la 20E. De nombreuses molécules chimiquement apparentées à l'ecdysone ont été découvertes chez les animaux et les végétaux constituant la famille des ecdystéroïdes (Koolman, 1990).

Les ecdystéroïdes sont impliqués dans le contrôle des mues larvaires, nymphale et imaginale. Ils agissent sur l'ADN nucléaire en induisant la synthèse de nouveaux ARN qui vont coder pour des protéines enzymatiques et structurales impliquées dans les processus de croissance et de différenciation.

C'est au début des années 1970 que Hagedorn avance l'hypothèse de l'existence d'une sécrétion d'ecdysone par les ovaires mettant ainsi en évidence le rôle des ecdystéroïdes dans la reproduction chez les adultes femelles (Riddiford et Truman, 1978).

Les cellules de la *pars intercerebralis* émettent avant le repas un facteur neurohémal de nature peptidique connu sous le nom de Egg Development NeuroHormone (EDNH) (Lea, 1972). Celui-ci est stocké dans les *corpora cardiaca* (CC). Après le repas, l'EDNH est libérée par les CC pour stimuler la production d'ecdysone par les ovaires (Lea, *op. cit.*).

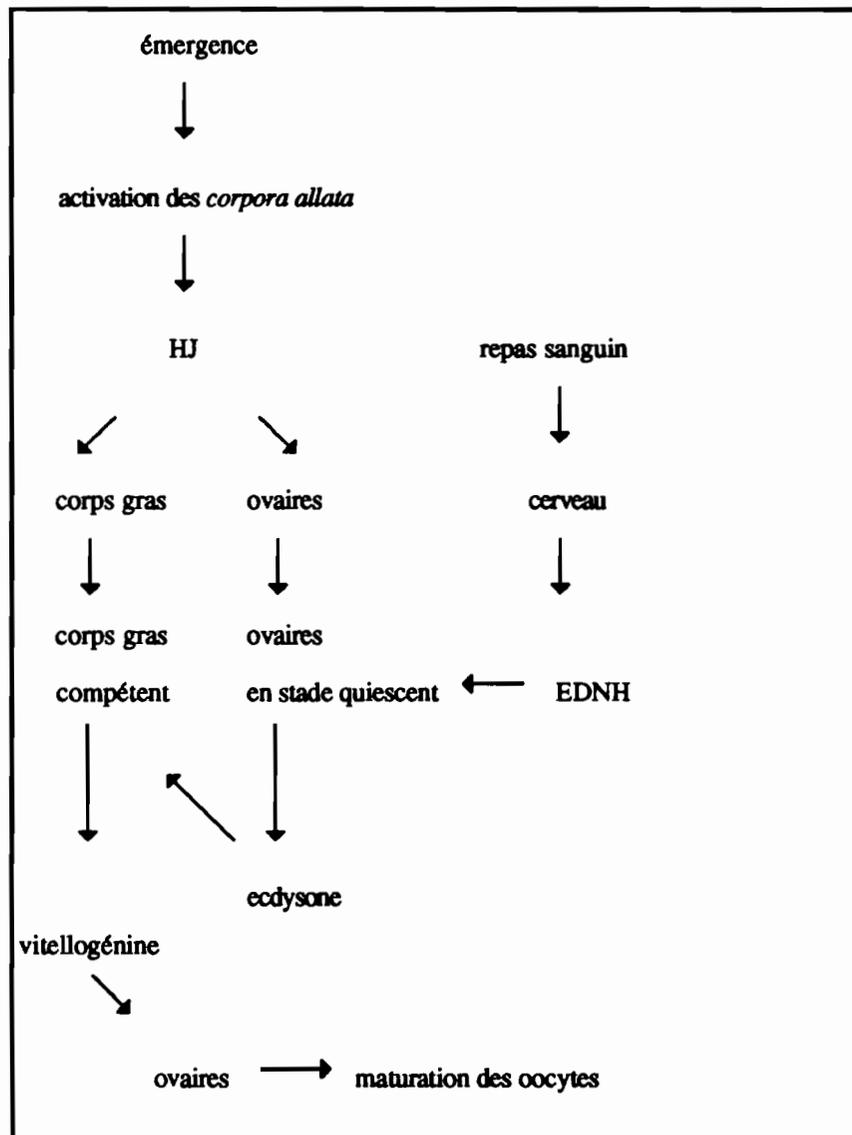
L'ecdysone synthétisée dans les ovaires est déversée dans l'hémolymphe vers le tissu adipeux rendu compétent à son action par la HJ comme nous l'avons mentionné précédemment. Elle est alors hydroxylée en 20E pour stimuler la vitellogenèse (Hagedorn *et al.*, 1975).

Les protéines vitellines sont sécrétées dans l'hémolymphe puis capturées par les oocytes. Il semble d'ailleurs qu'à ce niveau, les HJ soient encore impliquées (Riddiford et Truman, 1978).

On constate donc que c'est l'action gonadotrope de ces deux hormones qui conditionne la vitellogenèse.

Le processus de la reproduction est un phénomène aussi complexe que celui de la mue et de la métamorphose, il n'est d'ailleurs pas encore élucidé dans sa totalité.

Nous donnons ci-dessous une représentation schématique de l'action de l'hormone juvénile et de l'ecdysone sur la reproduction, inspirée de Hagedorn (1974) et de Flanagan et Hagedorn (1977) :



Ainsi, nous sommes en présence d'hormones à double fonction : régulation du développement larvaire et régulation de la reproduction.

Le système endocriné qui contrôle le développement des insectes et leur reproduction présente donc un certain nombre de points qui peuvent servir de cible à des insecticides comme les inhibiteurs de croissance (Raccaud-Schoëller, 1980).

3.3 - Les analogues de l'hormone juvénile

Ce sont en général des composés biodégradables, instables à la lumière. La plupart sont des composés lipophiles avec une solubilité dans l'eau assez faible (1 mg / l à 25°C). Ces produits sont cependant rapidement redistribués dans l'eau par adsorption sur des particules organiques ou non.

Ils agissent par ingestion et par contact, leur nature lipophile leur permettant de pénétrer facilement la cuticule.

Actuellement, le produit le plus prometteur et le plus utilisé est le méthoprène.

On constate que l'application des AHJ à des stades larvaires finaux est la plus efficace. Le processus de la métamorphose est alors bloqué de façon irréversible.

L'effet principal observé est la réduction de l'émergence.

Ces composés agissent sur la fécondité des femelles ainsi que sur la viabilité des oeufs (Arias and Mulla, 1975 ; Edwards, 1975).

Le blocage du développement embryonnaire s'observe aussi bien chez les Orthoptères, les Hémiptères, les Lépidoptères que chez les Coléoptères (Stockel, 1975).

Les différences d'action sur les diverses espèces d'insectes dépendent de nombreux facteurs dont trois apparaissent importants : la perméabilité du tégument, les transports extracellulaires et intracellulaires et la capacité des AHJ à se lier aux récepteurs des HJ.

Nous n'aborderons pas les AHJ plus longuement dans la mesure où ils n'ont pas fait l'objet de notre travail.

3.4 - Les antagonistes des ecdystéroïdes

Parmi tous les produits synthétisés jusqu'à maintenant, c'est le diflubenzuron qui a donné les résultats les plus favorables et il commence à être largement utilisé (Figure 9).

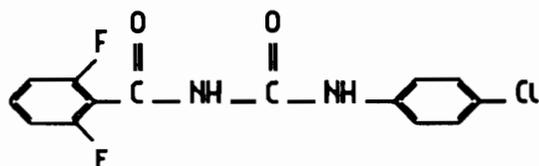


Figure 9 : Formule développée du diflubenzuron.

L'examen des coupes histologiques d'insectes traités au moyen des inhibiteurs de la mue révèle une perturbation de la formation de la cuticule. Il semble que l'endocuticule soit altérée de telle sorte que son épaisseur reste anormalement faible. Il en résulte une fragilisation du tégument et les individus restent bloqués au sein de leur exuvie (Grosscurt, 1978).

Plusieurs hypothèses ont été proposées quant au mode d'action de ces composés : inhibition de la synthèse de la chitine (Post *et al.*, 1974) par action sur la chitine-synthétase (Hajjar et Casida, 1979 ; Van Eck, 1979) ou sur le métabolisme des glucides et des protéines hémolymphatiques (Soltani, 1990), augmentation de l'activité de la chitinase (Ishaaya et Casida, 1974), inhibition du métabolisme des ecdystéroïdes (Yu et Terrière, 1977) ou enfin inhibition de la prolifération des cellules épidermiques imaginaires et de la synthèse de l'ADN (Soltani *et al.*, 1984). Les IGR pourraient agir directement sur les enzymes comme la chitinase ou les enzymes associées au métabolisme de la chitine, mais ils pourraient aussi interférer avec le métabolisme de l'hormone de mue pour agir secondairement sur les enzymes.

Du fait de l'interaction de ces produits avec les processus de synthèse cuticulaire, un effet est possible au niveau de la membrane péritrophique.

C'est le cas chez *Locusta migratoria* (Clarke *et al.*, 1977), où on constate une augmentation de l'apparence fibreuse s'accompagnant d'une fragilisation de la membrane péritrophique et d'une réduction de poids. Le changement de texture de la membrane péritrophique pourrait s'expliquer par une activité au niveau de la synthèse de la chitine.

Il pourrait y avoir réduction de la longueur des chaînes de chitine ou diminution de la cohésion de l'ensemble des chaînes, entraînant une mauvaise incorporation des protéines cuticulaires.

Finalement on observe une réduction globale du taux de chitine et de protéines qui entraîne une perte de poids.

Les inhibiteurs de la mue qui agissent par ingestion, sont utilisés comme larvicides. Tous les stades larvaires sont en général sensibles à leur action, ce qui implique que l'on peut les utiliser sur des populations asynchrones avec une meilleure efficacité.

Chez certaines espèces cependant, on a observé une activité par application topique parfois même plus efficace que par ingestion. C'est le cas avec *Spodoptera littoralis* (Grosscurt, 1978).

La mortalité se produit lors de la mue qui suit le traitement mais si la concentration utilisée est faible, les effets peuvent se manifester sur les mues suivantes ou sur la mue larve-nymphé ou encore nymphé-adulte.

Parmi les substances testées, d'autres ont montré une activité ovicide, certaines ont provoqué la stérilité chez les adultes. L'activité ovicide s'observe aussi bien par contact direct des oeufs avec le produit que par l'intermédiaire de la femelle.

Dans ce cas, elle dépend de l'âge de la femelle, de la concentration et de la formulation du produit. La sensibilité des oeufs est plus forte lorsqu'ils sont encore jeunes.

Chez certaines espèces, les individus se révèlent capables de sortir de leur exuvie mais ne peuvent ensuite se mouvoir (Lochouarn, 1990).

Le diflubenzuron peut être utilisé à des doses variant de 7,5 à 200 g (matière active) par hectare pour lutter contre les lépidoptères dont beaucoup constituent des fléaux en agriculture ou en sylviculture comme la chenille processionnaire, *Thaumetopoea pityocampa*. Il révèle également une activité importante sur les Diptères. Cependant d'autres espèces ne peuvent être atteintes, les doses requises étant trop élevées (2,2 kg (matière active) / hectare pour lutter contre *Trichoplusia ni*), ou les gîtes étant inaccessibles au traitement : les larves se nourrissant par exemple à l'intérieur des feuilles des plantes qu'elles détruisent (Grosscurt, 1978).

3.5 - Intérêt de leur utilisation

Les IGR constituent des insecticides de remplacement que l'on devrait pouvoir associer aux stratégies de lutte intégrée.

Leur spécificité étroite, comme leur biodégradabilité et leur action sur la physiologie de l'insecte les rendent écologiquement intéressants.

Si l'éradication du vecteur n'a pas été obtenue, les perturbations physiologiques qui résultent du traitement restent intéressantes dans la mesure où elles peuvent affecter la longévité, la reproduction et peut-être même la capacité vectorielle de l'insecte.

Les régulateurs de croissance qui perturbent le développement des larves pourraient avoir un effet chez l'adulte au niveau d'organes qui sont soumis à un contrôle hormonal du même type que celui du développement larvaire, les organes génitaux par exemple.

Si les organes reproducteurs des survivants sont affectés par le traitement, on peut espérer voir le niveau général de la population s'abaisser jusqu'à un seuil où la transmission des agents pathogènes véhiculés serait réduite.

On espérait que les insectes ne développent pas de résistance vis-à-vis de ces composés. En fait ce problème doit, semble-t-il, être reconsidéré, non pas que les insectes deviennent résistants mais parce que l'on a observé des phénomènes de résistance croisée avec d'autres insecticides.

Une résistance croisée avec le diflubenzuron a été pour la première fois mise en évidence en 1972 par Cerf et Georghiou avec des souches de *Musca domestica* résistantes aux organophosphorés, aux carbamates et aux organochlorés (Grosscurt, 1978).

Cependant les niveaux de résistance obtenus, de l'ordre de 10 fois à des niveaux encore plus importants, semblent difficilement interprétables compte tenu de l'incertitude quant à la quantité d'insecticide ayant véritablement pénétré. Les tests exécutés avec des souches de *Culex quinquefasciatus* et *Aedes aegypti* résistantes au DDT donnent d'ailleurs des niveaux de résistance beaucoup moins importants. Ils sont respectivement de 3,2 et 2,1.

Enfin, les expériences réalisées pour tester l'effet des IGR sur la faune non-cible ont donné des résultats très favorables à leur application.

Les copépodes, les ostracodes (*Cypris*) et les cladocères (*Daphnia*) que l'on trouve dans les mêmes biotopes que les larves de moustiques ne semblent pas sensibles à l'action du diflubenzuron (Mulla *et al.*, 1975).

On observe en général une légère réduction de leurs populations mais l'espèce affectée recouvre toujours rapidement le niveau d'abondance qui était le sien avant le traitement.

Quant aux larves de libellules, le traitement est sans effet sur elles.

Les études de l'effet de ces produits sur les Oligochètes et les Hirudinés montrent l'absence de toxicité (Ali et Lord, 1980).

De la même façon, l'effet des traitements sur les Rotifères semble négligeable (Apperson *et al.*, 1978).

En ce qui concerne les algues, elles ne semblent pas affectées bien que l'on observe alors une diminution du taux de fixation de l'azote dans les cultures (Apperson *et al.*, *op. cit.*).

Les IGR apparaissent également sans danger pour les mammifères comme en témoignent les résultats de la campagne pilote menée à Hawaï pour l'éradication de *Haematobia irritans* (Beadles *et al.*, 1975).

L'introduction de capsules de méthoprène dans l'alimentation du bétail a complètement inhibé le développement des mouches dans leurs déjections. Des résultats identiques ont été obtenus en introduisant l'insecticide dans l'eau de boisson du bétail.

L'efficacité des traitements s'observe pendant 3 à 5 semaines : la persistance de ces produits dans la nature varie avec leur composition et les facteurs extérieurs.

Apperson *et al.* (1978) montrent que 35 jours après le traitement, on retrouve encore des traces de diflubenzuron dans l'eau. Cette persistance est attribuée à la température et au pH modérés de l'eau.

On ne retrouve pas de trace de diflubenzuron dans les sédiments recouvrant les fonds des gîtes, ce qui suggère qu'il est rapidement dégradé avant ou au moment de sa pénétration.

Ainsi, bien que l'on reproche aux régulateurs de croissance leur faible stabilité, facteur contribuant pourtant à en limiter l'accumulation dans l'environnement, et qu'il semble impossible de les utiliser en tant qu'unique moyen de lutte, les avantages qu'ils offrent méritent d'être étudiés.

4 - Présentation de l'étude

Nous venons de dégager un certain nombre de problèmes auxquels sont confrontés ceux qui luttent actuellement contre les vecteurs et qui constituent les fondements de notre étude.

Nous avons vu que les efforts ne doivent plus se concentrer exclusivement sur la recherche de nouveaux insecticides, mais aussi sur l'amélioration des méthodes de traitement.

Les régulateurs de croissance offrent la possibilité de cibler davantage l'intervention sur les espèces que l'on souhaite éliminer mais leur utilisation optimale implique de parfaire nos connaissances quant aux mécanismes par lesquels ils agissent.

L'étude des effets des régulateurs de croissance à long terme sur les populations résiduelles nous semble constituer une étape importante à intégrer dans le choix du produit.

Les deux IGR que nous avons utilisés au cours de notre étude et que nous présentons dans le chapitre suivant, l'OMS 2017 et le diflubenzuron, sont considérés comme des antagonistes de l'ecdysone, appartenant à la famille des substitués de l'urée.

Nous avons donc considéré ces produits aussi bien comme des régulateurs de la croissance que comme des régulateurs de la reproduction chez le moustique afin d'apporter des éléments nouveaux concernant leur activité sur la fécondité et la fertilité des femelles.

Nous avons aussi été amenés à envisager l'effet possible des produits testés sur la production des ecdystéroïdes qui jouent un rôle de double contrôle de la croissance et de la reproduction chez le moustique. Il est en effet intéressant de déterminer dans quelle mesure ces effets sont liés à une perturbation de la production des ecdystéroïdes. Les taux d'ecdystéroïdes ont été mesurés par une méthode enzymo-immunologique, plus sensible que les méthodes radio-immunologiques.

Un autre aspect du problème a retenu notre attention. Il s'agit de l'étude des effets des traitements insecticides sur la capacité vectorielle des moustiques. Connaissant la finesse des mécanismes qui régissent le développement de l'agent pathogène à l'intérieur de l'insecte, on ne peut manquer de s'interroger sur le devenir de vecteurs potentiels ayant survécu à l'impact d'un traitement insecticide. Cette question a été peu abordée jusqu'à présent.

Notre propos est de tenter de déterminer dans quelle mesure un traitement insecticide peut favoriser ou au contraire inhiber les processus de vection. Pour ce faire, nous avons choisi comme modèle, le couple *Molinema dessetae* - *Aedes aegypti* et nous avons analysé différents paramètres (taux d'infestation, rendement parasitaire, distribution des filaires) nous permettant d'évaluer l'effet des traitements sur la dynamique de la transmission. Les résultats de cette étude sont comparés à ceux obtenus avec un autre modèle : le virus de la dengue 2 - *Aedes aegypti*.

Enfin, dans la mesure où le choix des régulateurs de croissance s'inscrit dans les préoccupations actuelles visant à limiter les risques de pollution de l'environnement et donc à préserver l'ensemble des espèces vivantes de notre planète, nous avons tenu à analyser l'impact des insecticides utilisés sur deux espèces non-cibles.

CHAPITRE 1

Chapitre 1

Matériel et méthodes

1 - *Aedes aegypti* : techniques d'élevage

Ce moustique très anthropophile constitue fréquemment une nuisance par sa seule abondance. Il est le vecteur majeur de la fièvre jaune et de la dengue.

Nous avons utilisé pour notre étude la souche GKEP fournie par le Museum d'Histoire Naturelle ; elle est en élevage au laboratoire depuis 1976. Cette souche originaire du Ghana a été spécialement sélectionnée pour la transmission des filaires de reptiles.

1.1 - Les oeufs

La ponte a lieu 2 à 3 jours après le repas sanguin des femelles.

Les oeufs sont pondus sur une bande de papier filtre de 26 cm x 7 cm qui recouvre les parois internes d'un pondoir de plastique à l'interface de l'eau. Ils sont récoltés trois fois par semaine : l'eau des pondoirs est vidée de telle sorte qu'il reste quelques centimètres cubes d'eau dans le fond.

Les pondoirs sont alors stockés dans un endroit humide afin que l'eau s'évapore lentement pendant que l'oeuf poursuit son développement. Lorsque le papier filtre est sec, il est plié et stocké jusqu'à son utilisation. On peut ainsi conserver les oeufs pendant une période de 3 mois environ.

Quand on a besoin de matériel, on met une bande pondoir dans une cuvette de plastique contenant 1,5 l d'eau bien froide (choc thermique) et quelques milligrammes d'acide ascorbique. En effet une réduction du taux d'oxygène dissout dans l'eau stimule l'éclosion (Christophers, 1960). L'acide ascorbique (ou vitamine C) qui est un capteur d'oxygène, permet de provoquer cette réduction d'oxygène.

Quand les oeufs ont éclos, on répartit les jeunes larves dans des cuvettes en plastique contenant 1,5 l d'eau à raison de 150 larves environ par cuvette. Ces cuvettes sont maintenues dans une pièce où il règne une température de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

1.2 - Les larves

Les larves sont nourries une fois par jour avec de la poudre de biscuit pour souris finement tamisée. Les cuvettes sont recouvertes d'un couvercle de plastique ou de tulle. A 28°C , les larves atteignent le stade nymphal en 7 jours.

Il est très important que les larves contenues dans les cristallisoirs ne soient pas en surpopulation. Dans de telles conditions, leur croissance serait ralentie, les nymphes présenteraient alors une réduction de leur taille, qui se retrouverait au stade adulte. On remarque en outre que dans ce cas, les populations ne se développent pas en harmonie : les tailles des larves pour un même stade varient énormément.

1.3 - Les nymphes

Les nymphes sont récoltées dès leur apparition au moyen d'une pipette à poire. Elles sont mises dans des gobelets de plastique de 200 ml qui sont ensuite introduits dans des cages recouvertes de tulle où émergent les adultes.

1.4 - Les adultes

L'émergence se produit 48 heures après la nymphose. Les adultes sont maintenus dans une pièce à une température de $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et 65 % d'humidité relative. Dès leur émergence, les adultes se nourrissent avec une solution de glucose à 10 % contenue dans un tube où plonge un papier filtre plissé. Le tube est changé 3 fois par semaine.

Les mâles se nourriront sur cette solution pendant toute leur vie alors que les femelles doivent, pour pondre, prendre un repas de sang. C'est en effet le repas de sang qui conditionne le développement des ovaires à maturité.

Les femelles prennent 3 fois par semaine un repas sanguin sur un cobaye qui est déposé, emmaillotté dans un manchon de tulle, sur le dessus de la cage.

2 - Les régulateurs de la croissance et du développement utilisés

Nous avons choisi pour notre travail deux composés : l'OMS 2017 et le diflubenzuron (DFB).

L'OMS 2017 n'est plus synthétisé en raison de son efficacité relative dans la nature mais les résultats préliminaires que nous avons enregistrés étaient suffisamment intéressants pour nous inciter à poursuivre nos études. En outre, les effets des régulateurs de croissance diffèrent d'un produit à l'autre rendant ainsi l'étude comparée intéressante. Selon Gaaboub *et al* (1981), les effets du diflubenzuron sur la fertilité des femelles d'*Aedes aegypti* semblent d'ailleurs tout à fait opposés à ceux que l'on obtient avec l'OMS 2017.

2.1 - L'OMS 2017

Nous avons peu d'informations sur ce composé récemment synthétisé mais qui n'a jamais été commercialisé (Guillet, 1985 ; Hougard, 1988).

Il nous a été envoyé par l'OMS et nous le présentons ici sous son nom de code.

De formule chimique globale $C_{18}H_{12}N_2Cl_4F_2O_3$, c'est un dérivé de l'urée, légèrement soluble dans l'eau. Il est peu toxique pour les mammifères : la DL aiguë chez le rat est supérieure à 4000 mg / kg par voie orale.

La figure 10 illustre sa formule développée qui s'écrit : 1-(3,5-dichloro-4-(2,2-dichlorocyclopropylméthoxy)-phényl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)-urée.

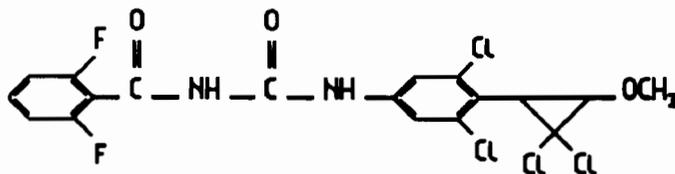


Figure 10 : Formule développée de l'OMS 2017

Il se présente sous la forme d'une poudre mouillable à 25 % de matière active (WP 25 %). Il a été utilisé en Côte d'Ivoire sur des larves du complexe *Simulium damnosum* (Hougard, 1988).

Sur des larves de simulies de stade VI-VII avec un temps de contact de 60 minutes (évaluation à échelle réduite), le taux de réduction d'émergence augmente avec la dose. On observe 28,4 % de réduction d'émergence à 0,1 mg / l, 40,6 % à 0,33 mg / l et 64,9 % à 1 mg / l.

Quand on réduit le temps de contact à 10 minutes, l'efficacité de l'OMS 2017 diminue et on n'observe guère plus de 50 % de réduction d'émergence à 2 g / l.

2.2 - Le diflubenzuron

C'est actuellement le seul IGR à connaître une large utilisation notamment en agriculture sous le nom de Dimilin®.

De formule globale $C_{14}H_9ClF_2N_2O_2$, il appartient également aux substitués de l'urée : 1-(4-chlorophényl)-3-(2,6 difluorobenzoyl) urée.

Nous rappelons sa formule en figure 11.

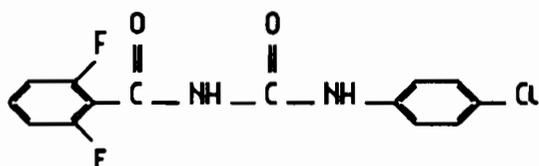


Figure 11 : Formule développée du diflubenzuron.

Il se présente également sous la forme d'une poudre mouillable à 25 % de matière active (WP 25 %). Il est peu toxique pour les mammifères : la DL50 chez le rat est supérieure à 10 000 mg / kg par voie orale.

Au laboratoire, les larves de la plupart des espèces de moustiques se montrent sensibles au diflubenzuron et des concentrations aussi faibles que 0,001 mg / l peuvent être utilisées comme CL 95. Dans des conditions naturelles, l'émergence des adultes est en général réduite complètement pendant 4 à 10 jours sauf dans des systèmes clos où l'effet du traitement peut se maintenir un mois.

Le diflubenzuron a été testé dans de nombreux pays aussi bien à échelle réduite qu'à grande échelle. Une étude au Pakistan révèle que ce produit est efficace à la concentration de 100 g / hectare (poudre mouillable) pour lutter contre les larves des moustiques de différentes espèces en eau polluée.

La rémanence du traitement est de 10 jours. La concentration peut être diminuée à 50 g par hectare en eau claire mais le traitement doit alors être renouvelé toutes les semaines.

Anopheles pharoensis, au Soudan montre une sensibilité au diflubenzuron : à 37,5 g par hectare (poudre mouillable) le taux de réduction des stades immatures est supérieur à 90 %. Les larves de moustiques font leur réapparition à partir du 5ème jour qui suit le traitement¹.

3 - Effets des traitements sur la survie adulte

Le protocole des traitements insecticides par des IGR que nous avons suivi est celui que l'OMS préconise.

3.1 - Préparation des solutions d'insecticide

Les solutions sont réalisées dans de l'eau permutée selon les conditions établies par l'OMS. On prépare une solution mère qui est refaite lors de chaque test afin que les résultats soient les plus reproductibles possibles.

A partir de cette solution, on peut préparer les différentes dilutions utilisées pour l'évaluation de l'activité des produits.

¹ Les résultats obtenus au Pakistan et au Soudan, sont communiqués par la firme Duphar qui commercialise le diflubenzuron.

3.2 - Choix des larves

Des larves de stade III âgées ou stade IV jeunes ont été utilisées.

Pour chaque concentration utilisée on répartit 100 larves par lot de 25 dans des gobelets de plastique de 200 ml de la dilution voulue. Les témoins au nombre de 100 sont mis dans 200 ml d'eau permutée par lot de 25.

La distribution des larves se fait au moyen d'un tamis de gaze afin de limiter l'apport en eau qui diminuerait la concentration du gobelet. On filtre donc les larves et on les introduit rapidement dans les gobelets de plastique.

3.3 - Modalités d'exposition

Le contact avec le produit peut être de 24 heures ou être maintenu jusqu'à l'émergence.

Cependant lors d'essais en laboratoire, un contact de 24 heures permet une meilleure analogie avec les tests d'évaluation des insecticides conventionnels (Anonyme, 1977).

Nous nous sommes inspirés du protocole expérimental décrit par Mulla *et al.* (1974) et Saleh (1985).

Les larves sont donc laissées en contact avec le produit pendant 24 heures. A l'issue de ces 24 heures, elles sont rincées à l'eau permutée et transférées dans des cristallisoirs de verre contenant 2 l d'eau, à raison de 100 larves par cristallisoir.

On a préféré les transférer dans des cristallisoirs plutôt que dans de nouveaux gobelets car les risques de formation de voile bactérien dus à la nourriture y sont moins importants.

Au cours du contact, les larves traitées, comme les larves témoins, sont laissées à jeun. Elles sont nourries après les 24 heures de contact.

Le relevé des mortalités se fait tous les jours, les nymphes sont placées dans de petites cages selon la concentration utilisée afin de suivre l'émergence des adultes.

En général, le test est arrêté à la fin des émergences chez les traités.

Les tests sont réalisés dans une pièce particulière où la température est de 27°C ± 1°C avec une humidité relative de 70 %.

L'activité des inhibiteurs de croissance est appréciée par le taux d'émergence des adultes qui est déterminé en comptant le nombre d'exuvies nymphales moins le nombre d'adultes morts noyés.

Les adultes qui n'ont pas réussi à se libérer de leur exuvie nymphale et ceux qui n'ont pas réussi à quitter la surface de l'eau, sont considérés comme noyés 24 heures après l'émergence.

3.4 - Exploitation des résultats

Les pourcentages de réduction ou d'inhibition d'émergence (I.E.) sont calculés par le rapport du nombre d'adultes viables récoltés au nombre de larves testées, et corrigés en appliquant la formule adaptée aux IGR de Mulla (*Mulla et al.*, 1974).

$$\%I.E. \text{ brut} = 100 - \left(\frac{\text{nombre d'adultes viables récoltés}}{\text{nombre de larves testées}} \times 100 \right)$$

$$\%I.E. \text{ corrigé} = 100 - \left(\frac{\text{nombre larves témoins}}{\text{nombre larves traitées}} \times \frac{\text{nombre adultes viables traités récoltés}}{\text{nombre adultes viables témoins}} \times 100 \right)$$

Il est ensuite nécessaire de savoir si les résultats obtenus s'inscrivent dans le cadre de la loi gaussio-logarithmique qui est habituellement utilisée pour les insecticides chimiques.

La courbe de régression de l'inhibition d'émergence en fonction de la concentration est linéarisée par une transformation des variables en logarithme pour la concentration et en probit pour l'inhibition d'émergence (Finney, 1952).

La représentation graphique est une droite de régression dite de Henri qui nous permet de déterminer les concentrations en produit donnant 30 %, 50 % et 90 % d'inhibition d'émergence (IE 30, IE 50 et IE 90).

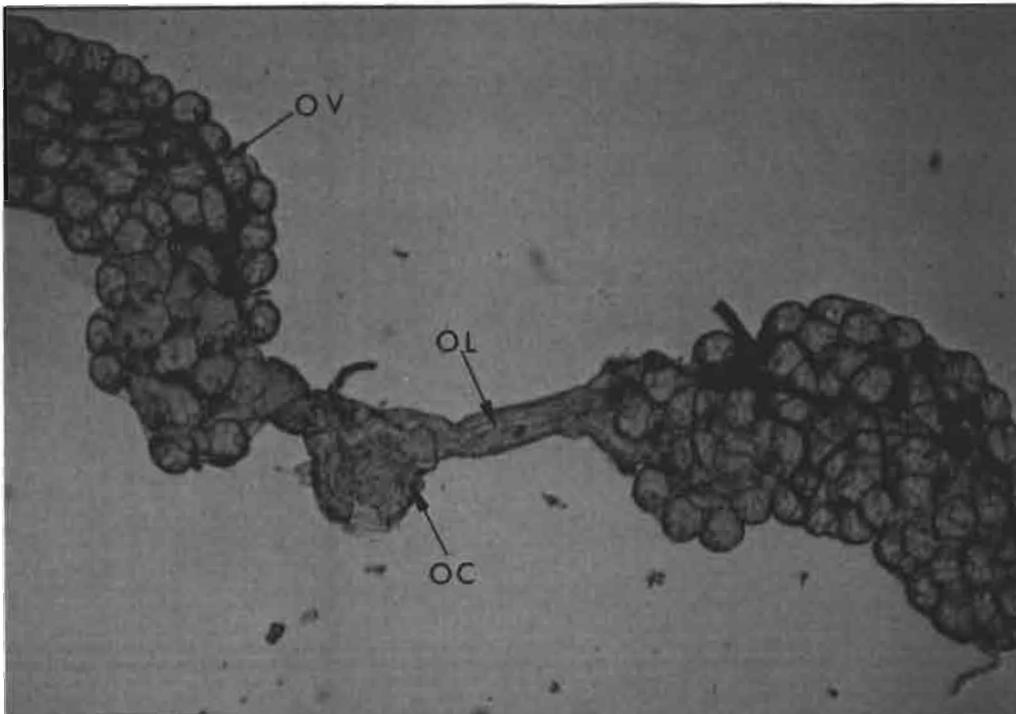
La comparaison entre les lots témoins et les lots traités est fondée sur le calcul de l'écart-réduit (E) des différences des pourcentages de non émergence. Si E est supérieur à 1,96 (E de la table au risque de 5 %), la différence est significative.

L'estimation des probits est réalisée par un logiciel conçu à l'ORSTOM par G. Pichon.

4 - Effets des traitements sur le potentiel reproducteur des femelles

4.1 - L'appareil génital femelle

Les ovaires (*ov*) des moustiques, au nombre de deux, sont situés latéro-dorsalement dans la partie postérieure de l'abdomen. Ils sont raccordés à l'oviducte commun (*oc*) par deux oviductes latéraux (*ol*) comme on peut le voir sur la photographie 1.



Photographie 1 : Montage *in toto* des ovaires d'une femelle pare (x 40).

Les ovaires sont constitués d'un ensemble d'ovarioles dont le nombre varie de 50 à 150 chez *Aedes aegypti* selon la taille de la femelle.

Les ovarioles sont de type méroïstique polytrophe, c'est-à-dire qu'ils possèdent des cellules nutritives accompagnant chaque oocyte.

Chaque ovariole est formé d'un germarium antérieur et d'un vitellarium postérieur.

Le germarium contient une masse centrale de noyaux volumineux, les oogonies qui se différencieront en oocytes et en cellules nourricières, et des noyaux plus petits, périphériques qui engendreront les cellules de l'épithélium folliculaire.

Le vitellarium contient les follicules qui sont constitués chacun d'un oocyte unique et de 7 cellules nourricières provenant de la même lignée cellulaire.

Un seul follicule basal par ovariole atteint sa maturation au cours d'un même cycle gonotrophique ce qui signifie que le nombre de follicules basaux est égal au nombre d'ovarioles (Sutherland *et al.*, 1967). Ce follicule est dit de rang I.

Si un ovariole ou plusieurs sont rudimentaires, pas encore développés ou ne présentant pas de follicule basal, alors le nombre d'ovarioles n'est plus égal au nombre de follicules basaux.

4.2 - Rappel du développement folliculaire et de la dynamique de l'ovogenèse chez *Aedes aegypti*

Au troisième stade larvaire, on peut observer dans la zone des 5ème et 6ème segments abdominaux les rudiments des gonades femelles (Parks, 1955).

Il est intéressant de noter qu'à ce stade, les gonades mâles sont déjà organisées.

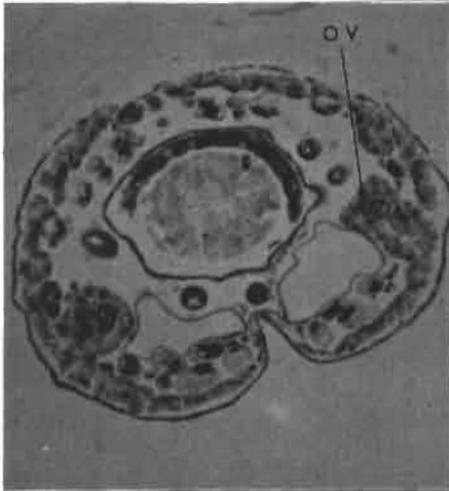
L'organisation des gonades chez les femelles devient visible au début du 4ème stade larvaire. Les cellules s'associent alors en petits groupes séparés par du tissu interstitiel (Planche 1).

Les ovarioles sont différenciés dès la 10ème heure du stade nymphal et on observe la présence des follicules contenant 8 cellules.

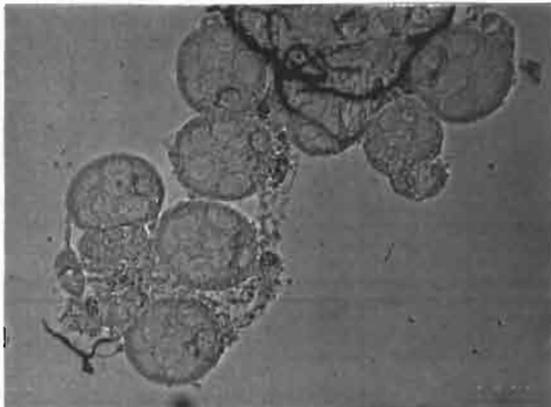
Le développement des follicules ovariens chez le moustique peut être divisé en cinq stades (Clements, 1963 ; Christophers, 1960 ; Detinova, 1963).

A l'émergence les follicules sont en stade Ia. Ils mesurent environ 50 µm de long. Ils sont de forme sphérique à ovale et on ne distingue pas l'oocyte des cellules nourricières.

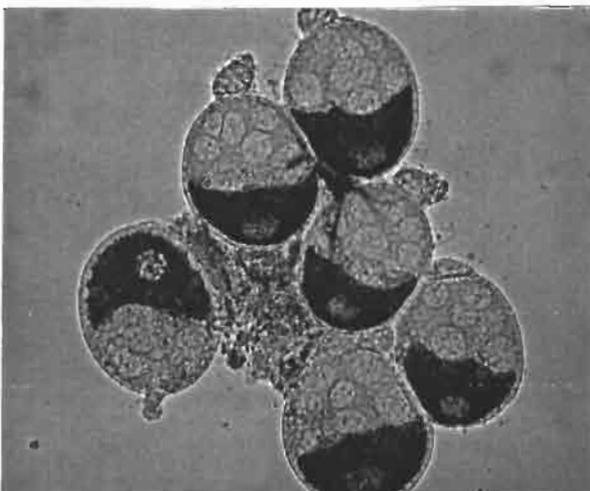
Planche 1 : Mise en place et développement des ovaires chez *A. aegypti* .



Coupe transversale de larve de stade IV d'*A. aegypti* montrant le début de l'organisation des ovaires (ov.).
Grossissement x 62,5.



Follicules (ovarioles) en stade II, observés 24 heures après l'émergence. Grossissement x 100.



Follicules (ovarioles) en stade IV, observés 24 heures après le repas sanguin. Grossissement x 100.

Il faut attendre encore plusieurs heures pour que la différenciation de l'ovocyte se produise, il sera alors en stade Ib (Planche 1).

Le stade IIa représente des follicules où des plages de vitellus apparaissent autour du noyau de l'ovocyte.

La longueur des follicules à ce moment a doublé par rapport à celle observée lors de l'émergence mais bientôt la croissance est arrêtée et les follicules entrent alors en stade IIb dit quiescent. Le développement ne reprendra qu'après le repas de sang.

Jusqu'au stade IIb, la croissance de l'ensemble des follicules se fait par multiplication cellulaire de l'épithélium folliculaire et par accroissement de la taille des trophocytes et de l'ovocyte. Lorsque le repas de sang déclenchera la reprise du développement, la croissance ne se fera plus que par augmentation de la taille des cellules.

La prise d'un repas de sang marque le début d'un cycle gonotrophique.

Au cours de chaque cycle, ce n'est pas l'ensemble des follicules qui reprennent leur développement mais uniquement celui situé le plus postérieurement dans le vitellarium.

Après le repas de sang, le vitellus occupe une place de plus en plus importante au sein de l'ovocyte aux dépens des trophocytes (stade III).

Les follicules s'allongent et 24 heures après le repas, ils sont en stade IVa (Planche 1).

L'apparence d'un ovocyte mature est atteinte au stade IVb.

Au stade V, l'ovocyte est prêt à être pondu, ses structures annexes (les flotteurs chez les Anophèles par exemple) sont mises en place.

Après la ponte, on observe des follicules dans l'état de ceux décrits après l'émergence (stade I-II). Lorsque la femelle prendra un second repas, le follicule suivant dit de rang II alors en stade IIb quiescent, reprendra son développement pour atteindre sa maturité et cela dans tous les ovarioles.

Le traitement des larves par des IGR pourrait avoir des conséquences sur le potentiel reproducteur des adultes qui ont survécu. Les effets des traitements peuvent être envisagés à plusieurs niveaux.

Ils pourraient modifier la fécondité ou la fertilité au cours du cycle gonotrophique ou au moment de la mise en place de l'appareil génital, c'est-à-dire pendant le développement larvaire. Nous avons tout d'abord envisagé l'effet des traitements sur la fécondité et la fertilité avant d'analyser plus finement l'état des gonades femelles.

4.3 - Effets du traitement sur la ponte

Un lot de moustiques mâles et femelles, issu de larves traitées ou non à la concentration IE 30 de chacun des IGR, est placé dans une cage d'élevage. Les femelles âgées de 5 jours prennent leur premier repas sur un cobaye. Elles sont ensuite isolées dans des pondoirs individuels et elles continuent de recevoir du jus sucré grâce à un coton imbibé placé sur le dessus du tulle qui obture le pondoir.

Les pontes sont récoltées 3 jours plus tard et le nombre d'oeufs est déterminé sous loupe binoculaire. Les différences observées sont testées par un test de Student.

