

ORSAY
n° d'ordre :

UNIVERSITÉ DE PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

T H E S E

présentée
Pour obtenir

Le grade de Docteur es Sciences Naturelles

par

Pierre GUILLET

Sujet :

**LA LUTTE CONTRE LES VECTEURS DE L'ONCHOCERCOSE EN AFRIQUE DE L'OUEST :
ÉTUDE DE LA RÉSISTANCE ET RECHERCHE DE NOUVEAUX LARVICIDES.**

Soutenu le 22 Octobre 1985 devant la Commission d'examen

MM.	J. BERGERARD	Président
	J. MOUCHET	Rapporteur
	F. RAMADE	
	B. PHILIPPON	Examineurs
	J. COZ	

NOM GUILLET

PRENOM Pierre

TITRE LA LUTTE CONTRE LES VECTEURS DE L'ONCHOCERCOSE
EN AFRIQUE DE L'OUEST

ETUDE DE LA RESISTANCE ET RECHERCHE DE NOUVEAUX LARVICIDES.

RESUME

Des méthodes ont été mises au point pour évaluer l'efficacité de différentes classes d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs de l'onchocercose dans le cadre d'un vaste Programme de lutte en Afrique de l'Ouest.

Une résistance au téméphos a été mise en évidence, suivie d'une résistance aux autres composés organophosphorés. Compte-tenu des perspectives limitées offertes par les insecticides conventionnels, on a évalué l'efficacité de nouvelles classes d'insecticides, en particulier les régulateurs de croissance et les agents de lutte biologique.

Les résultats limités obtenus avec les premiers n'ont pas encore permis d'envisager leur utilisation. Les facteurs qui conditionnent l'efficacité du *Bacillus thuringiensis* H14 ont été étudiés ; un type de formulation adapté à l'utilisation sur le terrain a été sélectionné.

Cet entomopathogène peut être produit industriellement en très grandes quantités ; son utilisation a rapidement atteint le stade opérationnel pour le traitement des larves résistantes aux insecticides. Les risques de développement d'une résistance à la toxine bactérienne sont très faibles mais ont toutefois été pris en compte. L'amélioration des formulations va permettre d'étendre sensiblement leurs possibilités d'utilisation.

MOTS CLES : Onchocercose, lutte antivectorielle, larvicides, résistance, *Bacillus thuringiensis* H14 (formulations).

AVANT-PROPOS

Le Programme de lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest (OCP)*, mis en place par l'Organisation mondiale de la Santé en 1974, couvre actuellement sept états soit 764 000 km² d'un seul tenant. Il est prévu pour durer environ 20 ans compte-tenu de la longévité du parasite chez l'homme. Chaque semaine, selon la saison, de 6 000 à 23 000 km de rivières sont surveillés et au besoin traités.

Il s'agit là de la plus importante opération de lutte antivectorielle actuellement en cours. Lors de sa mise en place en 1974, le Programme de lutte reposait sur une seule méthode : la lutte antivectorielle, et disposait d'un seul insecticide : le téméphos.

La recherche de nouveaux insecticides utilisables à grande échelle était et demeure une des priorités du Programme :

- pour faire face aux problèmes posés par la résistance aux insecticides,
- pour limiter l'impact des traitements sur l'environnement en recherchant des larvicides aussi sélectifs que possible,
- pour limiter également le coût des traitements qui représentent une part importante des fonds consacrés à cette opération.

C'est dans ce contexte que se sont déroulés nos travaux. Plusieurs contrats de recherches (15 au total de 1976 à 1984) ont été passés entre l'OCCGE ** et l'OMS, et plus précisément :

- le Programme de lutte OCP,
- la division VBC (biologie des vecteurs et lutte antivectorielle)
- et le Programme spécial TDR PNUD/OMS/Banque mondiale/FAO de recherches et de formation concernant les maladies tropicales.

* OCP : Onchocerciasis Control Project.

** OCCGE : Organisation de Coopération et de Coordination pour la lutte contre les Grandes Endémies.

Les objectifs successifs de ces recherches ont été :

- La mise au point de méthodologies permettant de tester l'efficacité des larvicides antisimulidiens contre les larves du complexe *Simulium damnosum*.

- L'évaluation de tous les larvicides expérimentaux produits par l'industrie.

- L'évaluation de la sensibilité de base aux insecticides des populations larvaires du complexe *S. damnosum* dans la zone du Programme, leur suivi, et l'étude des phénomènes de résistance.

- La recherche de nouveaux insecticides utilisables contre les populations résistantes aux insecticides.

L'ensemble des travaux a été réalisé à l'Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et sur l'Onchocercose (Institut Pierre Richet) de l'OCCGE situé à Bouaké en Côte d'Ivoire. Nombreuses sont les personnes qui m'ont apporté au cours de ce travail leur soutien moral et matériel, parmi lesquelles il m'est agréable de remercier ici :

- Monsieur le Directeur Général de l'ORSTOM, pour les facilités qu'il m'a accordées dans la réalisation et la rédaction de ce travail.

- Monsieur le Docteur C. SOW, Secrétaire Général de l'OCCGE jusqu'en 1984, qui nous a accueillis dans son organisation et nous a permis de réaliser ce travail dans d'excellentes conditions.

- Messieurs M.LS. BAZIN et le Docteur E.M. SAMBA, Directeurs successifs du Programme de lutte, qui ont en grande partie financé ces travaux.

- Monsieur J. MOUCHET, Inspecteur Général de Recherches honoraire de l'ORSTOM, qui nous a fait bénéficier de sa grande expérience de la lutte antivectorielle et auprès de qui nous avons trouvé au cours de la réalisation de ce travail et de la rédaction une disponibilité remarquable et des conseils précieux ; qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude et de mon amitié.

- Monsieur J. BERGERARD, Professeur de l'Université Paris Sud, qui a suivi avec intérêt le déroulement de nos travaux et m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

- Monsieur F. RAMADE, Professeur de l'Université Paris Sud, qui a bien voulu s'intéresser aux résultats de nos travaux et siéger au jury de thèse.

- Monsieur B. PHILIPPON, Directeur de l'IRTO puis Chef de l'unité de lutte antivectorielle du Programme OCP, qui a assuré en grande partie la direction scientifique de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de mon amitié.

- Monsieur J. COZ, Président de la Commission Scientifique ORSTOM des sciences biologiques appliquées à l'homme, qui m'a apporté son concours dans la rédaction de ce travail et a accepté de siéger au jury de thèse.

- Monsieur R. LE BERRE, de l'Organisation mondiale de la Santé, dont les conseils et l'amitié ont été des atouts précieux tout au long de notre étude ; qu'il trouve ici le témoignage de toute ma gratitude.

- Monsieur D. QUILLEVERE, Directeur de l'IRTO de 1980 à 1985, qui a dirigé en partie notre étude et nous a toujours judicieusement conseillés.

- Monsieur J.M. HOUGARD, qui m'a activement secondé pendant deux ans avant de prendre ma succession à Bouaké.

- Monsieur H. ESCAFFRE, pour son ingéniosité, son dynamisme et pour les nombreuses tournées en brousse que ce travail a nécessité ; je lui en suis vivement reconnaissant et lui témoigne mon amitié.

- Monsieur J. DUVAL, pour son expérience et ses qualités d'organisateur qui nous ont été précieuses durant les deux dernières années de notre étude.

- Monsieur J. HAMON, Chef de la division VBC de l'Organisation mondiale de la Santé puis assistant Directeur Général, qui nous a soutenus et encouragés dans nos premiers travaux sur les agents de lutte biologique et m'a permis d'apporter ma modeste contribution à l'orientation de la lutte biologique contre les vecteurs au sein du Programme TDR ; je lui en suis vivement reconnaissant.

- Monsieur D. KURTAK, de l'Organisation mondiale de la Santé, qui a collaboré spontanément à nos recherches et assumé en grande partie l'application de nos résultats ; qu'il trouve ici le témoignage de mon amitié.

- Monsieur G. QUELENNEC, de l'Organisation mondiale de la Santé, qui nous a conseillés et encouragés depuis le début de nos travaux.

- Messieurs V. SANOU, S. BAKAYOKO, B. SANOU, P. IDO KORO et O. SOGOMORI, fidèles et dévoués collaborateurs de "l'équipe insectides" de l'IRTO, sans lesquels cette étude n'aurait pu être menée à bien.

- les entomologistes et techniciens du Programme de lutte contre l'onchocercose, R. SUBRA, J. GRUNEWALD, M. OUEDRAOGO, M. OCRAN, A. AKPOBOUA, P. PANGALET, H. AGOUA, J. HENDERICKX et A. SEKETELI avec lesquels nous avons travaillé en étroite collaboration.

- Monsieur D. COURET, qui nous a initiés à l'utilisation des micro-ordinateurs et a réalisé nos programmes de traitement des données.

- Monsieur J. LAMOTTE, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure, qui m'a accueilli spontanément pour la rédaction de ce travail.

Nos remerciements s'adressent enfin aux autorités administratives Ivoiriennes, Maliennes et Guinéennes qui nous ont toujours réservé le meilleur accueil.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE : NOTE DE SYNTHESE ET RESUME

<u>INTRODUCTION</u>	13
LES PERFORMANCES DEMANDEES AUX LARVICIDES ANTISIMULIDIENS -----	
LE CHOIX DES FORMULATIONS -----	
LES DIFFERENTS TYPES DE FORMULATIONS UTILISABLES -----	
<u>L'EVALUATION DE L'ACTIVITE DES LARVICIDES ANTISIMULIDIENS</u>	
<u>SUR LES LARVES DU COMPLEXE <i>Simulium damnosum</i></u>	19
- Evaluation des larvicides chimiques -----	
- Evaluation des formulations de <i>Bacillus thuringiensis</i> H14 ----	
- Essais en rivière -----	
- Phases d'évaluation des larvicides -----	
<u>RESULTATS OBTENUS JUSQU'A LA MISE EN EVIDENCE DE LA RESISTANCE</u>	
<u>AU TEMEPHOS</u>	23
- avec les formulations micro-encapsulées -----	
- avec d'autres types de formulations -----	
<u>LES PHENOMENES DE RESISTANCE AUX INSECTICIDES</u>	
<u>DANS LE COMPLEXE <i>Simulium damnosum</i></u>	25
- La résistance au DDT -----	
- La résistance au téméphos -----	
- La résistance au chlorphoxime -----	
- Le phénomène de résistance croisée -----	
- Discussion -----	
<u>LA RECHERCHE DE NOUVEAUX INSECTICIDES UTILISABLES</u>	
<u>CONTRE LES LARVES RESISTANTES AUX ORGANOPHOSPHORES</u>	31
- Les insecticides régulateurs de croissance -----	
- Les agents de lutte biologique :	
- le <i>Bacillus thuringiensis</i> H14 -----	
- autres bactéries sporogènes -----	
- autres agents de lutte biologique -----	
<u>CONCLUSION</u>	40
<u>RESUME</u>	49

DEUXIEME PARTIE : ARTICLES PUBLIES OU SOUMIS POUR PUBLICATION

Note : LA LUTTE CONTRE LES VECTEURS DE L'ONCHOCERCOSE.

Un film de Pierre GUILLET réalisé avec Bernard SURRUGUE, produit par l'ORSTOM et l'Organisation mondiale de la Santé (film en 16 mm, durée 12 mn).

Ce film, projeté au cours de la soutenance, présente les méthodologies utilisées dans le cadre de cette étude. De ce fait, les deux manuscrits relatifs au même sujet et qui ne sont pas encore sous une forme définitive, n'ont pas été inclus dans le présent document.

EVALUATION DES INSECTICIDES CONVENTIONNELS

1 - Guillet, P. et Escaffre, H. - 1979.

10.065

La recherche de nouvelles formulations d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest.

Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical. Marseille, 1979.

P ② - Dejoux, C. et Guillet, P. - 1980.

x Evaluation of new blackfly larvicides for use in onchocerciasis control in West Africa.

Doc. mim. OMS, WHO/VBC/80.783.

RESISTANCE AUX INSECTICIDES

P ③ - Guillet, P., Mouchet, J. et Grebaut, S. - 1977.

x DDT resistance in *Simulium damnosum* s.l. (Diptera : Simuliidae) in West Africa.

Doc. mim. OMS, WHO/VBC/77.678.

4 - Guillet, P., Escaffre, H., Ouedraogo, M. et Quillévéré, D. - 1980.

4311A

Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XVIII (3).

P ⑤ - Kurtak, D.C., Ouedraogo, M., Ocran, M., Barro Télé et Guillet, P. 1982. Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae

x already resistant to temephos (Abate (R)).

Doc. mim. OMS, WHO/VBC/82.850.

- ⑥ - Guillet, P. et Kurtak, D.C. - 1985.
Cross-resistance to chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl in the larval populations of the *Simulium damnosum* complex already resistant to temephos in West Africa and its operational significance. Soumis pour publication à Tropenmed. Parasitol.

EVALUATION DES INSECTICIDES REGULATEURS DE CROISSANCE

- ⑦ - Guillet, P., Hougard, J.M., Doannio, J., Escaffre, H. et Duval, J. - 1985. Evaluation de l'activité d'un insecticide régulateur de croissance, le diflubenzuron, sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. I - Etude de quelques facteurs conditionnant l'efficacité. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM.
- ⑧ - Guillet, P., Hougard, J.M., Doannio, J., Escaffre, H. et Duval, J. - 1985. Evaluation de l'activité d'un insecticide régulateur de croissance, le diflubenzuron, sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. II - Efficacité comparée de quelques formulations et résultats des essais en rivière. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM.
- ⑨ - Guillet, P., Hougard, J.M., Doannio, J., Escaffre, H. et Duval, J. - 1985. Evaluation de l'activité de cinq insecticides régulateurs de croissance sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM.
- ⑩ - Guillet, P., Hougard, J.M., Doannio, J., Escaffre, H. et Duval, J. - 1985. Etude de l'activité de l'Avermectine MK 936 sur les larves des simulies vectrices de l'onchocercose appartenant au complexe *Simulium damnosum*. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM.
- ⑪ - Guillet, P., Sannier, C., Barrathe, J. et Andre, M. - 1985. Etude de la toxicité de l'Avermectine MK 936 pour les larves d'*Aedes aegypti* et de son influence sur la transmission de la filaire *Molinema dessetae* Bain. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM.

RECHERCHES SUR LE *Bacillus thuringiensis* H14 ET PERSPECTIVES OFFERTES
PAR LA LUTTE BIOLOGIQUE

- ⑫ - Guillet, P. - 1984.
Endotoxin of *Bacillus thuringiensis* H14 : mode of action, formulation and application against mosquito and blackfly larvae.
P. * Proceedings of the 6th european symposium on animal, plant and microbial toxins, Basle, 1984.
- ⑬ - Guillet, P. et de Barjac, H. - 1979.
Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves de Simulies vectrices de l'Onchocercose.
C.R. Acad. Sc. Paris, 289 D.

- ⑭ - Guillet, P. et Escaffre, H. - 1979.
Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l.
P_x I - Résultats des premiers essais réalisés sur le terrain.
Doc. mim. OMS, WHO/VBC/79.730.
- ⑮ - Guillet, P. et Escaffre, H. - 1979.
Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l.
P_x II - Efficacité comparée de trois formulations expérimentales.
Doc. mim. OMS, WHO/VBC/79.735.
- 16 - Guillet, P., Dempah, J. et Coz, J. - 1980.
Evaluation de *Bacillus thuringiensis* sérotype 14 de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l.
9943 III - Données préliminaires sur la sédimentation de l'endotoxine dans l'eau et sur sa stabilité en zone tropicale.
Doc. mim. OMS, WHO/VBC/80.756.
- ⑰ - Guillet, P., Escaffre, H., Prud'hom, J.M. et Bakayoko, S. - 1985.
Etude des facteurs conditionnant l'efficacité des préparations à base de *Bacillus thuringiensis* H14 vis-à-vis des larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera : Simuliidae).
I - Influence de la nature et de la taille des particules.
Soumis pour publication Cah. ORSTOM.
- ⑱ - Guillet, P., Escaffre, H., Prud'hom, J.M. et Bakayoko, S. - 1985.
Etude des facteurs conditionnant l'efficacité des préparations à base de *Bacillus thuringiensis* H14 vis-à-vis des larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera : Simuliidae).
II - Influence du temps de contact et de la quantité de particules naturelles en suspension dans l'eau.
Soumis pour publication Cah. ORSTOM.
- 19 - Guillet, P., Escaffre, H. et Prud'hom, J.M. - 1982.
L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest.
2741A I - Efficacité et modalités d'application.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XX (3).
- ⑳ - Lacey, L.A., Escaffre, H., Philippon, B., Sékétéli, A. Guillet, P. - 1982. Large river treatment with *Bacillus thuringiensis* (H14) for the control of *Simulium damnosum* s.l. in the onchocerciasis control programme.
Tropenmed. Parasitol., 33.
- 21 - Guillet, P., Escaffre, H. et Prud'hom, J.M. - 1982.
L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest.
2742A II - Stabilité dans les conditions de stockage en milieu tropical.
Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XX (3).

- (22) - Guillet, P., Doannio, J., Hougard, J.M., Escaffre, H. et Duval, J.
- 1985. Production de masse d'un agent de lutte biologique, le
Bacillus thuringiensis H14, pour la lutte contre les vecteurs de
l'onchocercose en Afrique de l'Ouest.
Soumis pour publication Cah. ORSTOM.
- 23 - Guillet, P. - 1985.
Present status and prospects for use of *Bacillus thuringiensis* H14
in onchocerciasis control.
F24450 XI International congress for tropical medicine and malaria, Calgary.
- (24) - Guillet, P., Escaffre, H. et Prud'hom, J.M. - 1982.
Bacillus thuringiensis H14, a biocontrol agent for onchocerciasis
control in West Africa.
P_x IIIrd international colloquium on invertebrate pathology, Brighton,
U.K., September 1982.
- (25) - Guillet, P., Hougard, J.M., Doannio, J., Escaffre, H. et Duval, J.
- 1985. Toxicité comparée du *Bacillus thuringiensis* H14 pour les
larves de moustiques et de simulies.
Soumis pour publication à Entomophaga.
- (26) - Guillet, P. et Duval, J. - 1985.
The effect of blending on the toxicity of *Bacillus thuringiensis*
serotype H14 preparations against mosquito and blackfly larvae.
Soumis pour publication à Entomophaga.
- (27) - Guillet, P., Hougard, J.M., Doannio, J., Escaffre, H. et Duval, J.
- 1985. Evaluation de la sensibilité des larves du complexe *Simulium*
damnosum à la toxine du *Bacillus thuringiensis* H14.
I - Méthodologie.
Soumis pour publication Cah. ORSTOM.
- (28) - Guillet, P., Hougard, J.M., Doannio, J., Escaffre, H. et Duval, J.
- 1985. Evaluation de la sensibilité des larves du complexe *Simulium*
damnosum à la toxine du *Bacillus thuringiensis* H14.
II - Sensibilité relative de quelques groupes d'espèces et possibi-
lités d'utilisation de doses diagnostiques.
Soumis pour publication Cah. ORSTOM.
- (29) - Guillet, P. - 1984.
La lutte contre l'onchocercose humaine et les perspectives d'inté-
gration de la lutte biologique.
Entomophaga, 29 (2).
-

PREMIERE PARTIE : NOTE DE SYNTHESE ET RESUME.

NOTE DE SYNTHÈSE

INTRODUCTION

L'onchocercose humaine en Afrique de l'ouest constitue un problème de santé publique majeur et un frein au développement socio-économique des pays où elle sévit.

L'écologie des vecteurs, les simulies appartenant au complexe Simulium damnosum, et la biologie du parasite qu'elles transmettent, la filaire Onchocerca volvulus Leuckart, conditionnent la stratégie de la lutte contre cette endémie:

- les vecteurs se développent toute l'année à raison d'une génération tous les 10 à 15 jours environ soit 25 à 30 générations par an. Leurs larves sont localisées dans les rapides des cours d'eau et la durée du développement préimaginal est de 8 à 10 jours. Les femelles qui seules transmettent le parasite peuvent se déplacer de manière active sur des distances considérables (de 60 à 80 km) et accomplissent des migrations atteignant 400 km avec l'aide des vents de mousson. Leurs lieux de repos sont encore mal connus et apparemment diffus;

- le parasite vit chez l'homme plus de 10 ans et on ne dispose pas encore à l'heure actuelle de médicament macro ou micro-filaricide ayant une action prolongée qui soient utilisables en campagne de masse.

La seule solution envisageable pour lutter contre cette maladie est d'interrompre sa transmission en attaquant ses vecteurs à leur stade le plus vulnérable, le stade larvaire. Ceci est réalisé par application de larvicides dans les rapides où se développent les larves. Les quelques essais de lutte contre les adultes réalisés en zones tropicales ont eu des résultats négatifs qui n'ont pas permis d'envisager l'utilisation de cette méthode au stade opérationnel (Bellec, 1984 a).

Pour être efficace, une campagne de lutte contre les vecteurs de l'onchocercose doit durer jusqu'à épuisement du réservoir de parasite chez l'homme (soit environ 15 ans), et porter sur de très vastes étendues afin de limiter les réinvasions des zones protégées par des simulies porteuses de parasites infectants venant de zones périphériques. Les traitements doivent en principe avoir une efficacité totale et être répétés chaque semaine.

En 1974, l'Organisation mondiale de la Santé a mis en place dans sept états d'Afrique de l'ouest une vaste campagne de lutte¹ destinée à ramener et maintenir cette endémie à un niveau suffisamment bas pour qu'elle ne constitue plus un problème médical et socio-économique sérieux et que les risques de reprise de la transmission après l'arrêt de la lutte antivectorielle soient négligeables.

¹ Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la région du bassin de la Volta (O.C.P.).

Le programme couvre actuellement une superficie de 764.000 km² d'un seul tenant. De 6.000 (saison sèche) à 23.000 km de rivières (saison des pluies) sont surveillés et, au besoin, traités. L'ampleur de la tâche et surtout le manque d'accès aux rivières, notamment en saison des pluies, ont conduit à appliquer les larvicides par voie aérienne. Ces derniers devraient être transportés et appliqués sans dilution préalable afin de limiter la charge des aéronefs et donc d'augmenter leur capacité de traitements. L'épandage est réalisé immédiatement en amont des rapides colonisés par les larves et l'insecticide doit se disperser spontanément dans l'eau. Immédiatement en aval du point de traitement, la concentration de la vague d'insecticide est très élevée tandis que son temps de contact avec les larves est bref. Plus on s'éloigne du point d'application, plus cette vague s'étale, le temps de contact augmente tandis que la concentration diminue.

LES PERFORMANCES DEMANDEES AUX LARVICIDES ANTISIMULIDIENS

Les performances d'un larvicide antisimulidien se mesurent d'une part à son degré d'efficacité (concentration minimum active à 100%) et d'autre part à sa portée qui est la distance en aval du point d'épandage sur laquelle le traitement demeure totalement efficace contre tous les stades larvaires. Pour être utilisable, un insecticide doit être formulé; il peut alors agir par ingestion, par contact ou les deux simultanément.

Il convient de mentionner ici l'importance considérable que revêt la formulation en matière de larvicides antisimulidiens. Dans la lutte antilarvaire contre les moustiques, l'insecticide est appliqué dans l'eau stagnante où se déplacent les larves. Plusieurs types de formulations peuvent être employés, leurs performances dépendant de la matière active utilisée plus que de la formulation elle-même. Dans le cas des simuliés, les larves sont fixées dans un milieu mobile; c'est donc la formulation qui va littéralement conduire la matière active vers la cible. Mal formulé, le meilleur insecticide passera à côté de la cible ou ne sera pas ingéré par les larves. Ainsi, certaines formulations de téméphos ont-elles une efficacité médiocre. A ceci, il convient d'ajouter que le temps de contact des larves de simuliés avec l'insecticide est très court (quelques minutes) et sous la dépendance du courant alors que pour les moustiques, le temps de contact est beaucoup plus long (jours, semaines) et dépend principalement de la rémanence de l'insecticide.

Pour être utilisable dans une campagne de l'ampleur de celle du Programme de Lutte contre l'Onchocercose, un insecticide doit présenter les caractéristiques suivantes:

- efficacité: le produit doit être totalement efficace à une concentration aussi faible que possible. L'utilisation d'un produit qui ne serait pas totalement efficace, engendrerait nécessairement une transmission résiduelle ou des reprises de transmission difficiles à maîtriser et nettement supérieures au seuil admissible. Le produit de référence actuel est le téméphos (Abate[®]) en concentré émulsifiable à 20% de matière active efficace à 0,05 et 0,1 mg/l pendant 10 minutes respectivement en saison des pluies et en saison sèche. L'utilisation de produits actifs à plus fortes concentrations ou de formulations moins concentrées, augmenterait sensiblement les coûts d'application.

- portée: le produit doit avoir une portée aussi grande que possible. Celle-ci dépend de la formulation utilisée mais également du débit des rivières traitées. Durant la saison sèche, les rivières sont à l'étiage et les rapides, généralement séparés les uns des autres par des étendues d'eau pratiquement stagnante. Chaque gîte doit être traité individuellement et, dans ce cas, la portée est limitée au rapide lui-même, quelle que soit la formulation utilisée. En revanche, pendant la saison des pluies, le débit des rivières est généralement beaucoup plus élevé et toute la masse de l'eau se déplace à une vitesse qui permet le développement des larves du complexe S. damnosum; les gîtes s'étalent sur toute la longueur du cours d'eau. Dans ces conditions, l'insecticide est rapidement entraîné vers l'aval et la portée peut alors atteindre plusieurs dizaines de kilomètres si la formulation le permet. Ce rapport entre le débit et la portée d'un larvicide, bien connu des gens du terrain, explique que la portée de l'Abate qui peut dépasser 40 à 50 km en Afrique de l'ouest, n'excède pas quelques dizaines de mètres en Amérique centrale dans les ruisselets où se développent les larves des vecteurs locaux de l'onchocercose (Takoaka et al, 1981; Umino et al, 1983; Matsuo, 1984); ce phénomène est encore plus marqué dans le cas des formulations d'une bactérie entomopathogène, le Bacillus thuringiensis H-14 (Undeen et al, 1981). Les facteurs qui conditionnent la portée des larvicides seront discutés ultérieurement dans le corps du texte.

- toxicité: le produit ne doit pas être toxique pour l'homme et les vertébrés; en effet, les rivières constituent souvent la principale source d'eau potable pour les populations riveraines et les animaux domestiques. Dans un premier temps, un seuil de toxicité a été fixé pour la matière active elle-même (DL 50 orale pour le rat ≥ 600 mg/kg). De fait, la proportion de matière active dans les produits peut varier de 2,5 à plus de 50% et il a paru plus logique de fixer un seuil pour la formulation (≥ 1000 mg/kg).