Le nombre de femelles non gorgées est noté ainsi que le nombre de femelles n'ayant pas pondu en distinguant les femelles vivantes des femelles mortes.

4.4 - Effets du traitement sur la fertilité

Les oeufs pondus par les femelles des lots précédemment constitués sont récoltés et mis à éclore par lots de 200.

Nous dénombrons alors le nombre de larves qui se sont développées jusqu'au stade IV et nous calculons le rapport de ce nombre à celui des oeufs mis à éclore.

Le rapport obtenu n'exprime pas réellement le taux d'éclosion puisqu'il aurait alors fallu déterminer le nombre d'oeufs éclos par rapport au nombre d'oeufs total. Ceci n'ayant pas toujours été possible, nous avons préféré considérer les nombres de larves parvenues au stade IV.

Les larves sont suivies jusqu'à la nymphose, le nombre de nymphes est déterminé et enfin celui des adultes qui émergent.

Ce sont les rapports calculés pour chaque lot témoin et traité qui nous permettent d'apprécier l'effet du traitement sur la fertilité.

Ainsi nous avons pu évaluer l'impact du traitement sur la génération suivante et la réduction à long terme de la population traitée.

4.5 - Effets du traitement sur le développement des ovarioles

Nous avons procédé aux dissections des ovaires de femelles ayant été soumises à un traitement au stade larvaire afin de compter le nombre d'ovarioles (ou le nombre de follicules) présents.

Il est en effet possible que le traitement que l'on applique à des larves de stade IV agisse sur les gonades avant ou au moment de la détermination du nombre d'ovarioles.

Le traitement pourrait également agir après la mise en place des ovarioles, inhiber le développement de certains ovarioles ou au contraire provoquer la maturation d'ovarioles rudimentaires.

Les adultes sont récoltés au fur et à mesure de leur émergence et répartis dans des cages d'élevage en fonction du jour d'émergence.

On procède alors à la dissection des ovaires sur des femelles légèrement anesthésiées au chloroforme et prises quelques heures après l'émergence, 24 heures après le premier repas sanguin ou 5 jours après la ponte.

Les dissections sont réalisées dans de l'eau physiologique. Les deux derniers segments abdominaux sont écartés délicatement de la partie antérieure de l'abdomen.

Lorsque la femelle est non gorgée, les ovaires restent solidaires de la partie postérieure de l'abdomen tandis que si la femelle est gorgée, les ovaires tendent à occuper tout l'abdomen et il suffit d'exercer une pression sur celui-ci pour les expulser.

Les ovaires sont déposés chacun dans une goutte d'eau physiologique et les ovarioles sont délicatement détachés les uns des autres afin de les compter.

Les deux ovaires ont toujours été considérés comme une seule entité et on détermine ainsi un nombre total d'ovarioles qui est égal au nombre de follicules basaux.

Les différences que l'on pourrait observer seront analysées par un test de Student.

5 - Effets des traitements sur la production des ecdystéroïdes

La détermination des variations des taux d'ecdystéroïdes au cours de la croissance et du développement des insectes est importante car elle nous indique à quel environnement les tissus de l'animal sont exposés.

Les IGR que nous avons utilisés étant des produits susceptibles d'agir sur la synthèse des ecdystéroïdes, il nous a semblé important de procéder à leur dosage.

C'est Shaaya et Karlson qui ont mesuré pour la première fois en 1964 la quantité d'ecdysone présente chez *Calliphora erythrocephala* (Riddiford et Truman, 1978).

L'expérience montrait l'existence d'un pic d'ecdysone au moment de la mue et son absence pendant toute la période de l'inter-mue. Ce premier essai fut laborieux et requies une grande quantité d'hémolymphe.

Au cours des dix dernières années, le développement de la chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse, la chromatographie liquide à haute pression (HPLC) et les dosages immunologiques ont permis d'augmenter considérablement nos connaissances dans ce domaine.

5.1 - Principe du dosage des ecdystéroïdes

Les dosages immunologiques par compétition s'inspirent de la méthode de dosage radioimmunologique de l'insuline développée en 1959 par Yalow et Berson.

Ces méthodes sont fondées sur la mesure d'un phénomène de compétition entre un antigène marqué (Ag*) et un antigène non marqué (Ag) que l'on veut doser, vis-à-vis d'un anticorps spécifique (Ac). La quantité de complexe formé à l'équilibre Ag* - Ac est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène non marqué présent.

En faisant varier les quantités d'antigène non marqué, on établit une courbe dose-réponse qui servira ensuite de référence pour doser le même antigène dans les échantillons biologiques.

La réglementation appliquée en matière de manipulation de radioisotopes et l'instabilité des marquages isotopiques ont contribué au développement de méthodes fondées sur l'utilisation de marqueurs non radioactifs.

Le dosage enzymo-immunologique constitue une méthode de remplacement qui permet en outre d'augmenter la sensibilité de la détection.

Le dosage des ecdystéroïdes chez les moustiques n'avait été réalisé que chez les nymphes et les adultes femelles (Hagedorn *et al.*, 1975 ; Masler *et al.*, 1980, 1981 ; Whisenton *et al.*, 1989).

Nous avons suivi la méthode décrite par Porcheron *et al.* (1989) en l'appliquant au dosage des ecdystéroïdes chez *Aedes aegypti* à tous les stades de sa croissance et de son développement.

Nous avons déterminé les variations des taux des ecdystéroïdes chez les individus traités par rapport aux individus témoins afin de mettre en évidence un éventuel effet des IGR utilisés sur la production des ecdystéroïdes.

5.2 - Mode de prélèvement des moustiques

5.2.1 - Larves

Le traitement insecticide étant appliqué à des larves en fin de troisième stade, nous avons dosé les ecdystéroïdes chez des larves prises à partir de la fin de ce stade et jusqu'à 72 heures après, c'est à dire aux abords de la nymphose.

5.2.2 - Nymphes

Les dosages ont été effectués sur la période allant de l'apparition de la nymphe jusqu'à la métamorphose. Les nymphes dites traitées sont des nymphes qui ont subi le traitement insecticide au troisième stade larvaire et qui se sont nymphosées.

Le sexe des nymphes peut être déterminé par rapport à la forme de la partie postérieure de l'abdomen en face ventrale (Christophers, 1960). Nous avons donc procédé à cette différenciation avant les dosages afin de connaître l'intervalle de temps qui sépare l'apparition des mâles de celle des femelles et interpréter les résultats obtenus chez les larves.

5.2.3 - Adultes mâles et femelles

Les dosages des adultes ont porté sur des individus ayant été traités à la fin du troisième stade larvaire et ayant survécu.

Nous avons effectué des prélèvements sur des adultes des deux sexes qui venaient d'émerger.

En ce qui concerne les mâles, les prélèvements se sont échelonnés pendant les 7 jours suivants. Quant aux femelles, elles reçoivent un repas de sang 4 jours après leur émergence, les prélèvements s'effectuant alors pendant l'ovogenèse et jusqu'à la ponte.

5.3 - Préparation des échantillons

Les moustiques sont prélevés et broyés dans 0,5 ml de méthanol (Merck 6009).

Ils sont ensuite centrifugés une première fois à 3 500 g pendant 20 min. Le surnageant est récupéré.

Cette opération est effectuée une seconde fois sur le culot. Le second surnageant est ajouté au premier et l'ensemble est évaporé à sec.

L'extrait sec est ensuite repris par 250 µl de tampon EIA (Tampon phosphate 0,1 M - pH 7,4 ; 0,01 % NaN₃ ; 0,4 M NaCl ; 1 mM EDTA² ; 0,1 % BSA³) avant d'être utilisé dans le dosage.

On peut ainsi conserver l'extrait sec à - 20°C pendant plusieurs semaines.

5.4 - Préparation des plaques

On immobilise sur une plaque de microtitration à 96 cupules un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin (Dynatech 010506) selon la méthode décrite par Métreau *et al.* (1987).

Pour cela, on dépose 200 µl d'une solution à 0,25 µg de l'anticorps dans du tampon phosphate 50 mM (pH7,4) dans chaque puits de la plaque.

Après 24 heures d'incubation à température ambiante, on ajoute dans les puits 100 µl de tampon EIA à 0,3 % de BSA. La saturation se fait en 12 heures à + 4°C et les plaques sont ensuite stockées toujours à + 4°C jusqu'à utilisation (dans les 6 mois).

² EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique.

³ BSA : Albumine Bovine Sérique (Sigma A 7030)

5.5 - Protocole de dosage

Au moment de l'utilisation, les plaques sont lavées avec un tampon de lavage (tampon phosphate 50 mM ; pH7,4 ; 0,05 % Tween-20) afin d'éliminer toute trace d'anticorps anti-lapin non fixé.

Dans chaque puits, sont mis en présence 50 µl d'ecdysone standard (Sigma H 5142) à différentes concentrations ou d'échantillon biologique à titrer ; 50 µl d'antisérum de lapin anti - 20 hydroxyecdysone (20E)⁴ utilisé au 1/50 000ème ; 50 µl de traceur enzymatique⁵ dilué au 1/100ème. Toutes les dilutions se font dans le tampon EIA.

Les liaisons non spécifiques du traceur avec la plaque sont déterminées par un mélange dans lequel l'antisérum anti-20E et l'ecdysone standard sont remplacés par 100 µl de tampon EIA.

La liaison du traceur à l'anticorps en l'absence de compétiteur c'est-à-dire d'échantillon (Bo) est mesurée en remplaçant l'ecdysone standard par 50 µl de tampon EIA. Toutes les mesures sont faites en double et pour les Bo en quadruple.

La plaque est ensuite placée sur un agitateur à température ambiante pour une incubation de 3 heures avant d'être déposée 12 heures à + 4°C. Elle est alors lavée à nouveau pour éliminer le traceur non lié à l'anticorps, avant la réaction enzymatique par laquelle on détermine la concentration en ecdystéroïdes de l'échantillon dosé.

Pour cela, on répartit dans chacun des puits 200 µl du substrat de l'acétylcholinestérase (réactif d'Ellman⁶). L'acétylthiocholine est hydrolysée en thiocholine et acétate par le traceur enzymatique.

La thiocholine réagit alors avec le DNTB et produit une coloration jaune dont on mesure l'intensité au spectrophotomètre à 410 nm.

Nous donnons une représentation schématique de la plaque obtenue en annexe 3.

⁴ L'antisérum anti - 20E nous a été fourni par le laboratoire de P. Porcheron sous forme d'une dilution au 1/100ème de la solution mère dans du tampon EIA. Il est conservé à + 4 °C jusqu'à son utilisation.

⁵ Le traceur enzymatique nous a également été fourni par P. Porcheron sous la forme d'aliqots à reprendre par 5 ml de tampon EIA. Il est préparé en couplant une molécule de 20-hydroxyecdysone-carboxyméthoxime à l'acétylcholinestérase. Il peut être conservé de cette manière à - 20 °C pendant quelques semaines.

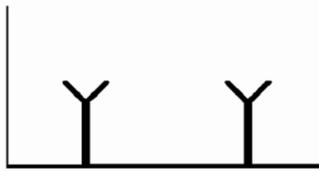
⁶ Réactif d'Ellman : 200 mg d'acétylthiocholine iodure (Sigma A 5751) et 215 mg de 5 - 5' dithiobis - (2 - nitrobenzoïc acide) ou DNTB (Sigma D 8130) dans 10 ml de tampon phosphate 1 M.

On prépare des tubes contenant 250 µl de la solution obtenue.

Ces tubes seront conservés à l'abri de la lumière à - 20 °C pendant plusieurs mois. Au moment de leur utilisation, il suffit de reprendre le contenu d'un tube dans 25 ml d'eau distillée.

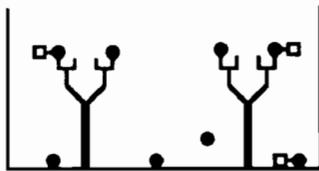
La figure 12 résume le principe du dosage enzymo-immunologique des ecdystéroïdes.

1ère étape - Coating



Anticorps chèvre anti-lapin

2ème étape - Réaction immunologique



anticorps lapin anti - 20E

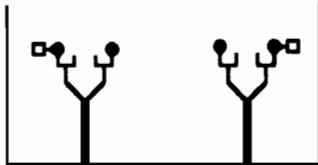


20 - hydroxyecdysone - acétylcholinestérase

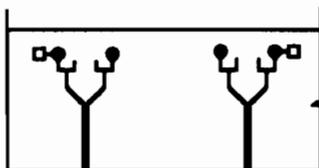


20 - hydroxyecdysone (20E)

3ème étape - Lavage



4ème étape - Réaction enzymatique



← Réactif d'Ellman (jaune)

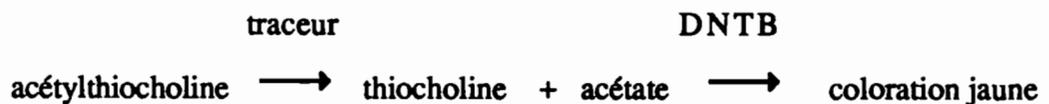


Figure 12 : Principales étapes du dosage des ecdystéroïdes.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de B/B_0 (où B représente l'absorbance mesurée).

$$\%B/B_0 = \frac{B - T_m}{B_{0m} - T_m} \times 100$$

où T_m est l'absorbance moyenne témoin et B_{0m} est la moyenne des absorbances en l'absence du compétiteur.

La courbe du pourcentage de B/B_0 en fonction de la concentration en ecdystéroïdes est linéarisée par une transformation graphique des variables en logarithme pour la concentration et en logit pour le pourcentage de B/B_0 ($\text{Log} [B/B_0 / (1 - B/B_0)]$).

Nous présentons en figure 13, l'exemple d'une droite de référence que nous avons obtenue au cours d'un des dosages. Cette droite est tracée à partir des résultats donnés par le dosage de l'ecdysone standard (puits 2C à 4A). Les pourcentages de B/B_0 calculés pour chaque échantillon à doser sont transformés en concentration d'ecdystéroïdes en pg par individu grâce à cette droite.

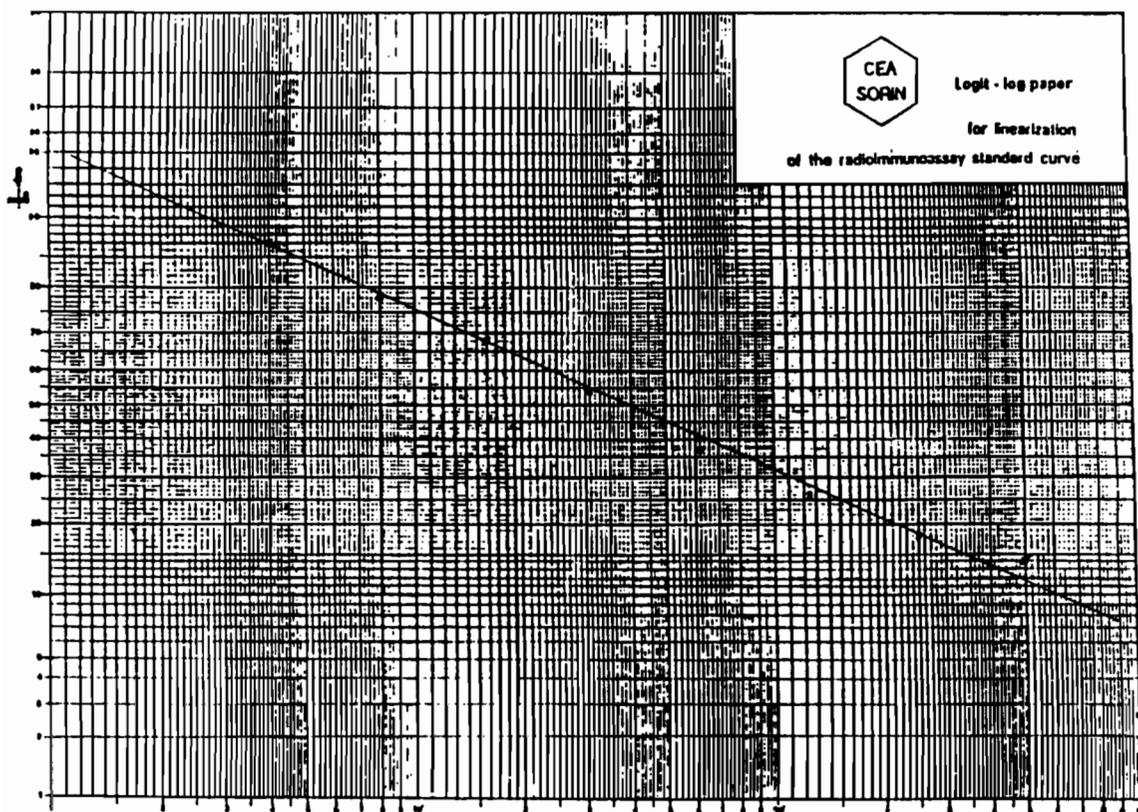


Figure 13 : Exemple de droite de référence permettant de déterminer graphiquement la concentration en ecdystéroïdes des échantillons à doser.

6 - Techniques histologiques

L'histologie nous permet d'une part, d'illustrer notre travail sur l'étude du potentiel reproducteur de *Aedes aegypti* et d'autre part, de tenter de mettre en évidence les effets des IGR.

Cette étude a été réalisée au laboratoire de Biologie Moléculaire de l'Université des Sciences de Dijon en s'inspirant des techniques décrites par Martoja et Martoja-Pierson (1967). Elle a porté sur des larves et des femelles adultes traitées par l'OMS 2017 et le diflubenzuron qui ont été comparées à des larves et des femelles témoins.

Les pièces ont été fixées à froid (4 à 6 °C) dans du Bouin alcoolique.

Nous avons utilisé une méthode de coloration rapide et trichrome : la triple coloration de Prenant variante de Gabe (Martoja et Martoja- Pierson, 1967).

Les coupes sont colorées à froid pendant 3 à 4 minutes à l'hématoxyline de Groat puis lavées à l'eau courante pendant 5 minutes.

Elles sont ensuite colorées par le mélange d'éosine-vert lumière pendant 3 minutes.

On procède alors directement à un rinçage dans l'alcool 95° puis dans l'alcool 100° et finalement on les transfère dans un bain de toluène où elles restent jusqu'au montage.

Les lames correspondant aux témoins, larves ou adultes, sont d'abord étudiées. Tous les critères et particularités observables au niveau du tractus digestif, du système nerveux (position des ganglions nerveux) et du tractus génital sont enregistrés avant d'observer les lames correspondant aux individus traités.

7 - Effets des traitements sur la réceptivité d'*Aedes aegypti* à la filaire *Molinema dessetae*

Ce couple constitue un modèle expérimental intéressant pour une étude destinée à analyser les effets des insecticides sur la capacité d'un vecteur à transmettre un agent pathogène.

Le vecteur naturel de cette filaire est inconnu (Gantier et Gayral, 1979) et c'est le moustique *Aedes aegypti* qui est utilisé au laboratoire pour la réalisation de la transmission cyclique étant donné qu'il s'est révélé d'emblée totalement sensible à cette filaire (Petit *et al.*, 1977).

7.1 - *Molinema dessetae* (Bain, 1973)

C'est une filaire de rongeur (Bain, 1973 a) qui présente une périodicité diurne : les microfilaries abondent entre 11h et 16h avec un maximum entre 12h et 14h (Gayral *et al.*, 1982).

Cette particularité ajoute à la facilité de son utilisation en laboratoire.

La durée du développement est de 21 jours à 26 °C chez *A. aegypti* (Petit *et al.*, 1977) alors que chez *Anopheles stephensi*, elle est de 27 jours à 25 °C (Bain, 1974).

Au cours du développement, les larves subissent deux mues. A 26 °C, elles ont lieu au 7ème et au 13ème jour (Petit et Spitalier-Kaveh, 1979).

Le début du développement est marqué par un raccourcissement de la larve et un léger épaississement. A la mue I, la larve (stade I ou L1) est cependant aussi longue que la microfilarie même si elle est beaucoup plus large. Elle migre alors vers le tissu adipeux où elle poursuit son développement.

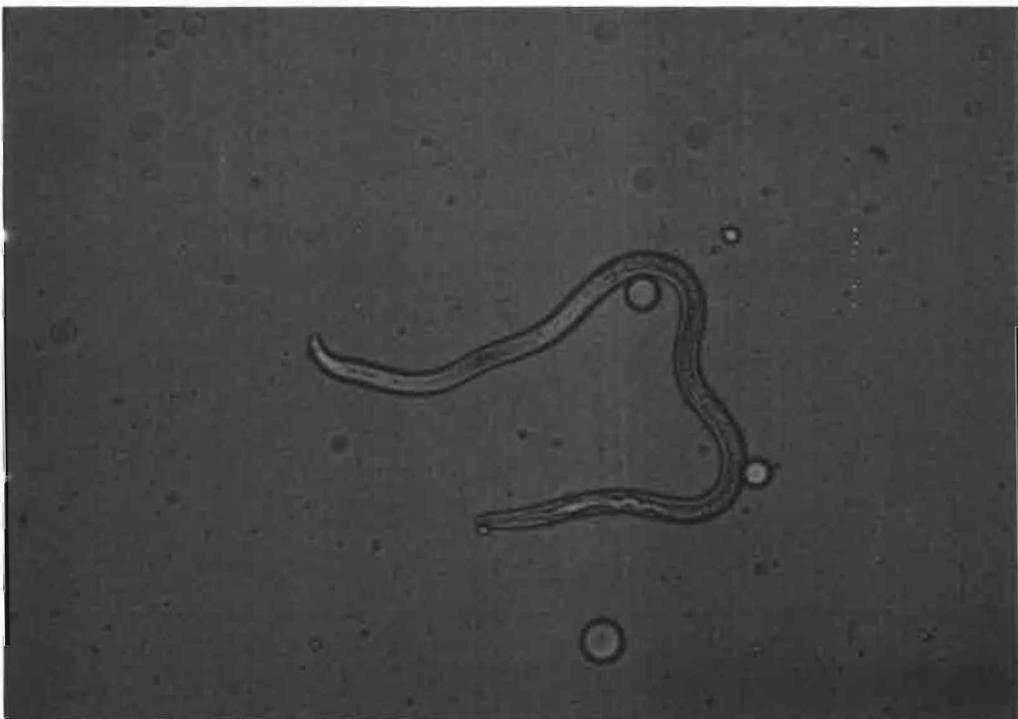
Entre la première mue et l'apparition de la larve de stade II ou L2, la longueur du corps triple presque. Pendant la maturation de la forme infestante (stade III ou L3), l'allongement est faible et le corps s'amincit (Planche 2).

Les premiers stades infestants apparaissent vers le 15ème jour. Ils migrent vers les pièces buccales (Planche 2).

Planche 2 : Deux stades de développement de *M. dessetae* chez *A. aegypti*.



Larve de stade II (L2) observée dans l'abdomen d'*A. aegypti*. (x 200).



Larve de stade III (L3), forme infestante, observée dans la tête d'*A. aegypti* (x 200).

7.2 - *Proechimys oris* Thomas, 1904

C'est un rongeur de la famille des *Echimyidae*, originaire du Brésil (Bain, 1973 b). Il est de taille moyenne et, pesant 200 à 300 g est donc facile à manipuler.

La filaire a été isolée en 1973 sur ce rongeur, naturellement infesté et depuis, elle est maintenue au laboratoire sur ce dernier.

Ces animaux sont élevés facilement au laboratoire à 25 °C ; ils se nourrissent d'aliments pour hamster.

Ils nous ont été fournis par le laboratoire de Parasitologie du Docteur Gayral de la Faculté de Pharmacie de Châtenay - Malabry.

Ils sont en général infestés par inoculation sous-cutanée de stades infestants (200 larves infestantes dans 0,5 ml). Les infestations sont réalisées à Châtenay-Malabry.

Ces larves pénètrent activement dans la peau à travers la lésion due à la piqûre du moustique. Elles atteignent la cavité péritonéale dès le 14^{ème} jour et subissent deux mues avant de devenir adultes au bout de 40 jours. Les filaires adultes, libres et mobiles, se trouvent dans la cavité abdominale du rongeur. Les mâles mesurent 3 cm de long et les femelles 8 cm. Les femelles sont ovipares.

Les microfilaraires apparaissent 90 jours environ après l'infestation du rongeur. Leur taille varie de 270 à 310 µm et elles vont circuler dans le sang.

On attend au moins le 180^{ème} jour avant d'utiliser les rats infectés car on observe parfois une perte totale des microfilaraires avant ce moment, perte inexplicée. Chez les rongeurs où cette perte ne se produit pas, on peut observer une augmentation progressive de la microfilarémie qui se maintient ensuite à un plateau pendant 60 à 90 jours. Les filaires adultes des deux sexes ont une durée de vie d'au moins 570 jours.

7.3 - Infestation d'*Aedes aegypti* par *Molinema dessetae*

On constitue trois cages contenant environ 200 femelles témoins et 200 femelles ayant survécu aux traitements par les IE 30 de l'OMS 2017 et du diflubenzuron (selon un protocole de traitement identique à celui décrit au paragraphe 3 de ce chapitre). Les femelles reçoivent le repas infestant 5 jours environ après leur émergence.

Nous avons utilisé deux rats : l'un a été introduit dans la cage témoin et dans la cage des femelles traitées par le diflubenzuron tandis que l'autre a été introduit seulement dans la cage des femelles traitées par l'OMS 2017.

En effet, pour être introduit dans la cage à infester, le rat doit être immobilisé sur le dos dans un appareil de contention pendant environ 30 minutes. Pour cela, il doit être anesthésié. L'anesthésie étant légère, on ne peut pas espérer maintenir le rat plus d'une heure dans la cage. Comme il est préférable de ne pas injecter une nouvelle dose d'anesthésique, nous avons utilisé deux rats.

Après le repas, on vérifie dans les cages que toutes les femelles sont gorgées et on élimine celles qui ne le sont pas.

Trois repas de sang sont ensuite administrés tous les trois jours jusqu'au 10^{ème} jour car il semble qu'en l'absence de repas, les réserves du vecteur s'épuisent rapidement et limitent alors le bon développement des filaires.

Petit *et al.* (1977) ont montré l'importance des repas surnuméraires pour le bon accomplissement du cycle des parasites dans le vecteur puisque le rendement parasitaire serait alors multiplié par 10.

7.4 - Détermination de la microfilarémie du rat

Les repas infestants sont administrés au moment où la microfilarémie du rat est maximale, c'est-à-dire vers 13 heures.

Il est important de connaître la microfilarémie du rat afin de pouvoir ensuite évaluer la quantité de microfilaires que les moustiques ont dû ingérer. C'est en effet la première étape de la régulation, étape sur laquelle les traitements insecticides pourraient agir.

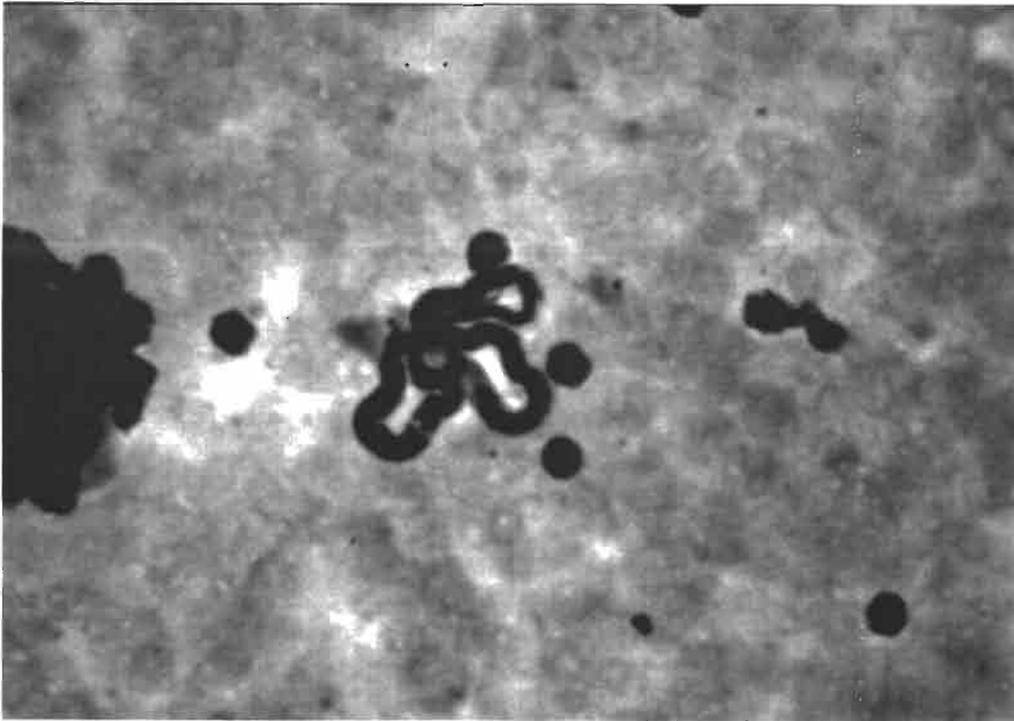
Pour cela, on prélève environ du sang au sinus orbital du rongeur avant de l'introduire dans la cage.

Ce prélèvement est effectué à l'aide d'une pipette Pasteur et on effectue une goutte épaisse en déposant sur une lame 10 μ l de sang. La goutte est étalée sur la lame par des mouvements de rotation en évitant les bulles d'air et laissée à l'air toute la nuit.

Le lendemain, elle est passée 10 minutes sous l'eau du robinet afin d'éliminer l'hémoglobine. On laisse encore sécher une nuit.

La lame est ensuite fixée au méthanol dénaturé puis colorée au Giemsa à 5 % pendant 20 minutes.

On peut alors compter sous le microscope le nombre de microfilaries et déterminer la microfilarémie du rat juste avant le repas infestant (Photographie 2).



Photographie 2 : Microfilarie dans le sang de *Proechimys oris* (x 400).

Comme le rat reste environ 30 minutes dans la cage des moustiques, il est probable que la microfilarémie varie au cours de cet intervalle de temps par rapport à la valeur que l'on a déterminée avant le repas de sang. Ceci est encore plus vrai pour le rat qui a servi à l'infestation des deux cages, et il faudra en tenir compte par la suite.

7.5 - Evaluation de la quantité de microfilaires ingérées

Trente minutes après le repas, dix femelles témoins et traitées (OMS 2017 et diflubenzuron) sont pesées afin de déterminer la quantité moyenne de sang qu'elles ont ingéré.

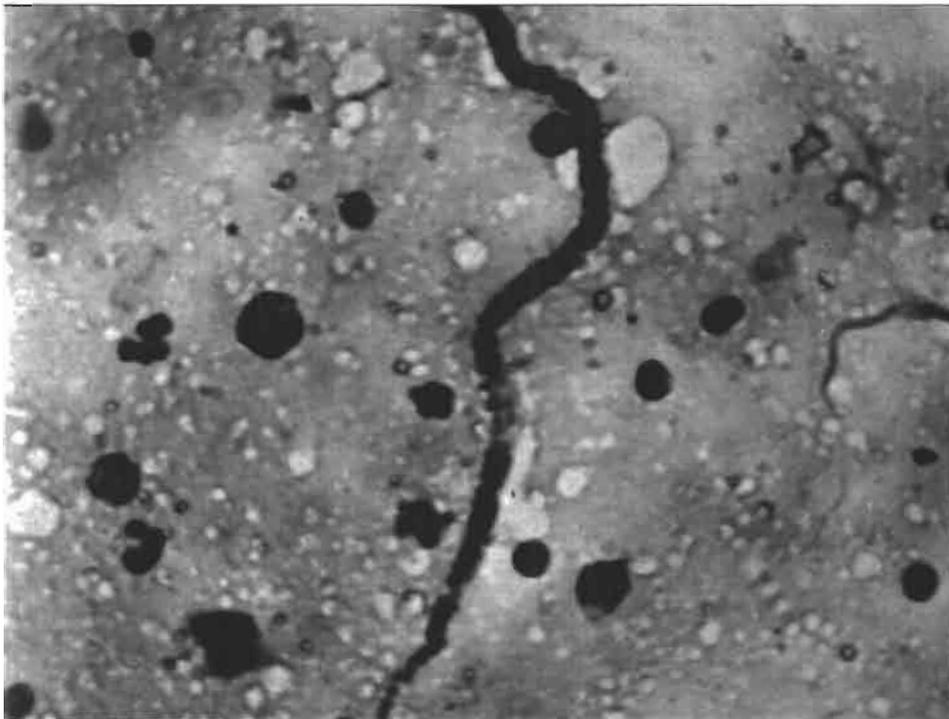
Dix femelles témoins et traitées sont également prélevées après le repas et conservées à 0 °C avant d'être disséquées afin d'évaluer le nombre de microfilaires absorbées et retrouvées dans l'estomac. Elles sont conservées au froid afin d'éviter le passage des microfilaires dans l'hémocèle.

Les femelles sont déposées sur une lame et on dégage leur estomac.

On écrase ensuite celui-ci le plus possible sur la lame en le tournant et on laisse sécher toute la nuit.

Le lendemain, on passe la lame 10 minutes sous l'eau du robinet afin de débarrasser la préparation de l'hémoglobine et on laisse sécher rapidement avant de fixer au méthanol. Ensuite on procède à une coloration par du Giemsa à 5 % pendant 20 minutes.

On peut finalement dénombrer sous le microscope le nombre de microfilaires ingérées la veille (Photographie 3).



Photographie 3 : Microfilarie dans l'estomac de *A. aegypti* (x 400).

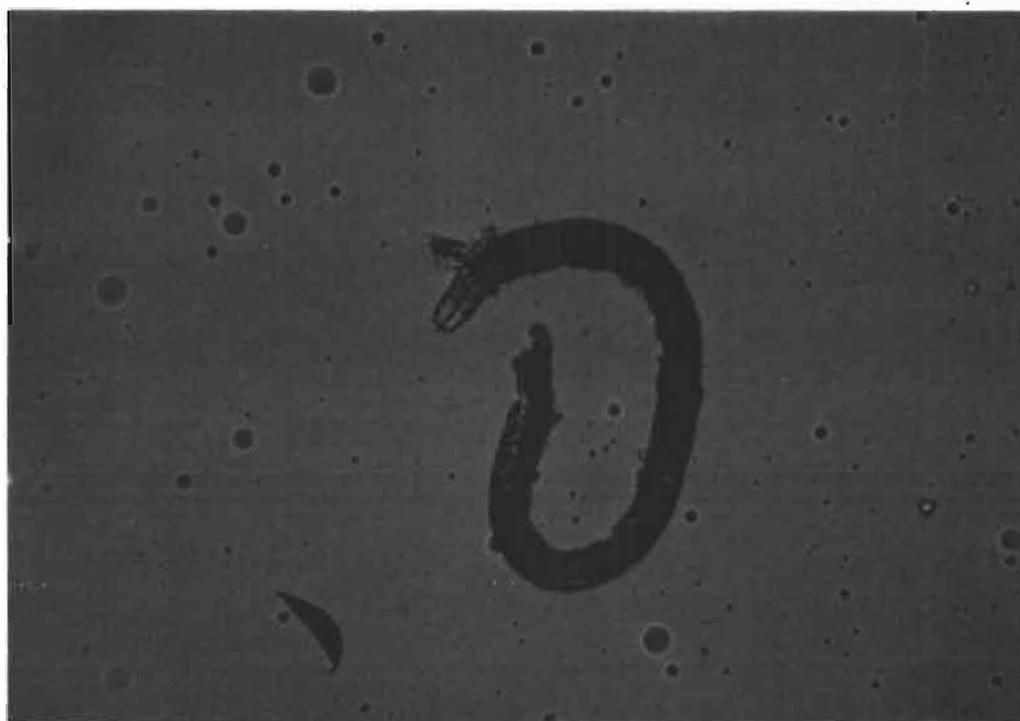
7.6 - Répartition des filaires dans le vecteur

Les moustiques sont disséqués 21 à 25 jours après l'infestation dans un milieu de culture (R.P.M.I.)

On sépare la tête, le thorax et l'abdomen de la femelle disséquée dans trois gouttes différentes de R.P.M.I.

On procède alors au dénombrement des différents stades des filaires observés dans chacune de ces parties afin de mettre en évidence la répartition des différents stades de la filaire à l'intérieur du moustique.

Le nombre de formes anormales, filaires en voie de dégénérescence ou encapsulées, (Photographie 4) est également déterminé.



Photographie 4 : Filaire en voie de dégénérescence dans l'abdomen du moustique (x 400).

7.7 - Traitement statistique des données

Il s'agit de déterminer si les traitements insecticides larvaires par l'OMS 2017 et le diflubenzuron ont un effet sur la production de formes infestantes sachant que le développement de *M. dassetae* chez *A. aegypti* est régulé par le phénomène de limitation (Bain et Chabaud, 1975 ; Petit, 1978).

Il faut donc déterminer le nombre moyen de L3 correspondant à chaque traitement et l'intervalle de confiance de chacune de ces moyennes qui dépend de la distribution des charges parasitaires. Les hôtes ne se répartissent pas en fonction de leur charge parasitaire suivant la loi du hasard : la variance des observations est toujours très élevée et supérieure à la moyenne, comme dans la plupart des couples vecteurs - parasites. Cela est dû à l'hétérogénéité de la prise des microfilaires. Cette propriété, appelée surdispersion, est caractéristique de la loi binômiale négative.

La BN est définie par une constante K, elle-même caractéristique d'un couple vecteur - parasite à un moment donné du développement du parasite (Pichon *et al.*, 1980 b). Il s'agit alors, comme nous l'avons déjà mentionné, d'une BN particulière, la loi géométrique définie par une constante K égale à 1, que l'on explique par la formation de "files d'attente" de parasites dans les capillaires de l'hôte vertébré.

L'analyse statistique consiste à déterminer si K peut être considéré comme constant ou s'il varie significativement, afin de savoir si les traitements insecticides agissent sur la forme de la distribution.

Ensuite, l'étude des intervalles de confiance des moyennes nous dira si les traitements agissent sur le parasitisme des moustiques.

Il est à noter que pour Petit (1978), la distribution des parasites suit une BN de constante K égal à 3, mais le protocole expérimental dans ce cas est différent. En effet, seules sont alors prises en compte les femelles gorgées à réplétion. Or on sait que même lorsque le repas est incomplet, on peut retrouver des stades infestants au niveau de la tête du moustique.

Les données résultant des dissections ont été analysées par un logiciel (PARADIS) conçu par G. Pichon au centre de Bondy. Ce logiciel vérifie que les distributions observées chez les femelles témoins et traitées sont ajustées par une BN dont il détermine la constante K par la méthode du maximum de vraisemblance. Si les valeurs de K pour les trois populations sont homogènes alors une constante K commune (Kc) est déterminée.

La conformité des distributions des filaires dans chaque population à cette valeur K_c est testée par un χ^2 et par deux autres méthodes sur les moments.

La variance de chaque moyenne est ensuite calculée et on analyse les différences observées en considérant les intervalles de confiance.

Le nombre de formes anormales a été déterminé ainsi que les niveaux d'infestation.

8 - Effet du traitement sur la faune non-cible

Nous avons vu que les IGR sont présentés comme des insecticides sans risque majeur pour la faune non-cible en raison de leur spécificité pour les insectes.

Nous avons conduit une étude sur deux espèces de crustacés qui vivent au sein des mêmes biotopes que les larves de moustiques, les daphnies qui sont des Cladocères et les *Cypris* appartenant aux Ostracodes.

Les crustacés ont été récoltés dans la mare située à Bondy et testés au laboratoire.

Les solutions insecticides ont été préparées avec l'eau de la mare préalablement filtrée.

Pour chaque concentration testée, nous avons prélevé 100 individus que nous avons répartis par lots de 25 dans des gobelets de plastique contenant 200 ml d'eau de la mare filtrée. Cent individus témoins ont également été répartis par lots de 25 pour chacune des deux espèces.

Nous avons réalisé un premier essai afin de déterminer le seuil de sensibilité de chaque espèce. Les tests ont ensuite été renouvelés avec une autre série de concentrations.

Dans les deux essais, la mortalité a été déterminée 24 heures après la mise en contact, puis 48 heures après sans que le contact soit arrêté.

CHAPITRE 2

Chapitre 2

Détermination des doses sublétales

1 - Résultats

Les concentrations que nous donnons représentent des concentrations en matière active (m.a.) de produit insecticide.

1.1 - OMS 2017

Afin de déterminer la concentration permettant d'obtenir un taux de réduction d'émergence de 30 % (IE 30), nous avons procédé à 4 évaluations de l'efficacité de l'OMS 2017. Les résultats figurent dans le tableau 1. Ils sont détaillés en annexe 1.

mg/l	essai 1	essai 2	essai 3	essai 4
0,001	20	3,1	14,3	12,2
0,0025	1,1	30,8	29,9	27,6
0,005	27,6	53	-	-
0,0075	37,9	58,1	33	-
0,01	67,8	58,1	55,1	86,7
0,1	98,8	94,2	100	96,9

Tableau 1 : OMS 2017, WP25 - pourcentages corrigés de réduction d'émergence après traitement des larves aux stades III âgé et IV jeune ;

(-) : concentration non testée.

On observe une faible mortalité larvaire sauf à la concentration la plus élevée. La mortalité nymphale est plus élevée et se manifeste dès la concentration de 0,005 mg / l. Cependant on remarque que d'un essai à un autre, pour une même concentration, on n'observe pas la même mortalité larvaire ou nymphale.

La mortalité des adultes à l'émergence est faible, de l'ordre de 10 %, et peut être considérée constante à toutes les concentrations.