- sélectivité: l'insecticide, à la concentration utilisée, doit être aussi peu toxique que possible pour les organismes aquatiques non-cibles (poissons, invertébrés). Dans cet esprit, par exemple, le programme de lutte s'appuie sur des études réalisées par des équipes d'hydrobiologistes qui ont pour but d'évaluer les effets à court et à long terme des différents insecticides sur la faune associée à S. damnosum s.l.; en outre, un groupe d'experts de haut niveau (groupe écologique) analyse les résultats de ces études et formule ses recommandations concernant les recherches et les possibilités d'utilisation des produits.

- caractéristiques physiques: la formulation, appliquée pure ou faiblement diluée doit se disperser spontanément et se répartir de façon homogène dans les 40 à 50 premiers centimètres d'eau dès le point d'application. Elle doit également être stable; les fûts d'insecticide sont stockés sur le terrain en plein soleil pendant plusieurs mois pendant lesquels le produit ne doit pas s'altérer.

LE CHOIX DES FORMULATIONS

Le choix des différents types de formulations utilisables est guidé en premier lieu par leurs performances au regard des caractéristiques évoquées précédemment. En outre, certains facteurs tels que les caractéristiques physico-chimiques de l'eau (incluant la température) et le comportement trophique des larves de simulies influent sur l'activité des formulations et conditionnent également leur choix.

- les contraintes liées à l'utilisation opérationnelle: nous avons déjà mentionné que les formulations doivent être parfaitement auto-dispersibles et stables dans les conditions de stockage prolongé sur le terrain. Dans la pratique, seules les formulations liquides peuvent actuellement être appliquées pures ou très faiblement diluées par voie aérienne.

- les qualités physico-chimiques des eaux: sur les 23.000 km de rivières surveillées dans le Programme et compte-tenu de l'alternance entre la saison sèche et la saison des pluies, les caractéristiques physico-chimiques des eaux de rivière varient considérablement. Cependant, quelques dominantes peuvent être dégagées:

- la température moyenne varie de 25 à 30°C, avec des extrêmes de 22 à 33°C selon la saison, la taille des rivières et la zone biogéographique (Quillévéré et al, 1976; 1977; Ocran et al, 1981; Grunewald, 1981).

- turbidité: elle est en moyenne beaucoup plus élevée et surtout beaucoup plus variable que dans les régions tempérées. Elle peut être due à la présence de substances dissoutes mais surtout de matières en suspension, notamment de particules colloïdales. Mesurée à l'aide d'un photomètre (Hach®), la turbidité peut varier de moins de 5 unités FTU (unités de titre formaldéhyde) en saison sèche à plus de 45 en saison des pluies; de même, la lecture du disque de Secci peut passer de 1,5 m à moins de 20 cm et se maintenir autour de cette valeur pendant presque toute la saison des pluies. Quelques dosages réalisés sur les matières totales en suspension ont également montré de fortes variations (de moins de 5 mg/l à plus de 500 mg/l). La turbidité est importante car les larves de simulies ingèrent les particules en suspension. L'insecticide peut soit s'adsorber sur celles-ci, soit entrer en concurrence avec elles dans le cas de formulations particulières.

- les modalités de nutrition des larves de simulies: les larves de simulies, solidement fixées sur des supports dans les courants, se nourrissent en filtrant les particules naturelles en suspension; elles ingèrent des particules dont la taille peut varier de moins de $0,1 \mu$ (Wotton, 1976) à plus de 300μ (Wallace et Merritt, 1980); quelle que soit leur nature, elles peuvent ingérer des particules d'autant plus grosses qu'elles sont friables ou déformables (Elsen, 1979). La prise de nourriture est pratiquement continue et la progression du bol alimentaire s'effectue par bourrage (Elouard et Elsen, 1977). Le transit intestinal est rapide: de 2 minutes chez les larves jeunes à 15-20 minutes chez les larves âgées (Elsen, 1980). La rapidité du transit intestinal peut dépendre de certains facteurs extrinsèques, notamment la quantité de particules en suspension dans l'eau (Elsen, 1980, loc. cit.). Toutefois, dans les conditions naturelles, elle varie relativement peu (Elsen et Hébrard, 1979; Guillet et al, 1985a, 1.).

On observe chez les larves de simulies deux modalités différentes de capture des particules: les plus grosses (plus de 20μ) sont capturées mécaniquement au niveau des éventails céphaliques dans les mailles que forment les soies prémandibulaires primaires et secondaires. La taille optimum dépend alors de la nature de la particule, du stade larvaire et de l'espèce considérée (Chance, 1977; Kurtak, 1978). En revanche, les fines particules (moins de 5μ) qui représentent en fait 75 à 80% du volume ingéré par les larves du complexe S. damnosum (Elsen, 1979, loc. cit.) ne peuvent pas être mécaniquement capturées. Elles sont en fait retenues par adhésion sur le mucus qui recouvre les parties des soies céphaliques et de leurs microtriches exposées au courant (Ross et Craig, 1980). La capture des fines particules dépend autant de leurs propriétés de surface (charge électrostatique, mouillabilité) que de leur taille et de leur forme; en revanche, ces propriétés de surface n'influent pas sur la capture et la rétention des grosses particules.

Les facteurs qui conditionnent l'adhésion des fines particules sur le mucus des soies céphaliques des larves de simulies restent pratiquement inconnus; toutefois, ce mode de capture qui joue déjà un rôle majeur dans les conditions naturelles, prend toute son acuité dans le contexte de la mise au point des larvicides à très fines particules tels que les microcapsules contenant des insecticides chimiques ou les cristaux d'endotoxine du B. thuringiensis H-14. Cet aspect particulier sera abordé ultérieurement.

LES DIFFERENTS TYPES DE FORMULATIONS UTILISABLES

Il existe plusieurs types de formulations larvicides utilisables dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose:

- les concentrés émulsifiables: il s'agit de formulations dans lesquelles la matière active dissoute dans un solvant organique peu soluble dans l'eau s'émulsionne grâce à la présence d'agents tensioactifs. Il se produit lors du mélange dans l'eau une émulsion

de gouttelettes d'émulsion de quelques microns qui permettent généralement à l'insecticide de s'adsorber sur les particules naturelles en suspension dans l'eau que les larves ingèrent; outre une meilleure sélectivité, ce phénomène d'adsorption confère une meilleure portée dans la mesure où il s'agit de particules dont la localisation restera compatible avec leur absorption par les larves. Ce phénomène a été mis en évidence avec le DDT (Fredeen *et al*, 1953), le méthoxychlore (Fredeen *et al*, 1975) et surtout l'Abate en Afrique de l'ouest (Guillet et Escaffre, 1979a, 1) et en Amérique centrale (Umino et Suzuki, 1984). Il explique pourquoi les concentrés émulsifiables sont généralement plus actifs dans les eaux turbides: ainsi l'Abate en saison sèche lorsque les eaux ne sont pas turbides doit être utilisé à une concentration double de celle de la saison des pluies. Ce phénomène d'adsorption n'est pas systématique; par exemple, le chlorphoxime en concentré émulsifiable ne s'adsorbe apparemment pas sur les particules naturelles; son efficacité ne dépend pas de la turbidité de l'eau (Guillet et Escaffre, 1, loc. cit.). Il présente également une sélectivité nettement inférieure à celle de l'Abate. L'adsorption est un facteur qui favorise l'efficacité des larvicides antisimulidiens et devrait être recherchée systématiquement. Elle détermine également la méthodologie à employer pour tester à échelle réduite l'activité des concentrés émulsifiables. Toutefois, les facteurs qui régissent dans les conditions naturelles cette adsorption restent mal connus.

- les formulations particulières:

- suspensions de microcapsules: en tenant compte du mode de nutrition des larves de simuliés, on a eu recours à la technique de la micro-encapsulation pour tenter d'améliorer la sélectivité des larvicides et éventuellement leur portée. La matière active est enrobée dans des capsules dont la taille moyenne varie selon les lots de moins de 1 μ à plus de 15 μ . La formulation est une suspension contenant de 5 à 10 x 10⁶ capsules/ml. Deux types différents de capsules ont été mis au point: i) des capsules digestibles composées d'un mélange de gélose et de gomme arabique qui, après ingestion par les larves, se dégradent rapidement sous l'action des enzymes digestifs libérant les produits actifs; ii) des capsules à relargage progressif dont les parois en polymères non digestibles relarguent progressivement la matière active dès leur mise en suspension dans l'eau.

- concentrés de suspension: on regroupe sous ce terme les formulations dans lesquelles la matière active, qu'elle soit insoluble comme l'endotoxine du B. thuringiensis H-14, ou adsorbée sur un support inerte, se présente sous forme de particules très fines (1 à 5 μ) en suspension.

- poudres mouillables: ce type de formulation est très couramment utilisé en agriculture. De nombreux essais ont été réalisés contre les larves de simuliés avec divers insecticides: Sevin[®] (Quélenec *et al*, 1967), Mobam[®] (Quélenec, 1971). Ces formula-

tions, qui peuvent contenir une forte proportion de matière active, sont généralement efficaces contre les larves de simuliés. Toutefois, elles ne peuvent pas être utilisées dans les traitements aériens.

Il existe plusieurs variantes de ces quatre types de formulations, souvent liées à certaines particularités de la matière active, notamment son degré de solubilité dans les solvants organiques usuels. D'autres types de formulations ont été occasionnellement testés tels que des solutions, des suspensions huileuses ou des films de surface.

L'EVALUATION DE L'ACTIVITE DES LARVICIDES ANTISIMULIDIENS SUR LES LARVES DU COMPLEXE S. DAMNOSUM

Quand le Programme de Lutte contre l'Onchocercose a été planifié en 1972-1973, deux larvicides seulement étaient alors disponibles: l'Abate et le chlorphoxime, tous deux des composés organo-phosphorés du même groupe chimique des phosphoro-thioates. Si l'Abate présente une toxicité acceptable vis-à-vis des organismes non-cibles (Dejoux et al, 1970), le chlorphoxime est relativement plus toxique (Gibon et Troubat, 1980). Un programme d'une telle ampleur ne pouvait reposer sur l'emploi d'un seul larvicide à cause des risques de développement d'une résistance chez les populations régulièrement traitées d'une part, et d'autre part des implications financières liées à une situation de monopole d'un producteur. Il est donc apparu indispensable de sélectionner d'autres larvicides utilisables à grande échelle.

Pour sélectionner l'Abate et le chlorphoxime, il a fallu, entre 1967 et 1973, tester en rivières l'efficacité de plus de 60 formulations différentes. Ce type d'évaluation, par ailleurs très rudimentaire sur le plan méthodologique, présente certaines insuffisances parmi lesquelles l'impossibilité de travailler dans des conditions reproductibles et donc de comparer directement les résultats obtenus, la difficulté et le coût de la mise en oeuvre et enfin le nombre restreint de formulations qu'il est possible de tester ainsi. Pour intensifier le criblage des nouvelles formulations, il a fallu mettre au point des méthodes qui permettent de pratiquer ce type d'essais à échelle réduite dans des conditions normalisées.

Plusieurs dispositifs d'évaluation à échelle réduite ont été décrits et utilisés depuis de nombreuses années par des équipes travaillant en zones tempérées. Tous présentaient un inconvénient majeur qui résidait dans l'absence d'une corrélation systématique entre l'efficacité observée dans ces dispositifs et l'efficacité observée lors d'essais en rivières. Ceci était particulièrement net avec les concentrés émulsifiables.

Compte-tenu des critères exposés ci-dessus, la spécificité d'action des larvicides antisimulidiens est un phénomène très accusé, constaté par plusieurs auteurs (Gjullin et al, 1947; Jamnback et Means, 1968; Guillet et Escaffre, 1, loc. cit.). Qu'il s'agisse de

formulations classiques telles que l'Abate, de formulations de microcapsules ou de B. thuringiensis H-14, on constate couramment qu'un changement en apparence insignifiant dans leur composition peut modifier complètement leur efficacité. Il est rapidement apparu indispensable de tester les larvicides antisimulidiens dans des conditions aussi proches que possible que celles dans lesquelles ils sont destinés à être utilisés (Guillet 1982, non publié).¹ Nous avons à ce propos souligné l'importance des conditions hydrologiques; il faut également mentionner celle de la cible, les larves du complexe S. damnosum, leur sensibilité intrinsèque aux insecticides ou leur rythme de transit intestinal plus rapide que celui d'espèces vivant en eaux plus froides (Lacey et Mulla, 1979; Wotton, 1978; Elsen, 1980; Schröder, 1981). Ce dernier facteur revêt un intérêt particulier dans le cas des produits agissant comme poison stomacal tels que les microcapsules ou la toxine du B. thuringiensis H-14 (Gaugler et Molloy, 1980; Guillet, non publié). Un rythme de transit rapide limite l'absorption du produit à travers la paroi intestinale et donc l'efficacité de ce type de produits. L'utilisation d'espèces simuliennes de substitution (espèces néarctiques ou paléarctiques en particulier) ne peut pas être envisagée; les essais doivent donc être réalisés sur la cible elle-même, les larves du complexe S. damnosum et dans leur environnement naturel.

Pour toutes ces raisons, la mise au point d'une méthode d'évaluation à échelle réduite est de la première importance. Depuis 1967, la proportion de formulations testées qui atteint le stade opérationnel est à peine de 1%. Il est donc essentiel, quelle que soit la méthode adoptée, de ne pas éliminer lors du criblage une formulation qui pourrait être efficace sur le terrain. Le choix de cette méthode est également conditionné par le type de formulations à tester et le mode d'action de la matière active.

- évaluation des larvicides chimiques: pour mettre en évidence l'efficacité de ces larvicides, il faut que la matière active puisse éventuellement s'adsorber sur les particules en suspension dans l'eau. Pour cela, il est nécessaire de les mélanger à l'eau du dispositif d'évaluation plusieurs minutes avant le test et ce dans un volume aussi grand que possible. Sans cette période de contact préalable, l'adsorption n'est pas suffisante et l'efficacité d'un produit tel que l'Abate par exemple peut se révéler médiocre. Si la quantité d'eau du dispositif est trop faible, les particules naturelles sont saturées d'insecticide et la matière active restante peut s'adsorber sur les parois du dispositif d'évaluation, ce qui diminue également l'efficacité.

Dans un premier temps, au lieu de simuler totalement les conditions naturelles, nous avons travaillé dans ces mêmes conditions en isolant plusieurs fractions d'un gîte préimaginal (rapide) à l'aide de gouttières flottantes. Les larves du complexe S. damnosum fixées sur leurs supports naturels sont placées à l'extrémité postérieure de

¹ Comparison of the results obtained with comparable methods on the same insecticide in temperate climate and in Africa and their influence on testing strategy for onchocerciasis vector control. Doc. mim. OMS, VBC/OCP/IC/82.3.

la gouttière. Un filet permet de récolter les larves ayant dérivé sous l'effet du traitement. Avant son introduction dans la gouttière, l'insecticide est mélangé à 200 l d'eau de la rivière. Nous avons évalué cette méthode en contrôlant l'efficacité de 13 formulations différentes déjà testées en rivières et constaté qu'elle donnait des résultats très fiables (Guillet et Escaffre, 1, 1979, loc. cit.).

Ce dispositif présentait toutefois deux inconvénients: d'une part, il était difficile de mettre en oeuvre simultanément plus de 10 gouttières; d'autre part, il était impossible de filtrer l'eau avant son entrée dans la gouttière. Les larves devaient alors être triées parmi les débris naturels retenus dans les filets, ce qui représentait une opération fastidieuse.

Ultérieurement, Jamnback, utilisant les mêmes récipients (auges) et le même mode de colonisation par les larves que dans son laboratoire aux Etats-Unis (Jamnback et Frempong Boadu, 1966) a alimenté ces auges en circuit fermé à l'aide d'une pompe. Dans une première auge, les larves colonisent des plaquettes métalliques amovibles placées sur les déversoirs. Les plaquettes sont ensuite introduites dans une auge de traitement puis mises en observation dans une troisième auge.

Nous avons adapté cette méthode aux conditions de travail sur le terrain en vue de simplifier les opérations et d'améliorer sensiblement la capacité de criblage (Guillet et al, 1985b). Un système de déversoir alimenté par gravité avec de l'eau de rivière permet aux larves de similies de coloniser rapidement des plaquettes métalliques (Hougard et al, comm. pers.). Après le traitement dans les auges précédemment évoquées, qui dure généralement 10 minutes, les plaquettes sont placées dans un dispositif de mise en observation. Lorsqu'il s'agit d'insecticides à action rapide, ce dispositif est constitué par des mini-gouttières individuelles alimentées par gravité et munies à leur extrémité d'un filet de dérivation. Lorsqu'il s'agit d'insecticides régulateurs de croissance, dont l'action ne se manifeste qu'à retardement au moment de la mue qui suit le traitement (composés ecdysoïdes) ou lors de la nymphose ou de l'émergence (composés juvénoïdes), il s'agit d'un dispositif de mise en observation prolongée. Les plaquettes placées sur un déversoir également alimenté par gravité sont isolées à l'aide d'une cage d'émergence qui permet de récolter simultanément les larves ayant dérivé, les adultes non viables (qui n'ont pu s'envoler au moment de l'émergence) et les adultes viables. Dans ce cas, l'effet est exprimé en réduction d'émergence plutôt qu'en pourcentages de mortalité des larves.

Ce dispositif d'évaluation permet de cribler un grand nombre de formulations et donne des résultats tout-à-fait comparables à ceux obtenus sur le terrain lors d'essais en vraie grandeur.

- évaluation des formulations de B. thuringiensis H-14: l'endotoxine de cette bactérie est insoluble et n'agit que par ingestion. Il n'y a pas dans ce cas de phénomène d'adsorption analogue à celui précédemment mentionné. Pour l'évaluation de ces formulations, nous

avons mis au point un dispositif de "mini-gouttières" (Guillet et al, 1985c). Colonisées par les larves et alimentées par gravité en circuit ouvert avec de l'eau de rivière. La formulation, diluée dans 1,5 l d'eau est introduite en amont de chaque mini-gouttière où un dispositif assure son mélange avec l'eau. Un filet de dérivation est placé à l'extrémité.

Les mini-gouttières permettent de comparer l'efficacité des formulations et de déterminer avec précision les doses qui devront ultérieurement être appliquées sur le terrain. Ce dispositif n'est pas adapté à l'évaluation des larvicides chimiques, car il ne permet pas à la matière active de s'adsorber sur les particules naturelles, mais convient parfaitement à celle des formulations de B. thuringiensis H-14. Il a permis d'en tester par exemple, pour la seule année 1982, plus de 200 formulations différentes.

Les dispositifs d'évaluation adoptés donnent des résultats fiables. Grâce à une capacité de criblage élevée, il est possible de réaliser, pour chaque produit, des tests complets (4 à 5 concentrations avec 3 répétitions), qui permettent une détermination précise des valeurs caractéristiques (CL 50, 95 et 100). Il est alors possible de comparer les performances relatives des différentes formulations et d'étudier l'influence éventuelle de certains facteurs. Dans la pratique, c'est généralement sur la valeur de la CL 100 que s'opère le choix des produits qui pourront atteindre le stade des essais en rivière en vraie grandeur.

- essais en rivière : ces essais, réalisés avec les produits sélectionnés au cours du criblage, se déroulent généralement en deux temps:

- essais de basses eaux (saison sèche): l'épandage est réalisé immédiatement en amont d'un gîte, soit en une seule bande transversale, soit en bandes successives, pendant 10 minutes avec un dispositif à tirette (fût percé placé sur un flotteur). Ces essais, qui permettent de mesurer l'efficacité des formulations d'insecticides, ne permettent en revanche pas d'évaluer leur portée, toujours limitée dans de telles conditions hydrologiques;

- essais de hautes eaux (saison des pluies): les produits qui se sont montrés efficaces au cours des essais de saison sèche sont évalués en saison des pluies dans les conditions d'application opérationnelles (traitement hélicopté). L'efficacité du traitement est contrôlée après 24 et 48 heures dans plusieurs gîtes répartis sur une cinquantaine de km en aval du point d'épandage. Ces essais permettent de déterminer la portée efficace en période de hautes eaux.

Dans les deux cas, l'effet sur les larves est contrôlé in situ sur des supports naturels repérés avant le traitement et uniformément répartis sur l'ensemble du ou des gîtes traités. Dans le cas où l'efficacité n'est pas totale, elle est estimée approximativement (presque totale, partielle, très partielle, nulle). Dans la pratique, on recherche la concentration qui tue la totalité des larves et on en mesure la portée, lorsque les conditions hydrologiques le permettent.

- les phases d'évaluation des larvicides: l'évaluation des nouveaux larvicides se déroule en trois phases successives: ¹

- phase I: recherche d'insecticides potentiels qui doivent être toxiques pour les larves de moustiques (CL 50 A. aegypti inférieure à 0,1 mg/l), avoir une toxicité acceptable vis-à-vis des mammifères et ne pas présenter de résistance croisée avec le téméphos chez les larves du complexe S. damnosum (ce dernier aspect sera abordé ultérieurement);

- phase II: ces insecticides sont formulés par l'industrie puis testés dans le dispositif d'évaluation approprié. On considère comme prometteuses les formulations qui présentent une concentration efficace inférieure à 0,5 mg/l pendant 10 minutes pour les larvicides chimiques ou 1,6 mg/l pour les formulations de B. thuringiensis H-14; ces concentrations ont été fixées en fonction des risques de toxicité élevée pour les organismes non-cibles dans le cas des insecticides chimiques ainsi que du coût et des possibilités d'application dans le cas du B. thuringiensis H-14;

- phase III: a) essais en rivière de saison sèche et de saison des pluies;
b) utilisation de la formulation sur l'ensemble d'un bassin hydrographique pendant une année environ (une saison sèche et une saison des pluies) pour contrôler les effets des applications répétitives, la stabilité au stockage et apprécier les commodités d'utilisation. Au cours de cette phase, on procède à une évaluation des traitements sur la transmission du parasite. En outre, au cours des phases 3a et 3b, on évalue la toxicité vis-à-vis des organismes non-cibles.

LES RESULTATS OBTENUS JUSQU'A LA MISE EN EVIDENCE DE LA RESISTANCE AU TEMEPHOS

De 1976 à 1980, 14 insecticides différents représentant un total de 51 formulations ont fait l'objet d'une évaluation à échelle réduite (Guillet, 1978, non publié;² Guillet et Escaffre, 1979a, 1, loc. cit.; Guillet et Escaffre, 1980, non publié³). Globalement, au moins une formulation de 10 insecticides différents s'est montrée prometteuse. Parmi ceux-ci, on comptait sept composés organo-phosphorés, deux pyréthrinoïdes et un di-aryl-alkane substitué.

- résultats obtenus avec les formulations micro-encapsulées:

- microcapsules digestibles: nous avons testé au total 14 lots de Reldan[®] 10/10 (10% de chlorpyriphos-méthyl, capsules de 5 à 15 µ). Les différences entre lots ont porté sur la taille moyenne des capsules, l'épaisseur des parois et le degré de liaison des protéines

¹ Conformément au plan établi par l'Organisation mondiale de la Santé (WHO Pesticides Evaluation Scheme).

² Search for new formulations suitable for use against the larvae of onchocerciasis vectors in West Africa. Doc. mim. OMS, OCP/SWG/78.

³ Rapport annuel d'activité, Doc. multigr., OCCGE, 23/ONCHO/RAP/80.

qui les constituent et qui conditionnent leur digestibilité. Certains lots expérimentaux se sont révélés très efficaces (CL 100 de 0,025 à 0,05 mg/l/10 mn). Toutefois, il n'a pas été possible de mettre en évidence l'influence de l'un ou l'autre de ces facteurs tandis que l'on a observé entre des lots normalement identiques de fortes différences d'efficacité sans raisons apparentes. Des essais de saison sèche en rivières ont également donné de bons résultats (efficacité totale à 0,1 mg/l/10 mn). Malheureusement, la firme qui produisait ces microcapsules n'a jamais pu formuler correctement des quantités suffisantes pour réaliser des essais de saison des pluies;

- microcapsules à relargage progressif: 13 lots d'Actellic[®] M20 (20% de pirimifos-méthyl) et quatre de chlorpyriphos-méthyl ont été testés. Les différences entre les lots ont porté, outre la taille moyenne des capsules (1 à 5 μ), sur leur densité, l'épaisseur des parois et leur vitesse de relargage de la matière active. Dans l'ensemble, ces formulations se sont montrées moins efficaces que celles à microcapsules digestibles (CL 100 supérieure ou égale à 0,1 mg/l/10 mn). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec des capsules flottantes à parois minces (relargage rapide). Comme dans le cas précédent, la firme n'a pu reproduire industriellement les lots expérimentaux. De même, d'une série à l'autre, des échantillons théoriquement identiques ont présenté une efficacité tout-à-fait différente. L'adjonction de seulement 1% d'un agent de dispersion par exemple suffit pour en altérer totalement l'efficacité. Ceci peut s'expliquer par les modalités de capture de ces particules exposées précédemment.

La micro-encapsulation fait appel à des techniques nouvelles et relativement compliquées que les firmes contrôlent encore imparfaitement. Les essais réalisés en rivières ont permis de montrer que ces formulations n'étaient pas aussi sélectives que l'on aurait pu le souhaiter (Dejoux et Guillet, 1980, 2). La mise au point de ces formulations devrait être poursuivie avec des firmes spécialisées dans ces techniques. En outre, il était prévu d'étudier les facteurs pouvant conditionner le captage des microcapsules par les larves de simules. Malheureusement, ces essais ont été suspendus lorsqu'est apparue la résistance au téméphos (1980) puis la résistance croisée avec le chlorpyriphos-méthyl et le pirimifos-méthyl (1981) qui ont réduit à néant les perspectives d'utilisation de ces deux insecticides.

- résultats obtenus avec d'autres types de formulations: nous avons pu sélectionner sept concentrés émulsifiables ayant une efficacité totale à une concentration égale ou inférieure à 0,4 mg/l/10 mn dont quatre organo-phosphorés: étrimphos, chlorfenvinphos, chlorpyriphos-méthyl et azamétiphos, deux pyréthri-noïdes: deltaméthrine et perméthrine et un alkane substitué (GH 74). Les essais avec le chlorfenvinphos, le GH 74 et les pyréthri-noïdes n'ont pas été poursuivis à cause de leur forte toxicité immédiate pour les organismes non-cibles. Par la suite, une résistance croisée entre le téméphos et l'étrimphos a été mise en évidence (Kurtak et al, 1984). Cette résistance croisée ne se manifeste pas avec l'azamétiphos, qui a fait l'objet d'essais complémentaires et reste potentiellement utilisable.

La mise en évidence des phénomènes de résistance croisée, en réduisant considérablement l'arsenal des insecticides utilisables, a sensiblement modifié les perspectives de la lutte chimique et conduit progressivement vers une nouvelle stratégie d'utilisation des insecticides.