Au cours du premier essai, on a observé une forte mortalité des adultes après l'émergence que l'on ne retrouve pas au cours des autres tests. Il est vraisemblable que cette mortalité est due à un facteur extérieur comme une contamination de la cage ou une augmentation anormale de la température.

Les représentations graphiques de chacun des essais sont portées en annexe 1 avec les équations des droites correspondantes.

L'hétérogénéité des points autour des droites de régression n'est pas significative pour les essais 2 et 4 mais elle l'est pour les essais 1 et 3 ($p < 0,001$).

Les pentes des droites sont relativement similaires témoignant de la corrélation entre la dose et le taux de réduction d'émergence.

Les IE 30 calculées à partir des droites sont reportées dans le tableau 2.

	IE 30 (mg/l)	intervalle de confiance
essai 1	0,0029	[0,0019 - 0,004]
essai 2	0,0024	[0,0018 - 0,003]
essai 3	0,0025	[0,0019 - 0,0032]
essai 4	0,0035	[0,0025 - 0,0046]

Tableau 2 : IE 30 calculées pour chaque évaluation.

Nous avons dans un premier temps considéré la valeur moyenne de la IE 30 comme la moyenne de ces 4 valeurs soit 0,003 mg / l.

Cependant, compte tenu des variations que l'on observe à chaque évaluation, nous pensons qu'il est préférable de déterminer cette valeur moyenne en calculant la moyenne des mortalités obtenues pour chaque concentration lors des différentes évaluations et en déterminant avec ces valeurs une nouvelle droite de Henry.

Les résultats qui figurent dans le tableau 3 correspondent à la moyenne des inhibitions d'émergence calculée d'après les quatre essais :

mg/l	%IE
0,001	12,4
0,0025	21,9
0,005	43,2
0,0075	51,4
0,01	67,1
0,1	97,5

Tableau 3 : Taux moyens de réduction d'émergence obtenus pour chacun des tests d'évaluation.

On peut alors tracer la droite de Henry qui nous permet d'évaluer les taux d'inhibition d'émergence moyens.

Son équation est : $y = 1,59 x + 3,69$ (Figure 14).

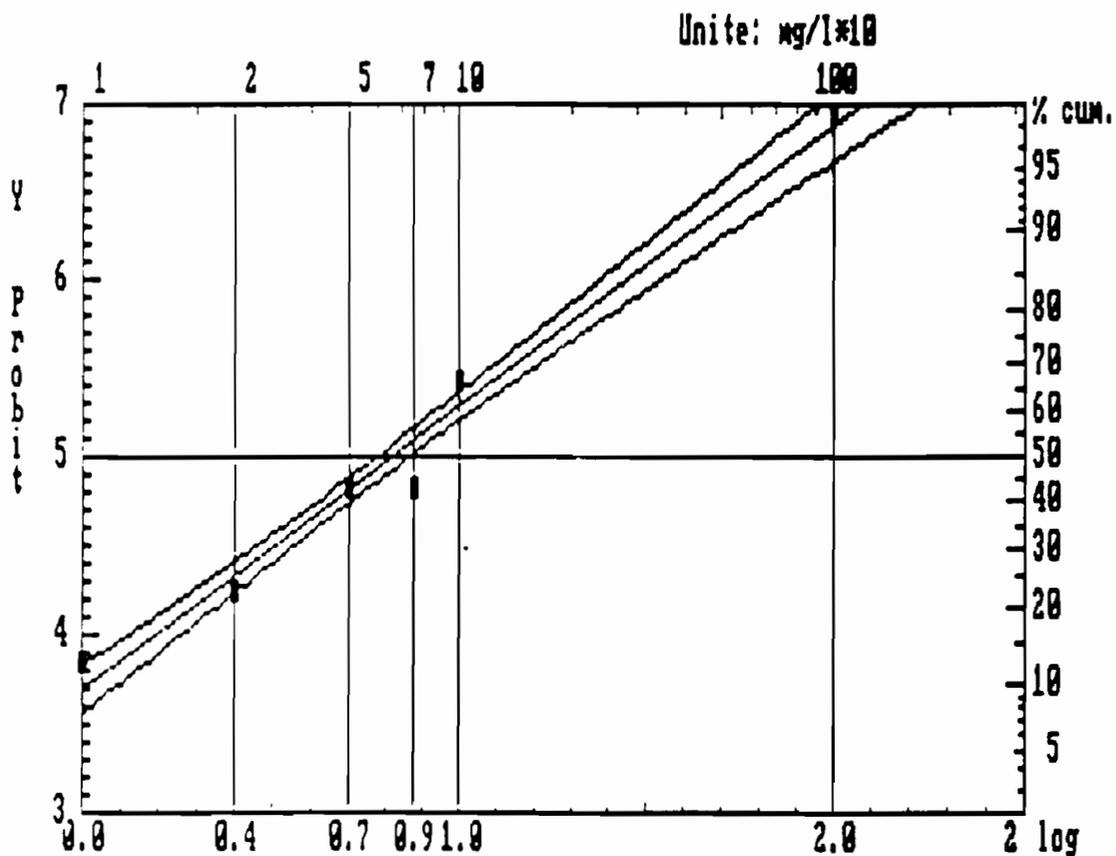


Figure 14 : Sensibilité des larves de stade III-IV de *A. aegypti* à l'OMS 2017 (WP 25%).

L'hétérogénéité des points autour de la droite est significative ($p < 0,00001$).

La IE 30 calculée à partir de cette droite est égale à 0,0031 mg / l, valeur très peu différente de 0,003 mg / l avec un intervalle de confiance de [0,0027 - 0,0034]. On constate donc que la valeur obtenue est la même que celle que nous obtenions en calculant la moyenne des IE 30 de chaque essai.

C'est cette concentration que nous appliquerons lors de l'évaluation des traitements sur le potentiel reproducteur, la capacité vectorielle et la synthèse des ecdystéroïdes d'*A. aegypti*.

1.2 - Diflubenzuron

Nous avons réalisé 5 essais avec le diflubenzuron (DFB) afin de déterminer la concentration (IE 30) qui provoque 30 % de réduction d'émergence.

Les résultats figurant dans le tableau 4 montrent les pourcentages de réduction d'émergence obtenus avec les différentes concentrations testées.

Ils sont détaillés dans les tableaux situés en annexe 2.

mg/l	essai 1	essai 2	essai 3	essai 4	essai 5
0,00001	-	21,4	9,9	-	-
0,00005	-	38,9	-	-	-
0,0001	14,4	39,5	0,09	15,2	19,2
0,00025	-	-	-	-	11,9
0,0005	-	13,3	15,1	58,2	24,5
0,00075	-	-	-	43,8	29,6
0,001	38,1	54,4	51	69,8	48,9
0,0025	-	-	-	88,7	79,2
0,005	45,4	92,1	95,7	96,9	-
0,01	85,6	-	-	-	-
0,1	100	-	-	-	-

Tableau 4 : DFB, WP25 - pourcentages corrigés de réduction d'émergence après traitement des larves aux stades III âgé et IV jeune ; (-) : concentration non testée.

On constate que les mortalités larvaires et nymphales apparaissent surtout à partir de la concentration de 0,001 mg / l encore qu'une généralisation des résultats ne soit pas très aisée.

On observe en effet une forte mortalité larvaire et nymphale dans les essais 4 et 5.

Les mortalités à l'émergence sont assez élevées notamment dans l'essai 2 où on observe également une mortalité importante après l'émergence que l'on pourrait probablement expliquer de la même façon que pour l'essai 1 de l'OMS 2017.

On notera également qu'il est difficile de généraliser les résultats en raison de la variation observée pour une même concentration.

Les représentations graphiques de chacun des essais sont portées en annexe 2 avec les équations des droites correspondantes.

On observe une hétérogénéité significative des points autour des droites ($p < 0,0001$). Cette remarque s'applique à tous les tests, ce qui n'était pas le cas avec l'OMS 2017. Ceci nous conduit à conclure que le DFB est moins stable que l'OMS 2017 dans les conditions où nous l'avons employé.

Les pentes des droites de régression sont peu semblables, variant de 0,58 à 1,42 et indiquent que les résultats sont peu reproductibles ; il existe une mauvaise corrélation entre la dose et le taux d'inhibition d'émergence.

Les IE 30 calculées à partir des droites sont reportées dans le tableau 5. On constate que les intervalles de confiance se recourent mal.

	IE 30 (mg/l)	intervalle de confiance
essai 1	0,00057	[0,00034 - 0,00087]
essai 2	0,00039	[0,00017 - 0,0007]
essai 3	0,00020	[0,0001 - 0,00034]
essai 4	0,00021	[0,00015 - 0,00026]
essai 5	0,00037	[0,00028 - 0,00049]

Tableau 5 : IE 30 calculées pour chaque évaluation.

Afin de déterminer la concentration induisant 30 % d'inhibition d'émergence, nous avons calculé la moyenne des 5 concentrations reportées dans le tableau ci-dessus. On obtient une concentration moyenne de 0,00037 mg/l soit environ 0,0004 mg / l.

Cependant nous avons préféré procéder d'une autre façon en calculant les moyennes des mortalités obtenues pour une même concentration au cours des différents tests et cela pour les mêmes raisons qu'avec l'OMS 2017. Il nous a semblé plus juste de considérer seulement les essais 1, 3 et 4 dans la mesure où les deux autres témoignaient d'une hétérogénéité très hautement significative se traduisant par un χ^2 très élevé.

Les taux de réductions d'émergence résultants sont regroupés dans le tableau 6 suivant :

mg/l	%IE
0,00001	19,9
0,00005	42,3
0,0001	17,7
0,00025	8,7
0,0005	28,3
0,00075	41,6
0,001	52,6
0,0025	83,3
0,005	80,2
0,01	85,3
0,1	100

Tableau 6 : Taux moyens de réduction d'émergence obtenus pour chacun des tests d'évaluation.

Nous donnons une représentation de la droite de Henry correspondant à ces valeurs moyennes dans la figure 15.

L'équation de la droite de Henry est : $y = 1,36 x + 3,59$ (Figure 15).

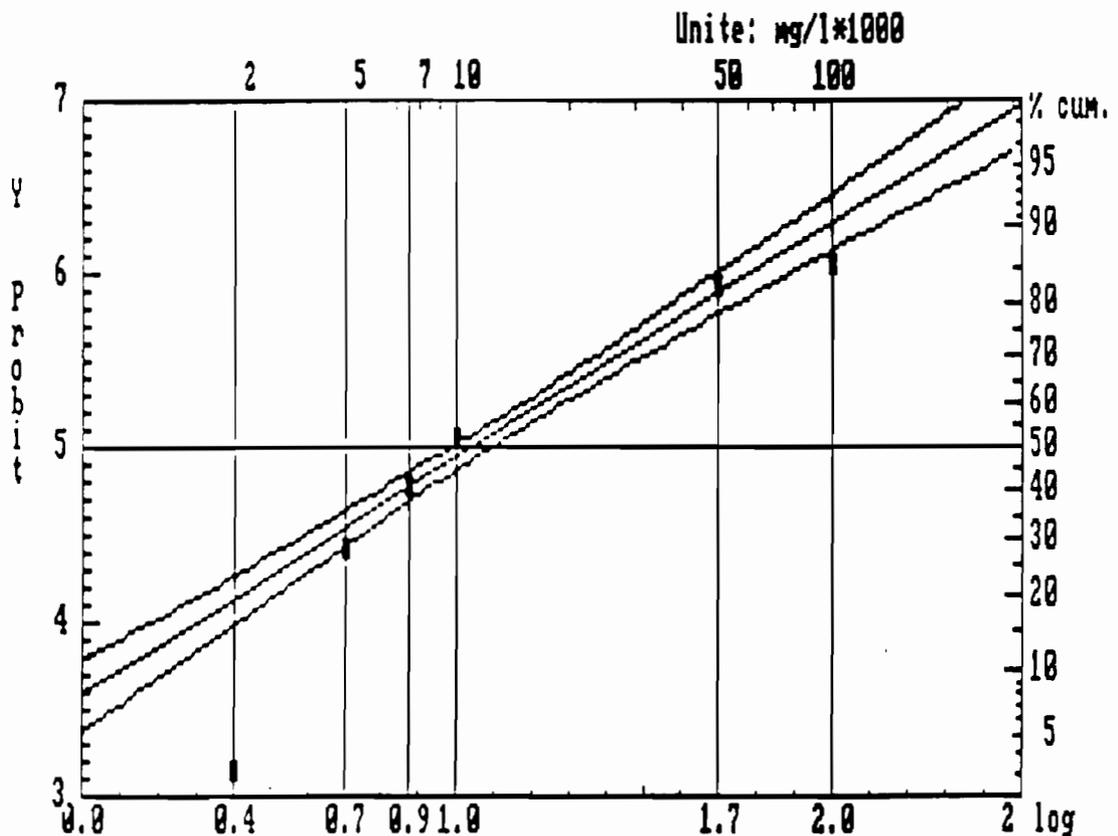


Figure 15 : Sensibilité des larves de stade III-IV de *A. aegypti* au DFB (WP 25 %).

L'hétérogénéité des points autour de la droite est significative ($p = 0,012$) mais elle est en accord avec ce que l'on obtenait pour chaque test.

La IE 30 calculée à partir de cette droite est égale à 0,00045 mg / l soit environ 0,0004 mg / l avec un intervalle de confiance de [0,00037 - 0,00053].

Là encore, nous constatons que la valeur moyenne trouvée précédemment n'était pas différente.

C'est cette concentration que nous appliquerons lors de l'évaluation des traitements sur le potentiel reproducteur, la capacité vectorielle et la synthèse des ecdystéroïdes d'*A. aegypti*.

2 - Discussion - Conclusion

Les évaluations de l'efficacité des deux IGR montrent avant tout que le diflubenzuron est plus efficace que l'OMS 2017 puisque les IE 30 obtenues sont respectivement de 0,0004 mg / l et 0,003 mg / l.

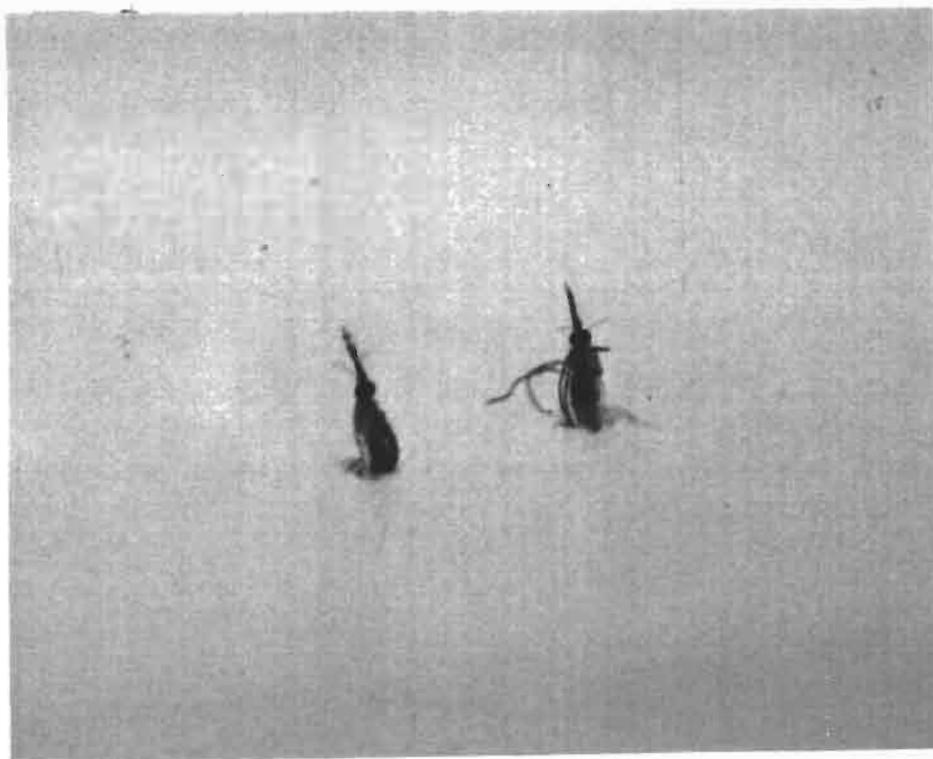
En second lieu, nous remarquons que l'OMS 2017 semble plus stable que le diflubenzuron ainsi qu'en témoigne l'homogénéité des points autour des droites de régression. Malgré tout, dans les deux cas, nous observons de grandes variations des doses sublétales cherchées, les intervalles de confiance calculés le montrent bien.

Darriet *et al.* (1985) observent aussi des différences importantes de la CL 50 de l'OMS 3007 aussi bien sur *Culex quinquefasciatus* que sur *Anopheles gambiae*.

Nous n'avons pas observé de mortalités larvaires et nymphales importantes sauf au cours de certains tests. Dans ces cas, les mortalités s'expliquent mal si ce n'est par des facteurs extrinsèques.

Les nymphes qui meurent sont de couleur blanchâtre indiquant qu'elles sont mortes juste après la nymphose sans avoir subi le processus de mélanisation.

Les adultes qui meurent au cours de l'émergence restent bloqués dans l'exuvie nymphale ou ne peuvent en détacher l'une de leurs pattes postérieures (Photographie 5).



Photographie 5 : Adulte émergant dans l'eau et restant bloqué dans l'exuvie nymphale.

Ceux qui réussissent à émerger complètement ne présentent apparemment pas de malformation comme celles décrites par Lochouarn (1990) : 60 % des adultes mâles et femelles de *Culex quinquefasciatus* ayant survécu à la DS 80 (dose sub létale provoquant 80 % d'inhibition d'émergence) de l'OMS 3031 (IGR de type inhibiteur de la mue) présentent des pattes recourbées vers le haut ou des ailes qui restent perpendiculaires au corps sans pouvoir se replier.

Ces différences sont peut-être dues au fait que *Culex quinquefasciatus* semble particulièrement sensible à l'action des IGR. Et en effet, les adultes survivants de *Anopheles gambiae* traités avec le même produit n'ont, semble-t-il, pas présenté ces anomalies.

Nous ne pouvons pas conclure que *Aedes aegypti* est moins sensible que *Culex quinquefasciatus* mais plus probablement que la dose utilisée n'est pas suffisante pour permettre l'observation de ces anomalies.

Les coupes histologiques que nous avons réalisées à partir d'adultes survivants, selon le protocole décrit au paragraphe 6 du chapitre 1, ne montrent aucune altération, en particulier de la cuticule. Néanmoins, étant donné la petite taille des moustiques, cette étude devrait être complétée par une analyse ultrastructurale. Les premiers résultats que nous avons obtenus révèlent la nécessité de trouver un mode de fixation mieux adapté.

On constate par ailleurs que la reproductibilité des tests est médiocre surtout avec le diflubenzuron. Les courbes de sensibilité obtenues sont très différentes d'un essai à un autre, malgré des conditions expérimentales identiques.

En outre, l'hétérogénéité des points autour des droites de Henry est importante comme le montrent les χ^2 indiquant l'existence d'une mauvaise corrélation entre la dose et le pourcentage de réduction d'émergence.

Ces résultats ne sont pas liés aux produits que nous avons utilisés mais plutôt aux conditions dans lesquelles nous les avons employés, conditions qui sont standardisées. En effet, le protocole d'évaluation de l'efficacité des IGR est défini par l'OMS et de fait, il est difficile de s'en écarter. En outre, ces conditions expérimentales se rapprochent au maximum des conditions requises pour leur utilisation sur le terrain.

Mais, les IGR sont des produits très mal solubles dans l'eau ce qui, déjà au départ, constitue un handicap à la reproductibilité des tests.

Nous avons cependant tenté de modifier légèrement les conditions de réalisation des tests. Au cours des essais préliminaires, nous transférons les larves après le contact dans des gobelets de plastique contenant 200 ml d'eau permutée, identiques à ceux que nous utilisons pour le traitement. Nous avons observé à de nombreuses reprises la formation d'un voile bactérien qui augmentait la mortalité, introduisant un biais difficilement quantifiable. C'est pourquoi nous avons par la suite, décidé de transférer les larves par lot de 100 dans des cristallisoirs (un cristallisoir par concentration) contenant 2 l d'eau de ville.

Dans ces conditions, les larves achèvent leur développement sans que l'on observe de mortalité anormale et bien que ces modifications ne résolvent pas entièrement le problème de la reproductibilité des tests, celle-ci est meilleure.

Il semble que le choix du stade larvaire soit à cet égard primordial.

Selon que les larves sont en fin de stade III ou en début de stade IV, les résultats sont différents, les larves traitées avant la mue semblent plus sensibles.

Il existe donc au sein d'un même stade des variations de la sensibilité.

Des essais conduits avec un analogue de l'hormone juvénile, l'isopropyl - 11 - méthoxy - 3, 7, 11 - triméthyl-dodeca - 2, 4 - diénoate, sur *Aedes aegypti* (Bhaskaran *et al.*, résultats non publiés) montrent l'existence de variations considérables de la sensibilité des larves de stade IV en fonction de leur âge.

La durée du stade IV, très brève par rapport à celle des stades précédents, ajoute encore au problème de la détermination de la période pendant laquelle le traitement serait le plus efficace ; la larve cesse rapidement de se nourrir et devient le terrain d'un profond remaniement de ses tissus.

Le dosage des ecdystéroïdes auquel nous avons procédé apporte des précisions à ce niveau que nous envisagerons par la suite.

La formulation des deux insecticides pourrait également être mise en cause.

L'utilisation du diflubenzuron en poudre mouillable est recommandée par Duphar sauf dans des cas particuliers comme la présence d'un couvert végétal important qui nécessite alors plutôt l'utilisation de granulés à 0,5 % de matière active.

L'évaluation à échelle réduite de l'efficacité de l'OMS 3007 et de l'OMS 3019 sur des larves de simules a mis en évidence la supériorité des concentrés émulsifiables sur les microcapsules (Hougard, 1988).

Ces observations sont vraies pour d'autres espèces.

Darriet *et al.* (1985) montrent que la limite de la CL 100 de l'OMS 3007 sur *Culex quinquefasciatus* est 25 fois plus faible dans le cas du concentré émulsifiable que dans celui de la poudre mouillable ou des microgranulés.

Il serait donc intéressant de disposer d'autres formulations des produits que nous avons utilisés qui se présentaient exclusivement sous forme de poudre mouillable afin de vérifier une éventuelle amélioration des résultats.

La nourriture et la température sont des facteurs qui semblent agir sur la variabilité des résultats obtenus.

L'adjonction de nourriture pendant la durée du test pourrait augmenter la stabilité de l'insecticide en solution. Ignoffo *et al.* (1981) constatent que la présence de nourriture augmente l'ingestion de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sérotype H14, en stimulant l'appétit des larves.

Certains laboratoires utilisent de manière empirique la levure pour stabiliser les effets des insecticides. Ceux-ci s'adsorbent sur les particules de levure, ce qui faciliterait leur ingestion.

Des essais ont été conduits au laboratoire afin de vérifier cette hypothèse (Gustave, comm. pers.).

L'effet de la levure en tant que facteur de stabilisation n'apparaît pas clairement. Cependant on note une diminution de la variabilité des résultats en ce qui concerne la détermination de la IE 50.

Pour une même concentration, la levure induit un taux de réduction d'émergence inférieur à celui que l'on observe en son absence.

Il pourrait s'agir d'un phénomène de compétition entre les particules de levure et l'insecticide mais ce n'est vrai qu'aux faibles concentrations.

Il semble donc intéressant d'ajouter de la levure aux préparations d'insecticide et il serait nécessaire d'affiner ces premières observations en diminuant par exemple la concentration de levure ou en étudiant des matériaux de synthèse qui n'interviendraient pas métaboliquement.

Le mode d'alimentation des larves pourrait être de la même manière impliqué dans ces variations. En effet, les larves d'*Aedes aegypti* comme nous l'avons déjà mentionné, se nourrissent sur les fonds des gîtes, tandis que les larves d'*Anopheles* se nourrissent en surface. Or il semble que la poudre mouillable reste plutôt en surface ce qui expliquerait qu'elle soit moins efficace qu'une autre formulation ayant tendance à sédimenter. Ce facteur doit cependant être relativisé étant donné les conditions expérimentales (évaluation dans des gobelets de faible volume).

Les concentrations de l'OMS 2017 et du diflubenzuron induisant 30 % de réduction d'émergence ont cependant été déterminées et nous allons maintenant procéder à l'analyse de leurs effets sur le potentiel reproducteur et la capacité vectorielle d'*A. aegypti*.

CHAPITRE 3

Chapitre 3

Potentiel reproducteur des femelles d'*Aedes aegypti* soumises à des doses sublétales d'insecticides

1 - Traitement des moustiques

Le principe du traitement insecticide des moustiques a été décrit au cours du premier chapitre : les adultes récoltés sont issus de larves traitées au début du quatrième stade par les concentrations entraînant 30 % de réduction d'émergence des deux IGR utilisés, l'OMS 2017 et le diflubenzuron, soit respectivement 0,003 et 0,0004 mg (m.a.) / l. Aucun traitement n'est par conséquent appliqué au stade adulte.

2 - Effets des traitements sur la ponte

2.1 - Effet de l'OMS 2017

Le traitement insecticide a provoqué 32,8 % de réduction d'émergence (taux de réduction d'émergence des témoins : 8,6 %).

Nous avons constitué, pour chaque série témoin et traitée, des cages de 50 femelles et 50 mâles survivants. Les femelles ont été nourries sur cobaye à l'âge de 5 jours et isolées ensuite dans des pondoires individuels.

Les pontes sont récoltées au bout de trois jours et on dénombre les femelles qui ont pondu et celles (mortes ou non) qui n'ont pas pondu, ainsi que le nombre d'oeufs déposés.

Les résultats figurent dans le tableau 7.

	nombre de ♀ vivantes	nombre de ♀ pares	nombre moyen d'oeufs ($\pm\sigma$)
TEMOINS	48	32	80 \pm 37
OMS 2017	42	25	56 \pm 23

Tableau 7 : Evaluation de l'effet de l'OMS 2017 sur la ponte des femelles d'*Aedes aegypti* ayant survécu au traitement larvaire (σ = écart-type).

Les femelles qui survivent au traitement par l'OMS 2017 pondent significativement moins d'oeufs que les femelles témoins ($t = 2,91$ à 55 ddl).

Sur l'ensemble des femelles vivantes, on compte 16 femelles témoins qui ne se sont pas gorgées tandis que chez les traitées à l'OMS 2017, elles sont 17. La différence n'étant pas significative, on ne peut pas affirmer que le traitement par l'OMS 2017 altère la capacité des femelles survivantes à prendre un repas de sang.

On observe chez les témoins 2 femelles mortes sans avoir pondu alors que chez les femelles traitées à l'OMS 2017, elles sont au nombre de 8.

La mortalité des femelles traitées est significativement plus élevée que celle des femelles témoins ($p < 0,05$).

La mortalité observée après l'isolement dans des pondoires individuels pourrait être due à un stress des femelles capturées au moyen d'un aspirateur à bouche et maintenues dans un espace réduit le temps de l'oviposition. Si cette hypothèse est vraie, alors les femelles traitées sont plus sensibles à ce stress que les femelles témoins.

2.2 - Effet du diflubenzuron

Le traitement insecticide a induit une réduction d'émergence de 24 % (chez les témoins, le taux de réduction d'émergence est de 11 %).

Nous avons constitué une cage de 30 femelles témoins et une cage de 25 femelles traitées, avec dans chaque cage, le même nombre de mâles.

Les femelles âgées de 5 jours reçoivent un repas de sang.

Les résultats sont consignés dans le tableau 8 suivant :

	nombre de ♀ vivantes	nombre de ♀ pares	nombre moyen d'oeufs ($\pm\sigma$)
TEMOINS	29	28	68 \pm 21
DFB	21	21	68 \pm 30

Tableau 8 : Evaluation de l'effet du DFB sur la ponte des femelles d'*Aedes aegypti* ayant survécu au traitement larvaire.

Les femelles qui survivent au traitement par le diflubenzuron pondent autant d'oeufs que les femelles témoins.

On a observé 4 morts parmi les femelles traitées qui n'avaient pas pondu alors que parmi les témoins, il n'y en avait qu'un. Cependant la différence n'est pas significative. Sur l'ensemble des femelles vivantes, toutes étaient gorgées à l'exception d'une femelle témoin mais cette différence n'est pas non plus significative.

2.3 - Discussion

Les résultats que l'on observe quant à l'effet d'un traitement insecticide au moyen de régulateurs de croissance sur le nombre moyen d'oeufs pondus varient en fonction des produits.

Dans le cas de l'OMS 2017, le traitement semble agir au niveau de la fécondité puisqu'il s'ensuit une réduction de la ponte. Le diflubenzuron au contraire, ne semble pas avoir d'effet à ce niveau.

Les femelles traitées par l'OMS 2017 ont présenté une mortalité supérieure à celle des témoins après le repas et bien que le traitement n'en soit certainement pas la cause directe, on peut penser que les femelles fragilisées n'ont pas supporté aussi bien que les témoins l'isolement dans le pondoir individuel.

Ce n'est pas le cas de celles traitées au diflubenzuron.

Il faut cependant noter que les deux traitements n'ont pas provoqué la même réduction à l'émergence : celle des moustiques traités par l'OMS 2017 a été plus élevée.

L'étude de l'effet de plusieurs AHJ sur le potentiel reproducteur de deux

L'étude de l'effet de plusieurs AHJ sur le potentiel reproducteur de deux générations successives a donné différents résultats selon le produit et selon la concentration appliquée (Kelada *et al.*, 1981).

Les traitements sont appliqués sur des larves au début du quatrième stade qui constituent la génération F0. On évalue l'effet des traitements sur les générations F1 et F2 issues des adultes survivants de la génération F0.

Dans l'ensemble le nombre moyen d'oeufs pondus est affecté par les traitements. Il augmente de 21,1 à 36,6 % selon la concentration dans le cas d'un traitement par l'Altosid aussi bien pour la génération F1 que pour la génération F2.

A l'inverse, le TH6040 provoque une augmentation de 55 à 75 % de la fécondité uniquement sur la seconde génération. Sur la première génération, il provoque tantôt une augmentation tantôt une diminution qui ne semble pas liée à la concentration appliquée et il peut même être sans effet.

Ces résultats pourraient s'expliquer par une différence de l'état physiologique des larves au moment du traitement mais aussi par le mode d'action des produits utilisés qui peut être différent.

Dans le cas où le traitement a le même effet sur les deux générations F1 et F2, on peut en déduire que l'effet observé est transmis aux générations suivantes.

Dans certains cas, on observe une augmentation du potentiel reproducteur de la génération F2 alors qu'il est sans effet sur la première génération. On peut alors s'interroger sur le mode d'action d'un insecticide dont l'effet serait masqué à la première génération pour ensuite s'exprimer à la seconde.

Nous avons tenté de poursuivre l'étude de l'effet du traitement effectué sur les larves de F0 par l'OMS 2017, sur la génération F1 (résultats non exposés) et nous avons pu observer qu'il n'existait plus de différence entre la ponte des témoins F1 (117 oeufs par femelle) et celle des traités F1 (124 oeufs par femelle).

Cette expérience n'a pas été réalisée avec le diflubenzuron dans la mesure où l'effet du traitement ne se manifestait pas sur la génération traitée.

Dans le cas de notre étude, nous pouvons donc conclure que le traitement par l'OMS 2017 de larves de F0 a un effet réducteur sur le nombre moyen d'oeufs pondus par les femelles survivantes mais cet effet n'est pas transmis à la génération suivante.

L'absence d'effet du diflubenzuron sur la fécondité d'*Aedes aegypti* apporte un nouvel argument en faveur d'une différence d'action liée au produit.

3 - Effets des traitements sur la fertilité

3.1 - Effet de l'OMS 2017

Nous avons mis à éclore un certain nombre d'œufs pondus par les femelles témoins et les femelles issues du traitement larvaire précédent et nous avons examiné le nombre de larves de quatrième stade que nous obtenions 4 à 5 jours plus tard.

Nous présentons les résultats dans le tableau 9.

	nombre d'œufs introduits	nombre de larves F1 stade IV
TEMOINS	420	273
OMS 2017	424	96

Tableau 9 : Effet du traitement par l'OMS 2017 sur l'éclosion de la génération F1.

On constate donc que trois fois moins de larves issues des œufs des femelles traitées atteignent le quatrième stade ; cette réduction est très hautement significative ($p = 0,0001$).

L'effet de l'OMS 2017 se traduit donc par une réduction de la fertilité.

Une partie des œufs a été examinée sous loupe binoculaire une journée après l'éclosion et nous avons pu constater chez les témoins que 36 % des œufs n'étaient pas encore éclos alors que chez les traités, il y en avait 58 %. Cette différence est significative de l'effet du traitement sur la génération F1 ($p = 0,0001$).

Les œufs qui n'ont pas éclos chez les témoins à ce moment-là peuvent être considérés comme morts puisqu'on observe ensuite 65 % de larves en stade IV par rapport au nombre d'œufs introduit.

Chez les traités, le pourcentage d'œufs non éclos n'est pas le reflet d'un retard de l'éclosion mais il montre que le traitement induit en plus une mortalité au sein des larves de la génération F1 après l'éclosion, puisqu'on ne compte que 23 % de larves en stade IV.

Bien que la présence d'un embryon dans les œufs n'ait pas été systématiquement recherchée, nous avons observé que les œufs non éclos étaient embryonnés et non pas vides.

3.2 - Effet du diflubenzuron

Les résultats obtenus quant à l'effet du diflubenzuron sur l'éclosion de la génération F1 figurent dans le tableau 10.

	nombre d'oeufs introduits	nombre de larves F1 stade IV
TEMOINS	66	57
DFB	86	71

Tableau 10 : Effet du traitement par le DFB sur l'éclosion de la génération F1.

Le traitement par le diflubenzuron ne semble pas avoir d'effet réducteur sur la fertilité des femelles traitées : il n'y a aucune différence entre le nombre de stades IV obtenus chez ces femelles par rapport aux témoins.

On remarque parmi les larves de stade IV dénombrées, la présence de larves de stade II à III tendant à montrer que les larves témoins sont en retard par rapport aux larves traitées.

La proportion varie en effet de 23 % chez les témoins à 11 % chez les traités. Cependant ce retard n'est pas significatif. D'ailleurs, les premières nymphes font leur apparition parmi les témoins.

Lorsque nous avons examiné l'état des oeufs non éclos sous la loupe, nous avons observé en général des oeufs non embryonnés aussi bien chez les traités que chez les témoins.

3.3 - Discussion

En déterminant le nombre de larves de stade IV que l'on obtenait finalement, nous n'avons pas déterminé le taux d'éclosion de la génération F1 issue de la génération F0.

Pour déterminer le taux d'éclosion des larves, il aurait fallu déterminer le nombre de stades I or, durant ce stade, d'une part le comptage n'est pas facile étant donné la taille des larves et d'autre part les larves sont encore très fragiles.

Nous avons donc préféré les perturber le moins possible, afin de pouvoir les suivre jusqu'à l'émergence.

La différence que nous avons observée au niveau de l'effet des deux traitements sur la fécondité d'*A. aegypti* est également visible au niveau de la fertilité : celui de l'OMS 2017 se manifeste encore sur la génération F1 par une diminution de l'éclosion alors que celui du diflubenzuron n'est pas visible, comme on pouvait l'attendre.

Bien que certaines différences aient été observées au niveau des oeufs non éclos, il est difficile de conclure. Dans le cas de l'OMS 2017, nous n'avons pas observé si l'embryon était normal ou non et donc nous ne pouvons déterminer si le traitement inhibe l'éclosion ou s'il bloque l'embryogenèse. Dans celui du diflubenzuron, la proportion d'oeufs vides témoins et traités n'a pas été relevée et rien ne nous permet de dire que ce n'est pas le traitement qui est responsable de ce phénomène.

4 - Effets des traitements sur le développement des ovarioles

Nous présentons ici les moyennes des nombres d'ovarioles que nous avons déterminés en totalisant le nombre des ovarioles présents dans les deux ovaires des femelles disséquées. Ces valeurs correspondent, comme nous l'avons précédemment écrit dans l'introduction, au nombre moyen de follicules basaux.

4.1 - Effet de l'OMS 2017

4.1.1 - Essai préliminaire

Nous avons disséqué 88 femelles témoins et 69 femelles traitées âgées de quelques heures à 4 jours.

Ces 69 femelles sont les survivantes d'un traitement par l'OMS 2017 effectué comme précédemment sur des larves de stade III-IV selon le protocole décrit au paragraphe 3 du chapitre 1.

Les résultats sont consignés dans le tableau 11 :

	nombre moyen d'ovarioles ($\pm \sigma$)
TEMOINS	91 \pm 21
OMS 2017	78 \pm 16

Tableau 11 : Effet du traitement par l'OMS 2017 effectué au stade larvaire sur le nombre des ovarioles.

La réduction du nombre des ovarioles observée chez les femelles traitées au stade larvaire par rapport aux femelles témoins est significative ($t = 4,3$ à 155 ddl).

Nous noterons que le taux de réduction d'émergence des adultes traités au stade larvaire par l'OMS 2017 est de 36 % (taux de réduction d'émergence des témoins 16,4 %).

4.1.2 - Etude des femelles 24 heures après leur émergence

Les femelles disséquées sont âgées de 24 heures, les follicules de rang I sont en stade II. Les résultats sont consignés dans le tableau 12.

	série 1	série 2	série 3	série 4
TEMOIN	94 \pm 14 (4,7)	96 \pm 19 (8)	109 \pm 16 (3,4)	115 \pm 16 (11,4)
OMS 2017	99 \pm 23 (33,5)	100 \pm 23 (73)	96 \pm 23 (14,5)	93 \pm 14 (14,7)

Tableau 12 : Nombre moyen d'ovarioles observé ($\pm \sigma$) chez les femelles témoins et les femelles ayant survécu au traitement par l'OMS 2017 24 heures après l'émergence (les taux de réduction d'émergence en % sont indiqués entre parenthèses).

Les différences que l'on observe entre les femelles témoins et traitées ne sont pas significatives pour les séries 1 et 2.

En revanche, la réduction du nombre des ovarioles que l'on peut constater dans les séries 3 et 4 est significative. Les valeurs de t sont respectivement 3,8 et 9,1 à 135 et 160 ddl.

4.1.3 - Etude des femelles 24 heures après leur premier repas de sang

Les femelles disséquées sont âgées de 5 jours, les follicules de rang I qui étaient en stade quiescent ont alors repris leur développement et sont pour la majorité d'entre eux en stade IV. Cependant, certains semblent être restés en stade II ; nous aborderons ce problème au cours de la discussion.

Les résultats sont consignés dans le tableau 13 :

	série 5	série 6	série 7	série 8
TEMOIN	93 ± 22 (6)	82 ± 19 (8,8)	84 ± 13 (3,3)	103 ± 14 (8,8)
OMS 2017	107 ± 23 (56)	82 ± 19 (61)	78 ± 13 (14)	104 ± 15 (28,7)

Tableau 13 : Nombre moyen d'ovarioles observé ($\pm \sigma$) chez les femelles témoins et les femelles ayant survécu au traitement par l'OMS 2017 24 heures après le repas (les taux de réduction d'émergence en % sont indiqués entre parenthèses).

Les séries 6 et 8 ne montrent aucune différence quant au nombre des ovarioles. Les femelles traitées de la série 5 présentent une augmentation du nombre des ovarioles par rapport aux femelles témoins qui est significative ($t = 3$ à 97 ddl). Les femelles traitées de la série 7 présentent une réduction du nombre des ovarioles, également significative ($t = 2,7$ à 165 ddl).

4.1.4 - Etude des femelles 5 jours après l'oviposition

Les femelles disséquées sont âgées de 10 jours. Lors d'un repas ultérieur, c'est un second cycle gonotrophique qui débiterait.

Les ovaires de ces femelles présentent des follicules de rang II bloqués en stade quiescent.

On a observé la présence d'oeufs non expulsés au sein des ovaires dont nous considérerons la signification ultérieurement au cours de la discussion.

Les résultats sont consignés dans le tableau 14 :

	série 9	série 10	série 11
TEMOIN	90 ± 20 (4,7)	91 ± 19 (8,7)	88 ± 15 (6)
OMS 2017	91 ± 14 (49)	80 ± 12 (41,5)	93 ± 16 (32,4)

Tableau 14 : Nombre moyen d'ovarioles secondaires observé ($\pm \sigma$) chez les femelles témoins et les femelles ayant survécu au traitement par l'OMS 2017 (les taux de réduction d'émergence en % sont indiqués entre parenthèses).

Les femelles traitées des séries 9 et 11 ne présentent aucune variation du nombre des ovarioles par rapport aux femelles témoins.

Les femelles traitées de la série 10 présentent en revanche une réduction significative du nombre des ovarioles ($t = 3,6$ à 96 ddl).

L'effet du traitement larvaire semble donc pouvoir se manifester encore au niveau du second cycle gonotrophique.

4.2 - Effet du diflubenzuron

Nous avons disséqué des femelles âgées de 5 jours, 24 heures après le premier repas de sang.

Les follicules de rang I bloqués en stade IIb ont repris leur développement.

Les résultats figurent dans le tableau 15 :

	série 1	série 2
TEMOIN	99 ± 14 (2,5)	111 ± 15 (9,5)
DFB	103 ± 10 (39,3)	86 ± 16 (23)

Tableau 15 : Nombre moyen d'ovarioles observé ($\pm \sigma$)chez les femelles témoins et les femelles ayant survécu au traitement par le DFB, 24 heures après le repas sanguin (les taux de réduction d'émergence en % sont indiqués entre parenthèses).

Les femelles traitées de la série 1 ne présentent pas de différence quant au nombre d'ovarioles par rapport à celui des femelles témoins.