LES PHENOMENES DE RESISTANCE AUX INSECTICIDES DANS LE COMPLEXE SIMULIUM DAMNOSUM

La lutte contre les vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'ouest engendre une très forte pression de sélection par les insecticides. Plusieurs facteurs sont favorables au développement rapide de la résistance chez les populations régulièrement traitées:

- la continuité des traitements, répétés à un rythme hebdomadaire;
- le nombre important de générations exposées annuellement (25 à 30);
- la prolificité des femelles du complexe S. damnosum;
- l'étendue de la zone traitée (764.000 km² d'un seul tenant);
- enfin, l'utilisation de larvicides qui, à chaque traitement, touchent pratiquement tous les individus d'une population.

Dès la mise en place du Programme de Lutte contre l'Onchocercose, les recherches dans ce domaine ont été encouragées. Dans un premier temps, une méthodologie nouvelle a été proposée pour tester la sensibilité des larves du complexe S. damnosum aux insecticides (Mouchet et al, 1976). L'originalité de cette méthode réside dans l'utilisation d'un temps de contact bref (3 heures) en eau distillée stagnante entre 20 et 25 °C. Seules les larves de stades 4 et 5 sont utilisées. Les auteurs ont également proposé l'utilisation de doses diagnostiques lorsque le nombre de larves disponibles ne permet pas de réaliser de test complet. Dans la mesure où les espèces du complexe S. damnosum ne s'élèvent pas, seules des larves prélevées dans les gîtes peuvent être utilisées.

De 1976 à 1980, nous avons systématiquement appliqué cette méthode dans le cadre d'enquêtes sur la sensibilité des différents groupes d'espèces du complexe S. damnosum au téméphos, chlorphoxime et DDT. Les tests ont été réalisés en Côte d'Ivoire, au Mali, au Bénin, au Togo et au Niger, dans la zone du programme de lutte, avant le début des traitements.

Nous avons confirmé que cette méthode pouvait être utilisée sur le terrain et donnait des résultats très fiables. L'interprétation des tests, du fait de la présence de larves moribondes due au temps de contact court, revêt une certaine part de subjectivité et doit être pratiqué par un personnel entraîné. Par ailleurs, il n'existe pas de caractère morphologique qui permette de déterminer avec précision le stade larvaire; là encore, une bonne pratique est indispensable. Les larves de stade 7 (dernier stade) sont 10 fois moins sensibles que les larves de stades 4 et 5. L'utilisation de larves de stade 6 par exemple, mélangées aux larves jeunes entraîne donc une certaine hétérogénéité dans les résultats obtenus.

En comprenant les résultats de 20 tests réalisés pour moitiés de jour et de nuit, on n'a pas observé de variations nyctémérales significatives de la sensibilité au téméphos (Grébaut et Guillet, 1977, non publié).¹

Les espèces de forêt S. soubrense et S. sanctipauli en Côte d'Ivoire étaient, avant le début du programme de lutte, environ deux fois plus sensibles au téméphos que les autres espèces du complexe S. damnosum (Mouchet et Guillet, 1978, non publié).² Globalement, les différents groupes d'espèces sont 10 fois plus sensibles au chlorphoxime qu'au téméphos.

L'ensemble des données sur la sensibilité de base des différents groupes d'espèces du complexe S. damnosum aux insecticides recueillies avant la mise en place du programme de lutte ont par la suite servi d'éléments de comparaison lorsque les phénomènes de résistance sont apparus.

- la résistance au DDT: nous avons mis en évidence une résistance au DDT chez S. damnosum s.s. et S. sirbanum, les espèces savaniques du complexe dans quatre localités à l'intérieur du programme de lutte (Guillet et al, 1977, 3). Le coefficient de résistance observé au niveau de la CL 95 dépassait 10 au Bénin et au Togo, et 20 en Côte d'Ivoire et au Mali. Cette résistance a été détectée dans quatre zones de culture intensive du coton qui n'avaient jamais fait l'objet d'une lutte antisimulidienne. Elle s'explique par l'usage encore massif du DDT pour la protection de cette culture durant la saison des pluies. Survenant sur des rivières temporaires, cette résistance s'est révélée instable du fait de la disparition des populations pendant la saison sèche.

Bien qu'elle soit sans incidence pratique immédiate dans la mesure où l'on n'envisage plus l'utilisation de composés organo-chlorés, cette résistance doit être sérieusement prise en compte. Elle démontre d'une part que les espèces savaniques du complexe S. damnosum sont génétiquement aptes à développer une résistance aux insecticides et d'autre part que le seul usage agricole d'un insecticide peut favoriser, éventuellement entraîner le développement d'une résistance chez les vecteurs de l'onchocercose. Si cette résistance est due, même partiellement, à l'action du gène Kdr, il est probable qu'une résistance aux pyréthrinoïdes apparaisse rapidement au cas où ils seraient utilisés, cette résistance étant elle aussi sous la dépendance du même gène. Une résistance croisée entre le DDT et les pyréthrinoïdes a été mise en évidence chez les moustiques (Prasittisuk et Busvine, 1977; Priester et al, 1981) et d'autres insectes.

1 Sensibilité à l'Abate, au chlorphoxime et au DDT des populations larvaires du complexe S. damnosum dans la phase 3 du Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la région du bassin de la Volta. Doc. multigr., OCCGE, No 9, ONCHO/RAP/77, 48 pp.

2 Insecticide resistance in blackfly of the S. damnosum complex in West Africa, Doc. mim. OMS, OCP/SWG/78.17.

Les pyréthriinoïdes sont de plus en plus largement utilisés pour la protection des cultures, notamment la perméthrine et la deltaméthrine. C'est le cas par exemple du Togo où l'on a observé que les larves du complexe *S. damnosum* sont significativement moins sensibles à la perméthrine que dans d'autres zones du programme de lutte (Kurtak, comm. pers.).

- la résistance au téméphos: douze à seize mois après l'extension des traitements vers le sud en Côte d'Ivoire, on a observé sur le cours inférieur du Bandama une nette diminution de l'efficacité des traitements à l'Abate. Nous avons alors mis en évidence le développement d'une résistance à l'insecticide, le téméphos, chez deux espèces forestières, *S. soubrense* et *S. sanctipauli* (Guillet et al, 1980, 4). On a pu observer qu'un coefficient de résistance de seulement 4 à 5 fois au niveau de la CL 95, correspondant à 5-8% de survivants à la dose diagnostique, s'accompagnait d'un échec complet des traitements opérationnels. En effet, en appliquant huit fois la dose habituelle, le pourcentage de décrochement ne dépassait pas 50%.

En testant l'effet de synergistes classiques tels que le piperonyl de butoxide (pb) ou le tributyl phosphoro-trithioate (DEF[®]), nous avons montré que cette résistance n'était pas due à l'action d'oxydases à fonction mixte mais probablement à l'action d'estérases et/ou de glutathion transférases. La technique de détection colorimétrique de la résistance aux organo-phosphorés par hydrolyse de l'alpha-naphtyl acétate (Georghiou et al, 1981) ne s'applique ni aux larves ni aux adultes de simuliés dans le cas de la résistance au téméphos (Guillet et Kurtak, 1985, 6). L'emploi du DEF comme synergiste ne peut pas être envisagé pour prolonger l'utilisation de l'Abate, car ce produit est très toxique.

La résistance au téméphos s'est rapidement étendue à toute l'aire de répartition de ces deux espèces dans les zones traitées et même au-delà vers le sud et l'est (Kurtak, comm. pers.). Dès la mise en évidence de la résistance, le chlorphoxime, un autre composé organo-phosphoré a été utilisé en remplacement. Le coefficient de résistance au téméphos a continué à augmenter graduellement pour atteindre 100 fois. Il s'est maintenu à ce niveau très haut même après plusieurs mois d'arrêt des traitements à l'Abate et son remplacement par le chlorphoxime puis le *B. thuringiensis* H-14. Les individus résistants semblent être bien adaptés au milieu et donc compétitifs par rapport aux individus sensibles.

- la résistance au chlorphoxime: après une quarantaine de cycles de traitements au chlorphoxime, on nota une diminution d'efficacité des traitements. Des tests ont permis de mettre en évidence une résistance de l'ordre de 10 fois au niveau de la CL 95 (Kurtak et al, 1982b, 5). Contrairement au téméphos, la résistance au chlorphoxime peut décroître en l'absence de traitements ou pendant l'utilisation du *B. thuringiensis* H-14. Toutefois, dans la pratique, cet insecticide ne peut plus être considéré comme un larvicide de remplacement à part entière en cas de résistance au téméphos, seule une utilisation ponctuelle pouvant être envisagée.

- les phénomènes de résistance croisée: devant les niveaux de résistance atteints avec le téméphos, nous avons recherché s'il n'existait pas de résistance croisée avec les deux insecticides de remplacement les plus prometteurs, le chlorpyriphos-méthyl et le pirimifosméthyl. Des comparaisons ont été établies au niveau des valeurs caractéristiques entre des populations de S. soubrense sensibles (Togo) et résistantes (Côte d'Ivoire) qui ont mis en évidence une forte résistance croisée entre ces deux insecticides et le téméphos (Guillet et Kurtak, 6, loc. cit.) et démontré leur inutilité en tant que larvicides de remplacement. Des tests de résistance croisée ont été étendus à tous les autres composés organo-phosphorés utilisables et un seul d'entre eux, l'azamétiphos, ne présente pas d'emblée de résistance croisée et s'avère potentiellement utilisable (Kurtak, 1984, loc. cit.). Il est toutefois très probable que si cet insecticide qui appartient au même groupe chimique que le téméphos et le chlorphoxime, était utilisé, les larves développeraient également une résistance à son encontre.

- Discussion

La méthodologie utilisée s'est révélée très utile pour suivre l'évolution des niveaux de résistance et pour mettre en évidence les phénomènes de résistance croisée. Elle n'est en revanche pas suffisamment précise pour permettre de détecter dans la pratique une baisse de sensibilité avant que celle-ci n'affecte l'efficacité des traitements opérationnels. Cela s'explique dans la mesure où les surdosages étant onéreux et dangereux pour la faune non-cible, les doses sont parfaitement ajustées. Dans ces conditions, la moindre augmentation du coefficient de résistance se traduit immédiatement par l'apparition de larves survivant aux traitements. A l'inverse, dans la lutte contre les moustiques urbains ou les mouches domestiques, les surdosages sont systématiques pour augmenter la rémanence des traitements. Dans ces conditions, la résistance peut être mise en évidence avant qu'elle n'affecte l'efficacité des traitements, son effet s'exerçant d'abord sur la rémanence.

En présence d'un coefficient de résistance de 4 à 5 fois, les insecticides ne sont absolument plus utilisables comme larvicides antisimulidiens et lorsqu'une résistance croisée contre un produit nouvellement testé atteint ce niveau, celui-ci peut être d'emblée rejeté.

Les espèces du complexe S. damnosum s.l. sont pratiquement impossibles à coloniser et il est donc très difficile d'étudier les mécanismes génétiques de la résistance. Dans ces conditions, il est impossible de prévoir comment elle évoluera sur le terrain. Nous avons vu par exemple que non seulement la résistance au téméphos se maintenait à un haut niveau en l'absence de pression de sélection par les organophosphorés, mais qu'elle pouvait s'étendre, comme cela a été observé au Ghana (Kurtak, comm. pers.), à des populations qui n'étaient pas et n'avaient jamais été traitées avec cet insecticide.

Jusqu'à présent, la résistance n'est apparue que chez deux espèces parmi les six que comprend le complexe S. damnosum dans la zone du Programme. Une résistance ponctuelle au téméphos est toutefois apparue chez une population d'espèces savaniques isolée en milieu forestier (Kurtak, non publié), mais l'utilisation du B. thuringiensis H-14 a, semble-t-il, permis d'éliminer cette population. Il est difficile de comprendre pourquoi les phénomènes de résistance qui ont atteint une telle ampleur chez S. soubrense et S. sanctipauli ne se sont pas encore manifestés à un niveau décelable chez les espèces savaniques. Ces dernières sont génétiquement aptes à développer une résistance au téméphos comme cela s'est produit sur le Bandama, et comme elles l'ont été à développer une résistance au DDT. On pourrait penser qu'étant donné la pression sélective exercée sur elles par le Programme, s'il devait y avoir résistance, celle-ci serait déjà apparue. Bien que l'on ne puisse que formuler des hypothèses dans ce domaine, il est probable que le brassage des populations savaniques du fait des migrations et des réinvasions joue un rôle important dans le processus de développement de la résistance.

Quelques études théoriques concernent l'influence des réinvasions sur le développement et l'évolution de la résistance (Commins, 1977; Taylor, 1983; May, 1985). Ces observations ne peuvent pas être transposées à S. damnosum s.l., car l'on ne connaît pas le degré de dominance des gènes de la résistance et les données sur la dynamique des populations sont très fragmentaires. On pourrait penser, a priori, que les réinvasions ne devraient jouer qu'un rôle mineur dans le cas de S. damnosum s.l. comme cela a été suggéré (Le Berre, comm. pers.; Reiter, 1982). En effet, les femelles qui ne copulent qu'une seule fois partent déjà fécondées et ne peuvent donc se croiser dans les zones ré-envahies avec des mâles résistants. Leur descendance est détruite par les traitements larvicides et ne peut donc contribuer à une dilution des gènes de résistance.

Nous pensons, au contraire, que les mouvements de populations peuvent jouer un rôle important dans le développement de la résistance aux insecticides chez les espèces savaniques. Dans la pratique, les traitements ne sont pas systématiquement efficaces à 100% et il existe toujours des populations résiduelles dans les zones traitées. Celles-ci sont évaluées par la capture sur appât humain. Cette technique ne permet d'échantillonner dans une population que la fraction anthropophile alors qu'en zones de savane, une fraction non négligeable de la population ne pique pas l'homme (Bellec, 1984). Récemment, les captures sur plaque d'aluminium atteignaient plusieurs centaines d'individus sur la Bougouri-Ba (Burkina Faso) alors que dans le même temps, les captures sur appât humain étaient négatives (Bellec, non publié). Un phénomène analogue a été observé dans plusieurs localités du programme (Philippon, comm. pers.). Ces observations démontrent la présence d'importantes populations cryptiques jusque là insoupçonnées qui constituent probablement une part importante du "pool génique" des populations savaniques dans les zones traitées.

Les réinvasions qui surviennent par "flambées" (Garms et al, 1979) représentent un apport massif de simules allochtones dans ces zones et entraînent probablement une dilution importante des gènes de résistance et le maintien des individus qui en sont porteurs au-dessous du seuil de détection par les tests insecticides. En outre, les femelles de réinvasion, à l'ouest du Programme, proviennent de Guinée où la sensibilité des larves au téméphos est nettement plus élevée que dans l'ensemble du Programme (Escaffre, 1982, non publié; Kurtak, comm. pers.). Rappelons par ailleurs que la résistance au téméphos chez les espèces savaniques bien que très ponctuelle, est apparue précisément au même endroit que la résistance au téméphos puis au chlorphoxime chez les espèces forestières, dans des conditions d'isolement génétique relatif, comme semblerait le confirmer la lenteur du repeuplement après arrêt des traitements, même dans des conditions hydrologiques très favorables.

Ces phénomènes doivent être suivis avec beaucoup d'attention et de vigilance. Concrètement, peu de solutions s'offrent pour limiter le développement de la résistance. La plus simple est sans doute l'utilisation alternée de composés ayant des modes d'action radicalement différents. Dans le cas où la résistance à un composé ne s'est pas encore développée, on peut espérer qu'en relâchant significativement la pression de sélection, on retarde son apparition.¹ En revanche, lorsque la résistance à un composé est déjà installée à un haut niveau, il n'est pas évident qu'un arrêt momentané de la pression de sélection ait un effet bénéfique. La régression qui s'est manifestée à des degrés divers dans le cas du chlorphoxime ne peut être selon toute vraisemblance que tout-à-fait temporaire, comme les observations en Côte d'Ivoire tendent à le confirmer; la résistance est le plus souvent "une voie à sens unique" (Brown et al, 1963; Keiding, 1967).

Un phénomène intéressant de résistance croisée négative entre le téméphos et la perméthrine a été mis en évidence chez S. soubrense et S. sanctipauli (Kurtak, non publié). Un phénomène analogue a été mis en évidence chez la drosophile (Ogita, 1961 a et b), les blattes (McDonald et Grayson, 1966) et suspecté chez Cx. quinquefasciatus précisément entre ces deux mêmes insecticides (Georghiou et al, 1980). Il a également été démontré chez Cx. quinquefasciatus que la résistance au téméphos diminuait plus rapidement lorsque les populations étaient traitées à la perméthrine qu'en l'absence de pression insecticide (Georghiou et al, loc. cit.). Si un phénomène analogue se manifestait chez S. damnosum s.l., il ouvrirait de nouvelles perspectives quant à l'utilisation des pyréthrinoïdes et notamment la perméthrine.

L'utilisation de mixture de composés ayant des modes d'action très différents est d'usage courant en agriculture. Elle est basée sur le fait que la probabilité est infime que préexiste dans les populations sauvages des individus porteurs simultanément des deux mécanismes de résistance. Cette solution ne pourrait être envisageable que dans le

¹ Toutefois, il n'existe actuellement aucun modèle qui permette de l'affirmer.

cas de populations n'ayant encore développé aucun des deux mécanismes de résistance. Dans le cas de S. damnosum, de telles populations ne doivent pas se rencontrer fréquemment si l'on tient compte de l'usage agricole des insecticides. L'intérêt pratique des mixtures apparaît d'autant plus limité que l'emploi de deux composés, chacun à leur CL 100 respective, doublerait pratiquement le coût des traitements et leur impact sur l'environnement. Nous avons démontré par ailleurs qu'en associant un insecticide chimique au B. thuringiensis H-14, on n'obtenait aucune synergie, voire une synergie négative dans le cas des pyréthriinoïdes (Guillet, non publié). Dans la pratique, toutes les solutions envisageables pour faire face aux problèmes posés par la résistance passent par la recherche de nouveaux insecticides ne présentant pas de résistance croisée avec le téméphos. Un effort particulier a été entrepris pour rechercher et développer de tels insecticides, notamment des insecticides régulateurs de croissance ou des agents de lutte biologique.

LA RECHERCHE DE NOUVEAUX INSECTICIDES UTILISABLES CONTRE LES LARVES RESISTANTES AUX ORGANOPHOSPHORES

Lorsque la résistance croisée aux organophosphorés a été mise en évidence, les recherches ont été orientées vers la sélection de nouveaux insecticides n'appartenant pas à cette famille. Les insecticides chimiques conventionnels n'offraient alors que des perspectives a priori limitées:

- les organochlorés du fait de la résistance au DDT, du manque d'efficacité du méthoxychlor et de l'effet généralement ^{recif} de ces insecticides sur l'environnement;

- les carbamates qui ne sont généralement pas de bons larvicides et dont la toxicité pour les mammifères est souvent élevée (ce groupe n'est toutefois pas à négliger, une formulation efficace d'un carbamate ayant été récemment sélectionnée);

- les pyréthriinoïdes: deux formulations très efficaces avaient déjà été testées, la perméthrine et la deltaméthrine, cette dernière étant très toxique pour les organismes non-cibles. Leur usage généralisé en agriculture ainsi que la résistance au DDT laissent présager un risque de développement d'une résistance au cas où leur emploi devrait se généraliser. Seule une utilisation très ponctuelle à la fois dans l'espace et dans le temps devrait être envisagée.

De ce fait, nos recherches se sont orientées vers de nouveaux types d'insecticides ayant un mode d'action très différent de celui des insecticides conventionnels tels que les composés régulateurs de croissance et surtout les insecticides d'origine biologique comme le B. thuringiensis H-14, ce dernier offrant des perspectives très prometteuses dans le contexte de la résistance et de la protection de l'environnement.

- les insecticides régulateurs de croissance: les régulateurs de croissance qui constituent une nouvelle famille d'insecticides, ont été récemment développés par l'industrie pour faire face à la généralisation des phénomènes de résistance aux insecticides conventionnels. Ce sont généralement des mimétiques d'hormones: ils n'ont pas de toxicité immédiate pour les insectes mais agissent à retardement sur certains processus vitaux sous contrôle hormonal. Ils se divisent globalement en deux groupes, les composés juvénoides et ecdysoïdes.

Les ecdysoïdes agissent au moment de la mue et sont donc actifs sur tous les stades larvaires. Les juvénoides agissent au stade nymphal et n'ont qu'une toxicité très limitée, pour les larves jeunes. Le mode d'action des régulateurs de croissance reste en fait mal connu et plusieurs composés ne peuvent pas être rattachés à ces deux groupes. En outre, certains insecticides conventionnels, notamment des carbamates, agissent également comme régulateurs de croissance.

Deux composés ont fait l'objet de nombreux travaux, le diflubenzuron (Dimilin[®]) qui inhibe la formation de la chitine et perturbe l'apolyse et le méthoprène (Altosid[®]), un mimétique de l'hormone juvénile dont l'action se manifeste surtout au moment de l'émergence des adultes. Ils sont utilisés opérationnellement contre des populations de moustiques résistantes aux insecticides organophosphorés notamment en Californie (Mian et Mulla, 1982). Toutefois, un cas de résistance croisée entre les organophosphorés et un régulateur de croissance (une benzamide substituée) a déjà été observé chez les moustiques (Schaeffer et al, 1981).

En Amérique du nord, ces deux composés ont fait l'objet de plusieurs essais contre les larves de simulies tant au laboratoire que sur le terrain et ont été considérés comme des larvicides prometteurs.

Dès 1977, des tests ont été réalisés sur les larves du complexe S. damnosum avec le diflubenzuron et le méthoprène, mais ils ont été rapidement arrêtés après qu'on eut constaté l'effet limité de ces deux produits sur l'émergence des adultes issus de larves traitées (Guillet, non publié). Les recherches ont été reprises à la suite de la mise en évidence de la résistance au téméphos.

L'évaluation de l'activité des régulateurs de croissance sur les larves du complexe S. damnosum a posé un certain nombre de problèmes essentiellement d'ordre méthodologique. Le dispositif de récupération des adultes mis au point a donné entière satisfaction même si l'on a parfois observé entre les séries d'essais des variations importantes de même qu'occasionnellement une mauvaise corrélation dose/mortalité. Il s'agit en fait d'un phénomène propre aux régulateurs de croissance et qui s'observe également lors des tests avec les larves de moustiques (Schaeffer et Wilder, 1972).

Dès les premiers essais, l'efficacité du diflubenzuron sur les larves de simulies s'est révélée médiocre, alors que ce composé est remarquablement actif sur les larves de moustiques. Globalement, l'efficacité augmente avec le temps de contact et dépend de la formulation utilisée (Guillet et al, 1985d, 7). Les larves jeunes ne sont pas plus sensibles que les larves âgées. En augmentant artificiellement le temps de transit intestinal chez les larves traitées pour permettre une meilleure assimilation du produit, on n'a pas modifié significativement l'effet du traitement. Par la suite, nous avons testé 12 formulations expérimentales dont les plus efficaces étaient les formulations particulières. Toutefois, la meilleure formulation n'a pas permis d'atteindre 95% de réduction d'émergence à une concentration aussi forte que 1 mg/l pendant 20 minutes (Guillet et al, 1985e, 8). Des essais en rivières ont confirmé ces résultats.

Cinq autres régulateurs de croissance ont été testés et un seul, le phénoxy-carbe, un carbamate, a eu une efficacité totale sur les larves âgées avec un temps de contact court (0,4 mg/l pendant 10 minutes). Les autres ont eu une efficacité médiocre (Guillet et al, 1985f, 9).

Des tests ont également été réalisés avec l'Avermectine. Les Avermectines sont des substances naturelles analogues aux antibiotiques obtenues par fermentation d'un champignon (Streptomyces avermectilis), qui ont des propriétés insecticides et filaricides. En concentré émulsifiable, l'Avermectine agit à une concentration aussi faible que 0,005 mg/l pendant 10 minutes. En plus d'un effet immédiat très prononcé, elle agit également comme régulateur de croissance (Guillet et al, 1985g, 10).

L'Avermectine étant très active sur les stades évolutifs de filaires, nous avons vérifié chez un moustique vecteur de filariose si elle n'affectait pas la capacité vectrice des adultes issus de larves exposées à des doses subléthales. Nous avons utilisé le modèle A. aegypti/Molinema dessetae/Proechimys guyanensis, ce type d'étude ne pouvant être réalisé avec S. damnosum. Sur des larves exposées à des concentrations léthales 60 à 85%, l'Avermectine n'a eu aucun effet sur la transmission (Guillet et al, 1985h, 11). L'Avermectine devrait faire l'objet d'essais en vraie grandeur contre les larves du complexe S. damnosum. Toutefois, les perspectives d'utilisation apparaissent très limitées du fait de son large spectre d'activité et de sa toxicité pour les mammifères.

Les composés régulateurs de croissance qui présentent une toxicité remarquable pour les larves de moustiques, ont dans l'ensemble, mis à part le cas particulier de l'avermectine, une efficacité médiocre contre les larves du complexe S. damnosum. Il est peu probable que ces dernières soient intrinsèquement moins sensibles à ces composés que les larves de moustiques. En revanche, deux facteurs peuvent expliquer en partie cette différence:

- le temps d'exposition des larves de simulies est nécessairement court alors que les régulateurs de croissance sont plus efficaces avec des temps de contact longs à de très faibles concentrations;

- ces composés agissent essentiellement comme poison stomacal et la rapidité du transit intestinal des larves de simuliés peut limiter l'absorption de la matière active.

Les régulateurs de croissance n'offrent encore, au stade actuel, aucune perspective d'utilisation. Contrairement aux ecdysoïdes, certains juvénoïdes se sont révélés relativement efficaces. Toutefois, pour être utilisables, il faudrait qu'ils soient toxiques également pour les très jeunes larves de simuliés, ce qui semble peu probable mais n'a pu encore être vérifié.

Le criblage systématique de composés existants et de nouvelles molécules permettra peut-être de sélectionner des produits efficaces. L'utilisation des régulateurs de croissance contre les larves de simuliés passe également par la mise au point de formulations à relargage progressif de la matière active et de techniques d'application qui permettent de maintenir dans les rivières entre chaque application de très faibles concentrations de produit.

LES AGENTS DE LUTTE BIOLOGIQUE

La lutte biologique est souvent évoquée comme la solution idéale pour faire face aux problèmes posés par la résistance et pour limiter l'impact des campagnes de lutte sur l'environnement.

Elle connaît en agriculture des succès limités mais encourageants. Toutefois, le contexte de la lutte contre les vecteurs est très éloigné de celui de la protection des cultures. Dans ce dernier cas, il s'agit d'un milieu artificiel dans lequel l'impact des mesures de lutte contre les ravageurs, qu'il s'agisse de lutte biologique, chimique ou intégrée, se mesure par un rapport coût-efficacité qu'il est aisé d'estimer. Lorsqu'il est favorable, même en présence d'une efficacité limitée, le résultat est jugé satisfaisant. A l'inverse, la lutte contre les vecteurs s'applique le plus souvent¹ dans un milieu naturel où existent des équilibres complexes, contre des espèces qui ont généralement un développement très rapide et pour lesquelles l'influence de la dynamique des populations sur la transmission n'est pas toujours bien évaluée. Plusieurs essais de lutte biologique contre les vecteurs, notamment ceux du paludisme, ont été entrepris; la plupart du temps, il a été impossible d'évaluer l'impact réel des agents de lutte biologique sur l'évolution de la transmission et de la morbidité.

Si l'épidémiologie de l'onchocercose reste complexe, la stratégie de la lutte est en revanche relativement simple et la découverte du Bacillus thuringiensis H-14 a rapidement laissé entrevoir la possibilité d'y intégrer l'utilisation d'un agent de lutte biologique.

- le Bacillus thuringiensis H-14: le Bacillus thuringiensis H-14 est une bactérie sporogène qui produit en même temps que les spores

¹ à l'exception d'espèces synanthropes comme C. quinquefasciatus ou A. aegypti.

des inclusions cristallomorphes contenant une toxine appelée δ -endotoxine. Sous l'action des enzymes digestifs des larves de moustiques ou de simulies, ces inclusions libèrent plusieurs polypeptides dont certains sont hautement toxiques pour les larves. Sans cette activation en milieu alcalin, l'endotoxine n'agit pas. Les spores n'ont quant à elles aucune toxicité (Guillet, 1984, 11). Cette toxine qui est insoluble dans les solvants usuels ne peut pas être dosée avec les moyens d'analyse habituels (chromatographie...); elle doit être titrée par la mise en oeuvre d'essais biologiques normalisés utilisant des larves d'A. aegypti. La comparaison des produits à base de B. thuringiensis H-14 avec une préparation standard de référence produite par l'Institut Pasteur (Paris) permet de déterminer un titre biologique, exprimé en Unités Internationales A. aegypti/mg qui représente en fait la teneur des produits en endotoxine. Isolé en 1977 (Goldberg et Margalitt, 1977) et identifié en 1978 (de Barjac, 1978), le B. thuringiensis H-14 a immédiatement fait l'objet d'essais de laboratoire contre les larves de simulies (Undeen et Nagel, 1978; Undeen et Berl, 1979). Les premiers essais de terrain réalisés en Afrique de l'ouest avec une poudre primaire ont démontré l'efficacité remarquable de cet entomopathogène contre les larves du complexe S. damnosum (Guillet et Escaffre, 1979b, 14; Guillet et de Barjac, 1979, 13) ainsi que son innocuité pour les organismes non cibles (Dejoux, 1979). La stabilité de la δ -endotoxine permet de conserver les préparations de B. thuringiensis H-14 plusieurs mois en zone tropicale sans perte d'efficacité (Guillet, Dempah et Coz, 1980, 16). Efficacité, stabilité et sélectivité, les qualités de cet agent de lutte biologique ouvraient des perspectives très prometteuses. Son application sur le terrain supposait toutefois la mise au point de formulations utilisables dans les traitements opérationnels.

Les premiers essais réalisés avec des formulations expérimentales ont montré, comme cela avait été observé avec les insecticides conventionnels, que l'efficacité dépend au moins autant de la formulation elle-même que de sa teneur en matière active (dans ce cas, il s'agit de la toxine bactérienne, Guillet et Escaffre, 1979c, 15).

Globalement, deux types de formulations pouvaient être mis au point par l'industrie, des poudres ou des suspensions constituées de gros agrégats sphériques de spores et cristaux d'une taille moyenne de 30 à 50 μ ou des suspensions concentrées de très fines particules (0,5 à 1,5 μ). Dès les premiers essais, l'efficacité des formulations à grosses particules est apparue nettement supérieure. Plusieurs formulations expérimentales ont alors été testées pour étudier l'influence de la nature et de la taille des particules sur l'efficacité.

La taille optimum varie, selon les formulations, de 30 à 50 μ . Au-delà, on observe que l'efficacité vis-à-vis des larves jeunes diminue tandis qu'elle continue d'augmenter vis-à-vis des larves âgées. Les particules sont d'autant mieux ingérées qu'elles sont friables ou déformables, et l'efficacité des formulations est proportionnelle au volume ingéré par les larves. L'adjonction d'un ciment pour agréger les spores et les cristaux et éviter que ces agrégats ne se fragmentent dans les rapides et perdent de leur efficacité, se traduit par une perte d'activité très significative et un taux de sédimentation accru (Guillet et al, 1985i, 17).

Ultérieurement, on a constaté que l'efficacité des formulations à grosses particules diminuait lorsque la turbidité de l'eau dans les cours d'eau augmentait durant la saison des pluies ou à la suite d'un orage. Cette diminution s'explique par une compétition au niveau de la capture et de l'ingestion entre les particules naturelles et celles de B. thuringiensis H-14 (Guillet et al, 1985a, 18). Les larves du complexe S. damnosum dont le transit intestinal s'opère par bourrage (Elouard et Elsen, 1977) présentent dans les conditions naturelles une progression du bol alimentaire pratiquement constante quelle que soit la quantité de particules en suspension dans l'eau (Guillet, non publié). Lorsque celle-ci augmente, les chances pour qu'une larve capte des particules de B. thuringiensis H-14 diminuent, et la perte d'efficacité observée est directement proportionnelle à la quantité de particules en suspension (Guillet et al, 18, loc. cit.). De même, lorsque le temps de contact diminue, le nombre de particules ingérées, et donc l'efficacité, diminuent également.

Le captage des fines particules de toxine s'opère par adhésion sur un mucus et ce mécanisme évoqué précédemment n'est apparemment influencé ni par la quantité de particules naturelles en suspension dans l'eau ni par la durée du temps de contact. L'efficacité des formulations à fines particules est donc indépendante de la turbidité et de ce fait ne varie pas d'une saison à l'autre. Par ailleurs, une exposition très brève des larves telle qu'elle s'observe dans la pratique des traitements ne les empêche pas de capter et d'ingérer suffisamment de cristaux d'endotoxine. Ces formulations ont donc été jugées beaucoup mieux adaptées aux conditions d'utilisation opérationnelles. D'autres types de formulations ont également été testées (solutions huileuses, émulsions, films de surface, etc.) mais le choix s'est définitivement porté sur les suspensions concentrées à très fines particules.

Rapidement, une formulation de ce type a été testée sur le terrain en saison sèche (Guillet et al, 1981a, 19) puis en saison des pluies (Lacey et al, 1982, 20), et ses performances ont permis d'envisager son utilisation opérationnelle. Une étude de stabilité a montré également que le produit pouvait être stocké plus d'un an sur le terrain sans que son efficacité ne soit altérée (Guillet et al, 1981b, 21). Son utilisation a été effective dès que les résistances au téméphos et au chlorphoxime ont été mises en évidence, car il n'existait alors aucun larvicide chimique permettant de poursuivre la lutte contre les populations résistantes.

L'industrie a dû produire rapidement plusieurs centaines de milliers de litres de formulation. Un contrôle de qualité a été réalisé, portant sur 600.000 l et a montré que la teneur en endotoxine (titre A. aegypti) ainsi que le niveau d'efficacité contre les larves de simulies étaient très satisfaisants (Guillet et al, 1985j, 22). En revanche, les caractéristiques physiques des différents lots ont été variables, quelques lots, du fait d'une viscosité excessive, ne pouvant que très difficilement être appliqués.

Si le B. thuringiensis H-14 a dû atteindre très rapidement le stade de l'utilisation opérationnelle à cause de la résistance aux insecticides, les formulations existantes présentaient toutefois certaines insuffisances: efficacité et portée limitées de même qu'une viscosité à la fois excessive et variable nécessitant une dilution de la formulation avec de l'eau avant son application, le taux de dilution devant être ajusté en fonction de la viscosité. Ces insuffisances ont d'une part entraîné un coût d'utilisation très élevé et de sérieuses difficultés d'application, qui en ont limité l'emploi, mais elles ont également stimulé la recherche de formulations plus performantes.

Grâce à une coopération étroite avec l'industrie et l'Organisation mondiale de la Santé, plusieurs centaines de formulations expérimentales ont pu être testées, l'objectif étant la production de formulations parfaitement autodispersibles, de qualités constantes et plus concentrées en endotoxine pour que les quantités à appliquer ne dépassent pas 1,5 fois celles de l'Abate. Ce but a été atteint en 1984, et l'utilisation opérationnelle d'une formulation de ce type est imminente. Au stade expérimental, le degré d'efficacité vient encore d'être doublé (Guillet et al, 1985k, 23).

Une des difficultés majeures rencontrées dans la mise au point des formulations de B. thuringiensis H-14 réside dans le fait qu'il n'existe pas de relation systématique entre leur toxicité vis-à-vis des larves de moustiques et celles de simuliés. Le titrage de la toxine s'effectue sans difficulté au laboratoire avec des larves d'A. aegypti, mais un titre élevé ne représente pas une garantie systématique d'efficacité contre les larves de simuliés. Ceci s'observe aussi bien avec les formulations qu'avec les produits primaires non formulés (Guillet, 1982, 24). Lorsque les préparations primaires de B. thuringiensis H-14 sont testées dans des conditions comparables sur des larves de moustiques et de simuliés (contact 24 heures en eau distillée, agitée dans le cas des simuliés), on observe une concordance parfaite dans les résultats obtenus ($r^2 = 0,92$). En revanche, lorsque la durée de contact n'est plus que de 3 heures en eau distillée pour les simuliés, la corrélation diminue significativement ($r^2 = 0,72$). Enfin, avec un contact de 10 minutes en eau de rivière et un transit intestinal rapide chez les larves, on n'observe plus aucune corrélation ($r^2 = 0,20$) (Guillet et al, 1985l, 25).

Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces observations. La première est liée à la nature de la toxine elle-même. Le cristal du sérotype H-14 est constitué de plusieurs sous unités toxiques; la ou les fractions actives contre les larves de moustiques et contre celles de simuliés pourraient être différentes. La deuxième hypothèse a trait à l'activation de la toxine et à son absorption au cours du transit intestinal qui peuvent être limitées chez les larves de simuliés du fait de la rapidité du transit intestinal. D'autres éléments peuvent également jouer un rôle, par exemple des enveloppes qui entourent les cristaux du sérotype H-14 (Tyrell et al, 1981; Charles et de Barjac, 1982) qui peuvent limiter également l'activation

ou la libération de la toxine. La présence de ces enveloppes pourrait dépendre du stade de fermentation de la culture (Nickerson, 1982). Les protéases peuvent également jouer un rôle, qu'il s'agisse des protéases du milieu, généralement abondantes dans les préparations de B. thuringiensis H-14, ou de protéase(s) endogène(s) du cristal (Guillet et al, 1985m, 26). Des travaux sont actuellement en cours pour tenter de mieux comprendre le rôle des protéases et d'expliquer les différences observées dans l'activité des préparations de B. thuringiensis H-14 sur les larves de moustiques et sur celles de simulies. Les résultats obtenus jusqu'à présent sont fragmentaires et devront être complétés.

Il est probable que ces différences d'activité sur les moustiques et sur les simulies ont été trop souvent imputées à la formulation elle-même, alors que d'autres facteurs ont vraisemblablement joué un rôle important. Cela peut expliquer que des firmes aient pu produire des formulations très performantes contre les larves de moustiques, sans parvenir à maîtriser la production de formulations efficaces contre les larves de simulies.

Récemment, des souches asporogènes de B. thuringiensis H-14 ont été sélectionnées pour le traitement des eaux de boisson. Des formulations à base de souches asporogènes sont maintenant couramment produites (Guillet et al, 23, loc. cit.), et devraient dans un avenir proche remplacer progressivement les préparations contenant des spores.

L'utilisation opérationnelle du B. thuringiensis H-14 entraîne le risque de voir les larves régulièrement traitées développer une résistance à la toxine. Une très forte pression de sélection exercée au laboratoire sur des générations de larves de moustiques n'a engendré qu'une résistance très modérée et disparaissant dès l'arrêt de la pression sélective (Georghiou, 1982). Le risque de sélectionner une résistance chez les simulies est a priori faible, mais il doit toutefois être pris en compte. Récemment, une souche de Plodia interpunctella, un lépidoptère ravageur des grains stockés, a développé une forte résistance à la -endotoxine du B. thuringiensis H-14 (probablement de la variété Kurstaki), tant au laboratoire que sur le terrain (McGaughey, 1985).

Une méthode a été mise au point pour évaluer sur le terrain la sensibilité des larves du complexe S. damnosum à la toxine du B. thuringiensis H-14. Un dispositif d'agitateurs à bouteilles a été construit à cet effet, et l'influence de plusieurs paramètres expérimentaux (temps de contact, température, nombre de larves, etc.) a été testée systématiquement (Guillet et al, 1985n, 27). Le temps de contact, du fait de l'action très rapide de la toxine, a pu être réduit à 3 heures, afin de limiter la nymphose des larves au cours du test. Cette méthode est maintenant appliquée en routine. L'utilisation de doses diagnostiques a également été proposée (Guillet et al, 1985o, 28).

- autres bactéries sporogènes: de nouveaux sérotypes de B. thuringiensis ont été découverts dont certains sont toxiques pour les larves de moustiques: les sérotypes 8a et 8b, variété Morrisoni, (Padua et al, 1982), le sérotype 10 (variété Darmstadiensis, Padua et al, 1980) et la variété Kyushiniensis (Ohba et Aizawa, 1979).

Deux souches de Bacillus sphaericus remarquablement toxiques pour certaines espèces de moustiques (1593 et 2362) ont été testées et n'ont aucune activité sur les larves du complexe S. damnosum, même à des fortes concentrations ou avec un contact prolongé (Guillet, non publié; Molloy, comm. pers.).

Un programme de criblage de différents isolats de B. thuringiensis et B. sphaericus a été mis en place en collaboration avec l'OMS. Plus de 35 préparations différentes ont été testées; seuls certains isolats de B. thuringiensis se sont montrés toxiques (Guillet et al, 1984, non publié). Ces essais devraient être systématiquement poursuivis, notamment avec B. sphaericus, dont plusieurs souches nouvelles ont été isolées et qui présentent des spectres d'activité différents.

- autres agents de lutte biologique: des essais ont été réalisés avec deux champignons entomopathogènes toxiques pour les larves de moustiques Tolypocladium cylindrosporium, souche TC4A et Metharizium anisopliae, souche Ma 139, les deux souches les plus virulentes conservées à l'Institut National de la Recherche Agronomique de Versailles. Des préparations de blastopores de T. cylindrosporium et de conidies de M. anisopliae ont été fournies par l'INRA, transportées immédiatement en Afrique de l'ouest, et testées sur les larves du complexe S. damnosum dans le dispositif des auges. Aux concentrations de 10^6 à 10^7 spores/ml pendant 10 à 20 minutes (soit 500 mg à 5 g/l de préparation), on n'a observé aucun effet chez des larves jeunes mises en observation pendant 5 jours après le traitement. La virulence des préparations testées a été contrôlée au laboratoire avec des larves d'A. aegypti et les CL 50 obtenues étaient respectivement de 1,5 et 5×10^4 spores/ml qui représentent une valeur normale (Guillet, non publié).

L'activité d'une autre espèce de champignon entomopathogène a également été testée contre les larves de simulies (Culicinomyces claviformis) (Sweeney et Roberts, 1983; Jaronsky et Axtell, 1983). Une seule souche s'est révélée toxique mais à une dose trop élevée pour envisager favorablement des essais de terrain; de plus, ces souches semblent perdre leur virulence au cours du temps. Un phénomène analogue a également été observé avec T. cylindrosporium.

Actuellement, les champignons entomopathogènes n'offrent encore aucune perspective d'utilisation contre les larves du complexe S. damnosum. Il en va de même des autres agents potentiels de lutte biologique tels que les mermithides ou les microsporidies (Guillet, 1984, 29). Le parasitisme des larves de simulies par les mermithides a été très étudié, notamment chez les larves du complexe S. damnosum en

Afrique de l'ouest (Mondet, 1981). Dans les conditions naturelles, un fort taux de parasitisme (jusqu'à 50% des femelles) n'empêche pas la transmission de l'onchocercose de se maintenir à un niveau hyperendémique. De nombreux obstacles, parmi lesquels la production de masse et la stabilité des oeufs au stockage font que, dans l'état actuel des choses, les mermithides n'offrent absolument aucune perspective d'utilisation dans la lutte biologique contre les vecteurs de l'onchocercose.

CONCLUSION

Dès les premiers essais de lutte contre les vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'ouest et la mise en place du programme en 1974, les recherches ont été orientées vers l'étude des phénomènes de résistance aux insecticides et la sélection de larvicides efficaces utilisables à grande échelle.

Toute opération de lutte contre les insectes basée sur l'application répétée d'insecticides est confrontée plus ou moins rapidement aux problèmes posés par la résistance. La lutte contre l'onchocercose n'échappe pas à ce constat qui, dans la pratique, souffre peu d'exceptions.

La résistance au téméphos mise en évidence en 1981 chez S. soubreuse et S. sanctipauli a atteint rapidement un niveau très élevé et s'est étendue à la plupart des autres insecticides organophosphorés. L'étude des phénomènes de résistance croisée a montré que la résistance au téméphos entraînait une réduction considérable de l'arsenal des produits de remplacement; de ce fait, toutes les mesures doivent être prises pour en étendre au maximum leur durée d'utilisation.

Ces mesures, comme l'usage alterné de larvicides ayant des modes d'action très différents, sont prises, compte-tenu outre les exigences opérationnelles, de l'expérience acquise dans le domaine de la résistance dans le complexe S. damnosum, mais également chez les moustiques, les mouches domestiques ou les insectes d'intérêt agricole. Toutefois, le bien-fondé de ces mesures ne repose que sur des hypothèses car il n'existe encore aucun moyen de prévoir l'évolution des phénomènes de résistance sur le terrain, surtout dans le cas des simulies du complexe S. damnosum.

L'utilisation des insecticides en agriculture doit être prise en compte dans l'évaluation de la pression sélective exercée sur les populations larvaires. En effet, si relativement peu de composés organophosphorés sont utilisés actuellement dans la protection des cultures, il n'en va pas de même des pyréthri-noïdes dont l'utilisation va sans cesse croissant. Dans ce contexte, et si l'on tient compte des risques de résistance croisée entre les organochlorés et les pyréthri-noïdes, les composés de cette famille ne devraient pas être considérés comme des larvicides de remplacement à part entière.

Dans certains cas, la résistance à un insecticide peut régresser soit par arrêt de la pression sélective soit, éventuellement, sous la pression sélective d'un autre insecticide. Il importe de suivre ces phénomènes avec beaucoup d'attention, mais il demeure prudent de considérer que, globalement, la résistance est le plus souvent une "voie à sens unique". L'extension des traitements vers l'ouest dans la zone du Programme de lutte va très probablement réduire et annuler les phénomènes de réinvasion ce qui, d'un point de vue logistique et épidémiologique est éminemment souhaitable. Toutefois, cette extension, qui représente une évolution logique d'un programme qui doit être mené à son terme doit être considérée comme étant, a priori, un facteur de risque dans le développement possible de la résistance aux insecticides chez les espèces vectrices savaniques. Cela souligne d'autant plus la nécessité de sélectionner des nouveaux larvicides utilisables à grande échelle en cas de résistance au téméphos.

Plusieurs dispositifs et méthodes ont été mis au point pour évaluer l'efficacité des larvicides antisimulidiens, qu'il s'agisse de larvicides conventionnels, de régulateurs de croissance ou d'agents de lutte biologique. La difficulté majeure réside désormais dans la découverte de nouveaux insecticides utilisables. Dans un premier temps, l'effort devrait être porté sur l'évaluation des composés existants qui n'ont pas tous, loin s'en faut, fait l'objet d'essais contre les larves de simulies. Il faudrait également, en coopération avec l'industrie, évaluer l'activité des nouvelles molécules dont une proportion infime atteint le stade du développement commercial. A plus long terme, les recherches de nouvelles classes d'insecticides devraient être encouragées notamment les substances insecticides produites par les organismes vivants. L'exemple de l'Avermectine est à ce sujet révélateur car il a montré qu'une substance analogue à un antibiotique pouvait constituer l'un des insecticides les plus efficaces jamais testés contre les larves de simulies. Il existe à découvrir et à étudier probablement bien d'autres substances insecticides que les lactones des Avermectines ou les polypeptides des toxines bactériennes. Toutefois, il importe de rappeler que le développement d'un nouvel insecticide est un processus long et très onéreux qui de ce fait restera probablement de la compétence des compagnies industrielles dont la tendance actuelle serait plutôt de restreindre le nombre des nouveaux composés mis sur le marché.

L'évaluation des régulateurs de croissance devra être intensifiée en dépit des résultats médiocres obtenus jusqu'à présent. Les recherches devront être poursuivies également afin de mieux comprendre pourquoi des produits remarquablement efficaces contre les larves de moustiques n'ont qu'un effet très limité sur les larves de simulies. L'utilisation éventuelle des régulateurs de croissance suppose également des progrès dans la technologie des formulations à relargage progressif ainsi que dans les techniques d'applications. Toutefois, les conditions hydrologiques des rivières d'Afrique de l'ouest (fluctuations de débits, sédiments, algues...) ne sont, a priori, pas favorables à l'utilisation de formulations à relargage lent, permettant de maintenir en permanence une très faible concentration de produit dans les rapides.

Parallèlement à l'évaluation des nouveaux insecticides, un certain nombre de recherches devraient être entreprises, dans plusieurs domaines, notamment:

- la spécificité d'action des formulations sur les larves du complexe S. damnosum;
- leur devenir dans les cours d'eau (dispersion, adsorption..) et les facteurs, hydrologiques notamment, qui conditionnent la portée des traitements;
- les modalités de nutrition des larves de simuliés: la mise au point des formulations particulières, notamment celles de B. thuringiensis H-14 passe par une meilleure connaissance des facteurs qui conditionnent le captage et l'ingestion des fines particules par les larves.

Les perspectives offertes par la lutte biologique se limitent actuellement à l'emploi du B. thuringiensis H-14. Les premiers résultats obtenus ont été très prometteurs mais l'amélioration des formulations a été plus lente qu'on ne l'espérait initialement. Suite à la résistance au téméphos puis au chlorphoxime, cet entomopathogène a atteint très rapidement le stade de l'utilisation opérationnelle, avant que la production n'en soit totalement maîtrisée; c'est ce qui explique les difficultés rencontrées dans la production de lots de qualités rigoureusement constantes. Toutefois, cette utilisation précoce, en motivant l'industrie, a eu sans aucun doute un effet favorable en accélérant le processus de mise au point du B. thuringiensis H-14 comme larvicide antisimulidien.

En quatre années, les résultats obtenus sont encourageants puisque les nouvelles formulations devraient permettre, si leurs qualités se confirment, de généraliser l'emploi du B. thuringiensis H-14 en période de basses eaux soit 6 à 8 mois par an, dans toute la zone du Programme, entraînant une diminution très sensible de la pression sélective par les insecticides chimiques ainsi qu'une diminution de la pression sur l'environnement. Un emploi étendu à plus de huit mois serait bien entendu souhaitable mais il est peu probable, du moins dans un avenir proche, que les formulations de B. thuringiensis H-14 puissent être utilisées en périodes de hautes eaux en raison d'une part des quantités trop importantes de produit à appliquer et d'autre part de la portée réduite de ces formulations. Cette portée, selon toute vraisemblance, est et restera inférieure à celle des meilleurs larvicides chimiques durant la période des hautes eaux.

L'emploi des toxines bactériennes du fait de leurs propriétés remarquables, représente sans aucun doute, en matière de lutte larvicide, l'une des solutions d'avenir les plus prometteuses. Les manipulations génétiques par exemple permettront très vraisemblablement d'améliorer significativement les conditions de culture des bactéries pour obtenir des formulations plus performantes et adaptées à la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose, ou contre les larves de moustiques.

Au moment de sa mise en place en 1974, le Programme de lutte contre l'onchocercose reposait sur une seule méthode, la lutte antivectorielle, et disposait d'un seul insecticide, le téméphos. Depuis, un effort de recherches important a été consacré à la mise au point de nouveaux moyens de lutte utilisables à grande échelle. Ces recherches, qui constituent une composante essentielle du Programme, ont été orientées vers deux axes prioritaires: la recherche de nouveaux insecticides d'une part et de médicaments utilisables en campagne de masse, d'autre part.

Des insecticides nouveaux ont été développés, notamment un agent de lutte biologique qui a atteint le stade de l'utilisation opérationnelle. Dans le même temps, les techniques d'application ont été améliorées et les conditions hydrologiques des rivières mieux étudiées afin d'optimiser leur emploi. Parallèlement, les recherches sur la chimiothérapie ont permis de sélectionner l'Ivermectine[®], un médicament filaricide qui offre des perspectives d'utilisation prometteuses.

Ainsi la recherche permettra-t-elle de mettre à la disposition du Programme de lutte plusieurs outils complémentaires qui, intégrés dans sa stratégie, lui donneront la possibilité d'atteindre au mieux ses objectifs, dans les délais prévus, et ce pour le plus grand bénéfice des états participants.

BIBLIOGRAPHIE

Note : Les références bibliographiques suivies d'un numéro
(ex : Guillet *et al.*, 1985 d, (7))
renvoient aux articles présentés dans ce document.