En revanche, la réduction que l'on observe dans la série 2 est significative ($t = 6,4$ à 57 ddl).

Le diflubenzuron semble donc avoir un effet sur le développement des ovarioles alors que jusqu'à maintenant, aucun effet tant sur la fécondité que sur la fertilité n'avait été mis en évidence. Cet effet se manifeste lors du second cycle gonotrophique. Cependant il n'est pas observé sur chaque série, comme nous avons déjà pu le constater avec l'OMS 2017.

Ceci nous conduit à suggérer que les déterminations que nous avons faites auparavant ont pu être faussées par un échantillonnage non représentatif de la population ou que nous étions dans un cas où les traités ne présentaient pas de réduction quant au nombre des ovarioles comme celui de la série 1.

4.3 - Discussion

La réduction du nombre des oeufs pondus observée dans le cas du traitement par l'OMS 2017 pourrait donc être associée à la réduction du nombre des ovarioles que nous avons constatée dans un certain nombre des essais ou encore au blocage du développement à maturité d'un certain nombre de follicules.

L'ensemble des résultats fait apparaître que l'effet des traitements est variable : le nombre des ovarioles chez les femelles ayant survécu au traitement par l'OMS 2017 ou le DFB peut être égal, inférieur ou même supérieur à celui des femelles témoins et cela pour des femelles disséquées au même âge.

La variabilité pourrait être due d'une part, à une variabilité de l'efficacité du traitement bien que la même concentration ait été appliquée et d'autre part, à la période où il a été effectué, période plus ou moins critique du développement larvaire qui se traduit par la variabilité de la réduction d'émergence.

Nous allons donc essayer de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre ces facteurs, tout d'abord en ce qui concerne le traitement par l'OMS 2017.

4.3.1 - Corrélations entre la réduction du potentiel reproducteur et la réduction d'émergence

Comme nous l'avions déjà remarqué au cours du chapitre 2, les taux de réduction d'émergence que nous avons obtenus au cours des différents traitements effectués ici varient considérablement. Alors que l'on attendait 30 % de réduction d'émergence de la population traitée, on obtient selon les séries de 73 % à 14 % pour une variation de 11,4 % à 3,3 % dans la population témoin.

Si on essaie de comparer les variations obtenues chez les traités quant au nombre des ovarioles par rapport aux taux de réduction d'émergence, on trouve que si le taux de réduction d'émergence est supérieur à 50 % (séries 2, 5 et 6), le nombre des ovarioles des femelles traitées tend à être supérieur à celui des témoins ; lorsqu'il est compris entre 50% et 30 % (séries 1, 9, 10, et 11), ce nombre n'est pas différent de celui des témoins ; et enfin, lorsqu'il est inférieur à 30 % (séries 3, 4, 7 et 8), ce nombre tend à être inférieur à celui des témoins.

Bien que les femelles ne soient pas toutes du même âge, nous avons rassemblé les résultats obtenus par dissection en fonction des taux de réduction d'émergence dans le cas du traitement par l'OMS 2017.

Le tableau 16 synthétise l'ensemble de ces résultats :

	IE > 50	30 < IE < 50	IE < 30
TEMOIN	91 ± 23	90 ± 17	103 ± 19
OMS 2017	100 ± 24	93 ± 20	92 ± 19

Tableau 16 : Nombre moyen d'ovarioles observé ($\pm \sigma$) chez les femelles témoins et les femelles ayant survécu au traitement par l'OMS 2017 par rapport au taux de réduction d'émergence (IE) en %.

La réduction du nombre des ovarioles que l'on observe lorsque le taux de réduction d'émergence est inférieur à 30 % est significative ($t = 7,1$ à 615 ddl) de même que l'est l'augmentation de ce nombre lorsque le taux de réduction d'émergence est supérieur à 50 % ($t = 2,96$ à 247 ddl).

Si on essaie d'analyser ce que l'on obtient avec le diflubenzuron, on constate que le taux de réduction d'émergence des traités de la série 1 est de 39 %, tandis que celui de la série 2 est inférieur à 30 %.

Ces résultats vont donc dans le même sens que ceux obtenus avec l'OMS 2017. Si l'on revient à l'effet des traitements sur la fécondité, l'existence d'une telle corrélation avec le nombre moyen d'oeufs pondus est moins évidente. Le taux de réduction d'émergence observé pour les adultes survivants au traitement par l'OMS 2017 est de l'ordre de 30 % tandis que celui observé pour les adultes survivants au traitement par le diflubenzuron est de 24 %.

Dans les deux cas, on pouvait attendre une absence d'effet du traitement sur la fécondité, or ce n'est pas ce qui se produit avec les femelles traitées par l'OMS 2017.

La relation entre le nombre d'oeufs pondus et le nombre d'ovarioles est donc plus complexe, ce qui est probablement dû aux phénomènes de dégénérescence des follicules que nous verrons par la suite.

Gaaboub *et al.* (1981) constatent que chez *Culex pipiens* L., le nombre de follicules basaux augmente chez les femelles qui ont survécu au traitement par deux régulateurs de croissance, le Dimilin et l'Altosid. Les concentrations de 0,00001, 0,0001 et 0,001 ppm de Dimilin provoquent respectivement 9,6 %, 33,6 % et 18,6 % d'augmentation du nombre des ovarioles tandis que les mêmes concentrations d'Altosid provoquent 23,1 %, 26,5 % et 23,8 % d'augmentation.

L'augmentation du nombre des ovarioles n'est donc pas liée à la concentration appliquée.

En effet, il semble qu'il existe un plateau et qu'au-delà d'une certaine concentration, l'insecticide aurait un effet plutôt opposé. Ceci est vrai à la fois pour le Dimilin qui est un inhibiteur de la mue et pour l'Altosid qui est un AHJ.

L'augmentation du nombre des ovarioles a été également observée avec des insecticides chimiques classiques comme le DDT ou la dieldrine (Sutherland *et al.*, 1967). Elle semble liée dans ce cas à la concentration mais il existe un seuil au-delà duquel ce nombre ne varie plus.

Les stades larvaires I et II apparaissent plus sensibles que les stades III et IV.

Deux hypothèses peuvent alors être suggérées : la dose appliquée sur les stades âgés est trop faible pour induire des variations du nombre des ovarioles ou bien les gonades étant alors mises en place, le stimulus lié au traitement est sans effet sur le développement des ovarioles.

Selon Gaaboub *et al.* (1981), le traitement provoquerait un stimulus juste avant ou au moment de la détermination du nombre des ovarioles.

La mise en place des ovaires se produisant au cours du quatrième stade larvaire, l'augmentation ou la diminution du nombre des ovarioles est envisageable.

Il pourrait encore induire la maturation d'ovarioles rudimentaires après la prise d'un repas de sang ou au contraire l'inhibition du développement à maturité des oocytes.

Cette hypothèse, valable pour l'OMS 2017, reste à démontrer pour le diflubenzuron.

4.3.2 - Dégénérescence ou inhibition de la maturation folliculaire

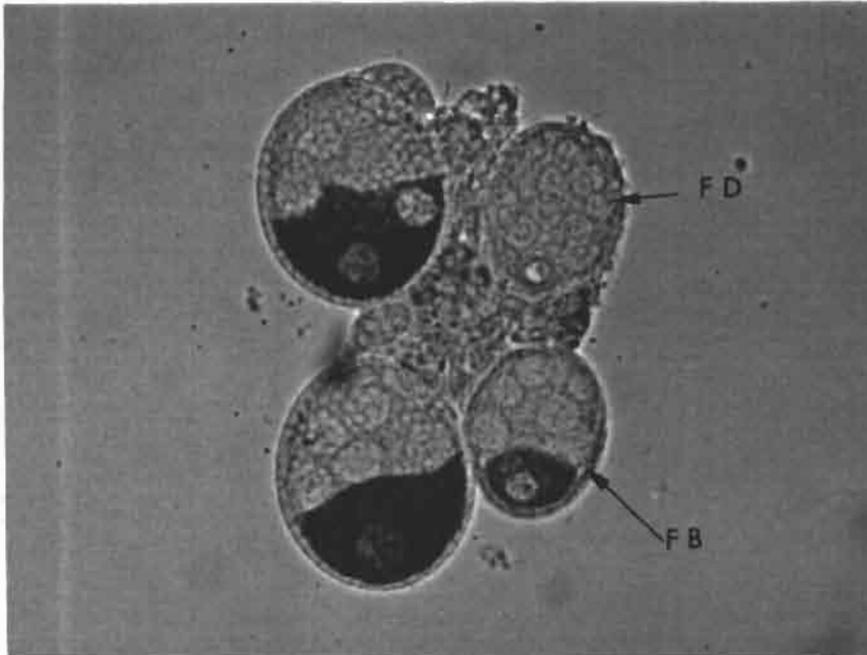
Le phénomène de dégénérescence des follicules semble être un phénomène normal chez les moustiques (Clements, 1963) qui se produit au cours de chaque cycle gonotrophique, 24 à 48 heures après le repas. Selon Judson and Lumen (1976), 25 % des follicules se résorberaient au cours de cette période chez *Aedes aegypti*. La dégénérescence commence au niveau de l'épithélium folliculaire puis gagne la masse centrale.

En général ce phénomène s'accroît avec l'âge de la femelle ; la dégénérescence se produit parfois parmi les follicules qui n'ont jamais atteint la maturité mais également chez des follicules qui avaient repris leur croissance à la suite de l'ingestion d'un repas.

Il pourrait s'agir d'une régulation tendant à prévenir tout risque de carence en protéines due à un repas insuffisant. En effet, le nombre de follicules dégénérescents est plus important à la suite d'un repas insuffisant.

La dégénérescence d'un follicule au cours d'un cycle gonotrophique n'empêche pas l'ovariole de développer un autre follicule au cours du cycle gonotrophique suivant.

Les femelles issues de larves traitées par l'OMS 2017 et le diflubenzuron prennent un repas de sang 4 jours après l'émergence. Vingt quatre heures après, nous avons disséqué ces femelles. Nous observons alors la présence de follicules ayant atteint le stade IV mais aussi celle de follicules qui pourraient être en voie de dégénérescence ou qui seraient bloqués au stade II (Photographie 6).



Photographie 6 : Follicule bloqué en stade II (FB) et follicule dégénéré (FD) au milieu de follicules normalement développés (x 100).

Il s'agit maintenant de déterminer si ces observations sont liées au traitement. La présence significative d'ovarioles en stade II pourrait correspondre à une dégénérescence des follicules ou à une inhibition de leur maturation.

Les résultats figurent dans le tableau 17 :

	nombre total de follicules	nombre de follicules st. II	nombre de follicules st. IV
TEMOIN	112 ± 25	11 ± 8	102 ± 25
OMS 2017	98 ± 14	5 ± 5	94 ± 13
DFB	107 ± 14	8 ± 8	99 ± 15

Tableau 17 : Nombre moyen d'ovarioles fonctionnels et dégénérés observé ($\pm \sigma$) chez les femelles témoins et les femelles ayant survécu au traitement par l'OMS 2017 et le DFB par rapport au nombre total d'ovarioles.

Les résultats indiquent que le nombre total des ovarioles développés par les femelles témoins et les femelles traitées par l'OMS 2017 est significativement différent ($t = 2,5$ à 58 ddl) ce qui n'est pas le cas pour les femelles traitées par le DFB.

En revanche le nombre des ovarioles fonctionnels aussi bien chez les femelles traitées par l'OMS 2017 que par le DFB n'est pas différent de celui des témoins.

Quant au nombre des ovarioles dégénérés ou bloqués en stade quiescent, les résultats montrent qu'il est plus faible chez les femelles traitées par l'OMS 2017 que chez les témoins ($t = 3,5$ à 58 ddl) tandis qu'il n'y a pas de différence entre les femelles traitées par le DFB et les témoins.

Il semble donc que la présence des ovarioles immatures à ce stade de l'ovogenèse ne soit pas due aux traitements.

Si on essaie alors de comparer les traitements entre eux, on découvre que l'effet de l'OMS 2017 sur le nombre total des follicules est supérieur à celui du diflubenzuron puisque la réduction est plus importante ($t = 2,5$ à 58 ddl). En revanche, le diflubenzuron favorise la dégénérescence des ovarioles, ce qui n'est pas vrai pour l'OMS 2017 ($t = 2$ à 58 ddl).

La différence entre la réduction du nombre d'ovarioroles induite par les deux traitements tend à mettre en évidence que le traitement par l'OMS 2017 est plus actif que celui par le diflubenzuron ou que les gonades sont plus sensibles à l'effet de l'OMS 2017. Même si globalement l'effet des deux traitements sur le nombre d'ovarioroles tend vers une diminution de leur nombre, il existerait une différence quant au mode d'action des deux IGR.

En effet, les résultats observés suggèrent que l'OMS 2017 pourrait agir dès le stade larvaire au moment où le nombre des ovarioroles est déterminé, tandis que le diflubenzuron agirait plutôt sur la maturation des follicules. Celui-ci pourrait agir sur la vitellogenèse en perturbant par exemple l'incorporation des protéines.

Les résultats que nous obtenons ici ne nous permettent pas de savoir si la présence des follicules en stade II est due à une inhibition de la maturation ou à une dégénérescence des follicules.

Il a été montré chez *Oxya japonica* que le diflubenzuron, bien que sans effet sur le nombre des ovarioroles, provoquait un retard dans le développement des oocytes et surtout une augmentation de leur résorption (Lim and Lee, 1982), ces effets contribuant à réduire la fécondité et l'éclosion des oeufs.

La quantité de protéines contenues dans les ovaires après le traitement est diminuée. Tout se passe comme si les traités subissaient un jeûne.

Le diflubenzuron causerait au niveau des ovaires une réduction des lipides, des protéines et des glucides, entraînant une perte de poids ou encore l'inhibition du dépôt de vitellus dans les oocytes.

4.3.3 - Rétention des oeufs par les femelles survivantes

Lors des dissections portant sur les femelles ayant normalement pondu, nous avons souvent été gênés par la présence d'oeufs.

Pour pallier ce problème, nous avons disséqué ces femelles 5 jours après la ponte au lieu de 48 heures comme nous le prévoyions au départ. Malgré cela, chez certaines femelles nous avons trouvé encore des oeufs.

Nous nous sommes alors demandés si le traitement favorisait ou non la rétention des oeufs. Pour cela, nous avons dénombré le nombre d'oeufs encore présents dans les ovaires 5 jours après l'oviposition.

Cette expérience n'a été conduite que dans le cas de l'OMS 2017, sur les séries 9 et 11. Le choix de ces deux séries s'explique par le fait que, n'observant pas de réduction du nombre des ovarioles chez les femelles traitées, nous avons voulu savoir si le traitement n'avait pas un autre effet, comme par exemple favoriser la rétention des oeufs dans les ovaires.

La majorité des femelles ne présentent plus d'oeufs dans les ovaires 5 jours après l'oviposition.

Parmi celles qui en présentent, il n'existe pas de différence entre le nombre d'oeufs retenus par les femelles traitées et les femelles témoins : dans la série 9, 3 oeufs en moyenne sont retenus dans les ovaires des femelles témoins et traitées ; dans la série 11, 17 oeufs en moyenne sont retenus dans les ovaires des femelles témoins pour 20 dans les ovaires des femelles traitées.

Cependant, si dans la série 11 le nombre de femelles présentant encore des oeufs dans les ovaires n'est pas différent de celui des témoins, dans la série 9, 40 % de femelles témoins présentent encore des oeufs dans les ovaires pour 8 % seulement chez les femelles traitées. Cette différence est significative ($p = 0,0018$) mais elle s'explique mal.

On peut dire à première vue que les femelles traitées ne retiennent pas plus d'oeufs dans leurs ovaires que les femelles témoins.

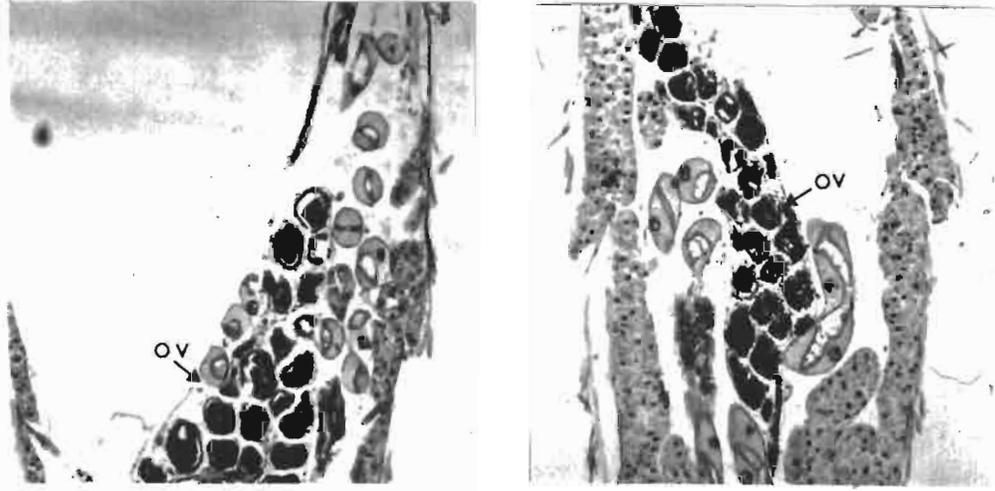
Etant donné que ces femelles sont moins nombreuses que les femelles témoins, il faut bien admettre que le phénomène de rétention des oeufs pourrait être favorisé par le traitement qui trouverait là une autre manifestation de ses effets.

4.3.4 - Etude histologique

L'étude des coupes que nous avons effectuée selon le protocole décrit au paragraphe 6 du chapitre 1 montre qu'il n'existe pas de différence au niveau de l'appareil reproducteur entre les femelles traitées par l'un ou l'autre des IGR et les femelles témoins (planche 3).

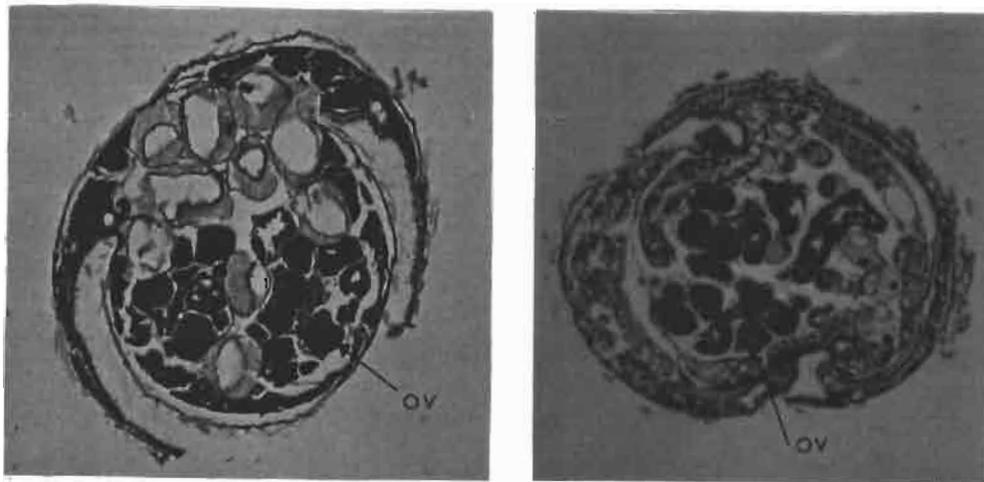
En particulier, nous n'avons observé ni diminution de l'épaisseur de l'épithélium folliculaire, ni réduction de la taille des oocytes comme c'est le cas lorsque *Cydia pomonella* est traitée au stade nymphal avec le diflubenzuron (Soltani, 1987).

Planche 3 : analyse histologique de l'effet des traitements sur les ovaires.



Coupes longitudinales d'une femelle témoin (à gauche) et traitée par l'OMS 2017 (à droite) montrant l'organisation des ovaires (ov.).

Grossissement x 62,5.



Coupes transversales réalisées au niveau de la partie terminale de l'abdomen d'une femelle témoin (à gauche) et traitée par le diflubenzuron (à droite) montrant l'organisation des ovaires (ov.). Grossissement x 62,5.

5 - Discussion - Conclusion

L'intérêt de l'ensemble de ces observations est double. Elles nous permettent d'analyser les effets des régulateurs de croissance en premier lieu sur la physiologie du moustique, ce qui est important pour la connaissance du mode d'action de ces produits puis sur l'ensemble de la population, ce qui est également très important dans la perspective de traitements sur le terrain.

Il apparaît que l'effet d'un régulateur de croissance sur le potentiel reproducteur des femelles de *Aedes aegypti* est loin d'être toujours constant.

Lors de certains essais, nous avons observé une réduction du potentiel reproducteur telle qu'on constate une réduction du nombre moyen d'oeufs pondus et une réduction de l'éclosion de la génération F1.

D'autres essais se sont soldés par une absence d'effet ou une augmentation du potentiel reproducteur.

En outre, l'étude comparée d'un autre régulateur de croissance révèle que deux produits différents ont des actions différentes.

En effet, d'une part, nous n'avons observé d'effet du diflubenzuron ni sur la fécondité des femelles survivantes ni sur la fertilité, et d'autre part, son effet sur le développement des ovarioles ne semble pas comparable à celui de l'OMS 2017.

Nous avons pu confirmer que la réduction de la fécondité était partiellement due à la réduction du nombre des ovarioles, au moins dans le cas de l'OMS 2017.

Il nous faut admettre cependant que les essais qui ont porté sur le diflubenzuron ont été moins nombreux, et que dans l'ensemble nous disposons d'un nombre plus limité de données par rapport au travail accompli avec l'OMS 2017.

Au sujet du développement des ovarioles, nous avançons l'hypothèse de l'existence de deux modes d'action différents selon le produit : l'OMS 2017 agirait sur la mise en place des ovaires alors que le diflubenzuron agirait davantage sur les réserves destinées aux oeufs. Or l'étude conduite par Behan et Hagedorn (1978) sur le corps gras d'*A. aegypti* montre que celui-ci n'est pas remanié au moment de la métamorphose, le tissu adipeux chez l'adulte étant le même que celui chez les larves. Ainsi, si le traitement par le diflubenzuron a un effet sur le tissu adipeux larvaire, il est possible d'en observer des traces chez l'adulte au moment de la maturation des oeufs.

Bien que peu de recherches aient été consacrées à l'étude du potentiel reproducteur des moustiques en relation avec un traitement insecticide, nous avons pu constater que dans l'ensemble, elles mettent plutôt en évidence un accroissement de celui-ci.

Sutherland *et al.* (1967) suggèrent que l'augmentation de la fécondité observée chez des adultes de *Drosophila* à la suite d'un traitement à la dieldrine ayant causé 66 à 69 % de mortalité n'est pas due directement à l'insecticide mais plutôt à la sélection par l'intermédiaire de cet insecticide, d'individus présentant une espérance de vie plus longue et donc un potentiel reproducteur plus grand puisque les femelles peuvent effectuer un plus grand nombre de cycles gonotrophiques.

Cette conclusion nous semble intéressante parce qu'il importe en effet de savoir ce qui peut se produire sur le terrain à la suite d'un traitement n'ayant pas été efficace à 100 %.

A la lumière de nos propres observations, nous avons pu montrer de la même façon que lorsque le traitement agit plus fortement sur la population (réduction de l'émergence importante), c'est-à-dire lorsque la pression de sélection est plus forte, il s'ensuit l'élimination des individus les plus faibles. Les survivants présentent alors un potentiel reproducteur accru.

Cet accroissement se manifeste en particulier au niveau de l'appareil reproducteur, par l'augmentation du nombre des ovarioles.

A l'inverse, lorsque le traitement semble n'avoir agi que modérément sur la population (faible réduction de l'émergence), on observe une réduction du potentiel reproducteur des moustiques liée à la réduction du nombre d'ovarioles qui traduirait davantage l'effet "physiologique" de l'insecticide qu'une réaction de l'insecte à la pression de sélection.

Nous n'avons pas étudié l'effet des traitements sur la longévité des survivants, mais un travail conduit sur *Anopheles gambiae* traité par un régulateur de croissance de type inhibiteur de la mue, l'OMS 3031, met en évidence la réduction de la longévité des moustiques survivants (Lochouarn, 1990).

Après 35 à 37 jours de vie imaginaire, la mortalité des mâles et des femelles en l'absence de traitement est de 60 % en moyenne alors qu'elle atteint 90 % en moyenne chez les moustiques issus de larves traitées.

Les traitements ayant été effectués avec une concentration correspondant à une IE 80, rien ne nous permet d'envisager que nous aurions obtenu de tels résultats avec l'OMS 2017 et le diflubenzuron sur *Aedes aegypti* mais il est intéressant de garder en mémoire que les IGR peuvent avoir un effet sur la longévité.

En revanche, nous avons mis en évidence lors de certains traitements par l'OMS 2017, une modification du sex ratio de la population traitée, la proportion des mâles tendant alors à augmenter.

Lorsque l'on tente d'établir une corrélation avec la réduction d'émergence obtenue, on constate qu'une forte inhibition d'émergence (supérieure à 50 %) entraîne une augmentation significative du nombre de mâles : on observe 63 % de mâles chez les traités et 52 % chez les témoins ($p = 0,003$).

Nous rappelons que dans ce cas, le potentiel reproducteur des femelles est accru.

Dans le cas où l'inhibition du taux d'émergence est inférieure à 30 % ou comprise entre 30 et 50 %, alors il n'existe pas de différence entre le nombre de mâles et celui des femelles.

Gaaboub *et al.* (1981) ont au contraire observé chez *Culex pipiens* L. une augmentation du nombre des femelles, femelles présentant un nombre d'ovarioles plus grand que celui des femelles témoins, liée aux fortes mortalités obtenues par traitement larvaire avec le Dimilin d'une part et l'Altosid d'autre part (coefficient de corrélation de 0,8). Ces résultats seraient dus à la présence au stade nymphal, d'un plus grand nombre de femelles immatures.

Il semble que les résultats obtenus par Gaaboub *et al.* (1981) sur le sex ratio sont révélateurs d'une sensibilité des mâles au traitement supérieure à celle des femelles, ce qui n'est pas le cas avec l'OMS 2017.

Abdelmonem *et al.* (1986) mettent en évidence que les mâles de *Hyalomma dromedarii* sont plus sensibles que les femelles à l'action de l'IGR utilisé.

Ces différences apportent une nouvelle fois la démonstration de l'existence de modes d'action différents selon les insecticides, et nous conduisent à nous interroger sur les fondements de la différence de sensibilité observée parfois entre les deux sexes. Elle semble encore difficile à expliquer : Still et Leopold (1978) montrent que l'élimination du diflubenzuron par *Anthonomus grandis* se fait de la même façon chez les mâles et les femelles. Cependant dans ce dernier cas, on n'observait pas, semble-t-il, de différence de sensibilité entre les deux sexes.

Il ne faut donc pas négliger l'importance de l'insecticide utilisé car nous avons pu le constater à plusieurs reprises, les effets observés varient avec celui-ci. Dès lors, il est nécessaire de ne pas faire de conclusions trop générales, et de mener une étude complète du produit avant tout traitement.

Nous nous sommes demandés plusieurs fois si les différences que l'on observait entre les deux traitements étaient dues à la concentration du produit que l'on avait administré aux larves.

Comme nous l'avons déjà mentionné, Kelada *et al.* (1981) mettent en évidence une corrélation entre la concentration appliquée et la réduction de la fécondité observée. Selon Gaaboub *et al.* (1981) cela serait vrai jusqu'à un certain point seulement.

Ceci est confirmé par les observations de Lochouarn (1990) qui n'obtient aucun effet de l'OMS 3031 appliqué pourtant à une concentration entraînant 80 % de réduction d'émergence sur la fécondité des femelles de *Anopheles gambiae*.

Rien n'indique que le diflubenzuron n'aurait pas eu un effet plus marqué s'il avait été appliqué à une concentration plus importante.

En ce qui concerne l'effet du traitement sur le niveau général de la population, l'étude de l'éclosion des oeufs pondus par les femelles ayant survécu au traitement par l'OMS 2017, effectué sur les larves de stade IV de la génération F0, s'est poursuivie par celle de l'émergence de la génération F1.

Les résultats montrent alors que la réduction du taux d'émergence des individus de la génération F1 issus des individus traités de la génération F0 (33 %) est significativement différente ($p = 0,02$) de celle des individus de la génération F1 issus des témoins (17 %).

On en déduit donc que l'effet du traitement se manifeste encore sur la génération F1.

Les résultats que nous avons indiqués dans le paragraphe 1.3 de ce chapitre ne nous permettaient pas de conclure que la réduction du nombre des ovarioles observée chez les femelles ayant survécu au traitement était un caractère transmis à la génération suivante puisque celle-ci ne pondait pas moins d'oeufs que les témoins.

Nous pouvons donc nous interroger sur la façon dont l'effet de l'OMS 2017 peut encore néanmoins se manifester sur l'éclosion des oeufs et l'émergence de la génération F1.

Nous pourrions envisager une accumulation de l'insecticide dans les oeufs chez la femelle traitée.

Or, les analyses chromatographiques conduites sur *Tenebrio molitor* (Soltani, 1983) montrent que lorsqu'on applique le diflubenzuron sur la cuticule de l'insecte ou lorsqu'on plonge celui-ci dans une solution de cet insecticide, on retrouve environ 90 % du produit dans les fécès.

Dans ce cas, l'hypothèse d'une accumulation du produit dans les oeufs est plus improbable, d'autant que les 10 % non retrouvés dans les excréments ont été, semble-t-il, métabolisés en CO₂.

En réalité, le type de produit utilisé, là encore, revêt une grande importance comme le montre l'étude de Emam *et al.* (1988). Ces auteurs ont mis en évidence que l'efficacité du produit utilisé était liée à sa distribution à l'intérieur de l'insecte cible, ici *Spodoptera littoralis*.

Les IGR qui ont permis de réaliser cette étude appartiennent tous à la famille des substitués de l'urée comme le diflubenzuron et l'OMS 2017.

Les résultats indiquent que l'insecticide peut être retrouvé intact dans les fécès, dans la cuticule ou dans l'hémolymphe dans des proportions qui varient avec le produit, et qu'il peut être métabolisé totalement en CO₂ ou seulement partiellement, en donnant des métabolites polaires qui favorisent son transport vers les tissus cibles de l'insecte.

En outre, la vitesse d'élimination du produit est variable. Par conséquent, c'est l'ensemble de ces paramètres qui détermine l'efficacité de l'IGR appliqué, ce qui explique en partie les différences que l'on observe.

Nous ne pouvons donc pas éliminer l'hypothèse de l'accumulation des IGR dans les oeufs des femelles traitées, mais il est certain qu'elle n'est pas vraisemblable dans tous les cas.

La manifestation de l'effet du traitement sur l'émergence de la génération F1 pourrait être également liée à la réduction de la quantité des réserves protéiques accumulées dans les oeufs de telle sorte que cela nuise à l'embryon, ce qui traduirait un effet de l'insecticide sur le tissu adipeux à partir duquel sont synthétisées les protéines vitellines. Cela d'autant plus probable que, comme nous l'avons déjà précisé, le tissu adipeux des adultes traverse la période de la métamorphose sans remaniement (Behan et Hagedorn, 1978).

L'embryon serait moins viable et s'il réussit à éclore, suffisamment affecté pour que l'émergence de l'imago en soit perturbée.

Cette hypothèse semble en accord avec les observations que nous avons pu faire sur les oeufs et nous remarquerons que là encore, les deux IGR utilisés ne semblent pas agir de la même façon puisque nous avons observé que les oeufs étaient toujours embryonnés après traitement à l'OMS 2017 alors qu'ils étaient vides après le traitement au diflubenzuron et chez les témoins.

Cette observation nous conduit à supposer que l'effet du diflubenzuron sur le métabolisme des protéines est plus marqué que celui de l'OMS 2017.

En conclusion nous dirons que les résultats obtenus mettent en évidence un effet des IGR sur le potentiel reproducteur qui dépend à la fois du produit et de l'intensité de ses effets.

Notre étude a donc permis d'apporter quelques précisions quant au mode d'action des IGR qui apparaît propre à chaque produit.

Au sujet de l'OMS 2017, l'étude que nous avons conduite sur deux générations nous permet de conclure à une réduction globale de la population due à la réduction de l'émergence et à la diminution du potentiel reproducteur.

Cette réduction correspondant à un traitement initial n'ayant provoqué que 30 % de réduction d'émergence, il faut espérer que la réduction d'émergence dans des conditions naturelles, même dans le cas d'un sous-dosage, serait plus importante.

Nous allons maintenant poursuivre par l'analyse des taux d'ecdystéroïdes en relation avec le traitement afin d'évaluer l'implication des IGR dans le contrôle hormonal exercé sur le développement larvaire et sur la reproduction.

CHAPITRE 4

Chapitre 4

Taux des ecdystéroïdes au cours de la croissance et du développement d'*Aedes aegypti* soumis à des doses sublétales d'insecticide

1 - Introduction

Nous allons maintenant aborder un autre aspect des effets des IGR, celui de la recherche de leur action sur la production des ecdystéroïdes, hormones impliquées aussi bien dans le contrôle de la croissance que du développement.

Cette étude a été réalisée afin de déterminer si les inhibiteurs de la mue que nous avons utilisés avaient un effet sur la synthèse des ecdystéroïdes.

Les résultats rapportés dans ce chapitre représentent le taux moyen d'ecdystéroïdes mesuré à un instant donné de la vie du moustique. Lorsque ce taux était inférieur à 15 pg par animal, il a été égalé à cette valeur qui représente le seuil de détection de la méthode enzymo-immunologique dans nos conditions expérimentales.

De la même façon, nous n'avons pas considéré les décimales et nous avons toujours ramené les moyennes à la valeur entière, inférieure ou supérieure.

Ces remarques valent pour les résultats obtenus sur les larves, les nymphes et les adultes.

Nous n'avons pas indiqué les valeurs des écart-types calculés car il est évident qu'étant donné la taille des échantillons avec lesquels nous avons travaillé (5 à 20 individus au plus), les écart-types ont toujours été très élevés.

2 - Dosage des ecdystéroïdes chez les larves

Les dosages ont été effectués tout au long de la durée du quatrième stade larvaire, le traitement insecticide ayant été appliqué sur les larves en début de stade IV selon le protocole décrit dans le paragraphe 3 du chapitre 1.

Les taux de réduction d'émergence obtenus dans les lots témoins, traités par l'OMS 2017 et par le diflubenzuron sont respectivement de 5 %, 19 % et 46 %.

Le premier prélèvement L_0 correspond au temps T_0 précédant le traitement. Ensuite nous avons prélevé des larves lorsque l'on arrêta le contact, soit 24 heures après (L_{24}).

Jusqu'à la 32^{ème} heure nous avons réparti les prélèvements toutes les 4 heures (à 28, L_{28} et à 32 heures, L_{32}) puis, toutes les 2 heures jusqu'à 70 heures (L_{34} à L_{70}).

2.1 - Résultats

La figure 16 illustre les résultats obtenus qui sont détaillés par ailleurs dans le tableau 1 de l'annexe 3.

2.1.1 - Larves témoins

Chez les témoins, la quantité d'ecdystéroïdes présents dans l'hémolymphe peut être considérée comme constante de L_0 à L_{50} .

Cette valeur oscille autour de 25 pg / larve et représente le niveau de base des ecdystéroïdes chez les larves d'*Aedes aegypti*.

A la 52^{ème} heure, la quantité d'ecdystéroïdes augmente légèrement pour atteindre la valeur de 46 pg / larve puis elle redescend à 25 pg / larve. On observe à L_{58} l'apparition d'un pic marqué atteignant 165 pg / larve suivi à L_{62} d'un retour au niveau de base.

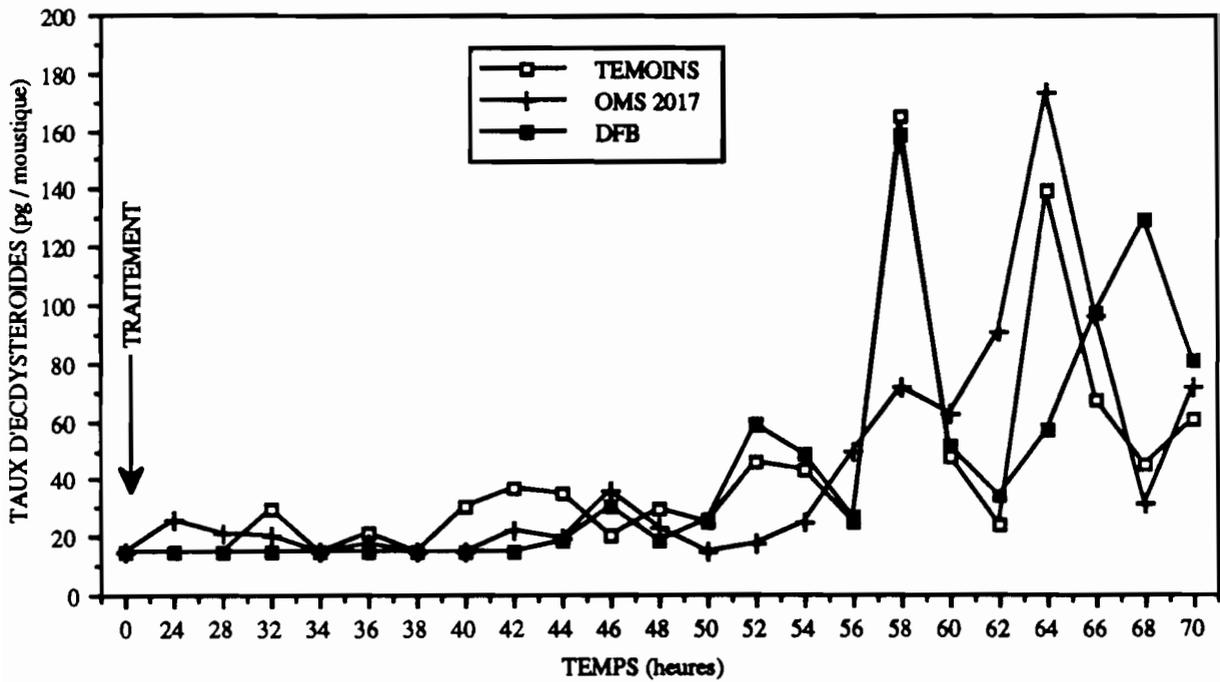


Figure 16 : Variations du taux des ecdystéroïdes en pg / individu chez les larves ayant été traitées par l'OMS 2017 et le DFB en L₀.

Un autre pic se produit 12 heures après le précédent (L₆₄). Il est d'une valeur de 139 pg / larve. Le taux d'ecdystéroïdes diminue à nouveau sans toutefois revenir au niveau de base.

2.1.2 - Larves traitées par le diflubenzuron

Chez les larves traitées avec le diflubenzuron, on observe un profil des variations semblable à celui observé chez les témoins : la quantité d'ecdystéroïdes reste faible (20 pg / larve) jusqu'à L₅₀ puis présente une augmentation jusqu'à 59 pg / larve à L₅₂. Le taux chute à 27 pg / larve puis remonte à nouveau à L₅₈ jusqu'à 159 pg / larve. Ce pic est suivi d'une chute à L₆₀ où le taux des ecdystéroïdes atteint 34 pg / larve à L₆₂ puis d'une remontée atteignant 129 pg / larve à L₆₈. Il se produit enfin une légère baisse jusqu'à 81 pg / larve à L₇₀.

2.1.3 - Larves traitées par l'OMS 2017

Le profil du dosage des ecdystéroïdes chez les larves traitées par l'OMS 2017 est sensiblement parallèle à ce que l'on a pu observer jusqu'à maintenant chez les larves témoins et celles traitées par le diflubenzuron.

Tout d'abord, le taux de base moyen des ecdystéroïdes circulants dans l'hémolymphe mesuré entre L₀ et L₅₄ est de 20 pg / larve.

On observe une augmentation progressive de L₅₄ à L₆₄ jusqu'à une valeur de 173 pg par larve.

A L₆₈, on note une chute très marquée jusqu'à 31 pg / larve.

Le taux des ecdystéroïdes à L₇₀ s'élève enfin une dernière fois à 72 pg / larve.

2.2 - Discussion

La première analyse, d'un point de vue purement mathématique, nous a montré qu'en raison des écarts-types, il n'existait pas de différence significative entre les taux d'ecdystéroïdes moyens mesurés chez les larves traitées par l'un ou l'autre des IGR et ceux mesurés chez les témoins.

Cependant, si les différences observées ne sont pas statistiquement significatives, les tendances observées suggèrent néanmoins l'existence d'interactions entre les insecticides et la production d'ecdystéroïdes, que nous pouvons tenter d'analyser.

Considérons tout d'abord le niveau de base des ecdystéroïdes.

Chez les larves traitées par le diflubenzuron, ainsi que le montre la figure 16, le taux des ecdystéroïdes ne présente pas les fluctuations que l'on observe aussi bien chez les larves témoins que chez les larves traitées par l'OMS 2017. Il semblerait donc que le diflubenzuron puisse agir sur le taux de base des ecdystéroïdes en l'abaissant.

La succession de pics que l'on observe est cependant plus difficile à interpréter.

Nous observons pour les témoins la présence de deux pics : le premier à L₅₈ et le deuxième à L₆₄.

Chez les larves traitées par l'OMS 2017, un seul pic à L₆₄ est nettement marqué.

L'amorce d'une augmentation à L₇₀ pourra être envisagée par la suite.

Chez les larves traitées par le diflubenzuron, le pic à L₅₈ se produit en même temps que chez les témoins mais le pic observé à L₆₄ chez ces derniers semble décalé et se produit à L₆₈.