- de BARJAC, H. - 1978. Une nouvelle variété de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques : *B. thuringiensis* var. *israelensis* sérotype 14. C.R. Acad. Sci. Paris, 286 D, 797-800.
- BELLEÇ, C. - 1984 a. Les techniques et méthodes de récoltes des adultes des espèces du complexe *Simulium damnosum*. Application à l'échantillonnage, la biologie et l'écologie des vecteurs, l'épidémiologie de l'onchocercose et la lutte antivectorielle. Thèse Doct. Etat, Univ. Paris Sud.
- BELLEÇ, C. et HEBRARD, G. - 1984 b. Déplacement des adultes de *Simulium damnosum* s.l. aux alentours des gîtes préimaginaux. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XXII (1).
- BROWN, A.W., LEWALLEN, L.L. et GILLIES, P.A. - 1963. Organophosphorus resistance in *Aedes nigromaculis* in California. Mosq. News, 23, 341-345.
- CHANCE, M.M. - 1977. Influence of water flow and particle concentration on larvae of the blackfly *Simulium vittatum* (Diptera : Simuliidae) with emphasis on larval filter feeding. Ph. D. thesis, Edmonton-Alberta, 236p.
- CHARLES, J. et de BARJAC, H. - 1982. Sporulation et cristallogénèse de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en microscopie électronique. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 133 A, 425-442.
- COMINS, H.N. - 1977. The development of insecticide resistance in the presence of migration. J. theor. Biol., 64, 177-197.
- DEJOUX, C. - 1979. Recherches préliminaires concernant l'action de *Bacillus thuringiensis* de Barjac sur la faune d'invertébrés d'un cours d'eau tropical. Doc. mim. OMS, WHO/VBC/79.721, 11p.
- DEJOUX, C., ELOUARD, J.M., JESTIN, J.M., GIBON, F. et TROUBAT, J.J. - 1980. Action du téméphos (Abate^R) sur les invertébrés aquatiques : mise en évidence d'un impact à long terme après six années de surveillance. Doc. mim. n° 36, Lab. Hydrobio. Bouaké, Côte d'Ivoire, 14p.
- ELOUARD, J.M. et ELSÉN, P. - 1977. Variations de l'absorption des particules alimentaires et de la vitesse de transit digestif en fonction de certains paramètres du milieu chez les larves de *Simulium damnosum* Theobald 1903 (Diptera : Simuliidae). Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 15, 29-39.
- ELSEN, P. - 1979. La nature et la taille des particules ingérées par les larves du complexe *Simulium damnosum* dans les rivières de Côte d'Ivoire. Rev. Zool. Afr., 93, 476-484.

- ELSEN, P. et HEBRARD, G. - 1979. Le transit intestinal chez les larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera : Simuliidae) en Afrique de l'Ouest. II - Influence de la température de l'eau, de la concentration des particules en suspension et de la nature de ces particules. Ann. Soc. belge Méd. trop., 59, 49-58.
- ELSEN, P. - 1980. Le transit intestinal chez les larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera : Simuliidae) en Afrique de l'Ouest. III - Influence du stade larvaire, du nyctémère et de la saison. Ann. Soc. belge Méd. trop., 60, 203-212.
- FREDEEN, F.J.H., ARNASON, A.P. et BERCK, B. - 1953. Adsorption of DDT on suspended solids in river water and its role in black fly control. Nature, 171, 700.
- FREDEEN, F.J.H., SAHA, J.G. et BALBA, M.N. - 1975. Residues of methoxychlor and other chlorinated hydrocarbons in water, sand and selected fauna following injections of methoxychlor black fly larvicide into the Saskatchewan River, 1972. Pestic. Monit. J., 8, 241-246.
- GARMS, R., WALSH, J.F. et DAVIES, J.B. - 1979. Studies on the reinvasion of the Onchocerciasis Control Programme in the Volta river basin by *Simulium damnosum* with emphasis on South Western areas. Tropenmed. Parasit., 30, 345-362.
- GAUGLER, R. et MOLLOY, D. - 1980. Feeding inhibition in black fly larvae (Diptera : Simuliidae) and its effects on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Environ. Entomol., 9, 704-708.
- GEORGHIOU, G.P., LAGUNES, A. et BAKER, J.D. - 1980. A progress report on the impact of joint rotational and sequential use of insecticides on the development of resistance by mosquitos. Proceedings, 48th annual conference of California mosquito and vector control association, January 20, 90-92.
- GIBON, F. et TROUBAT, J.J. - 1980. Effets d'un traitement au chlorphoxim sur la dérive des invertébrés benthiques. Doc. mim. n° 37, Lab. Hydrobio. Bouaké, Côte d'Ivoire, 7p.
- GJULLIN, C.M., COPE, O.B., QUISENBERRY, B.F. et DUCHANOIS, F.R. - 1945. The effect of some insecticides on black fly larvae in Alaskan streams. J. Econ. Ent., 42, 100-105.
- GOLDBERG, L. et MARGALIT, J. - 1977. Bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. Mosq. News, 37, 355-358.
- GRUNEWALD, J. - 1981. Hydro-chemical and physical characteristics of the larval sites of species of the *Simulium damnosum* complex in Blackflies : the future for biological methods in integrated control (M. Laird ed.), Academic Press, 227-235.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 b. Méthodologie pour tester l'activité des larvicides sur les simulies du complexe *Simulium damnosum*. I - Insecticides conventionnels et agents de lutte biologique. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., (soumis pour publication).

- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 c. Méthodologie pour tester l'efficacité des formulations d'insecticides sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. II - Composés régulateurs de croissance. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., (soumis pour publication).
- JAMNBACK, H. et FREMPONG-BOADU, J. - 1966. Testing black fly larvicides in the laboratory and in streams. Bull. WHO, 34, 405-421.
- JAMNBACK, H. et MEANS, R.G. - 1968. Formulation as a factor influencing the effectiveness of Abate^(R) in control of black flies (*Diptera* : *Simuliidae*). Proc. 55 Ann. Meet. N.J. Mosquito Ext. Assoc., Atlantic City, March 19-22, 1968, 89-94.
- KEIDING, J. - 1967. Persistence of resistant populations after the relaxation of the selection pressure. World Rev. Pest. Control, 6 (4), 115-130.
- KURTAK, D.C. - 1978. Efficiency of filter feeding of black fly larvae (*Diptera* : *Simuliidae*). Can. J. Zool., 56, 1608-1623.
- KURTAK, D.C., GUILLET, P., JAMNBACK, H., MEREDITH, S.E.O., OCRAN, M., RENAUD, P., PAUGY, D. et SUBRA, R. - 1984. Resistance to insecticides in the *Simulium damnosum* complex. Operational consequences, development of new chemicals and formulations. Abstract, XI international congress for tropical medicine and malaria, Calgary, Canada, september 16-22, 1984, 79.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1979. Factors affecting feeding rates of black fly larvae. Mosq. News, 39, 315-319.
- McDONALD, I.C. et GRAYSON, Mc.D. - 1966. Toxicity of two carbamate insecticides to resistant and normal strains of the german cockroach. J. Econ. Ent., 59, 1407-1409.
- McGAUGHEY, W.H. - 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science, 229, 193-195.
- MATSUO, K. - 1984. Use of temephos larvicide in solid form for the control of onchocerciasis in Guatemala. Bull. Pan Am. Health Organ., 18 (1), 58-61.
- MAY, M. - 1985. Evolution of pesticide resistance. Nature, 315, 12-13.
- MONDET, B. - 1981. Etudes sur *Isomermis lairdi* (Nematoda : Mermithidae) parasite de *Simulium damnosum* s.l. (*Diptera* : *Simuliidae*) en Afrique de l'Ouest. Tav. et Doc. ORSTOM, 141, 161p.
- MOUCHET, J., QUELENNEC, G, BERL, D., SECHAN, Y. et GREBAUT, S. - 1977. Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de *Simulium damnosum* s.l. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 15, 53-66.
- NICKERSON, K.W. - 1982. Chemistry and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal. IIIrd International Colloquium on Invertebrate Pathology, Brighton, U.K., 6-10 september 1982, 444-447.
- OCRAN, M.H., DAVIES, J.B., AGOUA, H., GBOHO, C. et OUEDRAOGO, J. - 1982. River water temperatures in the Onchocerciasis Control Programme Area. Doc. mim. OMS, WHO/VBC/82.848.

- OGITA, Z. - 1961 a. An attempt to reduce and increase insecticide-resistance in *Drosophila melanogaster* by selection pressure. *Botyu Kagaku*, 26, 7-17.
- OGITA, Z. - 1961 b. Relationship between the structure of compounds and negatively correlated activity. *Botyu Kagaku*, 26, 18-30.
- OHBA, M. et AIZAWA, K. - 1979. A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* 11a : 11c Flagellar antigenic structure : *Bacillus thuringiensis* subsp. *kyushuensis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 33, 387-388.
- PASTEUR, N. et GEORGHIOU, G.P. - 1981. Filter paper test for rapid determination of phenotypes with high esterase activity in organophosphate resistant mosquitoes. *Mosq. News*, 41 (1), 181-183.
- PRASITTISUK, C. et BUSVINE, J.R. - 1977. DDT resistant mosquito strains with cross-resistance to pyrethroids. *Pest. Sci.*, 8 (5), 527-533.
- PRIESTER, T.M., GEORGHIOU, G.P., HAWLEY, M.K. et PASTERNAK, M.E. - 1981. Toxicity of pyrethroids to organophosphate-carbamate and DDT resistant mosquitoes. *Mosq. News*, 41 (1), 143-150.
- PADUA, L.E., OHBA, M. et AIZAWA, K. - 1980. The isolates of *Bacillus thuringiensis* serotype 10 with a highly preferential toxicity to mosquito larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 36, 180-186.
- PADUA, L.E., GABRIEL, B.P., AIZAWA, K. et OHBA, M. - 1982. *Bacillus thuringiensis* isolated from the Philippines. *Philipp. Ent.*, 5, 199-208.
- QUELENNEC, G., PHILIPPON, B., CORDELLIER, R. et SIMONKOVITCH, E. - 1967. Essais d'activité d'une poudre insecticide à base de Sevin contre les larves de simulies (*Diptera : Simuliidae*). *Med. trop.*, 30 (4), 526-529.
- QUELENNEC, G. - 1971. Field trials of new insecticide formulations, OMS-708, Resmethrin and OMS-1155, against black fly larvae. WHO/VBC/71.310, unpublished mim. doc., 5p.
- QUILLEVERE, D., GOUZY, M., SECHAN, Y. et PENDRIEZ, B. - 1976. Etude du complexe *Simulium damnosum* en Afrique de l'Ouest. IV - Analyse de l'eau des gîtes larvaires en saison sèche. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 14, 315-330.
- QUILLEVERE, D., GOUZY, M., SECHAN, Y. et PENDRIEZ, B. - 1977. Etude du complexe *Simulium damnosum* en Afrique de l'Ouest. VI - Analyse de l'eau des gîtes larvaires en saison des pluies ; comparaison avec la saison sèche. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, 15, 195-207.
- REITER, P. - 1982. Migration and the dilution of resistance genes. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 72 (2), 282-283.
- ROSS, D.H. et CRAIG, D.A. - 1980. Mechanisms of fine particle capture by larval black flies (*Diptera : Simuliidae*). *Can. J. Zool.*, 58, 1186-1192.
- SCHAEFER, C.H. et WILDER, W.H. - 1972. Insect developmental inhibitors : a practical evaluation as mosquito control agents. *J. Econ. Entomol.*, 65 (4), 1066-1071.

- SCHRODER, P. - 1981. On the nutritional biology of the larvae of *Ogdamia ornata* Meigen (Diptera : Simuliidae). 3 - Ingestion, egestion and assimilation of 14 C-labelled algae. Arch. Hydrobiol. Suppl., 59, 97-133.
- SWEENEY, A.W. et ROBERTS, D. - 1983. Environ. Entomol., 12, 774-777.
- TAKOAKA, H., OCHOA, J.O., TAKAHASHI, M. et TAKAHASHI, H. - 1981. Evaluation of temephos as a larvicide against *Simulium ochraceum* (Diptera : Simuliidae) in Guatemala. J. Med. Entomol., 18 (2), 145-152.
- TAYLOR, C.E., QUAGLIA, F. et GEORGHIOU, G.P. - 1983. Evolution of resistance to insecticides : a cage study on the influence of migrations and insecticide decay rate. J. Econ. Ent., 76 (4), 704-707.
- TYRELL, D.J., BULLA Jr., L.A., ANDREWS Jr., R.E., KRAMER, K.J., DAVIDSON, L.I. et NORDIN, P. - 1981. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. J. Bacteriol., 145 (2), 1052-1062.
- UMINO, T., SUZUKI, T. et OCHOA, J.O. - 1983. Insecticide studies in vector control of Guatemalan onchocerciasis. 1 - Short carry of temephos in minute streamlets. Jap. J. Sanit. Zool., 34 (3), 213-219.
- UMINO, T. et SUZUKI, T. - 1984. Insecticide studies in vector control of Guatemalan onchocerciasis. 3 - Laboratory tests on adsorption of larvicide to soils. Jap. J. Sanit. Zool., 35 (1), 1-6.
- UNDEEN, A.H. et NAGEL, W.L. - 1978. The effect of *Bacillus thuringiensis* ONR-60A strain (Goldberg) on *Simulium* larvae in the laboratory. Mosq. News, 38, 524-527.
- UNDEEN, A.H. et BERL, D. - 1979. Laboratory studies on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac against *Simulium damnosum* (Diptera : Simuliidae) larvae. Mosq. News, 39, 742-745.
- UNDEEN, A.H., TAKAOKA, H. et HANSEN, K. - 1981. A test of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac as a larvicide for *Simulium ochraceum*, the Central American vector of onchocerciasis. Mosq. News, 41, 37-40.
- WALLACE, J.B. et MERRITT, R.W. - 1980. Filter-feeding ecology of aquatic insects. Ann. Rev. Entomol., 25, 103-132.
- WOTTON, R.S. - 1976. Evidence that black fly larvae can feed on particles of colloidal size. Nature (London), 261, 697.
- WOTTON, R.S. - 1978. The feeding rate of *Metacnephia tredecimatum* larvae (Diptera : Simuliidae) in a swedish lake outlet. Oikos, 30, 121-125.
-

RESUME

La lutte contre les vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest, faute de médicaments filaricides utilisables en campagne de masse, repose sur l'interruption de la transmission par la destruction des vecteurs, les simulies appartenant au complexe *Simulium damnosum*.

Compte-tenu des possibilités de dispersion des femelles vectrices et de la concentration des larves dans les rapides, c'est contre ces dernières, qui constituent le maillon le plus vulnérable, que la lutte est dirigée. Pour être efficace, une campagne de lutte doit reposer sur l'application hebdomadaire de larvicides dans les gîtes préimaginaux (rapides), sur de très vastes étendues et pendant une quinzaine d'années sans interruption, étant donnée la longévité du parasite chez l'homme.

En 1974, l'Organisation mondiale de la Santé a mis en place en Afrique de l'Ouest un vaste programme de lutte contre l'onchocercose qui couvre actuellement une superficie d'environ 770 000 km², où chaque semaine, de 6 000 à 23 000 km de rivières selon la saison sont surveillés et au besoin traités. Cette opération, prévue pour durer au moins 20 ans, reposait initialement sur l'utilisation d'un seul insecticide, l'Abate [®], une formulation de téméphos, composé organophosphoré.

La pression sélective exercée par l'insecticide sur les populations larvaires est très forte, de même que la pression sur l'environnement dans des écosystèmes lotiques sensibles. Il importait donc de sélectionner de nouveaux larvicides, d'une part pour faire face au risque de développement d'une résistance au téméphos, et d'autre part, pour limiter au maximum l'impact des traitements sur les organismes non cibles.

Les larves de simulies vivent fixées dans les rapides et se nourrissent en captant les fines particules naturelles en suspension dans l'eau. L'insecticide doit être formulé de manière à pouvoir atteindre la cible. Il peut agir par contact ou par ingestion ; dans ce dernier cas, il s'agit soit de matière adsorbée sur les particules naturelles dont se nourrissent les larves, soit directement d'insecticides particuliers. Les contraintes de l'utilisation opérationnelle conduisent à rechercher des formulations liquides aussi concentrées que possible et parfaitement auto-dispersibles. La formulation revêt, en matière de larvicides anti-simulidiens, une importance primordiale. Mal formulé, le meilleur insecticide n'aura aucune efficacité.

Pour tester l'efficacité des formulations et comparer leurs performances respectives, il a fallu mettre au point des méthodologies adaptées, en tenant compte de la cible : les larves du complexe *Simulium damnosum*, et du mode d'action des insecticides utilisés.

Dans le cas des insecticides chimiques, l'exposition des larves se fait dans un dispositif fonctionnant en circuit fermé avec de l'eau de rivière, ce qui permet l'adsorption éventuelle de la matière active sur les particules naturelles. Le dispositif de mise en observation des larves après le contact varie selon que l'insecticide agit rapidement ou au contraire à retardement, dans le cas par exemple des composés régulateurs de croissance.

Pour les larvicides biologiques tels que les formulations à base de la bactérie sporogène *Bacillus thuringiensis* H14, le traitement et l'observation s'effectuent dans un dispositif de gouttières fonctionnant en circuit ouvert, les phénomènes d'adsorption ne jouant dans ce cas apparemment aucun rôle.

Les larvicides les plus efficaces sont ensuite testés en rivière lors d'essais en vraie grandeur destinés à contrôler leur efficacité et à mesurer leur portée.

Plusieurs formulations ont pu être sélectionnées, pour la plupart à base de composés organophosphorés. Des essais ont été réalisés avec des produits micro-encapsulés composés de capsules digestibles ou à relargage progressif de la matière active. Leur mise au point finale a été interrompue lorsqu'ont été mis en évidence les phénomènes de résistance au téméphos et surtout de résistance croisée à la plupart des composés organophosphorés utilisables.

Ces phénomènes de résistance ont été observés chez deux espèces forestières *S. soubrense* et *S. sanctipauli*. Ils ont réduit pratiquement à néant l'arsenal des insecticides de remplacement du téméphos. L'utilisation de produits synergistes n'est pas envisageable. Les espèces savanicoles n'ont pas encore développé de résistance aux organophosphorés. En revanche, une forte résistance au DDT a été observée, suite à l'usage agricole de cet insecticide.

Un effort particulier a été entrepris pour rechercher de nouveaux larvicides ayant des modes d'action radicalement différents de celui des insecticides conventionnels. En effet, ceux-ci n'offraient alors plus que des perspectives d'utilisation très limitées, les organochlorés à cause de la résistance au DDT, les carbamates parce qu'ils ne sont généralement pas de bons larvicides et les pyréthrinoïdes à cause de leur forte toxicité pour les organismes non-cibles. Les recherches ont donc été orientées vers d'autres groupes d'insecticides, d'une part les régulateurs de croissance, juvénoïdes ou ecdysoïdes, et d'autre part, les toxines produites par les bactéries sporogènes, notamment le *Bacillus thuringiensis* H14.

Les principales difficultés rencontrées dans l'évaluation des régulateurs de croissance ont été d'ordre méthodologique. Cet aspect résolu, plusieurs composés ont pu être évalués, et certains facteurs conditionnant leur toxicité ont été étudiés. Aucun des produits expérimentés, pourtant remarquablement efficaces contre les larves de moustiques, n'a permis d'obtenir, avec un temps de contact court (inférieur ou égal à 15 mn), une réduction d'émergence totale à des doses concrètement utili-

sables. Un seul composé, un carbamate ayant une activité juvénoïde, s'est avéré relativement efficace. Toutefois, les composés de ce type n'offrent que des perspectives très limitées car ils ne sont généralement actifs que sur les larves âgées.

D'autres types d'insecticides ont été recherchés, comme par exemple les avermectines, des substances insecticides analogues aux antibiotiques. Elles se sont révélées remarquablement toxiques pour les larves de simulies et ont en outre un effet régulateur de croissance. Si l'utilisation des avermectines comme larvicide antisimulidien est peu probable du fait de leur forte toxicité pour les mammifères et de leur très large spectre d'activité, les résultats obtenus soulignent la nécessité de tester systématiquement de nouveaux types d'insecticides, en particulier des substances naturelles produites par des organismes vivants tels que le *B. thuringiensis* H14.

Les premiers essais réalisés dès 1979 avec cette bactérie sporogène, ont permis de mettre en évidence la toxicité remarquable de cette bactérie pour les larves de simulies ainsi que son innocuité pour les organismes non-cibles. Une étude de stabilité a montré que le produit pouvait être conservé plusieurs mois en zone tropicale sans aucune altération. Si les perspectives offertes par cet entomopathogène se sont avérées d'emblée remarquables, son utilisation opérationnelle supposait la mise au point d'une formulation adaptée.

Deux principaux types de formulations étaient réalisables, les unes composées de gros agrégats de spores et cristaux d'endotoxine d'une taille moyenne de 30 à 50 μ , les autres de fines particules individualisées (0,5 à 1,5 μ). Globalement, les premières se sont révélées beaucoup plus efficaces. L'influence de la taille des particules et de leur consistance a été étudiée en relation avec les modalités de nutrition des larves de simulies. Toutefois, il est apparu ultérieurement, que leur efficacité diminuait sensiblement dans les eaux turbides du fait de la compétition, au niveau de l'ingestion, entre les particules naturelles et celles de *B. thuringiensis* H14. De plus, leur efficacité s'est révélée proportionnelle au temps de contact qui, dans la pratique des traitements

est généralement très bref (quelques minutes). Après avoir testé d'autres types de formulations, le choix s'est porté finalement sur les suspensions de très fines particules dont l'efficacité, du fait du mode de nutrition des larves, est indépendante de la turbidité de l'eau et du temps de contact ; elles sont par conséquent mieux adaptées aux contraintes d'utilisation opérationnelle.

Lorsque la résistance au téméphos a été mise en évidence en 1981, une formulation de *B. thuringiensis* H14 avait déjà été testée en vraie grandeur, et sa stabilité au stockage sur le terrain dépassait 12 mois. En dépit de performances relativement modestes, son utilisation opérationnelle a dû être adoptée immédiatement, faute de larvicides chimiques de remplacement.

Une étude de qualité portant sur une production de 600 000 l a montré que l'industrie pouvait formuler massivement cette bactérie tout en garantissant une efficacité constante. Par la suite, grâce à une collaboration étroite avec plusieurs compagnies, plus de 200 formulations expérimentales furent testées en vue de mettre au point des formulations parfaitement auto-dispersibles, de qualités constantes et dont les quantités à appliquer ne dépassent pas 1,5 fois celles de l'Abate. Ce but a été atteint et l'utilisation opérationnelle d'une formulation de ce type est imminente.

Une des difficultés rencontrées dans la mise au point des produits à base de *B. thuringiensis* H14 réside dans le fait qu'il n'existe pas de relation systématique entre leur toxicité vis-à-vis des larves de moustiques et de simulies. Le titrage de la toxine s'effectue avec des larves d'*A. aegypti*, mais un titre *A. aegypti* élevé ne représente pas une garantie systématique d'efficacité contre les larves de simulies. Cette différence dépend étroitement des conditions d'utilisation de la toxine, le temps de contact et de transit intestinal relativement brefs chez les larves de simulies jouant apparemment un rôle important. La présence de protéases dans les préparations ou d'éventuelles protéases endogènes dans le cristal semble également jouer un rôle.

Actuellement, en dépit d'un important effort de recherche de larvicides de remplacement du téméphos, le *B. thuringiensis* H14 reste le seul alternatif réellement prometteur. Son utilisation en période de basses eaux sera progressivement étendue à l'ensemble du Programme de lutte si les qualités des nouvelles formulations se confirment. Ces dernières n'ont pas et n'auront probablement jamais de portée comparable à celle des meilleurs larvicides chimiques dont l'utilisation devrait être limitée aux courtes périodes pendant lesquelles le débit élevé des rivières ne permet pas l'utilisation du *B. thuringiensis* H14. Toutefois, son emploi généralisé engendre un risque, si minime soit-il, de développement d'une résistance. Une méthode a été mise au point pour évaluer et surveiller la sensibilité des larves du complexe *S. damnosum* à la toxine.

Des essais avec plusieurs souches d'une autre bactérie, *Bacillus sphaericus*, et avec des champignons entomopathogènes tels que *Tolypocladium cylindrosporium* ou *Metharrizium anisopliae* ont été négatifs.

Les nouveaux insecticides développés, notamment le *B. thuringiensis* H14, constituent autant d'outils qui, intégrés dans la stratégie du Programme de lutte, lui donneront la possibilité d'atteindre au mieux ses objectifs.

DEUXIEME PARTIE : ARTICLES PUBLIES OU SOUMIS POUR PUBLICATION.

EVALUATION DES INSECTICIDES CONVENTIONNELS



LA RECHERCHE DE NOUVELLES FORMULATIONS D'INSECTICIDES
UTILISABLES CONTRE LES LARVES DES VECTEURS DE L'ONCHOCERCOSE
EN AFRIQUE DE L'OUEST.

CONGRÈS SUR LA LUTTE CONTRE LES INSECTES EN MILIEU TROPICAL

LA RECHERCHE DE NOUVELLES FORMULATIONS D'INSECTICIDES UTILISABLES CONTRE LES LARVES DES VECTEURS DE L'ONCHOCERCOSE EN AFRIQUE DE L'OUEST ^(*)

P. GUILLET - H. ESCAFFRE

Institut de Recherches sur l'Onchocercose

B.P. 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire

INTRODUCTION

La lutte contre l'Onchocercose en Afrique de l'Ouest repose sur un traitement insecticide hebdomadaire appliqué à la totalité des gîtes préimaginaux à Simulium damnosum s.l. sur une superficie actuelle de 700.000 km². Jusqu'à présent une seule formulation, l'abate[®] Procida est utilisable et présente à la fois une grande efficacité sur les larves de simules et une relative innocuité sur la faune non cible. Il est vital dans une telle campagne de lutte programmée sur près de 20 ans, de disposer d'autres insecticides permettant de remplacer l'abate dans le cas où surviendrait une baisse de sensibilité ou une résistance à ce composé.

De 1967 à 1976 un grand nombre de formulations ont été testées en rivière contre S. damnosum s.l. lors d'essais en grandeur réelle. Ce schéma d'évaluation présentait un certain nombre d'inconvénients parmi lesquels : l'impossibilité de tester deux formulations dans des conditions identiques et de comparer directement les résultats, le délai de repeuplement des gîtes entre chaque essai, le coût élevé de ces opérations et enfin le faible nombre de formulations testées chaque année.

De nombreuses méthodes de laboratoire, visant à simuler des essais en rivière, ont été mises au point pour tester les larvicides anti-simulidiens (LEA et DALMAT 1954, MUIRHEAD-THOMSON 1957, WILTON et TRAVIS 1965, JAMNBACK et FREM-PONG-BOADU 1966, LACEY et MULLA 1977a). Ces essais ont été réalisés avec d'autres espèces que S. damnosum s.l. et les résultats sont souvent difficilement comparables à ceux obtenus sur le terrain.

Afin de pallier ces inconvénients, une nouvelle méthode d'évaluation a été étudiée pour sélectionner rapidement les larvicides les plus efficaces contre les larves de S. damnosum s.l.. L'idée de base a été de pratiquer en rivière des essais à échelle réduite, en isolant simultanément plusieurs fractions d'un gîte préimaginal à S. damnosum s.l. à l'aide de cages flottantes.

(*) Ce travail bénéficie d'une subvention de l'Organisation Mondiale de la Santé.

I. MATERIEL ET METHODES

I.1. Essais à échelle réduite

Les cages flottantes sont constituées de deux parties :

- une gouttière en aluminium longue de 2 m, de section rectangulaire (21cm x 15cm), dont la face supérieure est en plexiglass (pénétration de la lumière et observation des larves in situ).