Le traitement insecticide par l'OMS 2017 semble donc perturber la production des ecdystéroïdes puisque chez les larves traitées par ce produit, le premier pic disparaît. Chez les larves traitées par le diflubenzuron, nous constatons uniquement un retard du second pic de 4 heures. La signification d'un tel retard chez des insectes dont le développement est aussi rapide serait à évaluer.

Aucune étude quantitative des ecdystéroïdes larvaires chez *A. aegypti* n'a été réalisée antérieurement. Toutefois, l'analyse des taux d'ecdystéroïdes chez les lépidoptères comme *Manduca sexta*, *Pieris brassicae* ou encore *Galleria mellonella* révèle l'existence de deux pics pendant le dernier stade larvaire (Bollenbacher *et al.*, 1978).

Le premier pic induirait la détermination cellulaire, ou "commitment peak" selon l'expression anglo-saxonne, alors que le second provoquerait la différenciation cellulaire (Koolman, 1990).

Cependant, chez *A. aegypti*, l'apparition des imagos mâles précédant celle des imagos femelles de 12 heures (Clements, 1963), l'existence des deux pics observés pourrait être due à ce décalage. Dans ce cas, nous pourrions alors plutôt considérer la succession des deux pics comme résultant des différences de développement des deux sexes.

Rien ne nous permet de vérifier la véracité de cette hypothèse car il est impossible de différencier les mâles des femelles au stade larvaire, par des critères morphologiques du moins.

Cependant si l'insecticide agit sur la mise en place des organes reproducteurs chez les larves traitées par l'OMS 2017, il doit perturber alors les présumés mâles puisque c'est le premier pic qui semble inhibé.

Il serait par conséquent intéressant d'étudier l'effet du traitement chez ces derniers car il n'est pas exclu qu'il soit plus marqué chez ces derniers.

L'effet des deux IGR sur la variation du taux des ecdystéroïdes est donc différent : l'OMS 2017 inhiberait le pic situé à L₅₈ tandis que le diflubenzuron agirait en abaissant le niveau de base des ecdystéroïdes.

Ce résultat va d'ailleurs à l'encontre des observations de Soltani *et al.* (1984) qui montrent une inhibition de la synthèse des ecdystéroïdes chez la nymphe de *Tenebrio molitor* consécutive au traitement par le diflubenzuron.

Cette différence peut être expliquée par le fait que les conditions expérimentales de cette étude sont différentes de celles que nous avons appliquées : les nymphes de *T. molitor* sont trempées dans une solution de l'insecticide.

On peut donc penser que les perturbations endocrines observées entraînent des effets différents au niveau de l'appareil reproducteur.

Ce résultat confirme l'hypothèse que nous avons formulée à l'issue de l'étude de l'influence des deux IGR sur le potentiel reproducteur. Nous avons alors conclu que le diflubenzuron semblait agir davantage sur le processus de vitellogenèse que sur la détermination du nombre des ovarioles, c'est à dire non pas au cours du développement larvaire mais chez l'adulte et cela contrairement à l'OMS 2017.

Il est intéressant de remarquer que l'effet de l'OMS 2017 observé au niveau de l'émergence est ici moins important que celui du diflubenzuron. Les hormones agissant à très faibles doses, ce ne sont peut-être pas les concentrations d'IGR les plus élevées qui vont provoquer le plus de perturbation.

3 - Dosage des ecdystéroïdes chez les nymphes et les adultes

Chez les nymphes, l'étude de l'influence des IGR sur le taux des ecdystéroïdes produits a été conduite sur des individus ayant survécu à une application d'OMS 2017 et de diflubenzuron (IE 30) au début du quatrième stade larvaire.

Au cours de cette expérience, les taux de réduction d'émergence ont été de 18,2 % chez les témoins, 35,7 % chez les adultes traités par l'OMS 2017 et 43,9 % chez les adultes traités par le diflubenzuron.

Le premier prélèvement est effectué au moment de la nymphose (N₀).

Les prélèvements se sont ensuite échelonnés à 8 heures (N₈), 16 heures (N₁₆), 20 heures (N₂₀), 24 heures (N₂₄), 28 heures (N₂₈), 44 heures (N₄₄) après la nymphose.

Le sexe des nymphes a été déterminé à chaque prélèvement. Sa détermination nous a montré que les premières nymphes femelles apparaissent environ 12 heures après les nymphes mâles.

Nous noterons que, dans un but pratique, nous avons adopté la même notation pour les prélèvements des nymphes mâles et femelles bien que le prélèvement N_0 chez les femelles soit effectué 12 heures après celui des mâles.

Chez les adultes, les dosages ont été effectués sur des femelles et des mâles ayant survécu aux traitements insecticides larvaires. Comme lors des essais précédents, nous avons appliqué un traitement insecticide avec les IE 30 respectives des deux produits sur des larves en début de stade IV.

Nous avons suivi leur développement jusqu'à l'émergence et nous observons des taux de réduction d'émergence de 13,8 % chez les témoins, de 29,3 % chez les adultes traités par l'OMS 2017 et de 23,2 % chez les adultes traités par le diflubenzuron.

Les prélèvements successifs des moustiques qui ont lieu dès l'émergence sont notés F_0 et M_0 (F = femelle et M = mâle). Ils sont suivis d'un prélèvement 10 heures (F_{10} et M_{10}) et 24 heures plus tard (F_{24} et M_{24}).

Nous avons effectué chez les femelles un prélèvement au moment du repas noté FG_0 (FG = femelle gorgée) puis 4 heures (FG_4), 8 heures (FG_8), 14 heures (FG_{14}), 16 heures (FG_{16}), 18 heures (FG_{18}), 20 heures (FG_{20}), 24 heures (FG_{24}), 28 heures (FG_{28}) et pour finir 48 heures après ce repas (FG_{48}).

Le dernier prélèvement chez les femelles est effectué 5 jours après la ponte soit environ 10 jours après l'émergence (F_X) de façon que l'on vérifie un retour au niveau de base. Chez les mâles, il est effectué 7 jours après l'émergence (M_{VII}).

Nous présentons séparément les courbes obtenues en dosant les ecdystéroïdes chez les mâles et les femelles. Bien que les résultats observés proviennent de deux essais différents, nous avons porté sur le même graphique les nymphes et les adultes du même sexe, afin de mieux apprécier les effets des traitements.

3.1 - Résultats

3.1.1 - Mâles

Les résultats portés sur la figure 17 correspondent aux valeurs moyennes obtenues avec les mâles. Ils illustrent le tableau 2 situé en annexe 3.

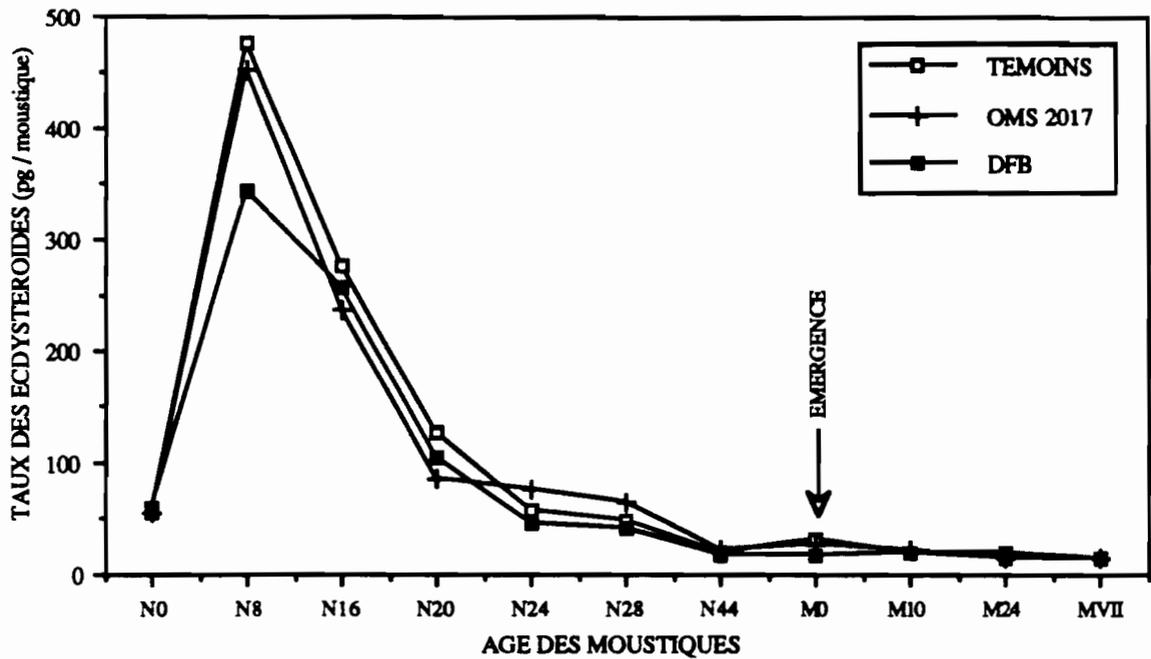


Figure 17 : Variations du taux des ecdystéroïdes en pg / individu chez les nymphes et les adultes mâles ayant survécu au traitement par l'OMS 2017 et le DFB au stade larvaire.

Les résultats montrent que la quantité d'ecdystéroïdes présente chez les nymphes mâles est sensiblement plus importante que chez les larves. En effet, lors des dosages chez ces dernières, les valeurs maximales mesurées étaient de l'ordre de 300 pg / individu alors que chez les nymphes, elles atteignent des valeurs de 600 pg / individu.

Il existe un pic 8 heures après la nymphose qui amène le taux moyen d'ecdystéroïdes de 54 à 475 pg / nymphe chez les témoins. Ce pic est également présent chez les nymphes issues des larves traitées par les deux IGR.

On remarque que le maximum mesuré avec les nymphes traitées par le diflubenzuron est inférieur à celui des témoins avec 342 pg / nymphe. Cette différence renforce les conclusions des dosages effectués chez les larves, à savoir que le diflubenzuron tend à abaisser la production des ecdystéroïdes.

A l'émergence, il se produit chez les mâles témoins et traités par l'OMS 2017 une légère augmentation du taux des ecdystéroïdes. Ensuite, il tend à diminuer pour atteindre son niveau le plus bas 24 à 48 heures plus tard. 7 jours après, il est toujours aussi faible.

La quantité d'ecdystéroïdes présente au moment de l'émergence chez les mâles issus du traitement par le diflubenzuron est en revanche réduite par rapport à la valeur obtenue chez les témoins ($t = 4,65$ à 19 ddl) : on obtient respectivement 17 pg / mâle et 32 pg / mâle. Lorsqu'on considère la dernière valeur mesurée chez les nymphes, on constate qu'il se produit une baisse de la production des ecdystéroïdes que l'on n'observe pas chez les mâles témoins ou traités par l'OMS 2017.

De fait, chez les mâles, le traitement par l'OMS 2017 n'a aucun effet sur la quantité des ecdystéroïdes sécrétés tant chez les nymphes que chez les adultes ayant survécu au traitement par l'OMS 2017. Quant au traitement par le diflubenzuron, il exerce encore une pression réductrice sur le niveau de base des ecdystéroïdes produits.

3.1.2 - Femelles

La figure 18 illustre les taux d'ecdystéroïdes mesurés chez les femelles qui sont présentés dans le tableau 3 situé en annexe 3. Les taux moyens d'ecdystéroïdes mesurés 5 jours après l'oviposition n'ont pas été reportés sur le graphique.

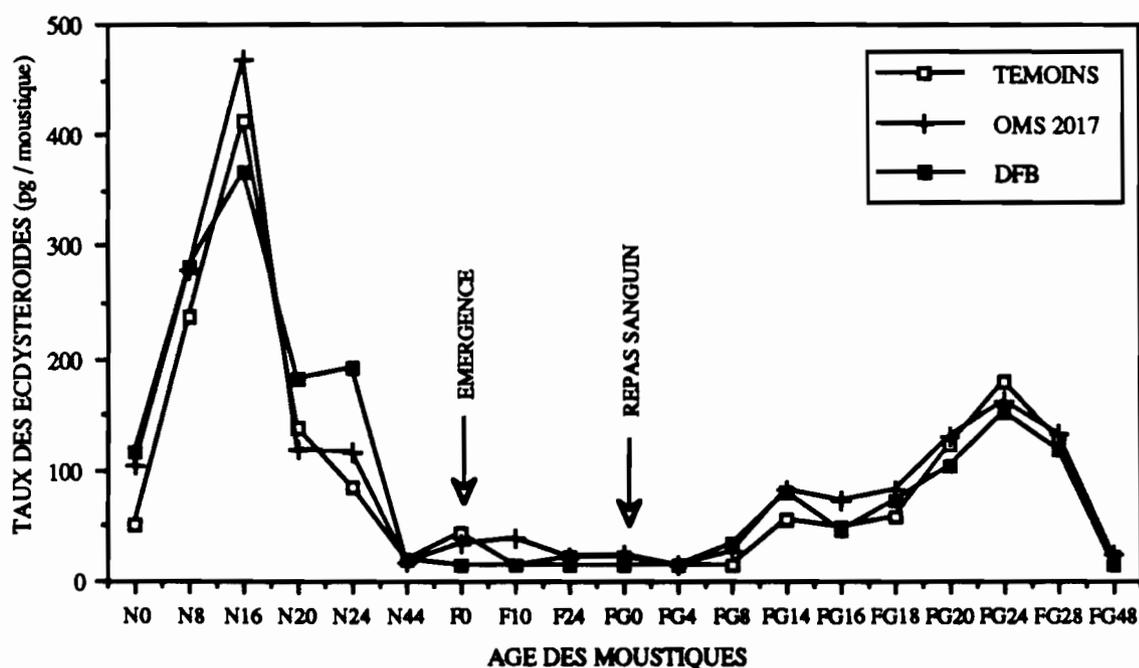


Figure 18 : Variations du taux des ecdystéroïdes en pg / individu chez les nymphes et les adultes femelles ayant survécu au traitement par l'OMS 2017 et le DFB au stade larvaire.

Les variations du taux des ecdystéroïdes chez les nymphes femelles présentent un profil différent de celles des mâles. Le pic chez les femelles témoins se produit 16 heures après la nymphose.

Chez les nymphes qui ont survécu aux traitements, on observe la même chose.

Les valeurs maximales sont comparables à celles observées avec les mâles, de l'ordre de 400 pg / nymphe mais on observe également que le maximum relevé chez les nymphes femelles traitées par le diflubenzuron est inférieur à celui des témoins.

24 heures après la nymphose, on observe une légère augmentation chez les nymphes traitées par chacun des deux IGR dont nous envisagerons la signification ultérieurement.

Lors de l'émergence, nous retrouvons la même image que chez les mâles, à savoir que le taux des ecdystéroïdes présente une légère remontée sauf dans le cas du diflubenzuron où il reste à son niveau le plus bas (de l'ordre de 15 pg / moustique).

L'augmentation des ecdystéroïdes chez les femelles est consécutive à la prise d'un repas de sang. En effet, entre l'émergence et le premier repas de sang, le taux des ecdystéroïdes tant chez les femelles témoins que chez les femelles traitées ne montre que des fluctuations relativement faibles tandis qu'il présente des variations importantes à la suite de la prise de nourriture.

Le taux d'ecdystéroïdes commence à augmenter huit heures après le repas et on observe un premier pic 14 heures après la prise du repas. Il atteint la valeur de 56 pg / femelle chez les témoins.

Ce pic est présent chez les femelles traitées par l'OMS 2017 et par le diflubenzuron, les valeurs étant respectivement de 82 et 79 pg / femelle.

Après une légère diminution, un second pic est amorcé qui atteint sa valeur maximale 24 heures après le repas à 179 pg / femelle témoin, 163 pg / femelle traitée par l'OMS 2017 et 153 pg / femelle traitée par le DFB.

Dans les 48 heures qui suivent le repas, le taux est revenu à son niveau le plus bas et 5 jours après la ponte, il s'y maintient toujours.

3.2 - Discussion

La première partie des dosages confirme dans l'ensemble ce que l'on observe en général chez les diptères au cours de la vie nymphale, à savoir l'existence d'un pic unique (Smith, 1985).

Whisenton *et al.* (1989) mettent de la même façon en évidence l'existence d'un pic unique lors de l'étude quantitative de la production des ecdystéroïdes sur des nymphes de *A. aegypti*.

Chez les adultes, les résultats obtenus montrent que le taux des ecdystéroïdes chez les mâles est en permanence faible et que chez les femelles, les variations sont liées à la prise d'un repas sanguin (Hagedorn, 1974, 1983).

Chez les nymphes, les pics pourraient être le reflet d'un dimorphisme sexuel au niveau de la croissance existant dans le dernier stade larvaire, tel que les mâles se développent les premiers. Ce phénomène permet aux mâles d'être sexuellement prêts lorsque les femelles émergent.

En effet, les *genitalia* des mâles effectuent une rotation de 180° au cours des 12 heures qui suivent leur émergence. Pendant cette période, ils sont inaptes à la copulation.

3.2.1 - Effet des traitements sur les taux d'ecdystéroïdes mesurés chez les mâles

Le diflubenzuron agit sur le niveau de base en l'abaissant mais il agit aussi sur le taux maximum relevé chez les nymphes. Nous pouvons penser que les larves traitées par le diflubenzuron qui ont réussi à survivre jusqu'au stade nymphal présentent des carences en ecdystéroïdes qui tendent à être compensées. Les larves n'ayant pu les compenser sont probablement mortes avant d'atteindre le stade nymphal.

Cette observation, valable pour les adultes, souligne l'importance du biais que nous avons introduit en suivant une population qui survit à un traitement insecticide.

Les résultats nous conduisent par ailleurs à vérifier que la méthode offre une sensibilité relativement importante.

Lorsqu'on considère le titre des ecdystéroïdes chez les adultes après les nymphes, on constate qu'il est beaucoup plus faible.

Chez les mâles, la présence des ecdystéroïdes en faible quantité n'a été mise en évidence que récemment (Briers et De Loof, 1981). Auparavant, on pensait qu'elle était limitée aux femelles. Cependant, leur rôle est encore mal expliqué.

Au cours de ces études, les ecdystéroïdes ont été détectés par dosage de l'individu entier. Cela signifie qu'ils sont effectivement présents mais cela ne veut pas dire qu'ils le soient dans l'hémolymphe.

En ce qui nous concerne, les dosages ont également porté sur des mâles entiers, et le traitement n'a eu une incidence que dans le cas du diflubenzuron avec lequel on observe un abaissement du niveau de base.

3.2.2 - Effet des traitements sur les taux d'ecdystéroïdes mesurés chez les femelles

Nous notons tout d'abord que les taux d'ecdystéroïdes relevés au début de la nymphose ne sont pas en contradiction avec les taux observés chez les larves à la fin de nos prélèvements. Cette observation tend à nous montrer que l'OMS 2017 induit bien chez les larves l'inhibition du premier pic plus que son retard. Elle pourrait aussi montrer que le dernier pic relevé chez les larves appartient plus aux futures femelles qu'aux futurs mâles. En effet, les taux des ecdystéroïdes observés chez les mâles au début de la période de nymphose sont relativement plus faibles.

Nous avons remarqué que chez les nymphes traitées par le diflubenzuron, la valeur maximale du pic (16 heures après la nymphose) était inférieure à celle relevée chez les témoins. Or 8 heures plus tard, on constate que le taux des ecdystéroïdes mesuré alors chez les nymphes traitées par le diflubenzuron est relativement plus élevé que chez les témoins. A cet instant, cette remarque se vérifie aussi pour les nymphes traitées par l'OMS 2017.

Il est possible que le diflubenzuron exerce effectivement une pression sur le niveau de base des ecdystéroïdes, qui pourrait persister lorsque le taux des ecdystéroïdes augmente. Des mécanismes de régulation tendant à compenser les carences en ecdystéroïdes peuvent en effet se mettre en place, et ce que l'on observe à N₂₄ pourrait être le reflet d'une telle compensation se produisant aussi bien chez les individus traités par le diflubenzuron que par l'OMS 2017.

Dans la période qui précède le repas de sang, on observe à nouveau que le diflubenzuron agit sur le niveau de base.

Le profil des variations en ecdystéroïdes obtenu chez les femelles adultes de *A. aegypti* est dans l'ensemble comparable à celui que Hagedorn *et al.* (1975) observent par dosage radio-immunologique des femelles de la même espèce.

Ces auteurs montrent que le taux des ecdystéroïdes présente 4 heures après le repas une première augmentation à 100 pg / femelle, puis 12 heures après une seconde augmentation de plus grande amplitude à 275 pg / femelle.

Les valeurs des maxima sont donc légèrement plus élevées que celles que l'on obtient, de même que les pics apparaissent plus tôt que ceux mis en évidence au cours de notre travail. Ces différences sont sans doute liées à une différence de spécificité des anticorps utilisés pour les différents ecdystéroïdes présents chez les insectes.

Les traitements insecticides que nous avons effectués chez les larves ne semblent pas avoir d'effet sur les femelles adultes, à l'exception de l'effet du diflubenzuron sur le niveau de base.

La production d'ecdystéroïdes par les ovaires n'est donc pas affectée au stade adulte. Dans ces conditions, la diminution du potentiel reproducteur observée chez les femelles survivant à un traitement, en particulier à l'OMS 2017, n'est pas due à une perturbation endocrine chez la femelle adulte. On ne peut cependant, en l'état actuel des résultats, écarter la possibilité que les traitements aient un effet au moment de la mise en place des organes génitaux, c'est-à-dire à un moment beaucoup plus précoce de la vie des moustiques.

4 - Discussion - Conclusion

L'analyse des taux des ecdystéroïdes effectuée pendant la durée du quatrième stade larvaire, stade sur lequel les traitements sont appliqués, montre que le diflubenzuron est sans effet sur la synthèse des ecdystéroïdes. Néanmoins, les résultats obtenus avec l'OMS 2017 montrent que ce composé induirait l'inhibition du premier pic d'ecdystéroïdes mis en évidence chez les larves témoins.

Il semble donc se dégager de ce travail que les moustiques, d'un point de vue endocrine, sont plus sensibles à l'OMS 2017 qu'au diflubenzuron, alors même que ce dernier est considéré comme plus performant.

L'OMS 2017, au vu des variations observées chez les larves traitées, pourrait agir sur la production hormonale au moment où les organes génitaux sont mis en place.

Ainsi, le diflubenzuron se comporterait davantage comme un insecticide classique en tuant immédiatement et en affectant finalement peu les survivants tandis que l'OMS 2017 montre des effets retards à proprement parler, en induisant peu ou pas de mortalité immédiate mais en laissant sur les survivants des séquelles handicapantes.

Ces résultats renforcent les conclusions du chapitre précédent qui mettaient en évidence un effet du traitement sur la mise en place des organes de la reproduction et confirment que le même IGR n'agit pas forcément de la même manière sur des insectes différents.

Dorn *et al.* (1986) montrent que le développement de l'oviducte chez les larves de dernier stade de *Oncopeltus fasciatus* est lié à la synthèse des ecdystéroïdes. Au cours du dernier stade larvaire, les oviductes latéraux subissent des transformations (raccourcissement et élongation) qui coïncident avec une augmentation du taux des ecdystéroïdes, augmentation liée également avec l'initiation de la métamorphose.

Les oviductes des larves de dernier stade sont donc aussi des organes cibles des ecdystéroïdes au même titre que les disques imaginaires, les glandes salivaires ou encore le corps gras chez l'adulte. Les ecdystéroïdes se comportent d'ailleurs un peu comme les hormones oestrogènes des mammifères, responsables de la différenciation de l'oviducte pendant la puberté.

Ils contrôlent donc la morphogenèse de l'appareil reproducteur (Koolman *et al.*, 1979), de même qu'ils semblent impliqués dans la gamétogenèse (Furtado, 1977). On peut donc envisager que les IGR, agonistes ou antagonistes des ecdystéroïdes, puissent agir sur les processus de mise en place des organes reproducteurs.

Chez les nymphes, la situation est différente. Les IGR engendrent une mortalité lors de la mue qui suit le traitement, c'est-à-dire ici au passage larve-nymphe ou nymphe-adulte. Si le traitement n'a pas d'effet sur le taux des ecdystéroïdes à ce stade, c'est que les nymphes dosées ont échappé complètement au traitement larvaire, ou que les perturbations ne sont pas suffisantes pour l'observer au niveau du taux des ecdystéroïdes. Les nymphes les plus perturbées ont pu être déjà éliminées lors de la nymphose.

En ce qui concerne les adultes, le problème est semblable puisque les mesures ont été effectuées sur des individus ayant survécu à un traitement. Cependant rien ne nous permet de conclure que dans d'autres conditions, l'application de diflubenzuron ou d'OMS 2017 à des adultes resterait sans effet.

L'existence d'un mode d'action multiple et donc complexe des IGR est confirmée par les résultats que nous obtenons. Ces observations montrent que pour une utilisation performante des IGR contre les vecteurs, les tests ne doivent pas se limiter à une simple recherche d'efficacité. Il importe désormais de poursuivre les évaluations au-delà de la simple recherche des effets finaux des insecticides que l'on se contentait jusqu'à maintenant d'observer car nous l'avons montré, la réduction du potentiel reproducteur par exemple peut être liée à des événements qui se sont produits plus tôt.

Notre conclusion serait que les techniques de lutte contre les vecteurs doivent s'appuyer sur les résultats d'une recherche plus fondamentale pour être optimales et les IGR en apportent la preuve .

L'étude de l'incidence des traitements larvaires sur la capacité d'*A. aegypti* à transmettre la filaire *Molinema dessetae* que nous allons maintenant aborder, confirme cette nécessité.

CHAPITRE 5

Chapitre 5

Réceptivité d'*Aedes aegypti* soumis à un traitement insecticide, à la filaire *Molinema dessetae*

Le couple *Aedes aegypti* - *Molinema dessetae* nous sert de modèle expérimental pour tenter de répondre à une question : la capacité d'un vecteur à transmettre un agent pathogène est-elle réduite ou au contraire accrue lorsque celui-ci a été en contact avec un insecticide de type IGR ?

1 - Traitement insecticide des moustiques

Le principe du traitement est décrit au premier chapitre. Nous avons appliqué à des larves en début de stade IV, les concentrations devant entraîner 30 % de réduction d'émergence, soit 0,003 mg (m.a.) / l pour l'OMS 2017 et 0,0004 mg (m.a.) / l pour le diflubenzuron.

Les adultes survivants sont récoltés et trois cages sont constituées, une cage de moustiques témoins et deux cages de moustiques traités contenant chacune une centaine de mâles et une centaine de femelles.

15 jours après le traitement, les femelles âgées de 5 à 7 jours reçoivent le repas infestant.

2 - Infestation des moustiques

Deux rongeurs ont été utilisés pour l'infestation des trois cages. Le premier rongeur est introduit d'abord dans la cage des femelles témoins puis dans celle des femelles traitées par le diflubenzuron, le second est introduit seulement dans la cage des femelles traitées par l'OMS 2017.

Auparavant, leur microfilarémie est vérifiée : 100 μ l de sang sont prélevés au sinus orbital et on réalise une série de 10 gouttes épaisses afin d'obtenir une bonne évaluation du nombre de microfilaires (mf) présentes chez le rat au moment du repas infestant. Chez le rongeur utilisé pour les femelles témoins et traitées par le diflubenzuron, on dénombre en moyenne 172 mf / 10 μ l et 117 mf / 10 μ l chez celui qui est utilisé pour les femelles traitées par l'OMS 2017. La différence n'est pas significative.

L'évaluation du nombre de microfilaires ingérées au cours du repas se fait par frottis de l'estomac selon la technique décrite au chapitre 1 (paragraphe 7), c'est-à-dire par rapport à la quantité de sang ingéré, déterminée par pesée après le repas.

La quantité de sang ingéré est évaluée chez les femelles témoins à $2,3 \pm 0,6$ mg et on constate qu'il n'existe pas de différence avec les femelles traitées.

Le nombre moyen de microfilaires ingérées par les femelles témoins est de 13 mf / mg tandis qu'il est de 12 mf / mg pour les femelles traitées par l'OMS 2017 et de 9 pour les femelles traitées par le diflubenzuron.

Il n'existe pas de différence significative entre le nombre de microfilaires ingérées par les témoins et les femelles traitées par le diflubenzuron.

L'écart observé est vraisemblablement dû à une variation de la microfilarémie du rat au cours du temps.

Nous ne pouvons analyser statistiquement les résultats entre les femelles témoins et celles traitées par l'OMS 2017 puisque nous avons utilisé des rats différents.

Néanmoins, les microfilarémies des deux rats étant relativement élevées et peu différentes, il y a tout lieu de penser que le nombre de microfilaires ingérées par les femelles traitées par l'OMS 2017 n'est pas significativement différent de celui des microfilaires ingérées par les témoins.

Le tableau 18 présente la synthèse de ces résultats, qui vont conditionner l'infestation et nous permettre ensuite d'évaluer l'influence des traitements sur la réceptivité à *Molinema dessetae* d'*Aedes aegypti*.

	TEMOINS	OMS 2017	DFB
% IE corrigé	4,1	24,8	45,9
microfilarémie (mf/ml)	172	117	172
mf /mg de sang ingéré	13	12	9

Tableau 18 : Données relatives à l'infestation par *M. dessetae* des femelles d'*A. aegypti* soumises à une dose d'insecticide au stade larvaire (% IE : taux de réduction d'émergence).

Les moustiques sont disséqués 21 à 25 jours après l'infestation sous une loupe binoculaire. La tête, le thorax et l'abdomen sont séparés et observés dans un milieu de culture (R.P.M.I.) afin de dénombrer les différents stades des filaires.

70 femelles témoins, 73 femelles traitées par l'OMS 2017 et 74 femelles traitées par le diflubenzuron ont été disséquées.

3 - Etude du développement des filaires chez les moustiques traités

Les résultats des dissections sont détaillés en annexe 4.

La figure 19 illustre les fréquences observées des différents stades de *M. dessetae* selon leur position chez *A. aegypti*. Les données relatives aux filaires présentes dans le thorax et l'abdomen ont été regroupées.

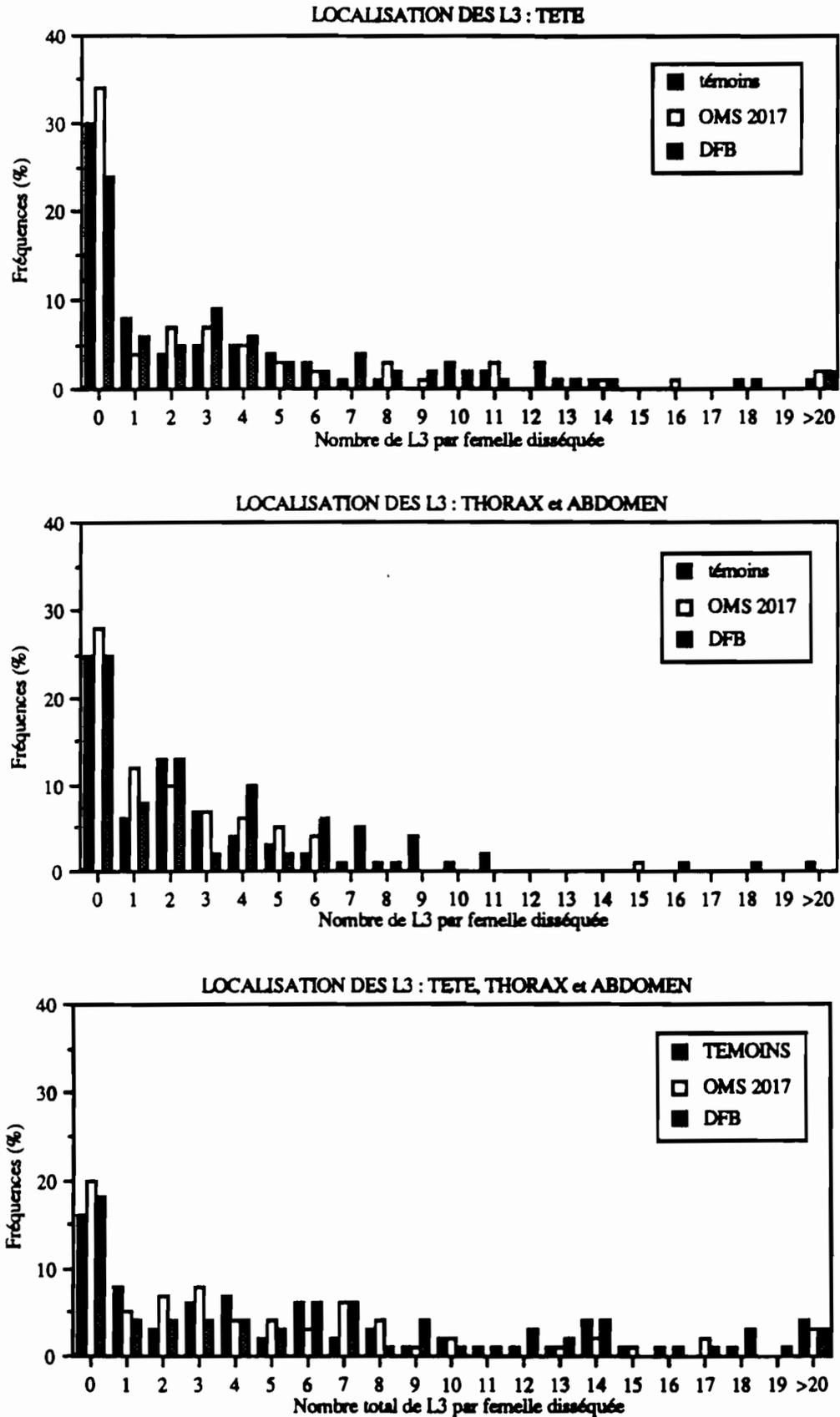


Figure 19 : Répartition des *M. dessetae* en fonction de leur position et de leur fréquence chez *A. aegypti*.

Les nombres totaux de L1, L2 et L3 dénombrés figurent dans le tableau 19 en fonction de leur position.

	tête			abdomen/thorax			total L3
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	
témoin	0	0	221	1	51	205	426
OMS 2017	0	0	230	0	35	141	371
DFB	0	0	310	0	51	203	513

Tableau 19 : Nombres totaux des différents stades de *M. dassetae* observés au cours des dissections en fonction de leur position et selon le traitement insecticide.

Au vu des résultats, nous n'envisagerons pas la répartition des stades I et II intracéphaliques ni celle des mêmes stades dans le thorax et l'abdomen, les nombres moyens de L1 et L2 par moustique variant de 0 à 0,7.

Il apparaît des différences quant aux nombres totaux de L3 à la fois dans la tête, le thorax et l'abdomen qui doivent être analysées. Mais auparavant, il faut déterminer si les traitements agissent sur la répartition des filaires chez le moustique et/ou sur son parasitisme.

On vérifie tout d'abord que la répartition des filaires, dans les lots témoins et traités, tant au niveau de la tête que du thorax et de l'abdomen (les données pour ces deux parties étant toujours regroupées), s'ajuste par une BN et que les valeurs de K, déterminées par la méthode du maximum de vraisemblance, sont homogènes.

Si K ne varie pas, on peut calculer la valeur d'une constante K commune (K_c) mais il faut alors vérifier que les distributions sont conformes à cette valeur par un test de χ^2 . Si χ^2 est significatif, le traitement insecticide agit sur la forme de la distribution, c'est-à-dire sur K.

Les différences observées entre les nombres moyens de L3 dans chacune des parties seront alors analysées en calculant l'intervalle de confiance des moyennes. Dans les tableaux, nous avons fait figurer pour chaque moyenne, cet intervalle de confiance.

3.1 - Distribution des L3 intracéphaliques

Les valeurs de K dans les trois lots sont homogènes et on peut calculer une valeur commune K_c égale à $0,45 \pm 0,06$.

Les résultats figurent dans le tableau 20.

	témoins	OMS 2017	DFB
nombre de \varnothing disséquées	70	73	74
$(nf)_{\max}$	20	24	22
moyenne	$3,2 \pm 0,5$	$3,2 \pm 0,4$	$4,2 \pm 0,8$
variance	20,3	25,5	25,5
écart-type	4,5	5,1	5,1
probabilité	0,68	0,24	0,18

Tableau 20 : Distribution des L3 de *M. dessetae* au niveau de la tête du moustique ; $(nf)_{\max}$: nombre maximum de filaires à l'intérieur du moustique et IC : intervalle de confiance de la moyenne.

Les trois distributions sont conformes à la valeur calculée de K_c donc les traitements n'agissent pas sur la forme de la distribution.

L'étude des intervalles de confiance des moyennes des nombres de L3 intracéphaliques par moustique montre qu'ils se chevauchent. Les traitements par l'OMS 2017 et le diflubenzuron n'ont donc pas d'action significative sur le parasitisme des moustiques au niveau de la tête.

3.2 - Distribution des L3 dans le thorax et l'abdomen

Les valeurs de K dans les trois lots sont homogènes et on peut calculer une valeur commune K_c égale à $0,74 \pm 0,11$.

Les résultats sont présentés dans le tableau 21.

	témoins	OMS 2017	DFB
nombre de \varnothing disséquées	70	73	74
$(nf)_{\max}$	26	15	18
moyenne	$2,9 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,3$	$2,7 \pm 0,4$
variance	17,3	6	11,5
écart-type	4,1	2,5	3,4
probabilité	0,15	0,51	0,51

Tableau 21 : Distribution des L3 de *M. dassetae* au niveau du thorax et de l'abdomen ; $(nf)_{\max}$: nombre maximum de filaires par moustique.

Comme précédemment, on constate que les trois distributions sont conformes à la valeur calculée de K_c ($p > 0,05$). Les traitements n'agissent pas non plus ici sur la forme de la distribution.

Nous remarquons cependant que la valeur de K_c est ici supérieure à celle calculée pour la répartition intracéphalique des L3, ce qui tend à mettre en évidence que les distributions intracéphaliques sont relativement moins homogènes. En effet, pour une même densité parasitaire moyenne, il y a plus de têtes présentant un grand nombre de parasites mais aussi plus de têtes sans parasite. Nous discuterons de la signification de ce résultat ultérieurement.

L'étude des intervalles de confiance des moyennes des nombres de L3 intracéphaliques par moustique montre qu'ils se chevauchent. Les traitements par l'OMS 2017 et le diflubenzuron n'ont donc pas d'action significative sur le parasitisme dans le reste du corps des moustiques.

Nous pouvons alors considérer la distribution totale des L3 en cumulant les résultats obtenus aussi bien dans la tête que dans les autres parties du corps. On détermine une valeur commune K_c égale à $0,7 \pm 0,08$.

Le tableau 22 illustre cette partie.

	témoins	OMS 2017	DFB
nombre de ♀ disséquées	70	73	74
(nf) _{max}	38	29	36
moyenne	6,1 ± 0,9	5,2 ± 0,8	6,9 ± 1
variance	56,4	41,7	55,3
écart-type	7,5	6,5	7,4
probabilité	0,82	0,46	0,07

Table 22 : Distribution des L3 de *M. ssetae* quelle que soit leur position ; (nf)_{max} : nombre maximum de filaires par moustique et IC : intervalle de confiance de la moyenne.

Comme précédemment, les résultats nous montrent que les traitements insecticides n'influent ni sur le nombre moyen de L3 produites ni sur leur dispersion statistique.

Nous remarquons que la valeur de la constante Kc de la distribution totale des L3 est également plus élevée que celle des L3 intracéphaliques et donc l'apparente hétérogénéité de la répartition des L3 dans la tête des vecteurs est masquée.

3.3 - Etude de la présence des formes anormales

Au cours des dissections, nous avons observé des filaires encapsulées ou en voie de dégénérescence, surtout dans la partie abdominale.

La figure 20 illustre les fréquences de ces formes chez les femelles disséquées.

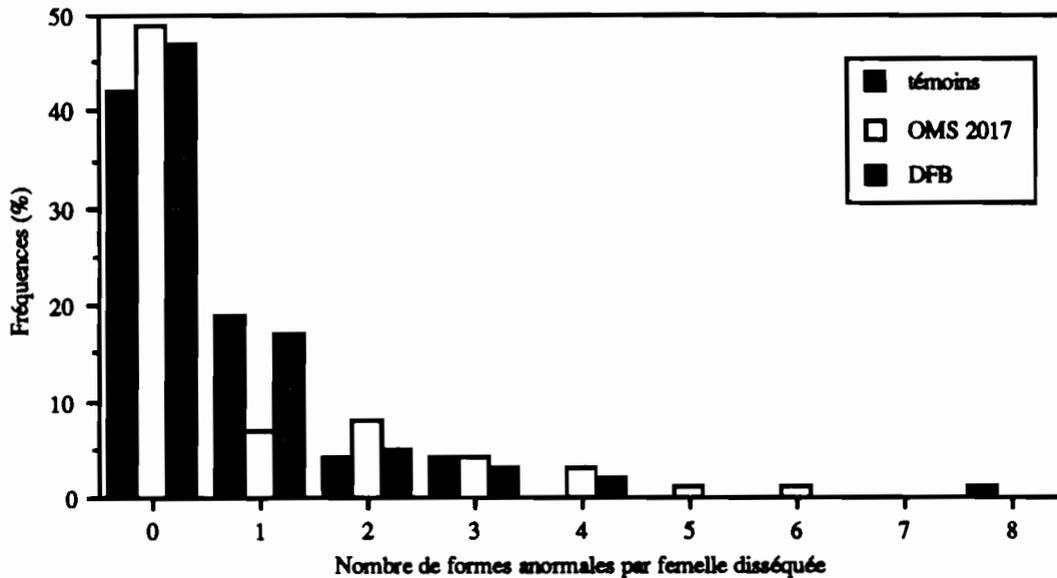


Figure 20 : Fréquences des formes anormales (dégénérées et encapsulées) de *M. dassetae* observées au cours des dissections.