- un collecteur de section rectangulaire (35cm x 20cm) relié à la gouttière par un manchon de tôle galvanisée long de 1m. Des pattes de fixation permettent d'amarrer les cages sur une barre métallique placée en travers d'un gîte préimaginal à S. damnosum s.l.. La vitesse du courant (≈ 90 cm/s) maintient les cages parallèlement à la surface, en position légèrement immergée.

Les larves de simulies accrochées sur leurs supports naturels sont collectées dans les gîtes situés en amont. Ces supports sont attachés dans la gouttière à l'extrémité postérieure. Les larves dérivant sous l'effet de l'insecticide sont récoltées dans un manchon cône de voile de nylon (mailles de 150 μ).

Le traitement a lieu 3 heures après la mise en place des supports dans les gouttières. Ce délai permet à toutes les larves de se placer favorablement dans le courant et d'avoir un comportement trophique normal lors du passage de l'insecticide.

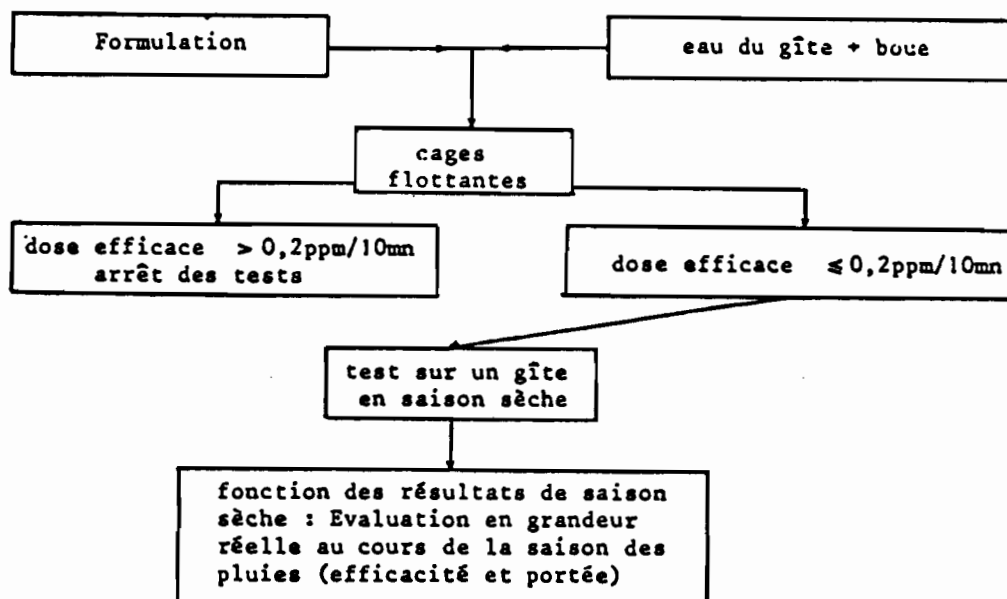
La formulation est mélangée à l'eau du gîte dans un fût de 250 litres. Ce mélange est ensuite injecté dans le collecteur à l'aide de trois buses à débit réglable. Le temps d'épandage généralement utilisé est de 10mn. Les larves dérivant après le traitement, considérées comme mortes, sont récoltées à intervalles réguliers. Le temps d'observation est de 12 heures. Le dénombrement des larves vivantes restées attachées aux supports permet de calculer le pourcentage de décrochement.

Une cage témoin pourvue de supports permet de connaître la dérive des larves en l'absence de traitement. Une cage dépourvue de support permet d'estimer la dérive naturelle des larves de simulies depuis les gîtes situés en amont. Dans les conditions normales celle-ci est généralement très faible.

I.2. Essais en rivière

Les formulations les plus prometteuses sont ensuite testées au cours de la saison sèche sur un gîte à S. damnosum s.l.. Le traitement se fait en une seule bande transversale légèrement en amont du gîte. Le décrochement des larves est contrôlé 24 heures après. Seul un traitement provoquant 100% de décrochement est considéré comme valable. Ce type d'essais est réalisable avec de faibles quantités de formulations et donne des informations préliminaires sur leur efficacité en rivière. Celles qui ont donné de bons résultats sont testées ultérieurement en période de hautes eaux. On peut alors en contrôler l'efficacité réelle et surtout en estimer la portée (celle de l'abate Procida est de 40 à 50 km).

Le schéma d'évaluation peut se résumer ainsi :



I.3. Les formulations

Quatre types de formulations sont théoriquement utilisables dans la lutte antismulidienne : les concentrés émulsifiables (CE), les poudres mouillables dispersibles (PMD), les "flowable" et les microcapsules. Toutes doivent posséder certaines caractéristiques parmi lesquelles : efficacité et portée suffisantes, faible toxicité pour l'homme et la faune non cible (arthropodes et poissons), faible rémanence, stabilité dans les conditions de stockage en milieu tropical. Enfin, elles doivent être adaptées aux modes de traitements (QUELENNEC, 1978).

Des spécifications précises n'ont été établies que pour les concentrés émulsifiables : densité, finesse et stabilité de l'émulsion...

Les poudres mouillables sont mal adaptées à la lutte antismulidienne. Le paramètre déterminant semble être la taille des particules.

Trop peu de données sur les "flowable" sont disponibles pour apprécier la validité de ce type de formulation.

Deux types de microcapsules ont été testés :

- les microcapsules digestibles qui ne libèrent la matière active qu'après la lyse de cette capsule par les enzymes digestifs de la larve.
- les microcapsules en polymères de synthèse perméables à la matière active. Celle-ci s'échappe progressivement dès la dispersion des capsules dans l'eau. Il importe que la quantité de matière active libérée au cours du transit intestinal soit suffisante pour intoxiquer la larve.

A partir de ces deux types de microcapsules, des formulations expérimentales sont mises au point en faisant varier un certain nombre de paramètres parmi lesquels : la taille des capsules (moyenne et variance de taille), leur densité et leur autodispersion dans l'eau, le degré de liaison des protéines intervenant sur la digestibilité des capsules ou celui des isomères conditionnant la perméabilité à la matière active.

II. RESULTATS

II.1. Validité de la méthode des cages flottantes

Onze formulations parmi celles qui avaient déjà été testées sur le terrain ont été utilisées dans les cages flottantes afin de comparer les résultats obtenus. Il existe une bonne corrélation entre ceux-ci au niveau du degré d'efficacité (tableau I).

Cependant les doses efficaces de l'abate Procida sont beaucoup plus élevées en cages flottantes (0,4 et 0,8ppm/10mn contre 0,05 et 0,1ppm/10mn) et varient selon le degré de turbidité des eaux. En diluant la formulation dans une eau très boueuse (particules $\leq 40 \mu$) la dose efficace passe de 0,8 à 0,2ppm/10mn. Le pourcentage de décrochement est directement proportionnel à la densité des particules en suspension dans l'eau (tableau II).

L'abate adsorbé sur ces particules agit essentiellement par ingestion. Cette faculté d'adsorption dépend de la matière active mais également de la formulation (tableau III) et peut expliquer les résultats obtenus sur le terrain.

Afin de ne pas éliminer d'éventuelles formulations présentant des caractéristiques semblables à celles de l'abate les concentrés émulsifiables sont systématiquement mélangés à une eau fortement boueuse avant chaque essai.

II.2. Evaluation des nouvelles formulations en cages flottantes

Les résultats obtenus sont résumés dans les tableaux IV a, b et c.

a) les concentrés émulsifiables (tableau IV a)

Seules les formulations à base de pyréthri-noïdes (perméthrine et K-othrine[®]) ont donné des résultats intéressants. La perméthrine est efficace à 0,075ppm/10mn ; en eaux claires ce dosage est de 0,2ppm/10mn. Son efficacité, comme celle de l'abate, semble donc liée à la densité de particules en suspension dans l'eau.

Deux formulations de K-othrine à 2,5% de dècamèthrine ont été testées. Elles ont été mises au point spécialement dans l'optique de la lutte antisimulidienne et leur composition est très voisine de celle de l'abate Procida. La présence de synergisant (piperonyl butoxide) dans l'une des deux formulations, n'accroît pas l'efficacité de façon significative. Malgré l'effet de K-O inhérent à la dècamèthrine toutes les larves qui dérivent sous l'effet de l'insecticide sont virtuellement mortes.

b) les poudres mouillables dispersibles (tableau IV b)

Seule la perméthrine présente un niveau d'efficacité intéressant. Cette formulation possède des particules beaucoup plus fines que l'abate ou le chlorphoxim.

c) les microcapsules (tableau IV c)

Le chlorpyrifos-méthyl (reldan[®]) en microcapsules digestibles est remarquablement actif contre les larves de simulies. La légère supériorité des lots B et D est seulement perceptible au niveau du décrochement des larves âgées (stades 6 et 7). Elle semble liée à la nature de l'agent de liaison plus qu'à l'épaisseur de la paroi des capsules. Par la suite, ont été testés six lots (A1 à F1) qui diffèrent uniquement par le degré de liaison croissant de A1 à F1. Les résultats ont été similaires et aucune différence très significative n'a été enregistrée.

Le pirimiphos-méthyl (actellic[®] M20) en microcapsules perméables de type "slow release" est moins efficace que le reldan. Seul le premier lot (JF 6180) testé a donné des résultats intéressants. Le lot Mali, théoriquement identique au précédent mais produit en grande quantité, donne en fait des résultats nettement moins bons. Les lots JF 6912 à JF 6915 (variation de la taille des capsules, de leur degré de liaison et de leur densité) ont tous une dose efficace supérieure à 0,5 ppm/10mn.

II.3. Les essais en rivière

En saison sèche, seuls l'abate lot 73 à 0,1 ppm/10mn et le reldan lot D à 0,05 ppm/10 mn ont provoqué 100% de décrochement.

Plusieurs formulations ont été testées en saison des pluies parmi lesquelles : l'azemetiphos 10% CE, l'abate 50% PMD et 20% CE lot 73, le reldan en microcapsules à 10% lots B, D, C1 et D1, l'actellic M20 (lot Mali) et la K-othrine 2,5% CE.

Seul l'abate 20% CE lot 73 et la K-othrine ont une activité égale ou supérieure à celle de l'abate Procida. La K-othrine donne des résultats remarquables tant par l'efficacité (5 à 7 ppb/10mn) que par la portée (10 à 15 km avec des débits inférieurs à 10 m/s). Malheureusement sa toxicité sur la faune non cible est très élevée.

Aucune des quatre formulations de reldan testées n'était correcte (microcapsules dégradées ayant perdu leur matière active).

L'actellic M20 (lot Mali) n'a qu'un effet partiel à 0,1 ppm/10mn.

III. DISCUSSION

La méthode des cages flottantes permet de tester rapidement les formulations dans des conditions proches de celles qui prévalent lors d'essais en rivière.

Le comportement trophique des larves a été étudié en injectant une poudre fluorescente dans les cages flottantes. Trois heures après leur mise en place, la totalité des larves se nourrissent normalement. Le contact préalable de la formulation avec une importante quantité d'eau du gîte (250 l) semble mettre en évidence l'influence éventuelle de la qualité de l'eau sur la toxicité de cette formulation.

L'analyse des résultats obtenus montre que certaines formulations, comparativement aux autres s'avèrent plus efficaces en cages flottantes que sur le terrain. Ce sont généralement des formulations qui n'ont pas les caractéristiques requises quant à la qualité de l'émulsion, la densité et la dispersion spontanée. De telles formulations dont l'efficacité a été surestimée sont éliminées dès le premier essai sur un gîte en saison sèche.

En revanche, aucune formulation efficace en rivière ne s'est montrée inefficace en cages flottantes. Ce point très important conditionne la validité de toute méthode d'évaluation des formulations antisimulidiennes. En effet, il a fallu depuis 1957, tester près de 90 formulations différentes pour en obtenir 4 réellement efficaces contre les larves de S. damnosum s.l., en faisant abstraction de leur toxicité sur la faune non cible.

C'est la composition de la formulation plus que la seule toxicité de la matière active qui détermine l'efficacité des larvicides antisimulidiens. De très légères différences au niveau de cette composition peuvent en modifier totalement l'efficacité, surtout pour les concentrés émulsifiables. La mise au point de ceux-ci reste le domaine réservé des firmes dans lequel la recherche a peu de moyens d'information et d'intervention.

Les microcapsules ont été mises au point pour pallier ces inconvénients et tenter d'améliorer la spécificité des formulations et leur portée. Les microcapsules de reldan tout en ayant une efficacité remarquable sont très sophistiquées et il est actuellement impossible de les produire en grandes quantités. Les nouveaux lots d'actellic M20 ont tous une efficacité médiocre. En faisant varier certains paramètres (taille des capsules, densité ...) on n'enregistre aucune différence significative dans les résultats. Paradoxalement, on ne peut expliquer les différences d'efficacité entre deux formulations théoriquement identiques comme l'actellic M20 lot JF 6180 et lot Mali.

Il est trop tôt pour préjuger des possibilités réelles d'utilisation des formulations microencapsulées dans la lutte antisimulidienne. Celles-ci font appel à des techniques nouvelles que les firmes maîtrisent encore mal. Une analyse précise des caractéristiques physico-chimiques des formulations déjà testées permettra peut-être de mettre en évidence le ou les facteurs qui conditionnent leur efficacité.

IV. PERSPECTIVES D'UTILISATION D'AUTRES TYPES DE LARVICIDES

IV.1. Les régulateurs de croissance

Deux types de régulateurs de croissance ont été testés contre les larves de Simulium. Le premier type avec le dimilin[®] (diflubenzuron) agit au moment de l'apolyse (mue). Le second type avec l'altosid[®] (méthoprène), mimétique d'hormone juvénile, n'agit que lors de la nymphose.

Ces produits sont mal adaptés à la lutte contre S. damnosum s.l.. Le dimilin n'agit à faible dosage qu'avec des temps de contact relativement longs (1 heure et plus) et les dosages efficaces sur le terrain s'avèrent élevés et difficilement réalisables (LACEY et MULLA 1977b, 1978a et b, 1979). L'altosid n'agit pratiquement que sur les stades larvaires âgés. Les jeunes larves doivent ingérer de très fortes quantités de matière active afin que la concentration, qui diminue d'une mue à l'autre, reste létale au moment de la nymphose. Pour ces produits la formulation joue également un très grand rôle.

IV.2. Le Bacillus thuringiensis

Treize souches de B. thuringiensis ont été testées contre les larves de Simulium (LACEY et MULLA 1977c). La mortalité varie de 64 à 88% après 24 heures de contact à une concentration de 10ppm. Une nouvelle variété de B. thuringiensis, B. thuringiensis israelensis sérotype 14 (de BARJAC 1978), très active contre les larves de diptères, a été testée au laboratoire contre les larves de Simulium (UNDEEN et NAGEL 1978, UNDEEN et BERL 1979). La poudre de B. thuringiensis israelensis testée en cages flottantes provoque 50% de décrochement à 0,05 ppm/10 mn et 100% à 0,2 ppm/10mn. L'effet sur la faune non cible semble extrêmement faible. Des essais en cours permettront d'apprécier les possibilités réelles d'utilisation d'un tel produit contre les larves de S. damnosum s.l..

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le schéma d'évaluation proposé permet de tester chaque année un nombre important de formulations nouvelles. Les cages flottantes servent d'une part à sélectionner rapidement les formulations les plus actives, d'autre part à expliquer certains des phénomènes complexes qui déterminent l'efficacité des formulations.

La plupart des concentrés émulsifiables conformes aux normes définies pour les larvicides antisimulidiens ont à ce jour été testés. En outre, le nombre de nouvelles matières actives lancées sur le marché chaque année est de plus en plus faible. Les insecticides du groupe des pyréthrinoïdes, s'ils s'avèrent très efficaces contre les larves de simulies, ont actuellement une toxicité sur la faune non cible qui limitera certainement beaucoup leurs possibilités d'utilisation dans les campagnes de lutte de grande envergure.

La recherche dans le domaine des formulations microencapsulées en est à ses débuts. Leur mise au point fait appel à des techniques sophistiquées et reste l'apanage des firmes qui ne peuvent qu'établir un compromis entre ce qui est techniquement réalisable et économiquement rentable.

D'une manière générale, les formulations antisimulidiennes sont très spécifiques, souvent longues à mettre au point et débouchent sur un marché relativement restreint. Mais c'est de leur utilisation que dépend actuellement le succès des vastes campagnes de lutte entreprises contre ce fléau qu'est l'onchocercose.

Cette lutte devrait, dans les années à venir, s'intensifier et s'étendre à la plupart des zones où sévit l'endémie onchocerquienne.

BIBLIOGRAPHIE

de BARJAC (H.), 1978 -

Une nouvelle variété de Bacillus thuringiensis très toxique pour les moustiques : B. thuringiensis var. israelensis sérotype 14.
C.R. Acad. Sc. Paris, 286, 797-800

JANBACK (H.), FREMPONG-BOADU (J.), 1966 -

Testing blackfly larvicides in the laboratory and in streams.
Bull. Wld. Hlth. Org., 34, 405-421

LACEY (L.A.), MULLA (M.S.), 1977 a -

A new bioassay unit for evaluating larvicides against blackflies.
J. econ. Ent., 70, 453-456

LACEY (L.A.), MULLA (M.S.), 1977 b -

Larvicidal and ovicidal activity of dixilin[®] against Simulium vittatum.
J. econ. Ent., 70, 369-373

LACEY (L.A.), MULLA (M.S.), 1977 c -

Evaluation of Bacillus thuringiensis as a biocide of blackfly larvae (Diptera Simuliidae).
J. Invert. Path., 30, 46-49

LACEY (L.A.), MULLA (M.S.), 1978 a -

Biological activity of diflubenzuron and three new IGRs against Simulium vittatum (Diptera : Simuliidae).
J. Amer. Mosquito Contr. Assoc., (Mosquito News), 38 (In press)

- LACEY (L.A.), MULLA (M.S.), 1978 b -
Factors affecting the activity of diflubenzuron against Simulium larvae
(Diptera : Simuliidae).
J. Amer. Mosquito Contr. Assoc., 38, (In press)
- LACEY (L.A.), MULLA (M.S.), 1979 -
Field evaluation of diflubenzuron against Simulium larvae
J. Amer. Mosquito Contr. Assoc., 39, (In press)
- LEA (A.O.), DALMAT (H.T.), 1954 -
Screening studies of chemicals for larval control of blackflies in Guatemala
J. Econ. Ent., 47, 135-141
- MUIRHEAD-THOMSON (R.C.), 1957 -
Laboratory studies on the reaction of Simulium larvae to insecticides
I. A laboratory method for studying the effects of insecticides on Simulium
larvae.
Amer. J. Trop. Med. Hyg., 6, 920-932
- QUELENNEC (G.), 1978 -
Characteristics of blackfly larvicide formulations.
Mimeographed document, OCP/SWG/78.5
- UNDEEN (A.H.), NAGEL (W.L.), 1978 -
The effect of Bacillus thuringiensis ONR-60 A strain (Goldberg) on Simulium
larvae in the laboratory.
Mosquito News, (In press).
- UNDEEN (A.H.), BERL (D.), 1979 -
Laboratory studies on the effectiveness of Bacillus thuringiensis var.
israelensis against Simulium damnosum larvae.
Nature, (In press)
- WILTON (D.P.), TRAVIS (B.V.), 1965 -
An improved method for simulated stream tests of blackfly larvicides.
Mosquito News, 25, 118-123

RESUME : Une nouvelle méthode basée sur l'utilisation de cages flottantes permet de tester les larvicides utilisables dans la lutte contre l'onchocercose. Elle donne des résultats comparables à ceux obtenus sur le terrain. L'évaluation des nouvelles formulations est présentée ainsi qu'un aperçu sommaire sur les possibilités d'utilisation d'autres types de larvicides (régulateurs de croissance, bacilles). Les recherches actuelles s'orientent sur la mise au point des formulations microencapsulées.

ABSTRACT : A new method, using floating cages, has been tested for screening new blackfly larvicide formulations suitable for onchocerciasis control in Africa. It gives results comparable to the field trials results. The evaluation of new formulations is shown with a brief review on the potentialities of new larvicides like insects growth regulators or bacillus. The actual researches concerns mostly microencapsulated formulations.

TABLEAU I . COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS EN CAGES FLOTTANTES ET SUR LE TERRAIN

Insecticide	Formulation	CAGES FLOTTANTES [*]		ESSAIS EN RIVIERE	
		Dosage ^{**}	% de décrochement des larves	Dosage	Disparition des larves
abate PROCIDA	lot 139 CE 20 %	0,4	100	0,05	totale sur 40-50 km
	lot 200 CE	0,4	100	0,05	-
abate AMERICAN- CYANAMID	lot 72 CE 20 %	0,4	92,5	0,05	partielle sur 2 km
	lot 73 CE 20 %	0,4	100	0,05	totale sur 40-50 km
	lot 74 CE 20 %	0,4	28,1	0,05	partielle sur 3-9 km
	lot 500 CE 50 %	0,4	24,8	0,1	partielle
	lot 500 CE 50 %	1,8	100	0,3	totale sur 22 km
pirimiphos. methyl	CE 20 %	0,4	55,8	0,1 et 0,3	partielle
bromophos	CE 20 %	1,2	18	0,05	partielle
chlorpyrifos - methyl	CE 20 %	0,4	88,2	0,05	totale sur 20 km
chlorphoxim	CE 20 %	0,06	100	0,05	totale sur 45 km
methoxychlore	CE 20 %	1,2	88,7	0,1 et 0,3	partielle

* essais réalisés en saison des pluies (eaux troubles) sans adjonction de boue.

** dosages en ppm/10mn.

TABLEAU II . DECROCHEMENT DES LARVES EN FONCTION DE LA QUANTITE DE PARTICULES EN SUSPENSION DANS L'EAU . Abate PROCIDA à 0,05 ppm/10 mn.

Nombre de litres de boue [*] rajoutés	0	0,5	1	2	4
% de décrochement des larves	7,5	27,7	62,7	89,1	93,6

* boue récoltée dans la rivière et tamisée à 40 µ

TABLEAU III . EFFICACITE DES DIFFERENTES FORMULATIONS D'ABATE EN FONCTION DE LA TURBIDITE DE L'EAU

Insecticide	Formulation	Dosage en ppm/10mn	% de décrochement des larves	
			Eaux claires	Eaux boueuses
abate	lot 72	0,1	81,5	99,5
		0,2	90	99,5
AMERICAN- CYANAMID	lot 73	0,1	58,4	99,2
		0,2	88,7	100
	lot 74	0,1	31	94,8
		0,2	42,3	97,4
abate PROCIDA	lot 139	0,1	42	99,4
		0,2	49	100
		0,4	82,1	—
		0,8	100	—

TABLEAUX IV . RESULTATS OBTENUS EN CAGES FLOTTANTES AVEC LES NOUVELLES FORMULATIONS

IVa - Concentrés émulsifiables (CE)

Insecticide et firme	Formulation CE	Dosage en ppm/10mn	Décrochement des larves (%)
abate AMERICAN-CYANAMID	44 %	1,2	25
	20 % lot 73	0,2	100
azemetphos CIBA-GEIGY	20 %	0,2 0,08	100 73
	12 %	0,2 0,1	100 83,4
fenitrothion SUMITOMO-CHEMICAL	20 %	0,4 0,8	63,2 100
tetrachlorvinphos SHELL	24 %	0,2	42,7
ekamet SANDOZ	50 %	0,2 0,4	84,6 100
permethrine WELLCOME	20 %	0,05 0,075	67,1 100
K-othrine PROCIDA	2,5 %	0,005	71
		0,01	98,4
		0,02	98,3
		0,04	100
	2,5 % synergisé	0,005	84,1
		0,01	96,2

IVb - Poudre mouillable dispersible (PMD)

Insecticide et firme	Formulation PMD	Dosage en ppm/10mn	Décrochement des larves (%)
abate AMERICAN-CYANAMID	50 %	0,2 0,4	96,7 100
chlorphoxim BAYER	50 %	0,2	98,3
permethrine WELLCOME	25 %	0,05 0,1	99,3 100

IVc - Formulations microencapsulées

Insecticide et firme	Formulation	Diamètre moyen des capsules (µ)	Dosage en ppm/10 mn	% de décrochement des larves	
				stades 6 et 7	Total
chlorpyrifos-methyl DOW-CHEMICAL	reidan 10% lot A	7	0,025	94,4	98,6 100
			0,05	100	
			0,025	99,1	
			0,05	100	
	lot B	6,8	0,025	97	97 100
			0,05	100	
			0,025	98,9	
			0,05	100	
pirimiphos-methyl IMPERIAL-CHEMICAL-INDUSTRY (I.C.I.)	actellic M 20 % JF 6180	2	0,05	98,6	94,5 100
			0,1	100	
	lot Mall	2	0,25	97,5	67,8 57,7
			0,5	80	
	JF 6912	4	0,25	80	44,3 57,7
			0,5	—	
			0,25	86,6	
			0,5	25,4	
			0,25	14,3	
			0,5	1,0	
JF 8914 A	< 1	0,25	80	72,9 100	
		0,5	80		
		0,25	100		
		0,5	100		
pirimiphos-methyl (I.C.I.)	pirimotec 20 %		0,4	100	97,8
sumicidin SUMITOMO-CHEMICAL	10 %	≈ 66	0,4	0	2,4

2

EVALUATION OF NEW BLACKFLY LARVICIDES
FOR USE IN ONCHOCERCIASIS CONTROL IN WEST AFRICA.



WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

WHO/VBC/80.783
ENGLISH ONLY

EVALUATION OF NEW BLACKFLY LARVICIDES FOR USE IN
ONCHOCERCIASIS CONTROL IN WEST AFRICA¹

by

C. Dejoux² and P. Guillet³

For the last four years the chemical control of *Simulium damnosum* s.l. in West Africa has been successfully carried out using temephos (Abate^R - 200 CE Procida), an organophosphorus insecticide used as an emulsion concentrate. Continuous research is, however, in hand with the object of selecting an alternative insecticide to temephos, which should, if possible, be of a different nature. While being as effective as temephos against *S. damnosum* s.l. larvae, this new product should preferably be no more toxic to the non-target fauna than temephos, so as to protect the freshwater environment against any pollution harmful to established biological balances.

The object of the present trials was, therefore, to study the effectiveness of three new formulations against *S. damnosum* s.l. larvae and to determine *in situ* their effect on the non-target fauna.

1. APPLICATION POINTS: LOCATION AND DESCRIPTION

That part of the study carried out in Mali took place in the period 23-28 October 1978 in the Toukoto region, west of Bamako (Fig. 1). The rivers treated were the Bakoye, the Baoulé, the Badinn-ko and the Darouma. All these rivers are tributaries of the Sénégal and are hydrologically of the Sahel type, with a low-water period between February and June and flooding between August and November. The experiments were carried out at the end of October, as water level fell progressively. The conditions were favourable for the evaluation of the larvicides: water discharges were adequate, the breeding sites were numerous and accessible, and there were abundant populations of larvae, mainly *Simulium sirbanum* and, to a lesser extent, *S. damnosum* s. In general, water transparency was low (15-30 cm measured by Secchi disk) and the suspended particule load relatively high.