Le nombre de femelles témoins et de femelles traitées ne présentant pas de forme de dégénérescence est relativement élevé puisque sur 70 femelles témoins disséquées, il y a 14 femelles sans forme anormale, sur 73 femelles traitées par l'OMS 2017 il y en a 17 et sur 74 femelles traitées au diflubenzuron, il y en a 12.

On observe ainsi en moyenne 0,7 forme anormale par femelle chez les témoins, 0,8 chez les femelles traitées par l'OMS 2017 et 0,6 pour celles traitées par le diflubenzuron.

La comparaison des moyennes montre qu'elles ne diffèrent pas de façon significative.

Le phénomène de dégénérescence des filaires ne semble pas très marqué chez le couple hôte-parasite considéré et les traitements par l'un ou l'autre des deux IGR ne semblent donc pas le favoriser.

Cependant, nous rapellons que nous observons les moustiques 20 jours environ après l'infestation et par conséquent, il est possible que les filaires aient déjà subi les processus de dégénérescence contribuant certainement à la limitation.

4 - Discussion

Les résultats que nous obtenons ne nous ont pas permis de mettre en évidence un effet du traitement sur la production de L3.

En fait, l'absence de conséquences des traitements sur la production de L3 était prévisible car nous sommes dans le cas d'un modèle avec limitation et par conséquent, le nombre de L3 tend vers une valeur constante.

Nous avons remarqué cependant que les distributions des L3 intracéphaliques chez les femelles traitées semblaient relativement moins homogènes que dans le reste du corps (Kc relativement plus faible). Ce résultat suggère qu'il pourrait y avoir une perturbation du cycle de développement des moustiques entre le moment où les filaires sont encore dans l'abdomen et/ou dans le thorax et celui où elles atteignent la tête du moustique.

Ceci est important car Pichon (comm. pers.) a montré que plus K est faible, plus les chances de rencontre des filaires des deux sexes chez l'hôte vertébré sont grandes. Nous serions alors dans une situation où la transmission de la maladie serait favorisée.

Mais comme nous observons également ce phénomène chez les témoins, plus qu'une perturbation des filaires consécutive aux traitements insecticides, ce résultat tend à remettre en cause la qualité des témoins.

Si l'on considère les taux d'infestation totale¹ des femelles traitées par l'OMS 2017 et par le diflubenzuron qui sont respectivement de 76,7 % et 83,8 %, on constate qu'ils ne diffèrent pas significativement de celui des femelles témoins qui est de 80 %. Il en est de même pour les taux d'infectiosité² qui sont respectivement de 77,1 %, 72,6% et 75,5 % chez les témoins, les femelles traitées par l'OMS 2017 et celles traitées par le diflubenzuron.

Si l'on s'intéresse maintenant au pouvoir infectant³ des femelles, on n'observe pas non plus de différence entre les témoins et les femelles traitées par l'OMS 2017, les pouvoirs infectants étant respectivement de 37,1 et 30,1 %.

En revanche, le pouvoir infectant des femelles traitées par le diflubenzuron, qui est de 51,4 % , est significativement plus élevé que celui des témoins ($p = 0,04$).

¹ Taux d'infestation totale = nombre de femelles infestées / nombre de femelles disséquées (Anonyme, 1984).

² Taux d'infectiosité = nombre de femelles infestées par des stades III (quelle que soit leur position) / nombre de femelles disséquées (Anonyme, 1984).

³ Pouvoir infectant = nombre de femelles infestées par des stades III intracéphaliques / nombre de femelles disséquées (Caubère, 1989).

Si on considère le nombre de stades infestants observés finalement par rapport au nombre de microfilaires ingérées, on constate que moins de 30 % des filaires ingérées arrivent à maturité chez les moustiques témoins et traités par l'OMS 2017. Chez les moustiques traités par le diflubenzuron, ce sont 44 % des filaires qui atteignent ce même stade.

Ces résultats suggèrent donc, malgré ce que l'on a pu observer précédemment, que les traitements insecticides pourraient avoir perturber la capacité vectorielle.

En outre, si on totalise le nombre de L3 dans la tête et le reste du corps, on observe que la proportion de L3 dans la tête est très significativement supérieure dans les lots traités par rapport au lot témoin. On trouve 62 % de L3 intracéphaliques chez les femelles traitées par l'OMS 2017, 60,5 % chez les femelles traitées par le diflubenzuron alors que chez les témoins, on a seulement 51 % de L3 intracéphaliques. Ces différences sont très hautement significatives ($p = 0,006$).

La comparaison de ces différents paramètres montre que les populations résiduelles peuvent être épidémiologiquement dangereuses sans que la production de L3 augmente. Le nombre de L3 qui réussissent à atteindre la tête du moustique est plus grand dans les lots traités et le nombre de femelles possédant des L3 intracéphaliques est également plus grand dans les lots traité. Cela signifie que nous sommes en présence d'une population où la proportion de femelles infestantes est augmentée alors que leur charge parasitaire n'est pas plus élevée. Les traitements insecticides pourraient finalement avoir un effet sur les processus de régulation de l'infestation.

Bien que nous ne l'ayons pas montré, il est possible que les traitements insecticides empêchent la dégénérescence des filaires. L'hypothèse d'un effet de l'insecticide sur le tissu adipeux du vecteur peut être envisagée.

La réduction du potentiel reproducteur que l'on observe chez les femelles infestées et en-dehors de tout traitement insecticide avec les couples *Aedes aegypti* - *Brugia pahangi* et *Aedes trivittatus* - *Dirofilaria immitis*, réduction d'autant plus importante que la densité filarienne est élevée (Gaaboub, 1976 ; Christensen, 1981), suggère l'existence d'une compétition s'effectuant au niveau du tissu adipeux en faveur du parasite. Les traitements insecticides pourraient favoriser cette compétition mais l'étude du potentiel reproducteur que nous avons conduite ne nous a pas permis de mettre en évidence une telle réduction.

Le rôle de la membrane péritrophique devrait être analysé. A la suite du repas, il se forme une membrane autour du sang ingéré et seules les filaires qui sont passées les premières peuvent gagner l'hémocèle.

Chez les simulies traitées au stade larvaire par l'OMS 3031, l'étude histologique montre que la membrane péritrophique n'est pas affectée par le traitement (Lochouarn, 1990). Cependant ce produit appartient à la famille des AHJ, produits qui n'agissent pas sur la synthèse de la chitine.

Il serait intéressant de vérifier que la membrane péritrophique, en se formant plus tard ou en étant altérée, n'est pas impliquée dans l'augmentation du potentiel vectoriel du moustique survivant aux traitements.

Les résultats que nous avons obtenus par ailleurs lors de l'étude du potentiel reproducteur suggèrent qu'il faut peut-être associer l'effet plus marqué du diflubenzuron sur l'efficacité vectorielle, comparé à celui de l'OMS 2017, au taux de réduction d'émergence qui est plus élevé (50 % pour 30 % avec les traités à l'OMS 2017).

Les mécanismes qui favorisent le développement de l'agent pathogène sont probablement complexes, d'autant que la présence de l'agent pathogène dans le vecteur semble avoir des répercussions sur d'autres fonctions comme celle de la reproduction. Il semble se produire des modifications de ce que l'on peut appeler l'environnement de la filaire, modifications susceptibles de lui être favorables.

Ces résultats ne signifient pas que l'absence de modification ne puisse pas être tout aussi importante du même point de vue épidémiologique.

Ainsi, Lochouarn (1990) souligne la menace que représentent les femelles d'*Anopheles gambiae*, vecteurs de la filariose de Bancroft en Afrique Centrale, soumises au stade larvaire à une IE80 d'un AHJ, l'OMS 3031. Le traitement ne perturbe en rien la longévité du moustique, son comportement alimentaire est normal de même que son potentiel reproducteur et le cycle de la filaire ne semble pas affecté. Ces moustiques peuvent donc transmettre la maladie.

Au vu de la variabilité des résultats relevés au cours des études réalisées concernant l'effet des traitements sur la capacité vectorielle, il est important de considérer chaque cas indépendamment des autres.

L'application de deltaméthrine à la concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ mg / l, à des larves d'*A. aegypti* a pour conséquence la réduction du pourcentage de femelles infestées par *M. dessetae* et l'augmentation du nombre de larves infestantes par femelle infestée (Elissa, 1990).

Gaaboub et Busvine (1975) étudient l'influence d'un traitement larvaire par le DDT sur la transmission d'une filaire *Brugia pahangi* par les survivants de deux souches d'*A. aegypti* : l'une hautement vectrice et l'autre fortement réfractaire à l'infestation.

Les résultats montrent que par rapport aux témoins, la proportion de femelles de la souche réfractaire qui développent des filaires augmente alors qu'elle diminue dans la souche vectrice.

Chez les adultes d'une souche d'*A. aegypti* résistante au DDT et réfractaire à l'infestation par *B. pahangi*, qui ont subi un traitement larvaire au diflubenzuron, on observe une augmentation du nombre de filaires arrivant à maturité (Gaaboub et Busvine, 1976).

La persistance de populations résiduelles après un traitement est par conséquent un problème important qui devrait être considéré avec attention lors des campagnes de lutte contre des vecteurs.

5 - Conclusion

Nous avons abordé au cours de ce chapitre le problème de l'effet des traitements IGR sur le développement de la filaire *Molinema dessetae* chez *Aedes aegypti*.

Les résultats que nous obtenons montrent que la proportion de femelles aptes à transmettre le parasite augmente après un traitement insecticide larvaire. Il faudrait alors évaluer le risque épidémiologique lorsqu'on se trouve en présence d'une population dont la charge parasitaire n'est pas plus élevée mais où les femelles infestées sont plus nombreuses.

La question de la surveillance des populations résiduelles à la suite d'un traitement insecticide doit donc être posée.

Les études de corrélations entre les traitements insecticides et la capacité du vecteur traité à transmettre un agent pathogène sont encore peu nombreuses car récentes mais d'autres systèmes hôte-parasite ont été considérés.

Elissa (1990) a poursuivi l'étude de la réceptivité d'*Anopheles stephensi*, soumis à un traitement par la deltaméthrine, à *Plasmodium yoelii*. Les résultats montrent un effet inhibiteur des traitements sur le développement du *Plasmodium* chez son vecteur.

L'effet des traitements par *Bacillus sphaericus* et *Bacillus thuringiensis* sur la réceptivité d'*Anopheles gambiae* à *Plasmodium falciparum*, agent du paludisme le plus grave pour l'homme, a été envisagé par Robert *et al.* (1987). Aux doses employées, *B. sphaericus* n'a aucun effet sur le couple hôte-parasite considéré, mais *B. thuringiensis* provoque une réduction significative de l'indice oocystique.

L'intérêt épidémiologique de ces résultats est nuancé car il serait bien sûr plus intéressant d'évaluer l'effet des traitements sur l'indice sporozoïtique. Il serait nécessaire de poursuivre plus en avant les investigations, afin de mettre notamment en évidence les mécanismes par lesquels le développement du *Plasmodium* est inhibé.

Les auteurs proposent une hypothèse selon laquelle la prise du repas de sang chez les femelles survivant au traitement serait plus faible que celle des témoins. Au moins dans notre cas, ceci ne peut être confirmé puisque le nombre de microfilaires ingérées est le même chez les traitées et les témoins. Lochouarn (1990) confirme ce résultat.

En matière de relations hôte-virus, une étude a été conduite dans notre laboratoire sur la réceptivité au virus de la dengue 2 d'*A. aegypti* traité au stade larvaire au diflubenzuron. Elle a fait l'objet d'un DEA effectué en collaboration avec l'Institut Pasteur (Gustave, 1991). La dengue fait partie des principales arboviroses sur le plan mondial. Plus de deux milliards de personnes sont potentiellement concernés par la maladie, et des millions de cas surviennent chaque année, surtout parmi les enfants. Malheureusement, de nombreux problèmes liés au protocole sont apparus, et les résultats ne nous permettent pas de déterminer actuellement si le traitement au diflubenzuron a un effet sur la capacité vectorielle d'*A. aegypti* à transmettre ce virus.

Il serait cependant intéressant de poursuivre plus en avant les recherches dans ce domaine, en particulier pour mieux connaître les relations hôte - parasite afin par exemple d'en tirer parti pour la mise au point de nouvelles stratégies de lutte.

Les recherches conduites par O'Reilly et Miller (1989) constituent à ce titre une perspective intéressante. Ces auteurs ont mis en évidence chez un baculovirus, un gène qui s'est révélé codant pour une UDP - glucosyl transférase des ecdystéroïdes.

Cette enzyme, en agissant sur les voies de synthèse des ecdystéroïdes, permet au virus de bloquer le développement normal de son hôte.

On pourrait envisager de déterminer chez des agents pathogènes la présence de séquences codant pour des enzymes capables de bloquer le développement du vecteur associé.

Ce domaine de la recherche encore récent pourrait ouvrir des voies importantes pour la lutte contre les vecteurs.

Nous avons donc pu mettre en évidence un certain nombre d'effets des traitements larvaires sur les adultes qui survivent et c'est par l'étude de l'impact des IGR sur la faune non-cible, et même plus généralement sur l'environnement, que nous achèverons ce travail.

CHAPITRE 6

Chapitre 6

Influence des traitements sur la faune non-cible

1 - Introduction

Les pesticides, qui désignent un ensemble de substances chimiques naturelles ou synthétiques, sont utilisés aussi bien en agriculture, dans les industries en vue de la conservation de cultures et de produits agricoles, pour la désinfection des locaux privés et publics, dans la construction pour la protection du bois et des matériaux, pour le désherbage des voies ferrées, talus, routes, berges qu'à des fins sanitaires vis-à-vis des vecteurs de maladies.

L'incidence écologique des pesticides, trop souvent utilisés de façon inconsidérée, peut être grave : suppression de la microfaune des étangs, des batraciens, des gastéropodes ou encore des oiseaux, perturbation des équilibres biologiques.

Les études réalisées pour évaluer précisément l'impact des traitements sont nombreuses. Compte tenu de l'accumulation et de la rémanence des produits insecticides dans l'environnement, leurs résultats mettent en évidence une situation préoccupante.

Les régulateurs de croissance apparaissent comme des produits de remplacement intéressants d'un point de vue écologique de par leur spécificité étroite pour les insectes et leur biodégradabilité limitant le problème de leur accumulation.

C'est pourquoi, il nous a semblé intéressant de réaliser l'étude de l'impact de l'OMS 2017 et du diflubenzuron sur deux espèces de crustacés présentes dans la mare naturelle située à Bondy : *Daphnia* sp. et *Cypris* sp.

Nous avons réalisé deux essais selon le protocole de traitement décrit au paragraphe 8 du chapitre 1.

Nous précisons que les concentrations mentionnées dans ce chapitre représentent des milligrammes de matière active par litre d'IGR utilisé.

2 - Résultats

L'ensemble des résultats est consigné dans le tableau 23.

concentrations mg/l	<i>Daphnia</i> sp.						<i>Cypris</i> sp.					
	essai 1		concentrations mg/l	essai 2		essai 1		concentrations mg/l	essai 2			
	24 heures	48 heures		24 heures	48 heures	24 heures	48 heures		24 heures	48 heures		
OMS 2017			OMS 2017			OMS 2017			OMS 2017			
100	100	100	20	100	100	100	0	0	500	100	100	
20	100	100	15	100	100	20	4	4	250	100	100	
2	0	0	10	100	100	2	0	0	150	100	100	
0,5	0	0	5	60	100	0,5	0	0	100	100	100	
			1	40	92				10	100	100	
DFB			DFB			DFB			DFB			
100	100	100	20	44	92	100	4	4	500	16	48	
20	100	100	15	60	108	20	0	0	250	0	32	
2	0	0	10	24	62	2	0	0	150	0	12	
0,5	0	0	5	32	52	0,5	0	0	100	8	16	
			1	20	24				10	0	4	
TEMOINS			TEMOINS			TEMOINS			TEMOINS			
	1	1		0	0		0	0		0	0	

Tableau 23 : Evaluation de l'effet en pourcentage de mortalité de l'OMS 2017 et du DFB sur deux espèces de crustacés non-cibles.

Cette étude suggère tout d'abord une efficacité différente de l'OMS 2017 et du diflubenzuron sur les *Cypris* et les *Daphnies*. Il apparaît en effet que l'OMS 2017 est plus toxique pour ces deux espèces que le diflubenzuron. En fait, ce résultat s'observe particulièrement au cours du second essai.

L'OMS 2017 semble tout d'abord peu agir mais montre ensuite une augmentation brutale de son activité en fonction de la concentration. En revanche, le diflubenzuron témoigne d'une efficacité croissante telle qu'à la concentration de 500 mg / l, on n'ait pas encore atteint le maximum d'activité.

En outre, les daphnies semblent plus sensibles que les ostracodes aux IGR.

Au cours du second essai, nous n'avons pas repris les mêmes concentrations pour les *Cypris* et les *Daphnies*. En effet, les résultats du premier essai montraient déjà une différence de sensibilité entre les *Cypris* et les *Daphnies* qui nous permettait d'envisager l'application de concentrations plus importantes sur les *Cypris*.

Les résultats du premier essai montrent qu'on atteint 100 % de mortalité dès la concentration de 20 mg / l avec les *Daphnies* alors que chez les *Cypris*, on observe 100 % de survivants à la plus forte concentration (100 mg / l).

Le second essai n'a malheureusement pas permis d'obtenir les résultats attendus en ce qui concerne le traitement par l'OMS 2017 : on observe 100 % de mortalité dès la plus faible concentration (10 mg / l) et après seulement 24 heures après le contact.

Les doses que nous avons utilisées sont particulièrement élevées or, comme nous l'avons déjà précisé, les IGR ne sont pas des composés très solubles. Il est donc possible que les solutions obtenues ne soient pas très homogènes et que les résultats en soient faussés.

Le traitement par le diflubenzuron donne des résultats plus cohérents et montre surtout que la mortalité augmente encore après 24 heures de contact. On observe en outre qu'à la concentration la plus élevée, la mortalité n'est pas encore de 100 % témoignant d'une faible sensibilité de cette espèce au diflubenzuron.

3 - Discussion - Conclusion

L'intérêt de cette étude aurait été accru, si nous avions pu réaliser les traitements à échelle réelle directement dans la mare.

Or, la mare où nous avons prélevé les deux espèces de crustacés sert de témoin à une étude portant sur le recyclage au cours du temps de *Bacillus sphaericus* et nous ne pouvions donc pas introduire de nouvel insecticide.

De tels traitements nous auraient permis d'étudier la rémanence des IGR dans des conditions naturelles, tout en nous permettant d'étudier leurs effets sur la faune non-cible. Cependant, comme il n'existe bien évidemment pas de population naturelle d'*Aedes aegypti* dans cette mare, il aurait fallu envisager l'effet du traitement sur des populations de *Culex pipiens*, présentes en revanche en abondance, mais ces résultats n'auraient apporté aucun élément de comparaison intéressant.

Il reste que cette étude nous permet de mettre en évidence qu'aux concentrations normalement appliquées aux moustiques, les espèces comme les daphnies et les *Cypris* ne sont pas affectées.

Il faut augmenter très nettement ces concentrations pour que les traitements deviennent toxiques pour la faune non-cible.

De nombreuses études ont bien sûr été réalisées afin d'évaluer l'impact des IGR sur la faune évoluant dans les mêmes biotopes que les moustiques (Ali et Lord, 1980 ; Apperson *et al.*, 1978 ; Case et Washino, 1978 ; Mulla *et al.*, 1975 ; Sacher, 1971 ; Steelman et Schilling, 1972).

Le diflubenzuron est sans effet sur les crustacés (Mulla *et al.*, 1975) bien que les daphnies apparaissent plus sensibles à l'effet du traitement que les copépodes par exemple. Cependant la formulation de l'IGR a de l'importance : la poudre mouillable est plus toxique que les granulés.

L'effet des traitements au moyen d'IGR sur les Rotifères semble négligeable (Apperson *et al.*, 1978).

En ce qui concerne les cyanobactéries, différents effets se sont manifestés : certaines ont subi une réduction qui s'est maintenue quelques semaines, d'autres ont subi également une réduction mais ont plus rapidement repris leur prolifération.

Les algues vertes sont affectées par les IGR mais réapparaissent ensuite relativement vite. Steelman et Schilling (1972) ont étudié l'efficacité d'un AHJ sur la faune annexe peuplant des cultures de riz et comprenant des adultes appartenant aux Hydrophilidés, aux Dytiscidés, aux Curculionidés, aux Corixidés et aux Notonectidés ainsi que des larves d'Hydrophilidés et de Dytiscidés.

Les résultats indiquent que les larves de Dytiscidés et d'Hydrophilidés sont affectées par le traitement mais non les adultes de ces espèces et des autres.

Par conséquent, ces résultats montrent que dans l'ensemble, l'application d'IGR entraîne des risques écotoxicologiques réduits : même si certaines espèces non-cibles comme les *Cyclops*, les dytiques ou les daphnies se révèlent sensibles aux IGR, l'effet de ces produits n'excède pas deux ou trois semaines, au-delà desquelles la population est reconstituée.

Ceci s'explique par le fait que les IGR sont rapidement dégradés.

En outre, dans la mesure où l'ensemble des arthropodes présentent un développement qui s'effectue sous le contrôle d'une hormone analogue à l'ecdysone, il était impensable d'écarter totalement l'éventualité d'un effet des IGR sur ces espèces.

Considérons maintenant l'impact des IGR sur l'environnement dans un sens plus général.

Metcalf *et al.* (1975) montrent qu'il n'existe pas de bioconcentration du diflubenzuron. En effet, celui-ci est par exemple très peu persistant dans les algues ou encore les escargots. Le poisson *Gambusia* sp. est capable de le dégrader très efficacement.

Selon Quistad *et al.* (1974), le méthoprène, seul AHJ commercialisé actuellement, serait rapidement dégradé par les plants de riz et de luzerne en métabolites non toxiques. Ces auteurs ont observé ensuite une conversion significative et inhabituelle de ces métabolites en produits naturels comme la cellulose, les caroténoïdes et la chlorophylle.

Cette étude apporte un nouvel argument en faveur de l'utilisation des régulateurs de croissance.

L'introduction du diflubenzuron (2,5 ; 25 ; 250 ppm) dans l'alimentation d'un poussin âgé de 1 jour pendant 56 jours se traduit par des perturbations du développement : variations de poids des organes, inhibition des caractères sexuels secondaires (absence de crête chez les mâles par exemple), réduction des taux de testostérone (Wright, 1976).

Bien qu'inquiétante, cette étude reste incomplète dans la mesure où elle ne donne pas la concentration en diflubenzuron avec laquelle on n'observe aucun effet toxique. Elle met surtout en évidence la nécessité de poursuivre l'amélioration de la spécificité de ces produits afin de protéger le mieux possible les espèces non-cibles.

Des analyses de toxicologie ont été effectuées avec différents AHJ. Les résultats varient en fonction des produits. L'administration d'un AHJ très prometteur, le R-20458, par injection intrapéritonéale ou *per os* à des rats ou à des moutons n'a révélé aucun signe clinique de toxicité ou de tératogénicité.

Les résultats de la campagne pilote menée à Hawaï pour l'éradication de *Haematobia irritans* (Beadles *et al.*, 1975) vont dans le même sens.

Cependant, en 1959, Williams *et al.* rapportent l'existence, dans de nombreux tissus de mammifères, de quantités non négligeables de substances dont l'activité ne peut être distinguée de celle de l'hormone juvénile.

Des substances montrant une activité comparable à celle de la HJ sont également présentes dans le lait, la crème, les légumes et les plantes qui constituent notre alimentation ordinaire.

La similitude des AHJ avec les terpénoïdes présents chez l'ensemble des vertébrés est trop importante pour ne pas être prise en considération.

Ainsi nous devons donc garder en mémoire l'éventualité d'une non-compatibilité des analogues des hormones utilisés pour lutter contre les insectes avec les fonctions biochimiques qui régissent le développement des plantes et des animaux. L'impact des IGR sur l'environnement étant difficile à mettre en évidence en raison même de leurs propriétés, il nous faut rester vigilant.

Il reste cependant, ainsi que le souligne Ramade (1990), que la fabrication des régulateurs de croissance ne fait pas appel à des précurseurs fortement toxiques, susceptibles d'être employés à des fins militaires, ce qui à l'heure de l'abolition des armes chimiques, rend leur développement intéressant.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

La plupart des maladies transmises à l'homme par des vecteurs sévisse dans les pays tropicaux en voie de développement. On estime que les trois quarts de la population mondiale se concentrent dans ces pays où l'espérance de vie est réduite à 50 ans.

Les conditions sanitaires sont souvent la raison de la prévalence de ces maladies. Or, de par leur caractère chronique et débilitant, elles contribuent à maintenir le pays en-dessous du développement auquel il aspire.

La majorité des maladies qui affectent l'homme dans ces pays sont liées à l'eau. Elles augmentent en relation avec la productivité agricole et l'extension urbaine. Ainsi la construction de lacs artificiels destinés à produire de l'énergie a favorisé l'augmentation de la prévalence de maladies comme la bilharziose, l'onchocercose ou encore le paludisme. Le développement des systèmes d'irrigation et l'urbanisation incontrôlée ont joué le même rôle.

Il y a donc un paradoxe à permettre aux populations concernées d'atteindre un développement décent au risque de contribuer à l'augmentation de la prévalence de maladies qui sont autant d'obstacles à ce développement. Ceci souligne la nécessité d'établir des stratégies de lutte contre les maladies transmises par des vecteurs bien adaptées au contexte épidémiologique et aux contraintes socio-économiques.

La lutte contre les maladies transmises par des vecteurs peut se situer à deux niveaux. Elle peut viser un abaissement de la densité des populations vectorielles et/ou la réduction de l'indice d'infection des insectes responsables de la transmission.

Or, malgré tous les progrès de la recherche entomologique de ces dernières années, aucun succès définitif n'a été obtenu en matière de lutte contre ces maladies.

La mise au point de vaccins anti-parasitaires est loin d'aboutir, la chimioprophylaxie est souvent trop coûteuse et rarement bien acceptée.

Les procédés de lutte contre les maladies transmises par les insectes se heurtent à l'insuffisance de la connaissance de l'épidémiologie de ces maladies, à l'apparition et à l'extension de la résistance des vecteurs aux insecticides.

C'est dans un tel contexte que nous avons entrepris l'étude de deux régulateurs de croissance sur le vecteur historique de la fièvre jaune, *Aedes aegypti*.

Ce travail nous a permis de discuter de leurs effets sur la physiologie de ce moustique. En effet, à l'heure actuelle, le choix d'un insecticide est conditionné par son efficacité, son coût, sa formulation, sa toxicité, sa stabilité, sa rémanence, mais aussi par les effets qu'il peut provoquer sur la physiologie du vecteur ciblé, notamment la réduction des capacités reproductrice et vectorielle.

Les régulateurs de croissance sont à ce titre, les produits les plus aptes à répondre à ce critère nouvellement requis.

L'OMS 2017 et le diflubenzuron, les deux IGR choisis pour cette étude, ont montré une activité importante sur le développement d'*A. aegypti* qui s'est principalement traduite par l'inhibition de son émergence. L'amplitude de la réponse est fonction de la concentration appliquée.

Les résultats recueillis au cours de nos expérimentations montrent que les femelles qui survivent au traitement, en particulier par l'OMS 2017, sont dans l'ensemble moins bonnes reproductrices : les taux de fécondité et de fertilité sont inférieurs à ceux des femelles témoins. Le traitement semble agir dans ce cas au moment de la mise en place des ovaires c'est-à-dire au cours du dernier stade larvaire, en inhibant le développement complet des follicules et en entraînant de fait une diminution de la fécondité.

L'étude des variations du taux des ecdystéroïdes chez les larves traitées montre que l'OMS 2017 inhibe l'apparition du premier pic. Quant à l'effet du diflubenzuron, il ne semble pas agir sur la production des ecdystéroïdes mais sur le taux de base en le maintenant toujours en-dessous de celui des témoins. Les effets des traitements ne se manifestent plus sur les nymphes et les adultes qui survivent. Ce résultat était attendu dans la mesure où nous avons introduit un paramètre difficilement contrôlable en dosant des ecdystéroïdes chez des individus qui avaient réussi à survivre aux traitements.

Ces résultats indiquent que l'OMS 2017 peut être considéré comme un insecticide à effet retard : même s'il n'induit pas une mortalité immédiate, le moustique qui a été en contact avec lui est suffisamment affecté pour que certaines de ses fonctions soient atteintes. Le diflubenzuron se comporte davantage comme un insecticide conventionnel, s'il ne tue pas le moustique, celui-ci ne semble pas profondément affecté par le contact.

Lorsqu'on considère l'effet global de la réduction de la fécondité et de la fertilité sur la génération traitée et celles qui s'ensuivent, on constate que le niveau de la population traitée par l'OMS 2017 tend à s'abaisser et cela de façon beaucoup plus marquée que dans le cas du traitement au diflubenzuron.

Le traitement effectué au stade larvaire continue donc d'exercer une pression sur la population survivante et ses descendances contribuant à en diminuer la densité. Il faudrait maintenant vérifier l'ampleur de ce phénomène dans des conditions naturelles.

Les procédés de lutte contre les maladies ont pour cible le vecteur ou le parasite, au cours de son développement chez l'hôte vertébré.

Or il nous semble également nécessaire de pouvoir atteindre le parasite chez son vecteur. En effet, en plaçant le vecteur dans des conditions qui lui sont défavorables, on peut envisager de perturber directement ou indirectement le développement du parasite qui lui est associé.

C'est pourquoi, nous avons également entrepris l'étude de l'effet des traitements sur la capacité du vecteur à transmettre un parasite.

L'analyse de la réceptivité à la filaire *Molinema dessetae* d'*A. aegypti* survivant à un traitement par l'un ou l'autre des IGR montre que la production de stades infestants n'est pas augmentée ou réduite. En revanche, la proportion de femelles traitées présentant des stades infestants dans la tête est supérieure à celle des femelles témoins.

Ces résultats montrent que la répartition statistique des filaires à l'intérieur du vecteur n'est pas affectée mais que le nombre de femelles parasitées, quelle que soit la charge parasitaire, est plus important.

Ce résultat est inquiétant car il montre qu'à l'issue de traitements sublétaux, la population résiduelle est encore à même d'assurer la transmission de la maladie. En outre, il doit être associé au risque de voir survivre des femelles meilleures reproductrices.

Néanmoins, l'augmentation de la capacité vectorielle qui fait suite à un traitement insecticide n'a pas toujours été observée, comme nous l'avons vu au cours du chapitre 5. D'autres études mettent au contraire en évidence une diminution de la capacité vectorielle des vecteurs soumis à un traitement insecticide. C'est le cas d'*Aedes aegypti* soumis au diflubenzuron, vis-à-vis de *Brugia pahangi* (Gaaboub et Busvine, 1976) et, dans un autre type de système hôte-parasite, celui de *Plasmodium yoelii* chez *Anopheles stephensi* traité à la deltaméthrine (Elissa, 1990).

L'insecticide utilisé et le système hôte-parasite apparaissent déterminants quant à l'incidence des traitements sur les fonctions de reproduction et de transmission. Ceci s'explique probablement par les différences du mode d'action des produits.

En ce qui concerne les insecticides classiques comme les organophosphorés ou les carbamates, on peut définir un même mode d'action pour une même famille, mais ce n'est plus vrai pour les régulateurs de croissance.

Il ne semble pas possible tout d'abord de comparer les effets des analogues de l'hormone juvénile avec ceux des antagonistes des ecdystéroïdes. Il ne semble pas non plus possible de comparer les effets de deux AHJ ou de deux inhibiteurs de la mue différents ainsi qu'en témoignent les résultats obtenus ici avec l'OMS 2017 et le diflubenzuron au niveau du potentiel reproducteur.

Ces produits sont tous deux des substitués de l'urée, différant par le nombre de substituants. Or, alors qu'on pouvait s'attendre à des effets parallèles, on constate que ces différences ont une importance au niveau de l'effet physiologique produit sur l'insecte-cible.

Perspectives de recherches

Nous retiendrons principalement de l'étude de l'incidence des traitements larvaires sur les individus qui survivent, qu'il est nécessaire d'effectuer un suivi des populations résiduelles et de leur descendance si l'on veut avoir une bonne appréciation du contexte épidémiologique après traitement, d'autant que les risques de sous-dosages existent toujours.

Il suffit de considérer l'importance de l'équipement mis en place en Afrique de l'ouest sur la zone couverte par le programme de lutte contre l'onchocercose (OCP : Onchocerciasis Control Programme) afin de connaître à tout instant le débit des rivières traitées et limiter ainsi les erreurs d'application des insecticides, pour comprendre que dans la mesure où tous les programmes ne peuvent bénéficier d'une telle logistique, l'erreur est possible.

Il serait à notre avis important de développer également les axes de recherches suivants :

- mise au point de tests d'évaluation insecticide mieux adaptés au IGR ;
- amélioration de la spécificité des produits.

Les résultats obtenus lors de notre étude nous amènent à un constat important : les tests d'évaluation de l'efficacité des insecticides chimiques conventionnels ne sont certainement pas suffisamment adaptés aux IGR. Les tests classiques permettent de savoir si un produit est plus compétitif qu'un autre mais ils ne s'intéressent en fait qu'aux effets du traitement sur l'émergence, seul critère finalement pris en compte, et ainsi ils sont insuffisants.

L'étude comparée de l'effet de l'OMS 2017 et du diflubenzuron sur *A. aegypti* en est un bon exemple. Elle montre que si le diflubenzuron a une activité toxique supérieure à celle de l'OMS 2017, c'est ce dernier qui semble provoquer le plus de perturbations physiologiques notamment au niveau des organes reproducteurs, en raison peut-être de son action sur la production des ecdystéroïdes au moment de leur mise en place.

L'OMS 2017 pourrait donc être un insecticide et un outil d'étude physiologique plus intéressant que le diflubenzuron, la suspension de sa fabrication apparaissant moins justifiée.

L'obtention de résultats différents avec deux produits relativement proches souligne la nécessité d'évaluer non seulement l'activité toxique du produit testé mais aussi l'intensité de ses effets au niveau du potentiel reproducteur et de la capacité de l'insecte considéré à transmettre un agent pathogène déterminé.

L'utilisation des IGR apparaît plus contraignante que celle des insecticides conventionnels, l'inconvénient majeur étant en particulier la nécessité de déterminer des périodes au cours desquelles l'insecte cible est particulièrement sensible à l'action du produit.

Pour réduire les concentrations d'application et donc limiter les effets des IGR sur la faune non-cible, leur spécificité devrait être affinée.

Même si cela contribue à alourdir leur utilisation, c'est à ce prix que ces produits deviendront compétitifs et que nous réduirons les risques écologiques.

L'entomologie médicale ne doit plus apparaître seulement comme une discipline de terrain. Elle doit pouvoir se fonder sur des recherches plus fondamentales tout en continuant d'approfondir ses connaissances quant à l'écologie et la biologie des insectes.

La mise au point de méthodes de lutte efficaces doit s'appuyer sur des techniques de pointe, le succès des campagnes de lutte en dépend. La réunion thématique d'entomologie médicale de l'OMS qui s'est tenue à Genève en septembre 1989, a longuement insisté sur ce dernier point.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- ABDELMONEM (A.E.), KHALIL (G.M.), SONENSHINE (D.E.) and SALLAM (O.A.), 1986** - Effect of two insect growth regulators on the camel tick *Hyalomma dromedarii* (Acari : Ixodoidea : Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, **23** (2) : 156-162.
- AKAI (M.) and KOBAYASHI (M.), 1971** - Induction of prolonged larval instar by the J.H. in *Bombyx mori* L. (Lep. Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.*, **6** (3) : 138-139.
- ALI (A.) and LORD (J.), 1980** - Impact of experimental insect growth regulators on some nontarget aquatic invertebrates. *Mosq. News*, **40** (4) : 564-570.
- ANONYME, 1977** - Evaluation au stade IV de l'efficacité de l'OMS-1804 (Dimilin) contre les larves de *Culex pipiens fatigans*, Wiedeman et *Aedes aegypti* Linné. *WHO/VBC/77-655*.
- ANONYME, 1982** - Lutte biologique contre les vecteurs de maladies. 6ème Rapport du comité OMS d'experts de la biologie des vecteurs et de la lutte antivectorielle. *Série de rapports techniques N°679*.
- ANONYME, 1984** - Filariose lymphatique. Rapport Technique n° 702, 129 pp.
- ANONYME, 1985** - Manuel de l'aménagement de l'environnement en vue de la démoustication. *Publication Offset OMS N°66, Genève*.
- APPERSON (C.S.), SCHAEFFER (C.H.), COLWELL (A.E.), WERNER (G.H.), ANDERSON (N.L.), DUPRAS JR (E.J.) and LONGANECKER (D.R.), 1978** - Effects of diflubenzuron on *Chaoborus astictopus* and nontarget organisms and persistence of diflubenzuron in lentic habitats. *J. Econ. Entomol.*, **71** (3) : 521-527.
- ARIAS (J.R.) and MULLA (M.S.), 1975** - Morphogenetic aberrations induced by a juvenile hormone analogue in the mosquito *Culex tarsalis* (DIPTERA : CULICIDAE). *J. Med. Ent.*, **12** (3) : 309-316.

- BAIN (O.), 1973 a - Une nouvelle filaire de rongeur sud-américain *Dipetalonema dessetae* n. sp. (Nematoda, Filaroidea). *Bull. Mus. Hist. nat.*, Paris, 3ème série, 116 : 309-316.
- BAIN (O.), 1973 b - Cycle d'une filaire de rongeur passant par moustique. *C. R. Acad. Sci. Paris*, série D, 276 : 2689.
- BAIN (O.), 1974 - Développement larvaire de *Dipetalonema dessetae*, filaire de rongeur, entretenue au laboratoire. *Ann. Parasit. hum. comp.*, 49 (4) : 457-466.
- BAIN (O.) et CHABAUD (A.G.), 1975 - Le mécanisme assurant la régularisation de la paroi stomacale du vecteur par les microfilaires (*Dipetalonema dessetae* - *Aedes aegypti*). *C. R. Acad. Sc. Paris*, sér. D, 283 : 391-392.
- BEADLES (M.L.), MILLER (J.A.), CHAMBERLAIN (W.F.), ESCHELE (J.L.) and HARRIS (R.L.), 1975 - The horn fly : methoprene in drinking water of cattle for control. *J. Econ. Entomol.*, 68 (6) : 781-785.
- BEHAN (M.) and HAGEDORN (H.H.), 1978 - Ultrastructural changes in the fat body of adult female *Aedes aegypti* in relationship to vitellogenin synthesis. *Cell Tiss. Res.*, 186 : 499-506.
- BOLLENBACHER (W.E.), ZVENKO (H.), KUMARAN (A.K.) and GILBERT (L.I.), 1978 - Changes in ecdysone content during postembryonic development of the wax moth, *Galleria mellonella* : the role of the ovary. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 34 : 169-179.
- BOWERS (W.S.) and BLICKENSTAFF (C.C.), 1966 - Hormonal termination of diapause in the Alfaalfa weevil. *Science*, 154 (3757) : 1673-1674.
- BRENGUES (J.) et BAIN (O.), 1972 - Passages des microfilaires de l'estomac vers l'hémocèle du vecteur, dans les complexes *Wuchereria bancrofti* - *Anopheles gambiae* A, *W. bancrofti* - *Aedes aegypti* et *Setaria labiatopapillosa* - *A. aegypti*. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, X (3) : 235-249.
- BRIERS (T.) and DE LOOF (A.), 1981 - The molting hormone activity in *Sarcophaga bullata* in relation to metamorphosis and reproduction. *Int. J. Invertebr. Reprod.*, 2 : 363-372.
- BUSVINE (J.R.), 1966 - Insects and hygiene. *London, 2nd ed.*, 467 pp.
- BUSVINE (J.R.), RONGSRIYAM (Y.) AND BRUNO (D.), 1976 - Effects of some insect development inhibitors on mosquito larvae. *Pestic. Sci.*, 7 : 153-160.
- CARNEVALE (P.), ROBERT (V.), BOUDIN (C.), HALNA (J.M.), PAZRAT (J.M.), RICHARD (A.) et MOUCHET (J.), 1988 - La lutte contre le paludisme par moustiquaires imprégnées de pyréthrianoïde au Burkina Faso. *Bull. Soc. Path. exot.*, 81 : 832-846.
- CASE (T.J.) and WASHINO (R.K.), 1978 - Effects of the growth regulator methoprene on *Culex tarsalis* and non-target organisms in California rice fields. *Mosq. News*, 38 (2) : 191-196.
- CAUBERE (P.), 1989 - *Chrysops dimidiata* et *Chrysops silacea* : activité nyctémérale de deux vecteurs de loase humaine dans le massif du Chaillu. *Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Paris VI*, 62 pp.