2. THE PRODUCTS TESTED - DESCRIPTION

2.1 Reidan^R

Chlorpyrifos-methyl (OMS-1155) produced by Dow Chemical Co. was a suspension of digestible microcapsules containing 100 g of active ingredient/litre.

Two batches were tested: batches C and D, consisting of capsules of roughly the same diameter (respectively 10.4 and 10.8 µm on average), and of the same thickness.

Only batch C was tested for its toxicity against non-target fauna, at a dosage rate of 0.05 ppm/10 min.

¹ This work was supported in part by a grant from the World Health Organization.

² ORSTOM Hydrobiologist, B.P. 1434, Bouaké, Ivory Coast.

³ ORSTOM Medical Entomologist, OCCGE, B.P. 1500, Bouaké, Ivory Coast.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

WHO/VBC/80.783
page 2

It is difficult to make use of the results obtained, owing to the deterioration of the two formulations (crystallization of the active ingredient at the bottom of the containers).

2.2 Actellic^R M 20

Pirimiphos-methyl (OMS-1424) produced by ICI Plant Protection was a suspension of microcapsules containing 200 g of active ingredient/litre. These synthetic polymer microcapsules have an average diameter of 2 μ m and a density of 1.05. Although initially intended for use on plants, this formulation roughly meets the standard requirements for blackfly larvicides (Quélennec, 1978).

2.3 K-othrine^R

Decamethrin (OMS-1998) produced by Roussel-Uclaf was an emulsion concentrate containing 25 g of active ingredient/litre. Two formulations were tested:

A - formulation without a synergist (density at 20°C: 0.92);

B - synergized formulation (density at 20°C: 0.94).

3. METHODOLOGY

3.1 Observations on the target fauna

Treatment was carried out by helicopter.¹ The formulation was released in a single transverse band 100-300 m upstream from the first larval site. A preliminary survey of breeding sites was made the day before treatment and, in some of them, substrates populated by blackfly larvae were marked with strips of coloured cloth.

In so far as possible, a river reach 40-50 km long was examined for each release of the larvicide. Effectiveness was verified 24 and 48 hours after treatment.² The estimate of effectiveness is purely qualitative, since only treatments resulting in the detachment of all the larvae are regarded as valid.

3.2 Observations on the non-target fauna

Two techniques were used: first, determination of drift cycles, before and after treatment, in situ and, secondly, quantitative analysis of the rate of drift by the "gutter" method (Dejoux, 1975).

In the first type of study, a natural drift curve is produced by collecting the drifting fauna at specified time intervals. Sampling is always carried out in the same place and the nets employed (two twin nets in most instances) have a mesh size of about 250 μ . Collections are made before, during and after treatment, and the effects of treatment are always reflected in a clear increase in the index of drift (ID).³ The kinetics of drift and the amplitude of the deviations are directly related to the toxicity of the product tested. In the case of concern to us here, the collection time for each drifting was 30 seconds and current velocity (needed to calculate the volume filtered) was measured by a small current meter at the mouth of the nets.

In the gutter technique, a certain quantity of the aquatic fauna under observation is placed in an adapted system that is partly isolated during the passage of the insecticide. The fauna carried along by the current, after insecticide application, is collected at regular intervals at the end of this system. Subsequent evaluation of the total quantity of fauna tested permits a precise estimate of the quantity affected by the treatment over a given time.

¹ Identical conditions to those under which operational treatments are carried out.

² When all the larvae had become detached from the marked substrates, a more detailed examination of the breeding site was undertaken.

³ $ID = \frac{N}{V}$ (V = volume filtered during the drift time, N = number of organisms collected in a net during the same period).

The purpose of in situ study of the traumatic drift resulting from the passage of a pesticide is always to evaluate two essential parameters: first, the maximum instantaneous increase, which is the relationship between the maximum value reached by ID after treatment and its normal value estimated immediately before commencement of the reaction of the fauna to the passage of the product.

The second parameter calculated is the weighted increase in the index of drift, which corresponds to the relationship between the mean value of ID calculated over a period of one hour centred on the peak phase of detachment, and the mean value of ID in the hour preceding the start of the effect. This relationship reflects the time distribution of the toxicity of the pesticide, as well as its intensity.

4. RESULTS

4.1 Trials with Reldan^R

4.1.1 Effects on the target fauna (Table 1)

Batch C at 0.05 ppm/10 min. The partial effect (of the order of 50% detachment) observed over only 2 km may be explained by the presence of microcapsules that were not broken down, or by the presence of numerous crystals of the finely crystallized active ingredient that gradually settled to the bottom. At 0.1 ppm/10 min, this formulation produces detachment of the majority of larvae.

Batch D had no discernible effect at 0.075 ppm/10 min.

It is difficult to interpret these results without knowing the proportion of intact capsules or the behaviour of this deteriorated formulation in the river (the density and dispersion of the broken-down capsules, and the sedimentation of the active ingredient in the free state).

4.1.2 Effects on the non-target fauna

In situ drift cycle

The observations were made on 24 October 1978. Sampling was begun at 6h30 and the larvicide was released at 8h35. Observations were made regularly at two points, one 300 m downstream from the treatment point, the other approximately 10 km downstream.

The larvicide reached the first observation point about 40 minutes after its release. The invertebrate detachment effect was very marked but gradual (Fig. 2). The peak phase was reached about an hour after the commencement of the reaction of the fauna; the maximum value of ID was of the order of 1500.

The resulting maximum instantaneous increase ($\frac{1472.22}{8.33} = 176.7$) and the weighted increase ($\frac{1101.95}{9.45} = 116.57$) are very high and indicate both a strong impact of Reldan C on invertebrates and particularly wide time spread in their detachment.

From 10h00 the fall in the rate of detachment was very steady, apart from a slight peak at 11h00 due to chironomids (Orthocladinae and Tanytarsini) reaching their maximum rate. However, it remained relatively high until 14h00, making in all five hours with a high rate of detachment.

The taxonomic groups most sensitive to this microencapsulated formulation are Baetidae, chironomids in general, Hydropsychidae and Leptoceridae.

Observations made about 10 km downstream from the distribution point, the object of which was to reveal the effective range against blackflies and also the long-range impact on the non-target fauna, led us to conclude that there was a very slight delayed effect on the latter. The insecticide wave did not reach the observation point until 18h45, or about

WHO/VBC/80.783
page 4

10 hours after the release of the capsules. Unfortunately, this timing also corresponds to the start of the normal increase in the index of drift as the invertebrates resume their nocturnal activity. Only comparison of the value obtained for ID at 18h45 on the day of release (48.5) with that obtained at the same hour on the day before (22.3) reveals the slight effect of Reldan C at this distance, mainly on Baetidae. Calculation of the mean values of ID for the period from 18h15 to 21h00 on the day before treatment and on the day of treatment yields respectively 46.52 and 54.82. Although there is a slight increase that can definitely be ascribed to the passage of the pesticide, it is statistically hardly significant.

Lastly, no "trace" of the passage of the product tested could be detected at a third checkpoint about 16 km below the point of release.

Rate of detachment in a gutter

The gutter used, which was positioned on 24 October, immediately below the zone in which the capsules were released, was closed at 6h45 on 25 October, and the first collection of drifting fauna was made at 7h00.

The information on drift in the gutter is summarized in Table 2 and presented graphically in Fig. 2. Only the fauna drifting after the time of passage of the insecticide was considered.

The total detachment (natural drift plus the drift resulting from treatment) was estimated at 63.07% of the fauna tested over a period of 24 hours, which constitutes a very considerable impact, one at a level incompatible with maintenance of the various biological balances of a river. Detachment was particularly catastrophic as regards Baetidae (in the vicinity of 100%!), Trichoptera, Leptoceridae and, in general, all chironomid Diptera.

As an indication, we obtained a detachment of 37.51% of the fauna tested in 24 hours when carrying out a similar treatment with temephos (0.05 ppm/10 min) in an untouched environment, which is an acceptable level for average toxic effect. Under other circumstances, we obtained a maximum instantaneous increase in the ID of 83.33 with temephos 200 CE at a concentration of 0.05 ppm/10 min, as against 176.7 with Reldan C, and a weighted increase in ID of 54.85, as against 116.57 under the same conditions. Consequently, the formulation tested has a higher toxic effect than temephos at the same concentration, and the effect is spread over a far longer period.

4.2 Trials with Actellic^R M20

4.2.1 Effects on the target fauna (Table 1)

Actellic M20 had only a very partial effect at 0.075 and 0.1 ppm/10 min. This partial effect was confirmed by detachment of only 17.6% of the blackflies in the gutters set up to study the non-target fauna. Furthermore, the range of the effect was very limited. When the same formulation was tested in floating cages (Guillet & Escaffre, 1979), it produced 97.8 and 100% detachment respectively at 0.25 and 0.50 ppm/10 min. Its spontaneous dispersion is poor and a significant quantity sinks directly to the bottom. It is, moreover, a feature of this formulation that it adheres very strongly to all sorts of substrates. There is the probability that it quite literally lines the bottom and the banks of the river immediately downstream from the treatment point. There is support for this hypothesis in the delayed effect of this formulation, which still produces detachment of the target and non-target fauna 24 hours after treatment 500 m downstream from the treatment point. Despite this delayed effect, many blackfly larvae were found to be alive on inspection after 48 hours.

4.2.2 Effects on the non-target fauna

In situ drift cycle

Treatment was carried out at 9h17 on 26 October 1978.

The first effects became apparent about one hour after the release of the insecticide, the time taken by the product to travel the 300-400 m between the point of impact and the observation post. The detachment of organisms was very gradual and spread out in time; it took two hours for the maximum rate to be reached. Moreover, the index of drift remained very high throughout the rest of the day, and was still 15 times higher on the day after release than it had been the day before, which was an unusual fact and one that had never been observed with the other types of formulations tested previously (Fig. 3).

The maximum instantaneous increase in ID was slightly lower, at 132.44, than the value found for Reldan C, but may be regarded as high, as may the weighted increase (91.31), which is a good reflection of the diffusion in time of the very marked impact of the poison on the invertebrate fauna.

The taxonomic groups that were most sensitive were practically the same as for Reldan (Baetidae and, in general, chironomids); in addition, Tricorythidae were particularly sensitive.

The results obtained at the second checkpoint, set up about 6 km downstream from the point of release, are not such as to justify the conclusion that Actellic in the formulation and concentration tested had a toxic action. It can be estimated that the insecticide reached the checkpoint around six to seven hours after release, i.e. between 15h00 and 16h00. No significant increase in the rate of drift occurred at this time. However, it is possible that a traumatic effect on some organisms superimposed on the natural nocturnal increase in the rate of activity is reflected in the nocturnal drift peak noted at 19h00, but it would be necessary to make a comparison with chronologically corresponding data that it was unfortunately impossible to obtain for material reasons on the day before treatment.

Rate of drift in a gutter

For technical reasons, it was impossible to make observations over a period of 24 hours and the gutter was left in situ for three hours before the passage of the insecticide and for only 12 hours after the commencement of treatment.

The first effects of the passage of the larvicide became apparent about one hour after treatment and were less gradual than in the surrounding natural environment. On the other hand, they were as spread out in time and pointed to continuous toxic action of this formulation over many hours.

The overall drift, summarized in Table 3 and shown graphically in Fig. 3, yields an estimate of 21.3% detachment of the fauna tested over a period of 12 hours. This value may be regarded as high, the more so because the following figures are obtained if we disregard the target group, S. damnosum and other Simuliidae:

Fauna drifting	645
Fauna remaining alive	715
Total fauna tested	1 360
Percentage detachment	47.4%

These results confirm the high toxicity of this Actellic formulation for non-target fauna, and in particular for Baetidae, Tricorythidae, Chironomini and Cheumatopsyche (Trichoptera).

4.3 Trials with K-othrine^R (Table 1)

4.3.1 Effects on the target fauna

The two formulations, not initially planned to be used in the experiment, were tested only on secondary rivers. Formulation A, tested at 0.02 ppm/10 min, produced total detachment of blackfly larvae and of almost the whole of the entomofauna over the whole length of

WHO/VBC/80.783
page 6

the river reach (12 km), despite the existence of many slack-water areas. It would therefore seem that this concentration is greatly above the minimum active concentration. At 0.007 ppm/10 min, formulation B was still completely effective over 10 km. At 0.003 ppm/10 min, its effect was partial, many older larvae, of instars 6 and 7, surviving the treatment.

4.3.2 Effects on the non-target fauna

In situ drift cycle

A first treatment was carried out at 8h17 on 25 October 1978, at a concentration of 3 ppb/10 min, about 200 m upstream from the observation point where collections of drifting larvae were regularly made. The first effects became apparent at 8h55, i.e. immediately after the insecticide reached the breeding ground. At 9h15, or about 20 minutes after the insecticide reached the checkpoint, the effect was at its maximum. The maximum instantaneous increase was then 87.9, which is relatively high but still an acceptable level.

We then witnessed an extremely rapid decline in ID, which settled back to a practically normal level one hour after maximum impact. The weighted increase of ID is very clear evidence of this brief toxic effect, since it is barely in excess of 21.

As always, Baetidae (Ephemeroptera) were the group most affected, but the fact that it was, overall, very small larvae that drifted shows that the impact of the concentration tested was moderate. Although they were collected in small numbers, it would also appear that Hydracarina are particularly sensitive to decamethrin.

On the Badinn-ko, where treatment was carried out at a concentration of 7 ppb/10 min, we found the effect practically identical to that observed by us on the Baoulé from the kinetic point of view, but extremely violent. Treatment was carried out at 8h25 on 26 October 1978 some 300 m upstream from the checkpoint. The pesticide reached the breeding site that it was intended to treat 30 minutes later and there immediately followed a spectacular detachment of the fauna, which was, moreover, very abundant in that area. The maximum impact was reached after 10 minutes and almost all groups were very appreciably affected, although the Baetidae remained the family that suffered most heavily from the passage of the insecticide. The maximum instantaneous increase, 510.9, was almost six times higher than in the case of treatment at 3 ppb. The weighted increase was also very high (143.5), because of the vast quantity of drifting fauna. However, if we turn to Fig. 4, a perfectly regular and rapid decline in ID values spread out over a period of about one hour is to be seen. No delayed effect was noted for any taxonomic group; the maximum drift always occurred in the first half-hour of the passage of the product (Fig. 4).

Lastly, it should be noted that, in contrast to treatment at 3 ppb, the organisms affected by treatment at 7 ppb were of all instars and that even Oligoneuridae (genus *Elassoneuria*) and very large Hydropsychidae (genus *Amphipsyche*) were found in quantity in the drift. Moreover, direct observations made in stagnant zones upstream from the treated breeding site showed that the fauna there had been catastrophically affected and that great numbers of very large insects, such as Gyrimidae (*Orectogyrus* sp.), Dytiscidae (*Cybister* sp.), Hemiptera (primarily Naucoridae and Belostomidae), and also Odonata (*Phyllomacromia* sp., *Pantala* sp., etc.), had perished. On the other hand, no mortality was observed among fish, but the location of the treatment point in a series of rapids at the entrance to a steep-sided canyon made it impossible to trace the effects of treatment downstream.

Rate of drift in a gutter

The first trials carried out in Mali with decamethrin showed firstly that this product, while very effective against *S. damnosum* s.l. at a concentration of 7 ppb/10 min, was also excessively toxic for invertebrates at this concentration. On the other hand, although the toxicity of a concentration of 3 ppb/10 min was acceptable in relation to the non-target fauna, this concentration was unfortunately not completely effective against *S. damnosum* s.l. This led us to test an intermediate concentration of 5 ppb/10 min. For this we employed the usual gutter system, installing it in the Ivory Coast in the river Maraoué, the lower reach of which had not previously been treated with temephos.

In order to quantify more precisely the impact of decamethrin, we carried out a comparative test using, in addition to the gutter into which the decamethrin flowed, another similar one into which temephos flowed at a concentration of 0.05 ppm/10 min, and a third, untreated, gutter as a control. The gutters were positioned one week before the test so that the fauna in them should be well established.

Results obtained in the control gutter

The mean values of the index of drift (ID) were low throughout the day, varying in the range 0-3. They rose slightly from 17h00, with a peak at 17h30 corresponding to the emergence of a species of Orthoclaadiinae. Subsequently, they remained at a higher level throughout the night, which is a normal phenomenon corresponding to the nocturnal activity period of invertebrates. A clearly defined peak towards 24h00 corresponds to the emergence of Tricorythidae (Ephemeroptera).

Over a period of 24 hours, 258 out of 1492 organisms tested, or 17.29%, went adrift. This value may be regarded as normal, particularly as the test took place during the period of emergence of some of the groups (Orthoclaadiinae and Tricorythidae).

Results obtained with temephos

The test carried out corresponded to a treatment of the rainy-season type, i.e. at a concentration of 0.05 ppm/10 min.

Treatment was begun at 9h00 and the maximum impact became apparent about an hour later. The maximum increase in drift was 76.56 and the weighted increase was around 50. It is difficult to obtain a precise value, since we had only half an hour of pretreatment drift, during which no organism went adrift! Nevertheless, the values obtained are of the same order of magnitude as those usually obtained by us in similar cases.

The overall percentage detachment over 24 hours was 45.8%, including the natural drift, which we had estimated in the control gutter to be about 17% of the fauna tested.

To determine more precisely the impact of treatment, we therefore have to consider that 17% of the 1227 organisms individually tested, i.e. 208, went adrift "naturally". The remainder (562 - 208 = 354) went adrift through the effect of the poison. This gives a final figure for the drift due to the treatment of the order of 28.8% in 24 hours.

The groups most affected, apart from Baetidae, known to be sensitive, were Tricorythidae, Hydropsychidae and Philopotamidae.

Results obtained with decamethrin

A first treatment was carried out at a concentration of 0.5 ppb/10 min. Having observed the effects for one hour, we applied a second treatment at 5 ppb/10 min. It was immediately apparent that even at concentrations as low as 0.5 ppb, which are never 100% effective against S. damnosum s.l., invertebrates are severely affected:

The reaction to treatment at 0.5 ppb/10 min is very violent: Baetidae became detached immediately because of their very exposed location in the natural environment. Other Ephemeroptera (Caenidae, Leptophlebiidae, Tricorythidae) react subsequently and their detachment is at its maximum 30 minutes after the start of treatment.

The maximum increase in ID, which was 68.3, was nearly as great as that obtained with temephos at a concentration of 0.05 ppm (76.6). The weighted increase was 40.5, as against 50 for temephos, confirming the drastic action of decamethrin at such a low concentration.

The second treatment, applied to the system after an hour, at a concentration of 5 ppb/10 min, induced detachment with the same kinetic features but, of course, lower in absolute magnitude because of the large numbers of invertebrates already detached following

WHO/VBC/80.783
page 8

the first treatment. It may be concluded from the overall results that 1344 of the 1608 organisms tested, or slightly more than 84%, were detached over a period of 24 hours. Allowing for a natural drift level of about 17% over this space of time, it can be calculated that there was "normal" detachment of 273 of the 1608 organisms tested, which brings the number of organisms that were detached through the effect of the treatment to 1071 out of 1608, or about 67% of the total fauna (Table 4).

The extremely violent but short-lasting action of decamethrin suggests that this insecticide has a very marked knock-down effect. The question remained whether this effect might not be of short duration only and whether, after some time, the organisms might not be capable of resuming normal activity. It was to verify this hypothesis that we conducted a series of tests on fish and invertebrates in the river Maroué in the Ivory Coast.

Contamination of test subjects was effected by the use of a fine-mesh landing net to keep them in decamethrin solutions of the desired concentrations for the time required. They were subsequently transferred to storage cages with all possible precautions. Because it was difficult to obtain live material rapidly and in large quantities, we were unable to make large series of tests; nevertheless, our observations cover 62 fish belonging to eight species, and would appear to us to be adequate for conclusions concerning the behaviour of the species tested. Similar tests were conducted on 164 invertebrates drawn from nine taxonomic groups.

In general, the ranges of concentrations tested were at high levels, but, given the short exposure times, they realistically reflect the conditions of airborne release in a vector control campaign. Several litres or decalitres of the product are generally released in zones of relatively calm water upstream from the larval sites to be treated. Diffusion is governed both by the flow rate of the mass of the water and by the morphological features of the river. Under these conditions a concentration of between 10 and 100 ppm in fact persists over a considerable stretch for between a few seconds and a few minutes, and even if the fish are able to move out of the most heavily contaminated zone. In such a case, the shock effect that occurs makes some species lose their balance in a few seconds, prevents them from taking avoiding action and keeps them in contact with the pesticide still longer, which increases their likelihood of being killed. As regard invertebrates, they are incapable in any case of taking avoiding action.

It emerges from our observations that survival time in the knock-down state is variable, probably as a function of the size and condition of the fish and, of course, of the exposure time and the concentration. The first reaction to long exposure and low concentration (1 ppm/10 min, for example) is avoidance, followed by a slackening in activity, "undecided" swimming and an apparent search for oxygen at the surface. The disruption of balance most often occurs at the end of exposure and the balance is restored very rapidly when the fish are returned to uncontaminated water. However, should the balance be disrupted for a second time within four to five hours, death usually results shortly after.

When concentrations are high (50-100 ppm), the shock is very violent and pelagic fish with a high metabolic rate are knocked down in a few seconds (for example, Alestes nurse, which is knocked down by exposure for two seconds at a concentration of 100 ppm). It would appear, moreover, that large fish are knocked down more rapidly than medium-sized fish. Fishes with a slower metabolic rate (Labeo, Tilapia, etc.) have a higher resistance to knock-down, but it is nevertheless undeniable that they are very heavily affected, even if loss of balance does not necessarily manifest itself in the course of contamination.

As regards invertebrates, those exposed to low concentrations for a very brief period are affected and attempt to flee the contaminated zone. In a natural environment, this is manifested in intensive drifting. Their survival rate is low. Furthermore, it would appear that if concentrations increase any injury becomes practically irreversible and leads more or less rapidly to death. From among the organisms tested, only Odonata exhibited a different behaviour pattern; three that we had considered to be close to death three hours after treatment were fully restored after 18 hours. This type of result may be compared with that obtained with large Alestes nurse which, despite an immediate and relatively prolonged loss of balance, gradually resumed what we call a "normal" life within 24 hours.

Finally, it would appear that, under certain treatment conditions, depending on exposure times and concentrations, affected organisms are able to resume normal activity if they survive the many hazards of their drifting in the natural environment.

5. SUMMARY AND DISCUSSION

Some of the trials carried out were designed to enable us to make a realistic appraisal of the possibilities of using microencapsulated insecticides for the control of S. damnosum s.l. larvae in West Africa.

The results obtained are very disappointing in respect both of low effectiveness against blackfly larvae and of high toxicity for the non-target fauna. However, it would seem impossible in the present state of affairs to reach final conclusions on the actual potentialities of this type of formulation. Neither the Reldan nor the Actellic formulations tested corresponded to what would be normally used. The partial effect against blackfly larvae obtained with Reldan may be explained by the deterioration of the microcapsules. Preliminary dry-season trials have shown that a correct Reldan formulation was effective in a river at 0.05 ppm/10 min. The results obtained on the non-target fauna provide very interesting general information on the kinetics of detachment for this formulation, but there are no grounds at all for concluding that a correct formulation is really toxic for the non-target fauna.

The same applies to the tested Actellic microcapsules, the behaviour of which in the river was not at all that initially sought. The working out of that formulation is based on the study of two main factors; on the one hand, the dispersion and behaviour of the microcapsules in the water and, on the other, the optimum rate of release of the active ingredients. The formulation tested in Mali is quite unsuitable for the control of S. damnosum s.l. Changes that would have to be made to this formulation to make it usable could also modify to some extent its toxicity for the non-target fauna. It may be that suitably adjusted formulations will possess lower toxicity than those which have been tested.

The two formulations of K-othrine that we tested possess remarkable larvicidal potency. The effective dose against S. damnosum s.l. would appear to be 0.005 ppm/10 min. The range of the recorded effect when river discharges were low led us to expect that the effective range with higher river discharges would be at least equal to that of Abate. It is, however, of importance to establish in practice whether there is an acceptable compromise between effectiveness against blackfly larvae and toxicity for non-target fauna.

As a whole, our results concerning the action of decamethrin on fish in fact confirm, firstly, that this product is basically highly toxic to fishes. Secondly, it is certain that its use in a blackfly control campaign, even in extremely weak doses (0.003 ppm/10 min, for example) entails a high risk of causing localized mortality among certain species with a high metabolic rate, the more so because mechanical effects causing injury or even death may be added to the toxic effects if the stunned fish are carried into zones of rapids by the current. Although we did not observe any direct mortality in the two experimental treatments carried out in Mali, that does not prove that no fish were killed. Dead fish that sank to the bottom at the point of impact may have been overlooked by us because of the turbidity of the water, or their transportation into the zones of violent rapids where we were working may have removed them from our observation.

As regards the action upon invertebrates, still considering decamethrin, the action kinetics are diametrically opposite, being characterized by an extremely violent and rapid effect which disappeared as quickly as it appeared. Although not ideal, this type of action is more favourable to the maintenance of biological balances in so far as it is possible to control the intensity of the acute effect; on the other hand, the medium-term consequences of the resultant of the partial knock-down yielded by each treatment still has to be verified over a fairly protracted treatment period, both for target and for non-target groups.

WHO/VBC/80.783
page 10

We have plotted the different types of detachment kinetics corresponding to these three groups of formulations in Fig. 5. It would appear at the present time that the type of reactions obtained with emulsion concentrates is what we should opt for, in so far as values for maximum instantaneous increase of ID remain at an acceptable level (below 100, for example).

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to express our gratitude to the Onchocerciasis Control Programme in the Volta River Basin Area which provided the helicopters for the field work and Mr Henderickx, Operations Officer, who actively participated in the trials.