- CHRISTENSEN (B.M.), 1981 - Effect of *Dirofilaria immitis* on the fecundity of *Aedes trivittatus*. *Mosq. News*, 41 (1) : 78-81.
- CHRISTOPHERS (S.R.), 1960 - *Aedes aegypti* (L.). The Yellow Fever Mosquito. Its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press, Cambridge, 739 pp.
- CLARKE (L.), TEMPLE (G.H.R.) and VINCENT (J.F.V.), 1977 - The effects of a chitin inhibitor - dimilin - on the production of peritrophic membrane in the locust, *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.*, 23 : 241-246.
- CLEMENTS (A.N.), 1963 - The physiology of mosquitoes. Pergamon Press, N.Y., 393 pp.
- CORDELIER (R.), GERMAIN (M.) et MOUCHET (J.), 1974 - Les vecteurs de fièvre jaune en Afrique. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, XII (1) : 57-75.
- DARRIET (F.), ROBERT (V.) et CARNEVALE (P.), 1985 - Evaluation au laboratoire et sur le terrain de l'activité larvicide d'un inhibiteur de croissance de type juvénoïde : l'OMS 3007 sur *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 et *Anopheles gambiae* s.s. Giles, 1902. *Doc. Tech. OCCGE*.
- DETINOVA (T.S.), 1963 - Méthode à appliquer pour classer par groupes d'âge les Diptères présentant une importance médicale. *Org. mond. Santé, série de monographies*, 47 : 220 pp.
- DORN (A.), RADEMACHER (J.M.) and SEHN (E.), 1986 - Ecdysteroid-dependent development of the oviduct in last-instar larvae of *Oncopeltus fasciatus*. *J. Insect Physiol.*, 32 (7) : 643-647.
- DOUMENGE (J.P.), 1989 - A propos des maladies à transmission hydrique : peut-on articuler utilement les recherches réalisées en milieu rural et dans le monde urbain ? *Coll. Colloques et Séminaires*, Editions ORSTOM, 83-86.
- DOUTT (R.L.), 1964 - The historical development of biological control. *In* Biological control of insects pests and weeds. Ed. DeBach (P.), Chapman and Hall Ltd. : 21-73.
- EDWARDS (J.P.), 1975 - The effects of a juvenile hormone analogue on laboratory colonies of pharaoh's ant, *Monomorium pharaonis* (L.) (Hymenoptera, Formicidae). *Bull. ent. Res.*, 65 : 75-80.
- ELISSA (N.), 1990 - Nouvelle approche de la lutte contre les maladies transmissibles : étude de l'effet de certains insecticides sur le développement de *Plasmodium yoelii yoelii* et de *Dipetalonema dassetae* dans leurs vecteurs. *Thèse de Doctorat de l'Université Paris-Sud*, Orsay, 307 pp.
- EMAM (A.K.), DEGHEELE (D.) and VAN OUTRYVE D'YDEWALLE (Y.), 1988 - Distribution of four ¹⁴C benzoylphenyl ureas in last instar larvae of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) and their excrements. *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, 53 (2b) : 751-757.
- FINNEY (D.J.), 1952 - Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, 318 pp.

- FLANAGAN (T.R.) and HAGEDORN (H.H.), 1977 - Vitellogenin synthesis in the mosquito : the role of juvenile hormone in the development of responsiveness to ecdysone. *Physiol. Ent.*, 2 : 173-178.
- FUCHS (M.S.) and KANG (S.-H.), 1981 - Ecdysone and mosquito vitellogenesis : a critical appraisal. Short review. *Insect Biochem.*, 11 (6) : 627-633.
- FURTADO (A.), 1977 - Hormones cérébrales, ecdysones et leurs implications dans le contrôle des mitoses goniales et de la méiose chez la femelle de *Panstrongylus megistus* (Hemiptera Reduviidae). *C. R. Acad. Sc. Paris*, t. 284, série D, n°23 : 2377-2380.
- GAABOUB (I.A.), 1976 - Observations on the basal follicle numbers developed per female of two strains of *Aedes aegypti* after being fed on hosts with different levels of microfilariae of *Brugia pahangi*. *J. Invert. Pathol.*, 28 : 203-207.
- GAABOUB (I.A.) and BUSVINE (J.R.), 1975 - DDT-resistance status and the effect of DDT exposure in relation to the vectorial capacity of *Aedes aegypti* (L.) for *Brugia pahangi* (Buckley and Edeson). *Annl. Trop. Med. Parasitol.*, 69 (4) : 493-501.
- GAABOUB (I.A.) and BUSVINE (J.R.), 1976 - Effects of larval treatment with the insect development inhibitor PH60 : 40 on the vectorial capacity of *Aedes aegypti* (L.) for *Brugia pahangi* (Buckley and Edeson). *Annl. Trop. Med. Parasitol.*, 70 (3) : 355-360.
- GAABOUB (I.A.), RAWASH (I.A.), EL-GAYAR (F.H.) and TRABOULSI (A.F.), 1981 - The delayed effects and the basal follicle numbers developed by females of *Culex pipiens* L. emerged from treatments of larvae with partially-lethal concentrations of Altosid and Dimilin. *Toxicology*, 19 : 269-274.
- GANTIER (J.C.) et GAYRAL (P.), 1979 - Elevage et constantes biologiques d'un nouveau rongeur de la boratoire : *Proechimys oris*, Thomas 1904. *Sci. Tech. Anim. Lab.*, 4 : n°4.
- GAYRAL (P.), DREYFUSS (G.) et GANTIER (J.C.), 1982 - *Dipetalonema dessetae* chez *Proechimys oris*. Cycle biologique de la filaire et proposition d'un modèle de filariose expérimentale de rongeur. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, XX (1) : 81-94.
- GROSSCURT (A.C.), 1978 - Diflubenzuron : some aspects of its ovicidal and larvicidal mode of action and an evaluation of its practical possibilities. *Pestic. Sci.*, 9 : 373-386.
- GUILLET (P.), 1985 - La lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest : étude de la résistance et recherche de nouveaux larvicides. *Thèse Doctorat d'Etat*, Université Paris-Sud, Orsay, 444 pp.
- GUSTAVE (J.), 1991 - Influence des doses sublétales de diflubenzuron sur la compétence vectorielle d'*Aedes aegypti* vis-à-vis du virus de la dengue 2. *Diplôme d'Etudes Approfondies*, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 43 pp.
- GWADZ (R.W.) and SPIELMAN (A.), 1973 - Corpus allatum control of ovarian development in *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.*, 19 : 1441-1448.
- HAGEDORN (H.H.), 1974 - The control of vitellogenesis in the mosquito *Aedes aegypti*. *Am. Zool.*, 14 : 1207-1217.

- HAGEDORN (H.H.), 1983 - III - The role of ecdysteroids in the adult insect. *In* : Endocrinology of insects, 271-304. Alan R. Liss, Inc., New York.
- HAGEDORN (H.H.), O'CONNOR (J.D.), FUCHS (M.S.), SAGE (B.), SCHLAEGER (D.A.) and BOHM (M.K.), 1975 - The ovary as a source of α -ecdysone in an adult mosquito. *Nature, Lond.*, **282** : 92-94.
- HAJJAR ((N.P.) and CASIDA (J.E.), 1979 - Structure, activity, relationships of benzoylphenyl ureas as toxicants and chitin synthesis inhibitors in *Oncopeltus fasciatus*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **11** : 33-45.
- HAMON (J.), PICHON (G.) et CORNET (M.), 1971 - La transmission du virus amaril en Afrique occidentale. Ecologie, répartition, fréquence et contrôle des vecteurs, et observations concernant l'épidémiologie de la fièvre jaune. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol.*, **IX** (1) : 3-60.
- HORN (), 1971 - The ecdysones. *In* Naturally occurring insecticides. Eds Jacobson (M.) and Grosley (D.G.). New York, Deyker Press : 333-459.
- HOUGARD (J.M.), 1988 - Evaluation de l'efficacité de nouveaux larvicides pour la lutte contre les vecteurs d'endémie en Afrique de l'Ouest. *Coll. Trav. et Doc. microédités*, Ed. ORSTOM, 245 pp.
- IGNOFFO (C.M.), GARCIA (C.), KROHA (M.J.), FUKUDA (T.) and COUCH (T.L.), 1981 - Laboratory tests to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. *Mosq. News*, **41** (1) : 85-93.
- ISHAAYA (I.) and CASIDA (J.E.), 1974 - Dietary TH 6040 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **4** : 484-490.
- JAMES (M.T.) and HARWOOD (R.F.), 1969 - Herms's Medical Entomology. Toronto, 6th ed., 484 pp.
- JENNINGS (R.C.), 1983 - Insect hormones and growth regulators. *Pestic. Sci.*, **14** : 327-333.
- JUDSON (C.L.) and LUMEN (H.Z.), 1976 - Some effects of juvenile hormone and analogues on ovarian follicles of the mosquito *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *J. Med. Ent.*, **13** (2) : 197-201.
- KARCH (S.), 1987 - Etudes au laboratoire et dans les conditions naturelles de l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* Neide, 1904, pour la lutte contre les moustiques. *Thèse d'Etat, Université Paris-Sud, Orsay*, 215 pp.
- KELADA (N.L.), GAABOUB (I.A.) and RAWASH (I.A.), 1981 - The effect on reproduction and morphometrics of females of *Culex pipiens* L. of treatment with six insect growth regulators. *J. Agric. Sci., Camb.*, **96** : 611-618.
- KOOLMAN ((J.), 1990 - Ecdysteroids (review). *Zoological Science*, **7** : 563-580.
- KOOLMAN (J.), SCHELLER (K.) ET BODENSTEIN (D.), 1979 - Ecdysteroids in the adult male blowfly *Calliphora vicina*. *Experientia*, **35** : 134-135.

- LAIRD (D.M.), 1962** - Les champignons *Coelomomyces*, importants parasites du moustique. *WHO/EBL-1/MAL-334/Fil-42*, 5 pp.
- LEA (A.O.), 1963** - Some relationships between environment, corpora allata and egg development in aedine mosquitoes. *J. Insect Physiol.*, **9** : 793-809.
- LEA (A.O.), 1972** - Regulation of egg maturation in the mosquito by the neurosecretory system : the role of the cardiacum. *Gen. comp. Endocr. Suppl.*, **3** : 602-608.
- LIM (S.J.) and LEE (S.S.), 1982** - Toxicity of diflubenzuron to the grasshopper *Oxya japonica* : effects on reproduction. *Ent. Exp. Appl.*, **31** (2) : 154-158.
- LOCHOUARN (L.), 1990** - Action des régulateurs de croissance à doses sublétales sur des vecteurs de filarioses en Afrique Centrale. *Thèse 3ème Cycle, Université Paris VI*, 208 pp.
- MARTOJA (R.) ET MARTOJA-PIERSON (M.), 1967** - Initiation aux techniques de l(histologie animale. *Masson* , 345 p.
- MASLER (E.P.), FUCHS (M.S.), SAGE (B.) and O'CONNOR (J.D.), 1980** - Endocrine regulation of ovarian development in the autogenous mosquito, *Aedes atropalpus* . *Gen. Comp. Endocrinol.*, **41** : 250-259.
- MASLER (E.P.), FUCHS (M.S.), SAGE (B.) and O'CONNOR (J.D.), 1981** - A positive correlation between oocyte production and ecdysteroid level in adult *Aedes* . *Physiol. Entomol.* , **6** : 45-49.
- METCALF (R.L.), LU (P.Y.) and BOWLUS (S.), 1975** - Degradation and environmental fate of 1-(2,6-difluorobenzoyl)-3-(4-chlorophenyl) urea. *J. Agr. Food Chem.*, **23** : 359.
- METREAU (E.), PLEAU (J.M.), DARDENNE (M.), BACH (J.F.) and PRADELLES (P.), 1987** - An enzyme immunoassay for synthetic thymulin. *J. Immunol. Methods*, **102** : 233-242.
- MOLLOY (D.) and JAMNBACK (H.), 1977** - A larval blackfly control field trial using mermithid parasites and its cost implication. *Mosq. News*, **37** : 104-108.
- MONTENY (N.), 1990** - Influence de facteurs biotiques et abiotiques, induits et naturels, sur l'efficacité larvicide de *Bacillus sphaericus* Neide, 1904. *Thèse Doctorat de l'Université Paris-Sud, Orsay*, 151 pp.
- MORIARTY (F.), 1969** - The sublethal effects of synthetic insecticides on insects. *Biol. Rev.*, **44** : 321-357.
- MOUCHET (J.), 1978** - Lutte contre les vecteurs et nuisances en Santé Publique. *ORSTOM, Paris*, 57 pp.
- MOUCHET (J.) et BELLEC (CH.), 1990** - Entomologie médicale et lutte antivectorielle : acquisitions et nouvelles perspectives. *Conférence présentée au 7ème Congrès International de Parasitologie, ICOPA VII, 20-24 août 1990, Paris*.
- MULLA (M.S.), DARWAZEH (H.A.) and NORLAND (R.L.), 1974** - Insect growth regulators : evaluation procedure and activity against mosquitoes. *J. Econ. Entomol.*, **67** (3) : 329-332.

- O'REILLY (D.R.) and MILLER (L.K.), 1989 - A baculovirus blocks insect molting by producing ecdysteroid UDP-Glucosyl transferase. *Science*, **245** : 1110-1112.
- PARKS (J.J.), 1955 - An anatomical and histological study of the female reproductive system and follicular development in *Aedes aegypti* (L.). *M. S. Thesis, University of Minnesota*, 71 pp.
- PETIT (G.), 1978 - La filaire *Dipetalonema dessetae* : phénomènes de régulation et rendement parasitaire chez l'*Aedes* vecteur. *Ann. Parasitol. hum. comp.*, **53** (6) : 649-668.
- PETIT (G.), BAIN (O.) et SPITALIER-KAVEH (H.), 1977 - Facteurs favorables à la transmission de la filaire de laboratoire *Dipetalonema dessetae*. *Ann. Parasit. hum. comp.*, **52** (5) : 585-586.
- PETIT (G.) et SPITALIER-KAVEH (H.), 1979 - La filaire *Dipetalonema dessetae* chez *Aedes aegypti*. Etude du tissu adipeux parasité. *Ann. Parasit. hum. comp.*, **54** (1) : 81-92.
- PICHON (G.), PERRAULT (J.) et LAIGRET (J.), 1975 - Rendement parasitaire chez les vecteurs de filarioses. *Bull. Org. mond. Santé*, **51** : 517-524.
- PICHON (G.), PROD'HON (J.) et RIVIERE (F.), 1980 a - Hétérogénéité de l'ingestion des parasites sanguicoles par leurs vecteurs : description quantitative, interprétation et conséquences. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **290**, série D : 1011-1013.
- PICHON (G.), PROD'HON (J.) et RIVIERE (F.), 1980 b - Filarioses : surdispersion parasitaire et surinfection de l'hôte invertébré. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, **XVIII** (1) : 27-47.
- PORCHERON (P.), MORINIERE (M.), GRASSI (J.) and PRADELLES (P.), 1989 - Development of an enzyme immunoassay for ecdysteroids using acetylcholinesterase as label. *Insect Biochem.*, **19** (2) : 117-122.
- POST (L.C.), DE JONG (B.J.) and VINCENT (W.R.), 1974 - 1 - (2,6 - disubstituted benzoyl) - 3 - phenylurea insecticides : inhibitors of chitin synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **4** : 473-483.
- QUELENNEC (J.), 1974 - Pratique de la lutte contre les arthropodes d'intérêt médical. *Doc. ronéo.*, 185 pp.
- QUISTAD (G.B.), STAIGER (L.E.) and SCHOOLEY (D.A.), 1974 - Environmental degradation of the insect growth regulator methoprene (isopropyl (2E, 4E) - 11 - methoxy - 3,7,11 - trimethyl - 2,4 - dodecadienoate). I. Metabolism by alfalfa and rice. *J. Agr. Food Chem.*, **22** : 582.
- RACCAUD-SCHOELLER (J.), 1980 - Les insectes : physiologie et développement. Masson, Paris, 296 pp.
- RAMADE (F.), 1990 - Des pesticides aux armes chimiques. *La recherche*, **21** (219) : 382-389.
- RIDDIFORD (L.M.), 1981 - Hormonal control of epidermal cell development. *Amer. Zool.*, **21** : 751-762.

- RIDDIFORD (L.M.) and TRUMAN (J.W.), 1978** - Biochemistry of insect hormones and insect growth regulators. *In* Biochemistry of insects. Morris Rockstein (ed.). Academic Press, New York, San Francisco, London : 308-357.
- RIVIERE (F.), 1988** - Ecologie de *Aedes (Stegomyia) polynesiensis*, Marks, 1951, et transmission de la filariose de Bancroft en Polynésie. *Thèse d'Etat., Université Paris-Sud*, Orsay, 475 pp.
- RIVIERE (F.), PICHON (G.), DUVAL (J.), THIREL (R.) et TOUDIC (A.), 1979** - Introduction de *Toxorhynchites (Toxorhynchites) amboinensis* (Doleschall, 1857) (*Diptera, Culicidae*) en Polynésie Française. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, XXVII (4) : 225-234.
- RIVIERE (J.L.), 1977** - Action du propoxur sur la reproduction de *Blatella germanica* L. *Ann. Zoo. Ecol. anim.*, 9 (1) : 111-116.
- ROBERT (V.), BOUSSINESQ (M.), BOUDIN (C.), CONAN (H.), DARRIET (F.) et CARNEVALE (P.), 1987** - Réceptivité à *Plasmodium falciparum* d'*Anopheles gambiae* soumis à *Bacillus thuringiensis* sérotype H₁₄ ou à *Bacillus sphaericus*. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, XXV (2) : 63-68.
- SACHER (R.M.), 1971** - A mosquito larvicide with favorable environmental properties. *Mosq. News*, 31 (4) : 513-516.
- SALEH (M.S.), 1985** - Effects of six insect growth regulators on mosquito larvae of *Aedes aegypti*. *Insect Sci. Applic.*, 6 (5) : 609-611.
- SLAMA (K.), 1971** - Substances naturelles et de synthèse douées d'effets d'hormone juvénile chez les insectes. *Arch. Zool. exp. gen.*, 112 : 579-589.
- SMITH (S.L.), 1985** - Regulation of ecdysteroids titer : synthesis. *In* Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Ed. Kerkut and Gilbert, Vol. 7 : 295-342. Pergamon Press, Oxford.
- SOLTANI (N.), 1983** - Penetration and insecticidal activity of diflubenzuron in *Tenebrio molitor* pupae. *Pestic. Sci.*, 14 : 615-622.
- SOLTANI (N.), 1987** - Effets d'un régulateur de croissance, le diflubenzuron, sur le développement et la reproduction de deux insectes : *Tenebrio molitor* L. (Coléoptère) et *Cydia pomonella* L. (Lépidoptère). *Thèse d'Etat, Université de Bourgogne*, Dijon.
- SOLTANI (N.), 1990** - Action du diflubenzuron et de la 20 - hydroxyecdysone sur les glucides et les protéines hémolympatiques chez les nymphes de *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera : Tenebrionidae). *Annls. Soc. ent. Fr. (N.S.)*, 26 (4) : 575-584.
- SOLTANI (N.), BESSON (M.T.) and DELACHAMBRE (J.), 1984** - Effects of diflubenzuron on the pupal-adult development of *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera, Tenebrionidae) : growth and development, cuticle secretion, epidermal cell density, and DNA synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 21 : 256-264.
- STEELMAN (C.D.) and SCHILLING (P.E.), 1972** - Effects of a juvenile hormone mimic on *Psorophora confinnis* (Lynch-Arribalzaga) and non-target aquatic insects. *Mosq. News*, 32 (3) : 350-353.

- STILL (G.G.) and LEOPOLD (R.A.), 1978** - The elimination of (N - [(4 - chlorophenyl) amino] carbonyl] - 2,6 - difluorobenzamide) by the Boll Weevil. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **9** : 304-312.
- STOCKEL (J.), 1975** - Les analogues de l'hormone juvénile ou régulateurs de croissance chez l'insecte. Possibilités d'application dans la lutte contre les espèces nuisibles. *Ann. Zool. Ecol. anim.*, **7** (1) : 91-118.
- SUTHERLAND (D.J.), BEAM (F.D.) and GUPTA (A.P.), 1967** - The effects on mosquitoes of sublethal exposure to insecticides. I. DDT, dieldrin, malathion and the basal follicles of *Aedes aegypti* (L.). *Mosq. News*, **27** : 316-323.
- VAN ECK (W.H.), 1979** - Mode of action of two benzoylphenyl ureas as inhibitors of chitin synthesis in insects. *Insect Biochem.*, **9** : 295-300.
- WHISENTON (L.R.), WARREN (J.T.), MANNING (M.K.) and BOLLENBACHER (W.E.), 1989** - Ecdysteroid titres during pupal-adult development of *Aedes aegypti* : basis for a sexual dimorphism in the rate of development. *J. Insect Physiol.*, **35** (1) : 67-73.
- WILLIAMS (C.M.), MOORHEAD (L.V.) and PULIS (J.F.), 1959** - Juvenile hormone in thymus, human placenta, and other mammalian organs. *Nature*, **183** : 405.
- WRIGHT (J.E.), 1976** - Environmental and toxicological aspects of Insect Growth Regulators. *Environmental Health Perspectives*, **14** : 127-132.
- YU (S.J.) and TERRIERE (L.C.), 1977** - Ecdysone metabolism by soluble enzymes from three species of Diptera and its inhibition by the insect growth regulator TH 6040. *Pestic. Biochem. Physiol.*, **7** : 48-55.

ANNEXES

Annexe 1

Evaluation insecticide de l'OMS 2017

ESSAI 1

concentrations en mg /l	témoin	0,001	0,0025	0,005	0,0075	0,01	0,1
nombre de larves testées	99	101	99	99	99	99	95
mortalité larvaire	3	3	2	6	7	12	86
mortalité nymphale	4	5	6	16	18	34	5
mortalité à l'émergence	0	3	2	3	6	11	3
mortalité post-émergence	5	19	3	11	14	14	0
nombre d'adultes récoltés	92	90	89	74	68	42	1
nombre réel d'adultes	87	71	86	63	54	28	1
% corrigé de réduction d'émergence	12,1	20,0	1,2	27,6	37,9	67,8	98,8

Evaluation du pourcentage de réduction d'émergence imaginaire d'*Aedes aegypti* après traitement des larves stade III-IV avec l'OMS 2017 (WP 25 %).

1 Droite de Henry : $y = 1,23 x + 3,9$ (Figure 1)

a : 1,23 Ecart-type : 0,179

b : 3.9 Ecart-type : 0,158

2 Test d'hétérogénéité autour de la droite théorique

Khi2 observé : 17,97 (d.d.l : 4)

Probabilité : 0,0012 \implies Hétérogénéité significative

3 Doses sublétales calculées

DL30 = 0,0029 et $0,0019 < IE 30 < 0,004$ mg/l

DL50 = 0,0078 et $0,0058 < IE 50 < 0,0104$ mg/l

DL90 = 0,085 et $0,045 < IE 90 < 0,259$ mg/l

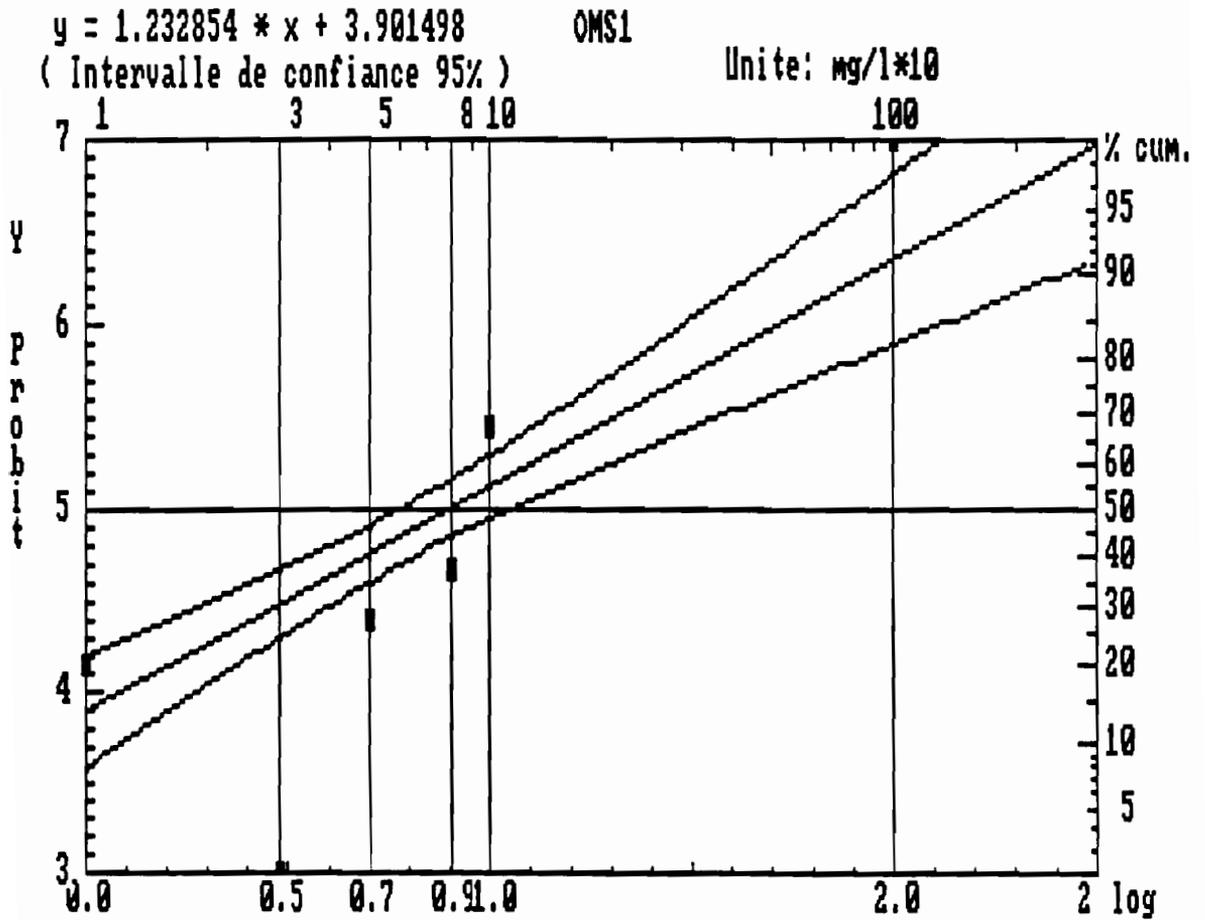


Figure 1 : Sensibilité des larves d'*Aedes aegypti* de stade III-IV
 à l'OMS 2017 WP 25 %

ESSAI 2

concentrations en mg /l	témoin	0,001	0,0025	0,005	0,0075	0,01	0,1
nombre de larves testées	100	102	98	97	98	98	96
mortalité larvaire	4	5	17	37	37	43	81
mortalité nymphale	6	6	13	12	18	16	10
mortalité à l'émergence	0	2	6	7	6	2	0
mortalité post-émergence	0	0	1	0	0	0	0
nombre d'adultes récoltés	90	89	62	41	37	37	5
nombre réel d'adultes	90	89	61	41	37	37	5
% corrigé de réduction d'émergence	10	3,1	30,8	53,0	58,1	58,1	94,2

Evaluation du pourcentage de réduction d'émergence imaginaire d'*Aedes aegypti* après traitement des larves stade III-IV avec l'OMS 2017 (WP 25 %).

1 Droite de Henry : $y = 1,56 x + 3,55$ (Figure 2)

a : 1,56 Ecart-type : 0,195

b : 3,55 Ecart-type : 0,211

2 Test d'hétérogénéité autour de la droite théorique

Khi2 observé : 3,77 (d.d.1 : 3)

Probabilité : 0,095 ==> Hétérogénéité non significative

3 Doses sublétales calculées

DL30 = 0,0039 et 0,0026 < IE 30 < 0,0052 mg/l

DL50 = 0,0085 et 0,0068 < IE 50 < 0,011 mg/l

DL90 = 0,056 et 0,038 < IE 90 < 0,1 mg/l

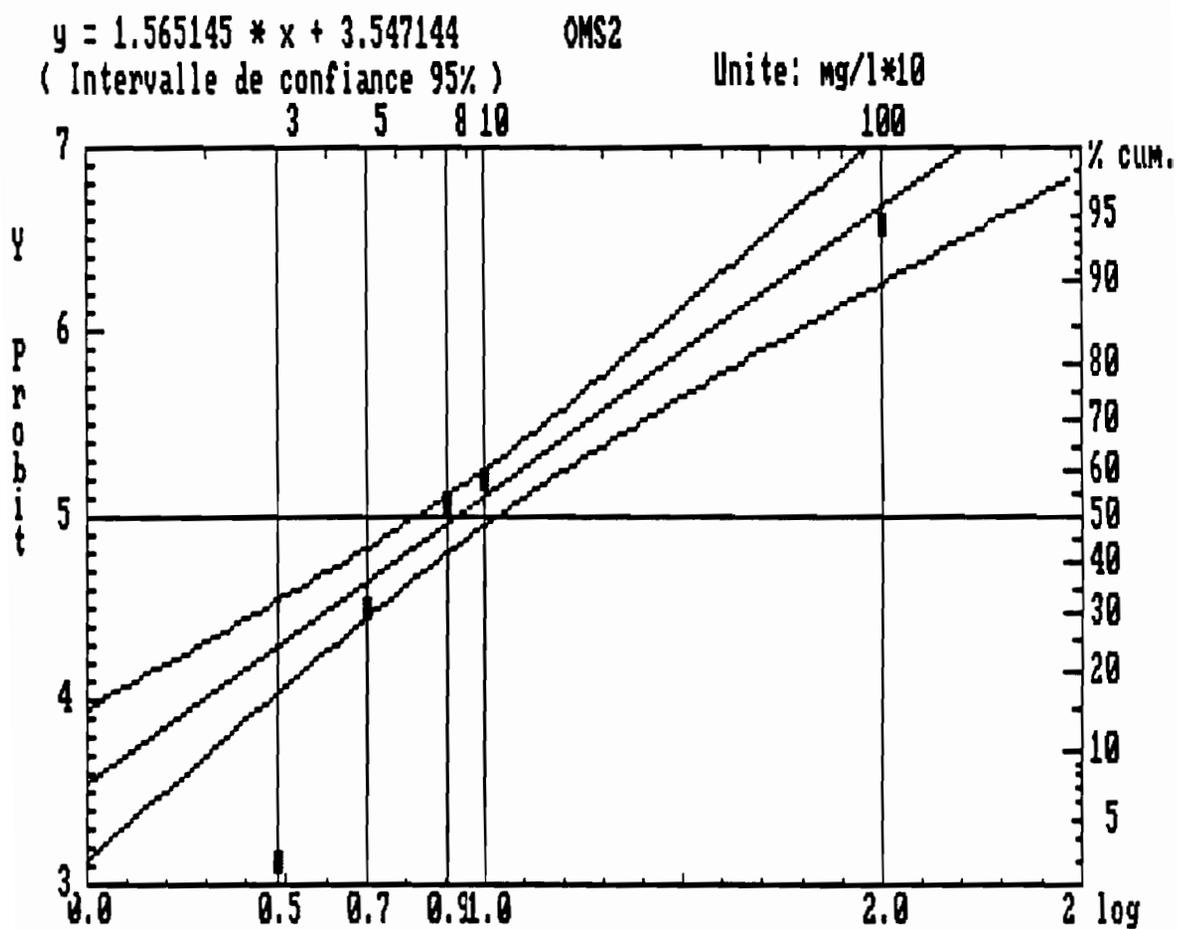


Figure 2 : Sensibilité des larves d'*Aedes aegypti* de stade III-IV
 à l'OMS 2017 WP 25 %.

ESSAI 3

concentrations en mg /l	témoin	0,001	0,0025	0,0075	0,01	0,1
nombre de larves testées	100	100	99	99	100	100
mortalité larvaire	0	7	3	10	16	69
mortalité nymphale	2	4	16	19	25	31
mortalité à l'émergence	0	0	8	5	13	0
mortalité post-émergence	0	5	4	0	2	0
nombre d'adultes récoltés	98	89	72	65	46	0
nombre réel d'adultes	98	84	68	65	44	0
% corrigé de réduction d'émergence	2	14,3	29,9	33,0	55,1	100

Evaluation du pourcentage de réduction d'émergence imaginaire d'*Aedes aegypti* après traitement des larves stade III-IV avec l'OMS 2017 (WP 25 %).

1 Paramètres de la droite de Henry : $y = 1,66 x + 3,85$ (Figure 3)

a : 1,66 Ecart-type : 0,143

b : 3,85 Ecart-type : 0,129

2 Test d'hétérogénéité autour de la droite théorique

Khi2 observé : 14,93 (d.d.l : 2)

Probabilité : 0,00003 \Rightarrow Hétérogénéité très hautement significative

3 Doses sublétales calculées

DL30 = 0,0024 et $0,0018 < IE 30 < 0,003$ mg/l

DL50 = 0,0049 et $0,0039 < IE 50 < 0,0062$ mg/l

DL90 = 0,029 et $0,021 < IE 90 < 0,045$ mg/l

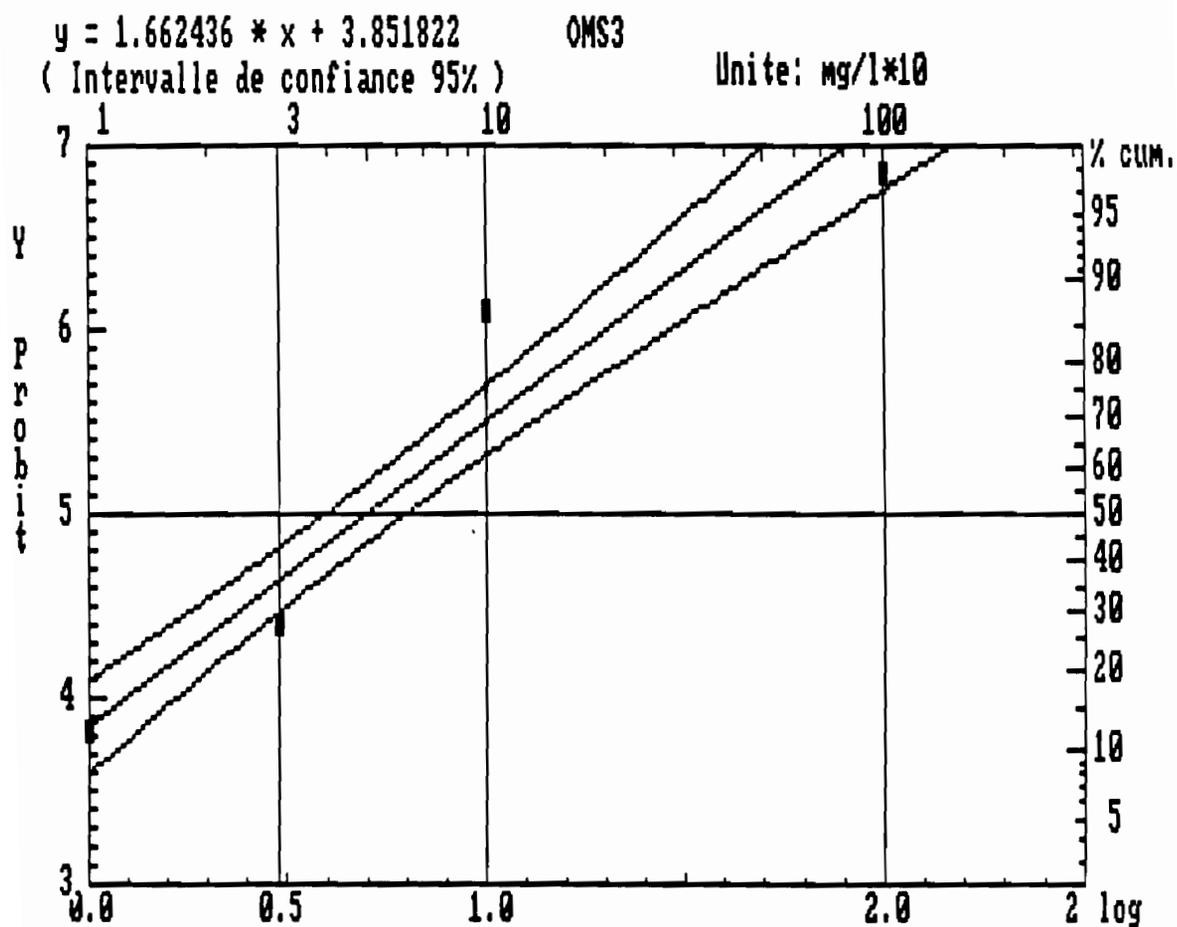


Figure 3 : Sensibilité des larves d'*Aedes aegypti* de stade III-IV à l'OMS 2017 WP 25 %.

ESSAI 4

concentrations en mg /l	témoin	0,001	0,0025	0,01	0,1
nombre de larves testées	100	100	100	100	100
mortalité larvaire	1	5	17	56	60
mortalité nymphale	1	6	8	31	37
mortalité à l'émergence	0	3	4	0	0
mortalité post-émergence	0	0	0	0	0
nombre d'adultes récoltés	98	86	71	13	3
nombre réel d'adultes	98	86	71	13	3
% corrigé de réduction d'émergence	2	12,3	27,6	86,7	96,9

Evaluation du pourcentage de réduction d'émergence imaginaire d'*Aedes aegypti* après traitement des larves stade III-IV avec l'OMS 2017 (WP 25 %).

1 Droite de Henry : $y = 1,14 x + 3,86$ (Figure 4)

a : 1,14 Ecart-type : 0,170

b : 3,86 Ecart-type : 0,135

2 Test d'hétérogénéité autour de la droite théorique

Khi2 observé : 7,58 (d.d.l : 3)

Probabilité : 0,0375 \Rightarrow Hétérogénéité significative

3 Doses sublétales calculées

DL30 = 0,0034 et $0,0025 < IE 30 < 0,0045$ mg/l

DL50 = 0,009 et $0,007 < IE 50 < 0,014$ mg/l

DL90 = 0,13 et $0,06 < IE 90 < 0,53$ mg/l

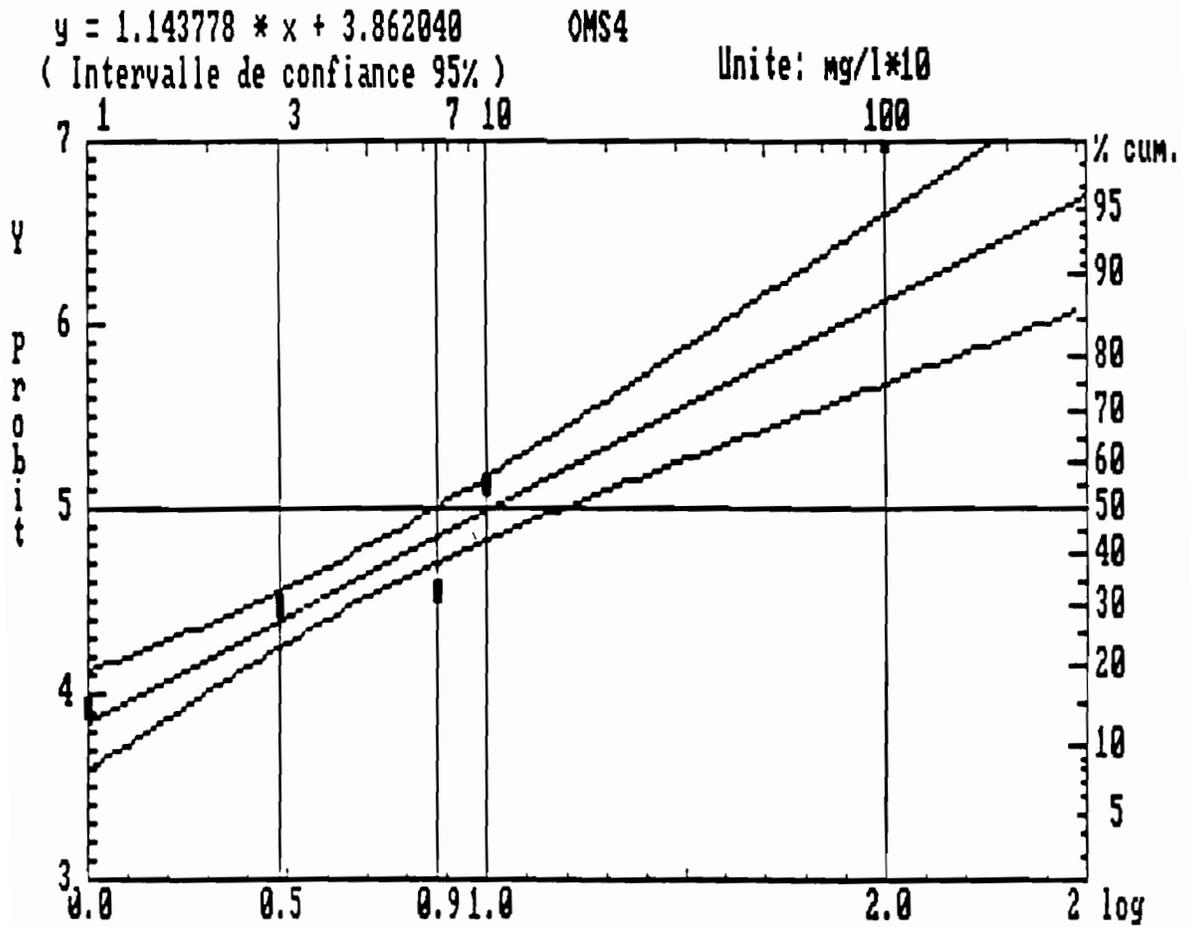


Figure 4 : Sensibilité des larves d'*Aedes aegypti* de stade III-IV
 à l'OMS 2017 WP 25 %.

Evaluation insecticide du diflubenzuron

ESSAI 1

concentrations en mg /l	témoin	0,0001	0,001	0,005	0,01	0,1
nombre de larves testées	100	100	100	100	100	100
mortalité larvaire	1	1	20	7	28	90
mortalité nymphale	1	8	15	24	43	10
mortalité à l'émergence	1	2	4	12	14	0
mortalité post-émergence	0	6	1	4	1	0
nombre d'adultes récoltés	97	89	61	57	15	0
nombre réel d'adultes	97	83	60	53	14	0
% corrigé de réduction d'émergence	3	14,4	38,1	45,4	85,6	100

Evaluation du pourcentage de réduction d'émergence imaginaire d'*Aedes aegypti* après traitement des larves stade III-IV avec le DFB (WP 25 %).

1 Droite de Henry : $y = 0,86 x + 3,82$ (Figure 1)

a : 0,86 Ecart-type : 0,098

b : 3,82 Ecart-type : 0,145

2 Test d'hétérogénéité autour de la droite théorique

Khi2 observé : 19,52 (d.d.l : 3)

Probabilité : 0,0002 ==> Hétérogénéité très hautement significative

3 Doses sublétales calculées

DL30 = 0,00057 et $0,00034 < IE 30 < 0,00087$ mg/l

DL50 = 0,0023 et $0,0016 < IE 50 < 0,0034$ mg/l

DL90 = 0,07 et $0,03 < IE 90 < 0,21$ mg/l

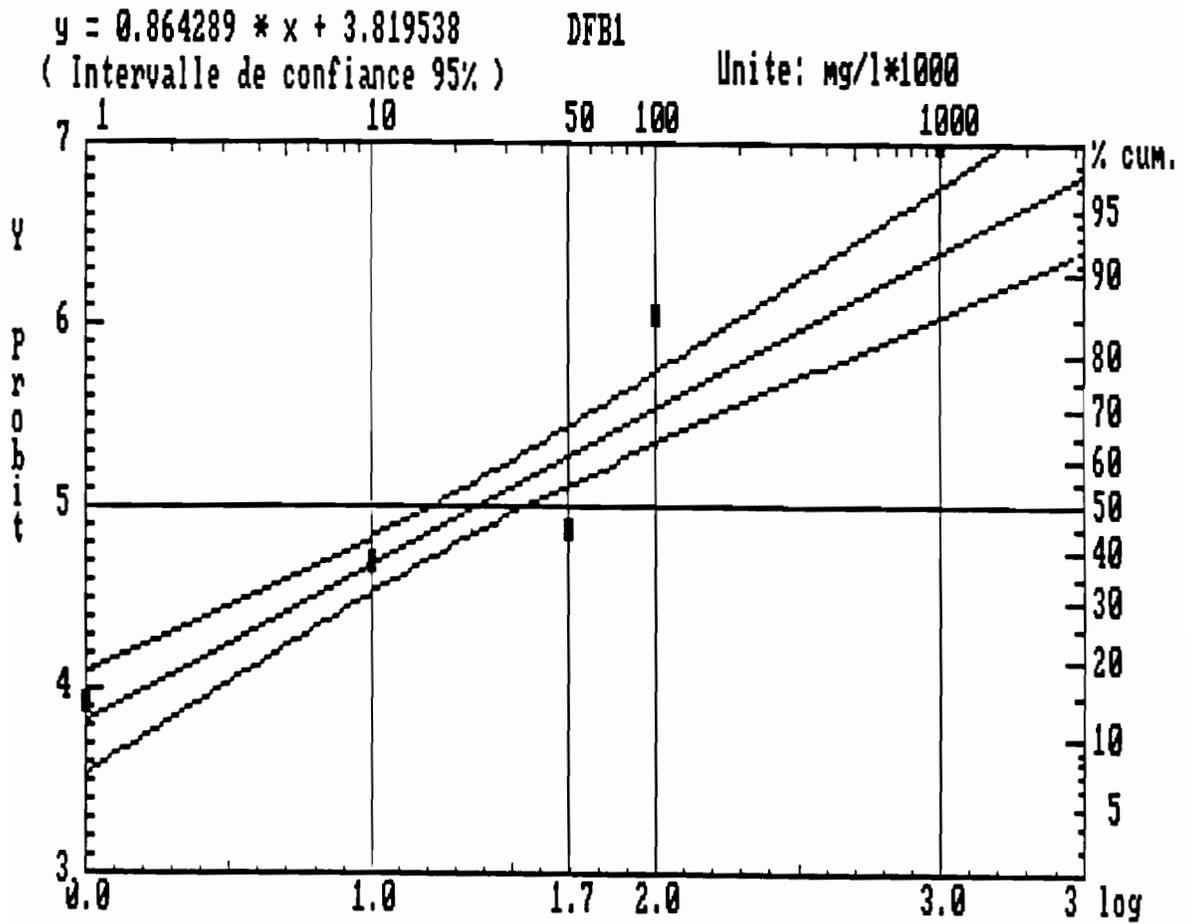


Figure 1 : Sensibilité des larves d'*Aedes aegypti* de stade III-IV
 au diflubenzuron WP 25 %.

ESSAI 2

concentrations en mg /l	témoin	1E-05	5E-05	0,0001	0,0005	0,001	0,005
nombre de larves testées	100	99	100	101	100	100	99
mortalité larvaire	0	0	3	1	2	9	32
mortalité nymphale	1	1	5	1	6	20	26
mortalité à l'émergence	0	0	4	0	2	6	9
mortalité post-émergence	9	28	33	44	12	24	25
nombre d'adultes récoltés	99	98	88	99	90	65	32
nombre réel d'adultes	90	70	55	55	78	41	7
% corrigé de réduction d'émergence	10	21,4	38,9	39,5	13,3	54,4	92,1

Evaluation du pourcentage de réduction d'émergence imaginale d'*Aedes aegypti* après traitement des larves stade III-IV avec le DFB (WP 25 %).

1 Droite de Henry : $y = 0,61 x + 4,18$ (Figure 2)

a : 0,61 Ecart-type : 0,075

b : 4,18 Ecart-type : 0,118

2 Test d'hétérogénéité autour de la droite théorique

Khi2 observé : 38,23 (d.d.l : 5)

Probabilité : 0,00001 ==> Hétérogénéité très hautement significative

3 Doses sublétales calculées

DL30 = 0,0003 et $0,00013 < IE 30 < 0,0002$ mg/l

DL50 = 0,0022 et $0,0013 < IE 50 < 0,0037$ mg/l

DL90 = 0,28 et $0,09 < IE 90 < 1,94$ mg/l

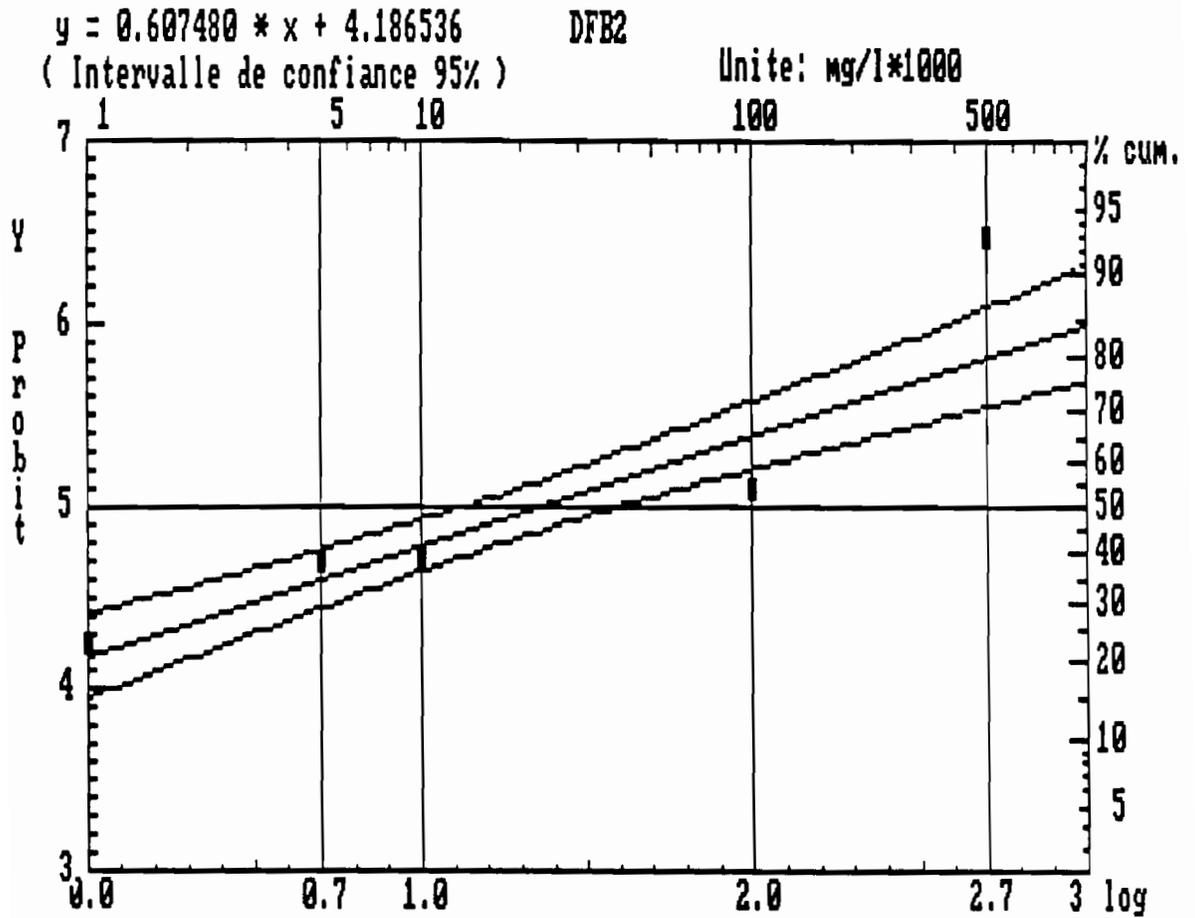


Figure 2 : Sensibilité des larves d'*Aedes aegypti* de stade III-IV
 au diflubenzuron WP 25 %.

ESSAI 3

concentrations en mg /l	témoin	1E-05	0,0001	0,0005	0,001	0,005
nombre de larves testées	100	100	101	101	101	101
mortalité larvaire	4	3	3	5	18	40
mortalité nymphale	4	1	2	10	23	49
mortalité à l'émergence	0	1	1	4	10	6
mortalité post-émergence	1	13	3	4	5	2
nombre d'adultes récoltés	92	95	95	82	50	6
nombre réel d'adultes	91	82	92	78	45	4
% corrigé de réduction d'émergence	9	9,9	0,1	15,1	51,0	95,7

Evaluation du pourcentage de réduction d'émergence imaginaire d'*Aedes aegypti* après traitement des larves stade III-IV avec le DFB (WP 25 %).

1 Droite de Henry : $y = 0,83 x + 3,38$ (Figure 3)

a : 0,83 Ecart-type : 0,117

b : 3,38 Ecart-type : 0,226

2 Test d'hétérogénéité autour de la droite théorique

Khi2 observé : 24,11 (d.d.l : 3)

Probabilité : 0,00001 \Rightarrow Hétérogénéité très hautement significative

3 Doses sublétales calculées

DL30 = 0,0002 et $0,0001 < IE 30 < 0,00034$ mg/l

DL50 = 0,00086 et $0,00051 < IE 50 < 0,00144$ mg/l

DL90 = 0,0296 et $0,0113 < IE 90 < 0,149$ mg/l

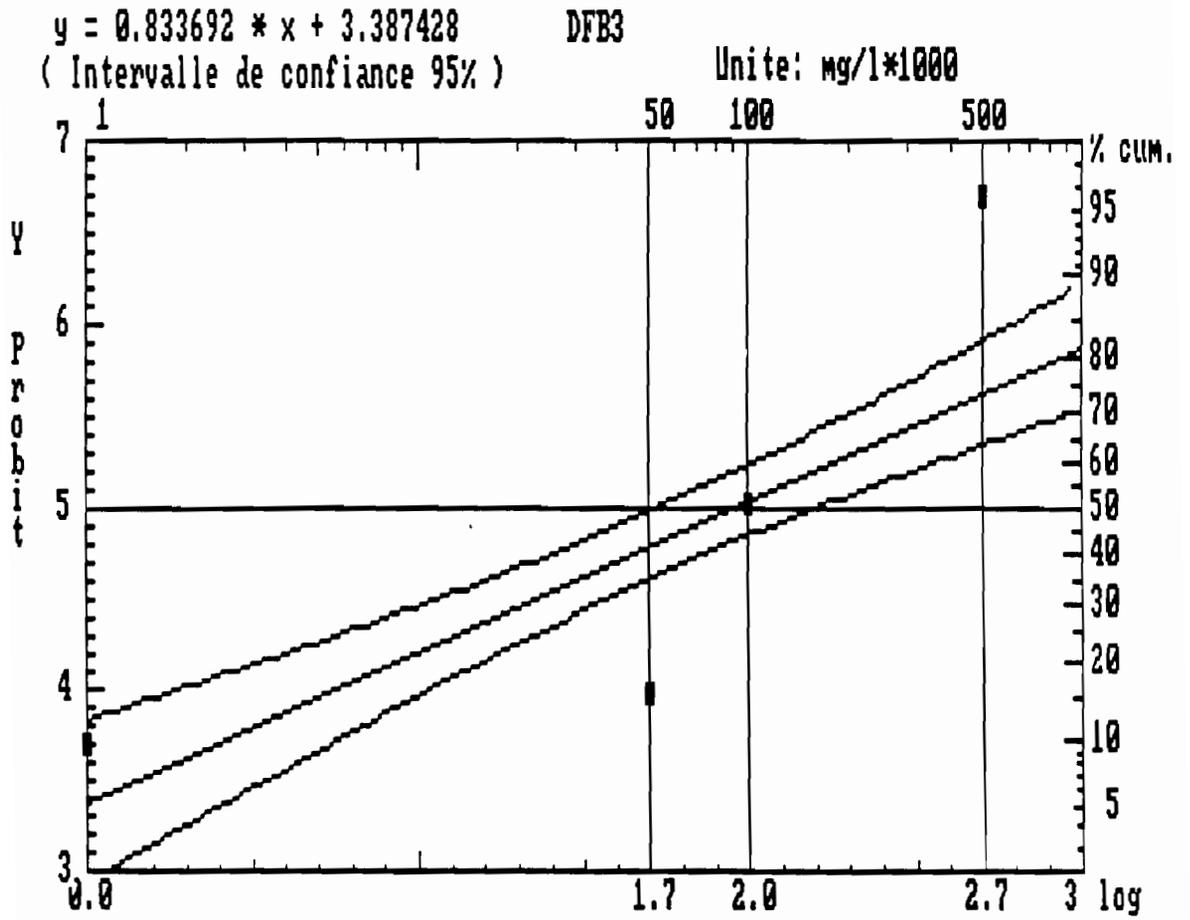


Figure 3 : Sensibilité des larves d'*Aedes aegypti* de stade III-IV
 au diflubenzuron WP 25 %.

ESSAI 4

concentrations en mg /l	témoin	0,0001	0,0005	0,0008	0,001	0,0025	0,005
nombre de larves testées	100	100	99	97	97	98	98
mortalité larvaire	1	3	19	10	19	16	17
mortalité nymphale	0	6	31	25	39	66	75
mortalité à l'émergence	0	4	4	6	7	5	3
mortalité post-émergence	0	3	4	2	3	0	0
nombre d'adultes récoltés	99	87	45	56	32	11	3
nombre réel d'adultes	99	84	41	54	29	11	3
% corrigé de réduction d'émergence	1	15,2	58,2	43,8	69,8	88,7	97,0

Evaluation du pourcentage de réduction d'émergence imaginaire d'*Aedes aegypti* après traitement des larves stade III-IV avec le DFB (WP 25 %).

1 Droite de Henry : $y = 1,58 x + 2,31$ (Figure 4)

a : 1,58 Ecart-type : 0,136

b : 2,31 Ecart-type : 0,259

2 Test d'hétérogénéité autour de la droite théorique

Khi2 observé : 12,11 (d.d.l : 4)

Probabilité : 0,0020 ==> Hétérogénéité hautement significative

3 Doses sublétales calculées

DL30 = 0,00026 et $0,00019 < IE 30 < 0,00033$ mg/l

DL50 = 0,0005 et $0,00042 < IE 50 < 0,00061$ mg/l

DL90 = 0,0035 et $0,0026 < IE 90 < 0,005$ mg/l

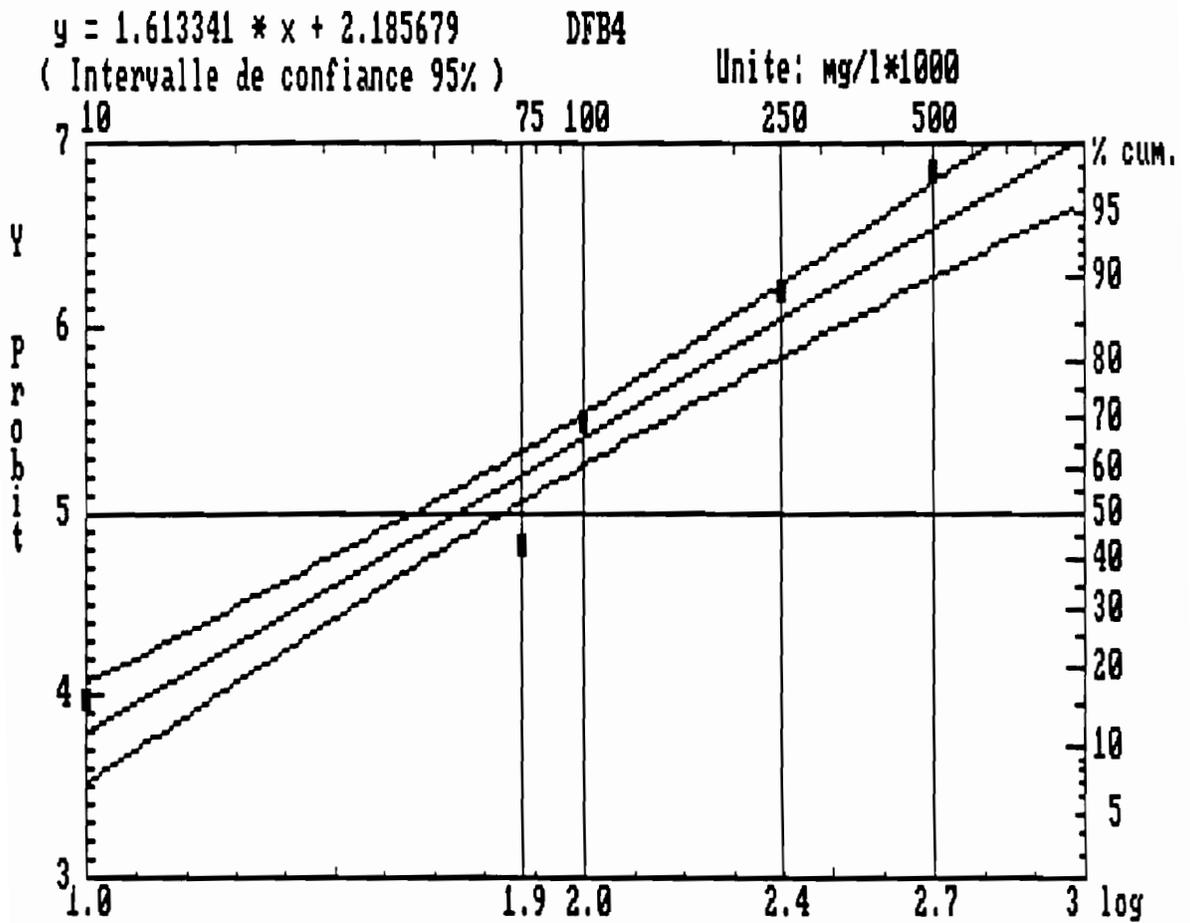


Figure 4 : Sensibilité des larves d'*Aedes aegypti* de stade III-IV au diflubenzuron WP 25 %.

ESSAI 5

concentrations en mg /l	témoin	0,0001	0,0003	0,0005	0,0008	0,001	0,0025
nombre de larves testées	100	100	101	99	99	97	97
mortalité larvaire	0	12	5	7	10	8	24
mortalité nymphale	1	8	4	13	11	28	46
mortalité à l'émergence	0	0	3	3	8	10	4
mortalité post-émergence	0	0	1	2	1	2	3
nombre d'adultes récoltés	99	80	89	76	70	51	23
nombre réel d'adultes	99	80	88	74	69	49	20
% corrigé de réduction d'émergence	1	19,2	12,0	24,5	29,6	49,0	79,2

Evaluation du pourcentage de réduction d'émergence imaginaire d'*Aedes aegypti* après traitement des larves stade III-IV avec le DFB (WP 25 %).

1 Droite de Henry : $y = 1,15 x + 2,61$ (Figure 5)

a : 1,15 Ecart-type : 0,135

b : 2,61 Ecart-type : 0,244

2 Test d'hétérogénéité autour de la droite théorique

Khi2 observé : 27,62 (d.d.l : 4)

Probabilité : 0,00001 \Rightarrow Hétérogénéité très hautement significative

3 Doses sublétales calculées

DL30 = 0,0004 et $0,0003 < IE 30 < 0,0005$ mg/l

DL50 = 0,0012 et $0,0008 < IE 50 < 0,0015$ mg/l

DL90 = 0,15 et $0,08 < IE 90 < 0,4$ mg/l

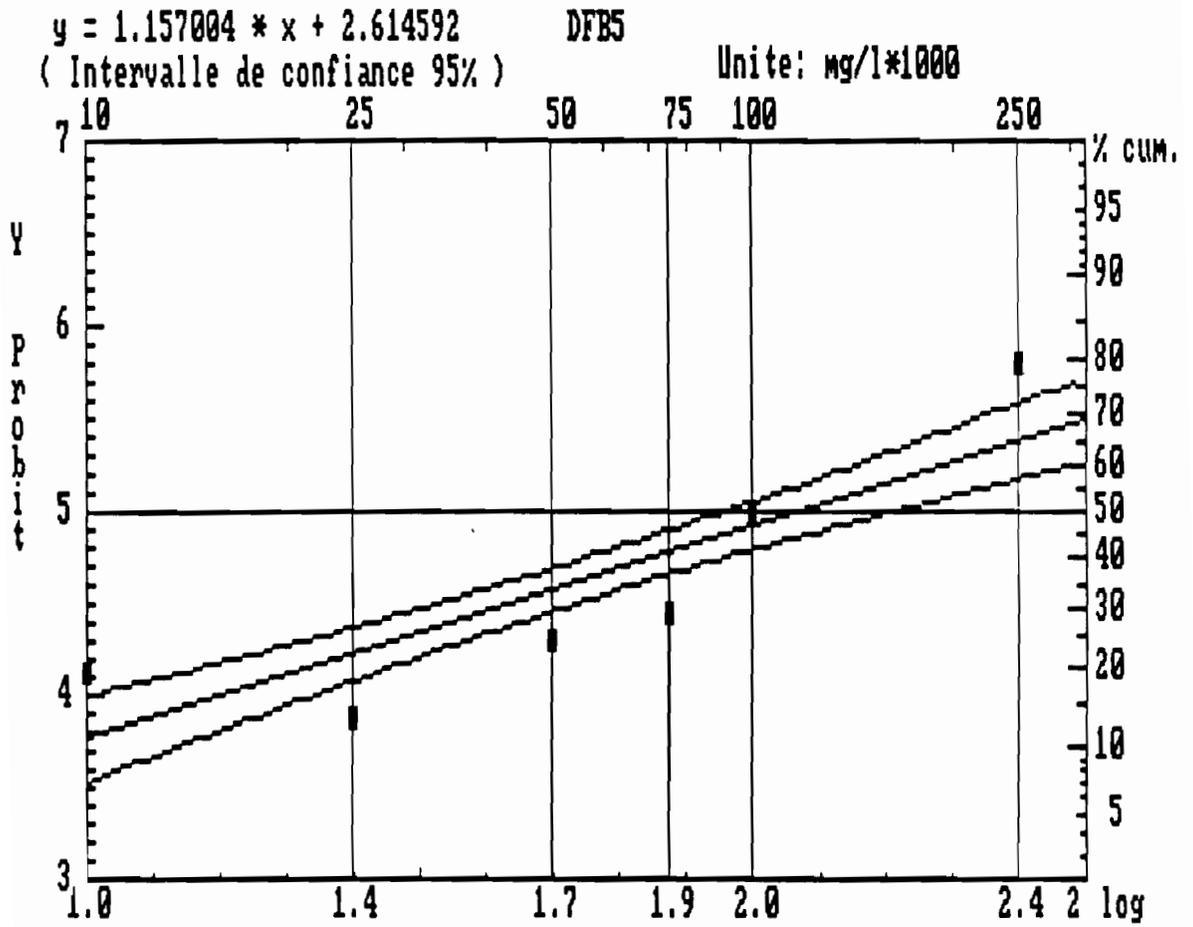


Figure 5 : Sensibilité des larves d'*Aedes aegypti* de stade III-IV au diflubenzuron WP 25 %.

Annexe 3

A - Schéma d'une plaque de dosage des ecdystéroïdes

La plaque obtenue peut ainsi être schématisée :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blc	Bo	62	4								
B												
C	AT	500	31									
D												
E	T	250	16									
F												
G	Bo	125	8									
H												

où :

Blc : blanc - 200 µl réactif d'Ellman ;

AT : activité totale - 5 µl traceur + 200 µl réactif d'Ellman ;

T : témoin - 100 µl tampon EIA + 50 µl traceur + 200 µl réactif d'Ellman ;

Bo : activité enzymatique en absence de compétiteur - 50 µl tampon EIA + 50 µl traceur + 50 µl antisérum anti - 20E + 200 µl réactif d'Ellman ;

puits 2C à 4A : 50 µl d'une solution d'ecdysone standard à des concentrations comprises entre 500 pg / 50 µl et 4 pg / 50 µl + 50 µl traceur + 50 µl antisérum anti - 20E + 200 µl réactif d'Ellman ;

puits 4C à 12H : 50 µl échantillon biologique + 50 µl traceur + 50 µl antisérum anti - 20E + 200 µl réactif d'Ellman.

B - Dosage des ecdystéroïdes chez les larves

	TEMOINS	OMS 2017	DFB
L ₀	15 (5)	15 (5)	15 (5)
L ₂₄	15 (8)	26 (10)	15 (9)
L ₂₈	15 (8)	21 (10)	15 (9)
L ₃₂	29 (10)	20 (8)	15 (6)
L ₃₄	15 (9)	15 (7)	15 (8)
L ₃₆	21 (9)	17 (10)	15 (7)
L ₃₈	15 (7)	15 (6)	15 (10)
L ₄₀	30 (10)	15 (9)	15 (10)
L ₄₂	37 (8)	22 (10)	15 (10)
L ₄₄	35 (10)	19 (9)	18 (10)
L ₄₆	20 (8)	36 (8)	30 (6)
L ₄₈	29 (8)	23 (9)	18 (10)
L ₅₀	25 (8)	15 (9)	26 (10)
L ₅₂	46 (8)	17 (8)	59 (7)
L ₅₄	43 (8)	25 (10)	49 (5)
L ₅₆	25 (7)	50 (9)	27 (9)
L ₅₈	165 (10)	72 (5)	159 (9)
L ₆₀	48 (10)	62 (9)	51 (10)
L ₆₂	24 (10)	91 (9)	34 (10)
L ₆₄	139 (10)	173 (7)	57 (9)
L ₆₆	67 (10)	96 (8)	97 (9)
L ₆₈	45 (10)	31 (10)	129 (10)
L ₇₀	61 (10)	72 (8)	81 (10)

Tableau 1 : Taux moyens d'ecdystéroïdes mesurés sur des larves de stade IV ayant été soumises à un traitement par l'OMS 2017 et le DFB au temps L₀.

(-) : mesure non effectuée et chiffres entre parenthèses correspondent aux effectifs des échantillons dosés.

C - Dosage des ecdystéroïdes chez les mâles nymphes et adultes

	TEMOINS	OMS 2017	DFB
nymphes			
N₀	54 (6)	55 (5)	59 (5)
N₈	475 (2)	451 (6)	342 (5)
N₁₆	274 (6)	237 (10)	257 (5)
N₂₀	126 (3)	85 (3)	106 (5)
N₂₄	57 (5)	76 (8)	46 (4)
N₂₈	47 (4)	65 (9)	41 (5)
N₄₄	18 (6)	21 (5)	16 (5)
adultes			
M₀	32 (10)	27 (11)	17 (7)
M₁₀	18 (10)	22 (9)	19 (9)
M₂₄	18 (10)	15 (10)	15 (9)
M_{VII}	15 (9)	15 (9)	15 (10)

Tableau 2 : Taux moyens d'ecdystéroïdes mesurés sur des nymphes et des adultes mâles ayant survécu à un traitement larvaire par l'OMS 2017 et le DFB (les chiffres entre parenthèses correspondent aux effectifs des échantillons dosés).

D - Dosage des ecdystéroïdes chez les femelles nymphes et adultes

	TEMOINS	OMS 2017	DFB
nymphes			
N ₀	52 (3)	105 (6)	117 (4)
N ₈	239 (5)	278 (8)	282 (5)
N ₁₆	412 (4)	468 (4)	366 (5)
N ₂₀	138 (3)	119 (4)	183 (3)
N ₂₄	85 (3)	117 (5)	192 (6)
N ₄₄	20 (5)	18 (4)	20 (6)
adultes			
F ₀	43 (14)	35 (13)	15 (10)
F ₁₀	15 (12)	39 (8)	15 (7)
F ₂₄	21 (8)	22 (10)	15 (10)
FG ₀	23 (6)	24 (5)	15 (5)
FG ₄	15 (5)	15 (5)	15 (5)
FG ₈	15 (2)	27 (2)	33 (3)
FG ₁₄	56 (3)	82 (3)	79 (4)
FG ₁₆	48 (3)	74 (4)	47 (3)
FG ₁₈	58 (4)	83 (3)	73 (4)
FG ₂₀	124 (4)	130 (5)	105 (3)
FG ₂₄	179 (15)	163 (15)	153 (5)
FG ₂₈	128 (4)	134 (5)	118 (4)
FG ₄₈	22(5)	25 (17)	15 (5)
F _X	21 (2)	24 (11)	17 (5)

Tableau 3 : Taux moyens d'ecdystéroïdes mesurés sur des nymphes et des adultes femelles ayant été soumis à un traitement par l'OMS 2017 et le DFB au stade larvaire (les chiffres entre parenthèses correspondent aux effectifs des échantillons dosés).

Annexe 4

Relevé des différents stades de *M. dessetae* en fonction de leur position chez les femelles témoins

	tête			thorax			abdomen			f. anormales
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	
1	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2L2
2	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0
3	0	0	4	0	0	0	0	6	6	1L3
4	0	0	10	0	0	3	0	2	5	1L2
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	2	0	0	0	0	2	2	1L2
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	3	0	0	0	0	0	1	1L2
11	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	6	3	0
13	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0
14	0	0	0	0	0	0	0	2	0	2L2
15	0	0	14	0	0	0	0	1	0	0
16	0	0	3	0	0	1	0	2	10	1L2
17	0	0	6	0	0	0	0	1	6	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
19	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0
20	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0
22	0	0	5	0	0	0	0	1	9	1
23	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	3	0	0	0	0	2	10	0
26	0	0	1	0	0	0	0	0	2	1L2
27	0	0	1	0	0	0	0	4	2	0
28	0	0	4	0	0	0	0	0	2	0
29	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
30	0	0	4	0	0	0	0	0	5	0
31	0	0	4	0	0	0	0	1	2	1L3 + 2L2
32	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
33	0	0	6	0	0	0	0	0	0	3L2
34	0	0	0	0	0	1	0	0	4	1L2
35	0	0	5	0	0	0	0	4	2	1L2
36	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
37	0	0	0	0	1	2	0	0	1	0
38	0	0	11	0	0	0	0	1	4	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	10	0	0	0	0	2	26	1L2
42	0	0	7	0	0	0	0	0	9	5L3+3L2
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	0	0	20	0	0	0	0	0	7	1L2
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	3	0	0	0	0	0	3	1L2
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1L2
48	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1L3
49	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
54	0	0	13	0	0	1	0	1	8	0
55	0	0	2	0	0	0	0	0	4	0
56	0	0	2	0	0	0	0	2	2	1L3
57	0	0	1	0	0	2	0	1	2	0
58	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
59	0	0	0	0	0	1	0	0	10	0
60	0	0	11	0	0	0	0	0	3	0
61	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1L3+1L2
62	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	5	0	0	0	0	2	2	3L3
64	0	0	18	0	0	3	0	0	6	2L3
65	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1L3
66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3L2
67	0	0	5	0	0	1	0	1	2	1L3
68	0	0	1	0	0	0	0	0	3	1L3
69	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	3	0	0	0	0	0	5	1L3
total	0	0	221	0	1	15	1	50	190	-

Relevé des différents stades de *M. dessetae* en fonction de leur position chez les femelles traitées par l'OMS 2017

	tête			thorax			abdomen			f. anormales
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	
1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1L2
2	0	0	1	0	0	0	0	0	2	0
3	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
5	0	0	1	0	0	0	0	1	1	5L3+1L2
6	0	0	2	0	2	3	0	3	2	1L3
7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1L3
8	0	0	3	0	0	0	0	0	4	1L3
9	0	0	0	0	0	0	0	2	3	0
10	0	0	0	0	0	0	0	1	4	0
11	0	0	24	0	0	0	0	0	5	0
12	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
14	0	0	16	0	0	0	0	0	1	4L3
15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2L2
16	0	0	2	0	0	1	0	0	3	0
17	0	0	24	0	0	1	0	0	4	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	2	0	0	0	0	0	5	0
20	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
21	0	0	5	0	0	0	0	2	3	0
22	0	0	4	0	0	0	0	0	3	0
23	0	0	0	0	0	0	0	2	1	1L2
24	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0
25	0	0	0	0	0	0	0	1	6	0
26	0	0	8	0	0	1	0	0	5	0
27	0	0	6	0	0	0	0	4	4	2L2
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	3	0	0	0	0	0	0	2L2
30	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32	0	0	11	0	0	3	0	0	3	2L2
33	0	0	8	0	0	2	0	0	13	5L2
34	0	0	2	0	0	0	0	0	6	2L2
35	0	0	1	0	0	0	0	3	3	2L2
36	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	11	0	0	1	0	0	1	0
40	0	0	0	0	0	0	0	1	2	3L2
41	0	0	3	0	0	0	0	2	5	0
42	0	0	6	0	1	0	0	0	3	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
44	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1L3
50	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
51	0	0	4	0	0	0	0	1	1	0
52	0	0	5	0	0	0	0	0	2	1L3
53	0	0	4	0	0	1	0	0	1	2L3+1L2
54	0	0	0	0	0	0	0	0	4	1L3+2L2
55	0	0	4	0	0	0	0	0	1	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2L3+2L2
57	0	0	9	0	0	0	0	0	1	3L2+1L3
58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
59	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0
62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2L3
63	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
64	0	0	5	0	0	1	0	1	1	0
65	0	0	11	0	0	0	0	2	3	2L2
66	0	0	14	0	0	0	0	0	1	3L3
67	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
70	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
total	0	0	230	0	3	18	0	32	123	-

Relevé des différents stades de *M. dessetae* en fonction de leur position chez les femelles traitées par le diflubenzuron

	tête			thorax			abdomen			f. anormales
	L1	L2	L3	L1	L2	L3	L1	L2	L3	
1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0
2	0	0	4	0	0	0	0	0	2	0
3	0	0	3	0	0	1	0	0	1	1L2
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	4	0	0	0	0	0	2	1L2+1L3
6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
7	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
8	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3L2
11	0	0	22	0	0	2	0	0	5	1L2
12	0	0	8	0	0	0	0	0	4	1L2
13	0	0	0	0	0	0	0	5	0	1L3
14	0	0	10	0	0	0	0	3	2	1L2
15	0	0	5	0	0	1	0	4	3	1L3+1L2
16	0	0	3	0	0	1	0	1	2	1L2
17	0	0	7	0	0	0	0	0	2	1L2
18	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
19	0	0	6	0	0	0	0	1	2	1L2
20	0	0	4	0	0	0	0	4	2	1L2
21	0	0	12	0	0	0	0	0	2	0
22	0	0	4	0	0	0	0	2	7	0
23	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0
24	0	0	11	0	0	2	0	1	3	0
25	0	0	2	0	0	0	0	0	16	0
26	0	0	0	0	0	4	0	6	3	0
27	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0
28	0	0	1	0	0	1	0	0	3	0
29	0	0	5	0	0	1	0	1	6	2L2
30	0	0	9	0	0	0	0	0	4	0
31	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
32	0	0	4	0	0	0	0	0	0	1L2
33	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
34	0	0	4	0	2	0	0	2	6	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	18	0	0	5	0	0	13	4L2
38	0	0	13	0	0	0	0	0	4	0
39	0	0	2	0	0	0	0	1	1	0
40	0	0	2	0	0	0	0	2	0	0
41	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0
42	0	0	1	0	0	3	0	0	3	0
43	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1L3
46	0	0	3	0	0	0	0	0	1	0
47	0	0	8	0	0	2	0	1	4	0
48	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1L3
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	14	0	0	1	0	0	4	1L2
51	0	0	6	0	0	0	0	0	3	0
52	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0
53	0	0	12	0	0	1	0	0	5	1L3
54	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
57	0	0	1	0	0	1	0	0	5	3L3
58	0	0	10	0	0	0	0	0	8	2L2
59	0	0	3	0	0	0	0	0	4	4L2
60	0	0	7	0	0	0	0	1	0	1L3
61	0	0	20	0	0	0	0	0	6	0
62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
63	0	0	12	0	0	0	0	1	2	2L3
64	0	0	5	0	0	0	0	1	1	0
65	0	0	7	0	0	0	0	0	2	1L3+2L2
66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
67	0	0	3	0	0	0	0	0	0	1L3
68	0	0	3	0	0	1	0	2	3	1L2
69	0	0	2	0	0	1	0	0	3	0
70	0	0	9	0	0	0	0	0	4	0
71	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72	0	0	7	0	0	1	0	0	6	0
73	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
74	0	0	3	0	0	0	0	0	2	0
total	0	0	310	0	4	32	0	47	171	

Le souci d'évaluer le devenir des populations qui ont survécu à un traitement insecticide a motivé notre travail. En effet, l'existence de troubles physiologiques transformant ces survivants en individus meilleurs reproducteurs et/ou meilleurs vecteurs est une éventualité dont il faut se préoccuper.

Les traitements insecticides ont été réalisés avec deux régulateurs de croissance appartenant aux inhibiteurs de la mue, l'OMS 2017 et le diflubenzuron. Ces produits, en intervenant au niveau des mécanismes hormonaux qui régissent la croissance et le développement des insectes, sont à même de provoquer des troubles fonctionnels de la reproduction et de la capacité vectorielle.

Chacun des insecticides a été utilisé sur *Aedes aegypti*, vecteur historique de la fièvre jaune, à une concentration provoquant seulement une réduction d'émergence partielle et leurs effets ont été analysés sur le potentiel reproducteur.

Bien qu'appartenant tous deux à la famille des substitués de l'urée, les effets de ces deux IGR ne sont pas les mêmes, l'OMS 2017 provoquant une réduction du potentiel reproducteur plus marquée que le diflubenzuron. Ces différences semblent s'expliquer par le fait que l'OMS 2017 agirait au moment de la mise en place des organes génitaux, tandis que le diflubenzuron agirait davantage sur le processus de la vitellogenèse. L'effet des deux IGR sur la production des ecdystéroïdes est différent. L'OMS 2017 inhibe l'un des pics larvaires, expliquant peut-être ainsi son action au niveau de l'organogenèse, alors que le diflubenzuron agit sur le taux de base des ecdystéroïdes.

L'étude de l'effet de ces produits sur la capacité vectorielle d'*A. aegypti* souligne l'importance de suivre le devenir des populations résiduelles. Les survivants des traitements insecticides ne produisent pas plus de filaires infestantes mais la proportion de femelles infestantes augmente dans les lots traités.

Les insecticides peuvent donc agir sur les fonctions physiologiques des insectes ciblés. La transmission d'agents pathogènes peut également être affectée. Ces résultats nous conduisent à suggérer la nécessité de prendre en compte ces paramètres lors des tests d'évaluation des insecticides.

Mots-Clés : *Aedes aegypti* - Régulateurs de croissance - Potentiel reproducteur - Ecdystéroïdes - Capacité vectorielle.

Summary

Few studies deal with the assessment of the turn of a population which has been in contact with an insecticide. However the survival fraction of the population may present some physiological troubles of the reproductive capacity and/or of the vectorial capacity.

Two insect growth regulators, the OMS 2017 and the diflubenzuron which are antagonists of ecdysteroids were used. The impact of sublethal concentrations of the two insecticides on the historical vector of yellow fever, *Aedes aegypti* was studied.

Although the OMS 2017 and the diflubenzuron are both benzoyl urea, they seem to act differently. The OMS 2017 induces a reduction of the reproductive capacity but not the diflubenzuron. Their modes of action are probably different : the OMS 2017 acts early when the genital organs are organized when the diflubenzuron may interfere with vitellogenesis.

The turn of these IGR on the ecdysteroids production, which may explain theirs effects is examined. The OMS 2017 inhibits one of the larval peaks and the diflubenzuron acts on the lower titres.

The results about the effects of the two IGRs' on the vectorial capacity show that there are more infested females in the treated samples although the production of L3 is not increased probably because of the limitation phenomenon.

This study emphasizes the importance to follow the residual population after a treatment in order to control the apparition of best vectors with a better reproductive capacity.

It becomes evident that insecticides may disturb vectors such as their reproductive and vectorial fonctions are affected. These results suggest the importance to enclose these parameters when the efficacy of an insecticide is studied.

Key-words : *Aedes aegypti* - Insect Growth Regulators - Reproductive capacity - Ecdysteroids - Vectorial capacity.