REFERENCES

- Dejoux, C. (1975) Nouvelle technique pour tester in situ l'impact des pesticides sur la faune aquatique non-cible, Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. et Parasitol., 13 (2), 75-80
- Guillet, P. & Escaffre, H. (1979) La recherche de nouvelles formulations d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest, Congress on insect control in a tropical environment, Marseille (To be issued)
- Quélenec, G. (1978) Characteristics of blackfly larvicide formulations (Mimeographed document OCP/SWC/78.5)

TABLE 1. RIVER TRIALS OF THE NEW FORMULATIONS: EFFECTS ON BLACKFLY LARVAE

Formulation	Batch	Watercourse	Discharge m ³ /s	Dosage ppm/10 min	Effect on blackfly larvae
Reldan ^R 10% of chlorpyrifos-methyl (OMS-1155)	C	Bakoye, below confluence with Baoulé	80	0.05	Partial for 2 km. Imperceptible beyond that.
		Bakoye, Badala ford	44	0.1	Almost completely effective. Only a few late instar larvae remain. No control breeding sites below the ford.
	D	Bakoye, upstream from Toukoto	40	0.075	No apparent effect.
Actellic ^R M20 20% of pirimiphos-methyl (OMS-1424)		Baoulé	22	0.075	Very partial effect for 7 km following verification after 24 and 48 hours.
		Bakoye, below Badala ford	44	0.1	Partial effect on the first breeding site after 24 and 48 hours, impercep- tible below.
K-othrine ^R 2.5% of decamethrin (OMS-1998)	A	Darouma, tributary of Bakoye	6.3	0.02	Completely effective over the 12 km accessible above confluence with Bakoye. Range in excess of 12 km.
	B	Badinn-ko, tributary of Bakoye	7	0.007	Completely effective over 10 km. Partial effect at 11.5 km after 1.5 km of slack water.
		Baoulé	16.6	0.003	Partial effect. Late instar larvae remain.
		Baoulé	16.6	0.001	Detachment of early instars.

WHO/VBC/80.783
page 12

TABLE 2. OVERALL RESULTS OF THE GUTTER TEST OF
THE TOXICITY OF RELDAN C

Taxa	Drifting fauna	Fauna remaining at end of experiment	Total fauna tested	Percentage detachment
Baetidae	258	2	260	<u>99.2</u>
Caenidae	2	0	2	100
Tricorythidae	8	24	32	25
Oligoneuridae	1	45	46	2.2
Heptageniidae	0	1	1	0
<u>S. damnosum</u>	263	293	556	47.3
Other Simuliidae	343	323	666	51.5
Orthoclaadiinae	173	53	226	<u>76.5</u>
Chironomini	71	14	85	<u>83.5</u>
Tanytarsini	9	6	15	<u>60</u>
Tanypodinae	5	1	6	83.3
Ceratopogonidae	0	2	2	0
T 1	48	34	82	58.5
T 11	3	0	3	100
T 14	47	32	79	<u>59.5</u>
T 16	0	6	6	0
T 20	164	2	166	<u>98.8</u>
Dytiscidae	3	0	3	100
Elmidae	2	2	4	50
Gerridae	6	0	6	100
Sisyridae	9	2	11	81.8
Veliidae	6	0	6	100
Libellulidae	1	0	1	100
Oligochaeta	6	0	6	100
Hydracarina	7	0	7	100
Nematoda	4	1	5	80
Plecoptera	1	0	1	100
Total	1 440	843	2 283	Global percentage: 63.07

TABLE 3. DRIFT RECORDED IN GUTTER OVER A 12-HOUR
OBSERVATION PERIOD FOLLOWING THE PASSAGE OF ACTELIC M20

Taxa	Drifting fauna	Fauna remaining	Total fauna tested	Percentage detachment
Baetidae	319	16	335	95.2
Caenidae	4	0	4	100
Leptophlebiidae	9	0	9	100
Tricorythidae	27	2	29	93.1
Oligoneuridae	3	4	7	42.9
Heptageniidae	3	0	3	100
<u>S. damnosum</u>	93	434	527	17.6
Other Simuliidae	364	2 925	3 289	11.1
Orthoclaadiinae	60	154	214	28.0
Chironomini	97	55	152	63.8
Tanytarsini	14	25	39	35.9
Tanypodinae	7	35	42	12.2
T 1	37	98	135	27.4
T 10	15	21	36	41.7
T 11	1	2	3	33.3
T 14	6	121	127	4.7
T 16	35	125	160	21.9
T 20	0	1	1	0
T 22	1	1	2	50
Dytiscidae	2	5	7	28.6
Hydrophilidae	1	9	10	100
Agrionidae	1	0	1	100
Libellulidae	0	3	3	0
Sisyridae	1	0	1	100
Pyralidae	0	1	1	0
Rhagionidae	0	7	7	0
Ceratopogonidae	0	19	19	0
<u>Micronecta</u>	0	2	2	0
Oligochaeta	0	9	9	0
Hydracarina	2	0	2	100
Total	1 102	4 074	5 176	21.29

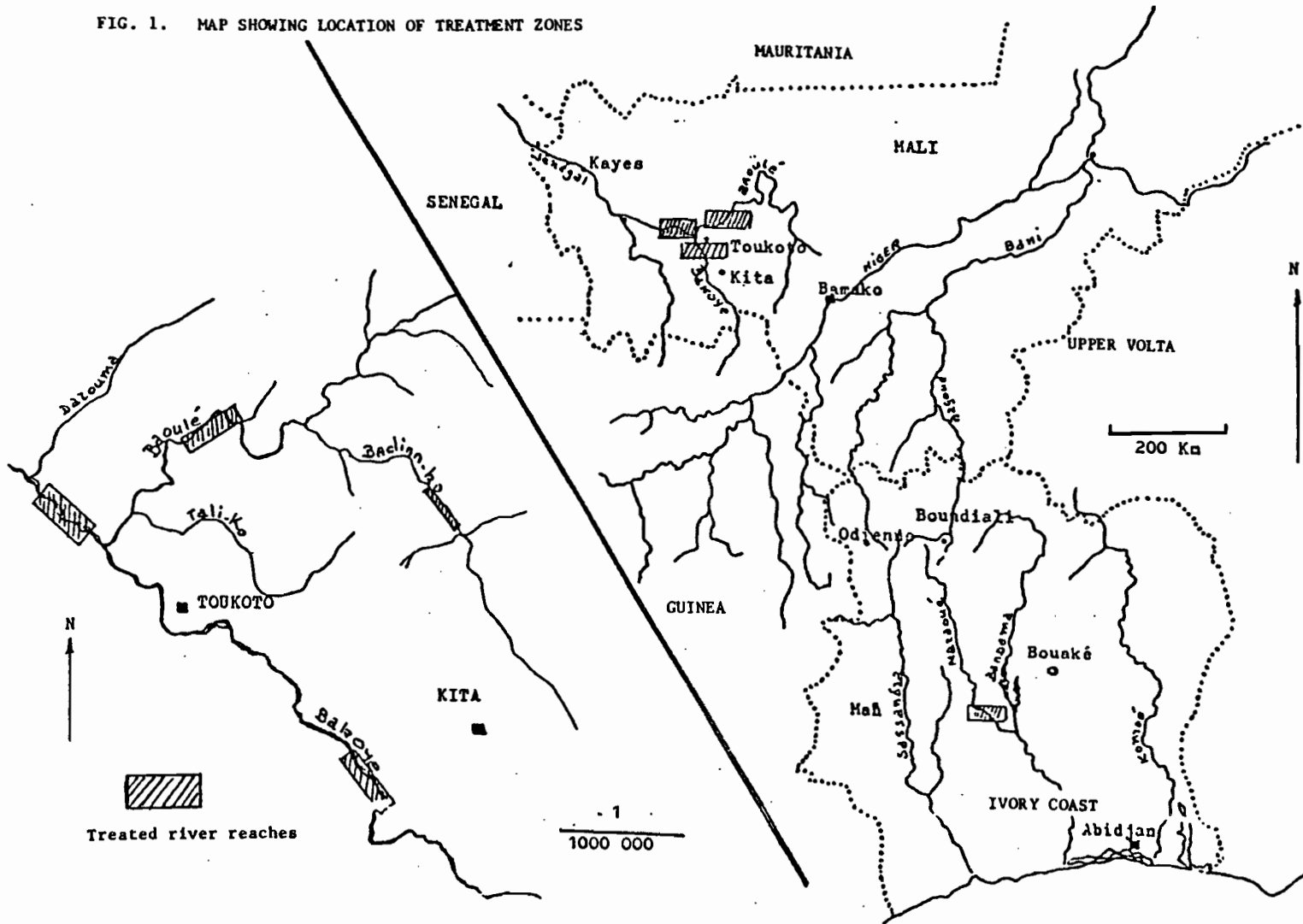
WHO/VBC/80.783
page 14

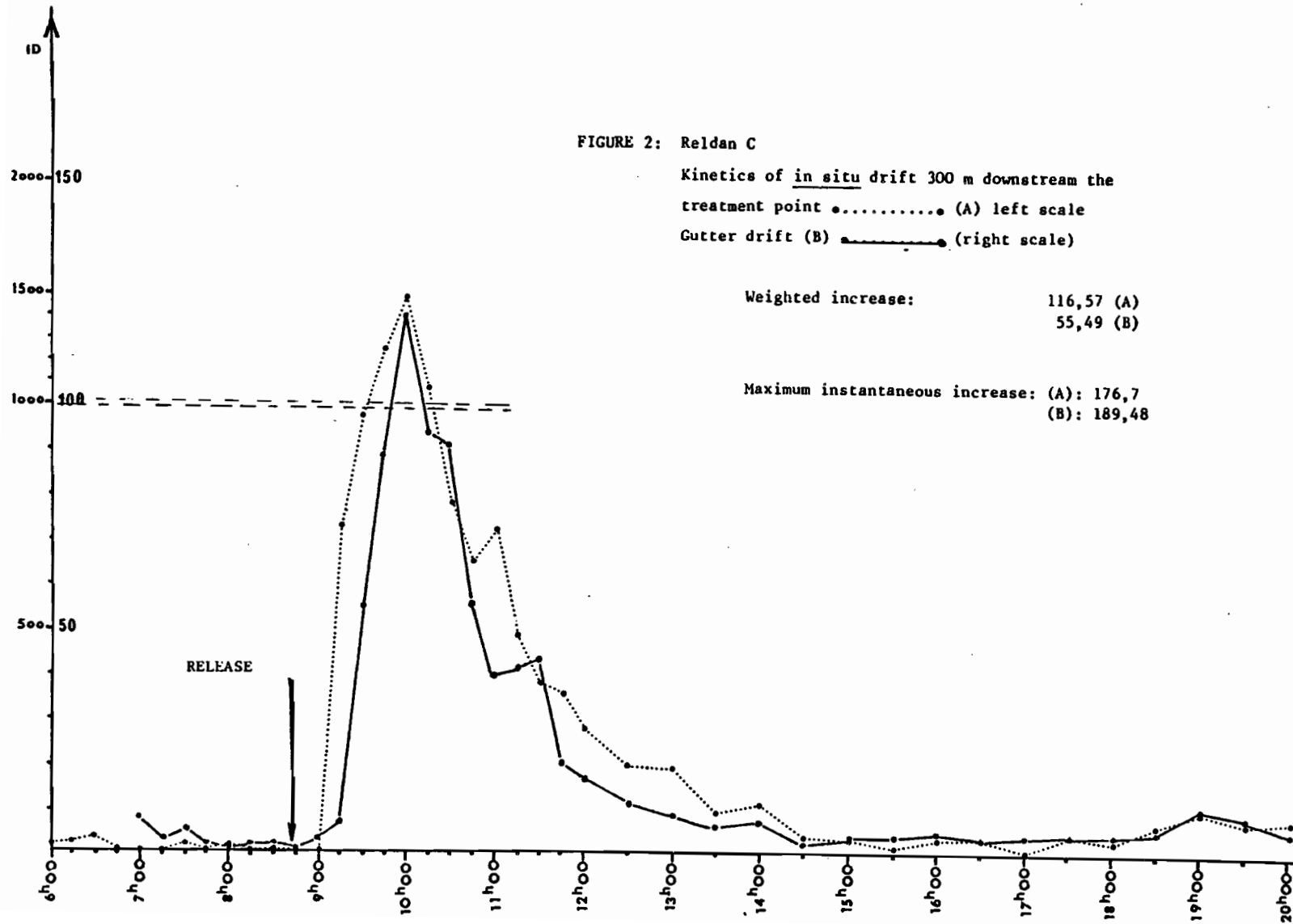
TABLE 4. COMPARISON OF PERCENTAGE DETACHMENT OF VARIOUS TAXONOMIC GROUPS OVER A PERIOD OF 24 HOURS IN RELATION TO THE INSECTICIDES TESTED*

Taxa	Percentage detachment in the control gutter	Percentage detachment with temephos at 0.05 ppm/10 min	Percentage detachment with decamethrin at 0.5 and then 5 ppb/10 min
Baetidae	22.58	58.68	94.74
Caenidae	9.62	2.94	95.17
Leptophlebiidae	4.26	48.88	93.91
Tricorythidae	20.52	77.73	96.63
Ephemerae	0	0	100.00
Oligoneuridae	0	0	76.51
Heptageniidae	3.77	16.66	100.00
Chironomini	44.44	72.00	77.83
Tanytarsini	0	20.00	100.00
Orthocladinae	67.24	62.71	75.00
Tanypodinae	10.20	25.00	76.00
Ceratopogonidae	100.00	50.00	0
Simuliidae	12.65	22.17	63.20
Tipulidae	-	-	100.00
T 1	20.73	42.01	55.20
T 2	0	100.00	100.00
T 10	0	75.00	87.54
T 16	3.67	61.19	82.33
T 32	100.00	100.00	100.00
T 14	-	50.00	71.42
Hydrophilidae	0	16.66	0
T 20	0	-	100.00
Dytiscidae	100.00	-	100.00
Elmidae	50.00	33.33	63.61
<u>Neoperla</u>	0	0	100.00
Gomphidae	0	0	-
Libellulidae	0	33.33	100.00
Hydrachnellae	33.33	50.00	100.00
Rhagionidae	0	10.66	0
Gasteropode	0	0	0
Veliidae	0	-	0
Gerridae	100.00	-	-
Agrionidae	-	-	14.33
Global percentage detachment	17.29	45.80	84.07
Total number of organisms tested	1 750	2 089	1 608

* 0 signifies that organisms belonging to this group were tested, but that there was no drift;
- signifies that no organism of this group was present in the fauna tested.

FIG. 1. MAP SHOWING LOCATION OF TREATMENT ZONES





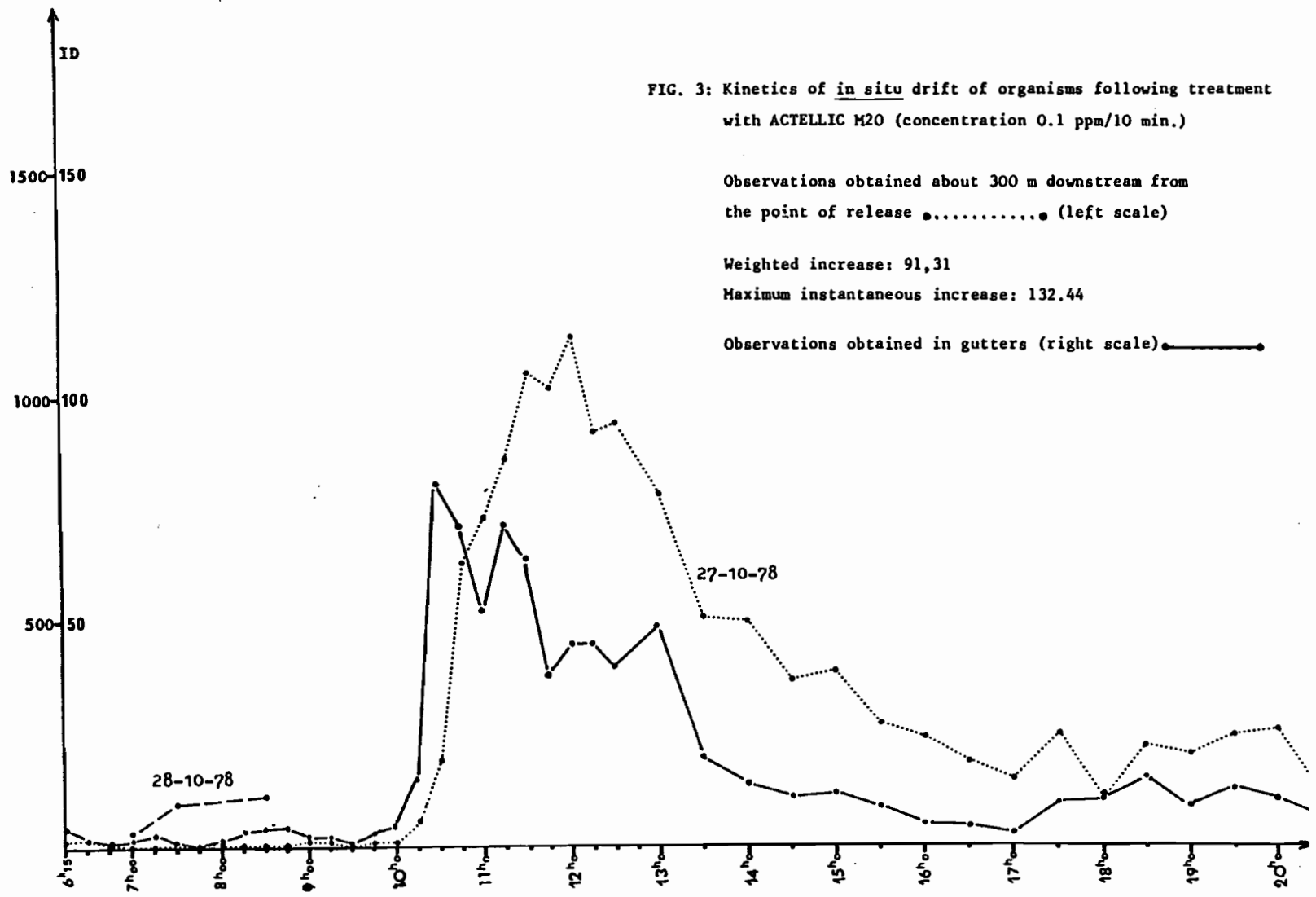


FIG. 3: Kinetics of in situ drift of organisms following treatment with ACTELLIC M20 (concentration 0.1 ppm/10 min.)

Observations obtained about 300 m downstream from the point of release ●.....● (left scale)

Weighted increase: 91,31
 Maximum instantaneous increase: 132.44

Observations obtained in gutters (right scale) ●——●

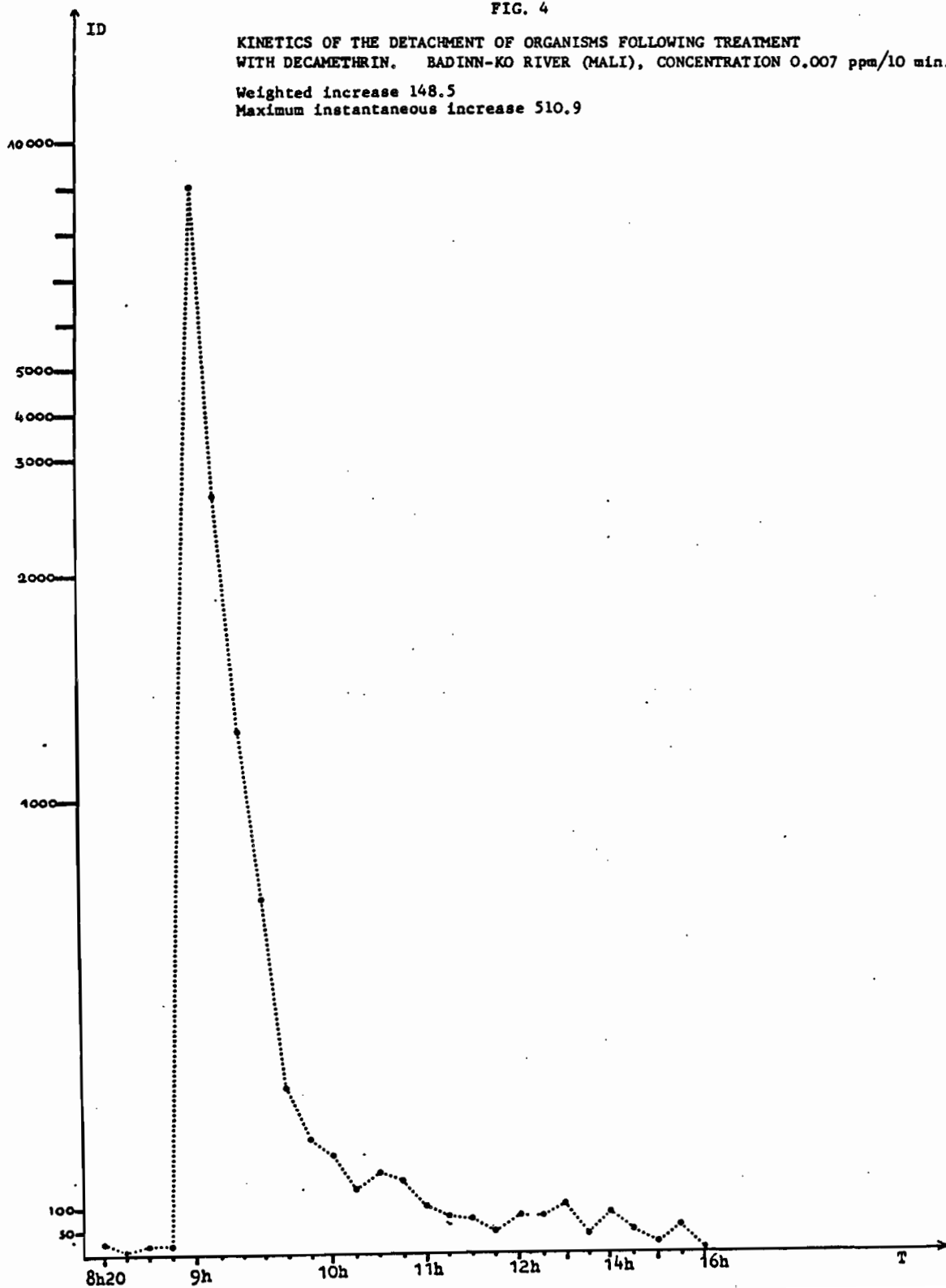
WHO/VBC/80.783
 page 17

WHO/VBC/80.783
page 18

FIG. 4

KINETICS OF THE DETACHMENT OF ORGANISMS FOLLOWING TREATMENT
WITH DECAMETHRIN. BADINN-KO RIVER (MALI), CONCENTRATION 0.007 ppm/10 min.

Weighted increase 148.5
Maximum instantaneous increase 510.9



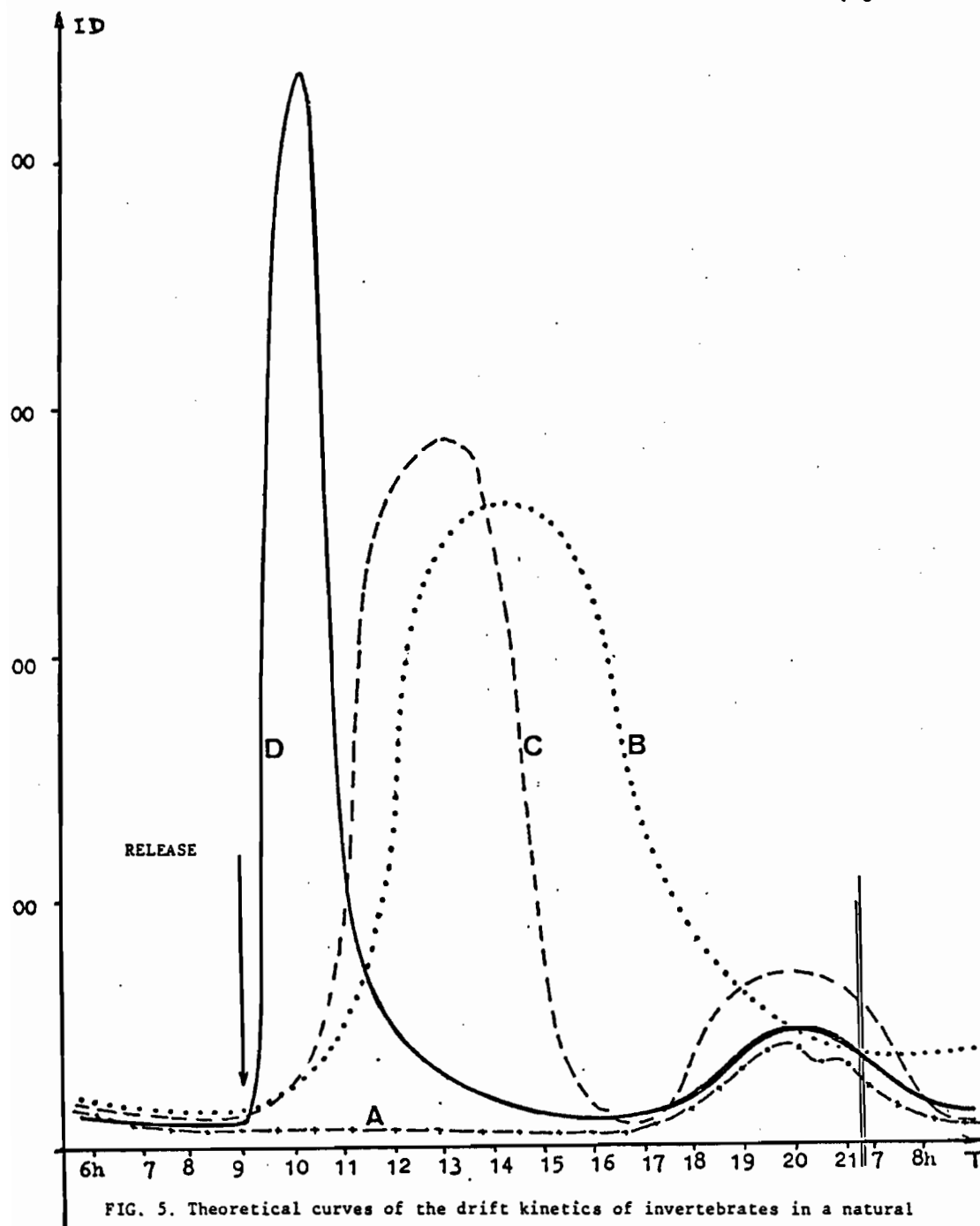


FIG. 5. Theoretical curves of the drift kinetics of invertebrates in a natural environment

- A. in the absence of pesticide;
- B. on release of a microencapsulated formulation;
- C. on release of an emulsion concentrate;
- D. on release of a pyrethroid.

RESISTANCE AUX INSECTICIDES

3

DDT RESISTANCE IN *Simulium damnosum* s.l.

(Diptera : Simuliidae)

IN WEST AFRICA.



WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

WHO/VBC/77.678
ENGLISH ONLY

DDT RESISTANCE IN SIMULIUM DAMNOSUM s.l. (DIPTERA, SIMULIIDAE)
IN WEST AFRICA¹

by

P. Guillet,² J. Mouchet² and S. Grébaud³

In West Africa Simulium damnosum s.l. may locally develop a high level of resistance to DDT. A probable relationship between such resistance and the sometimes intensive agricultural use of DDT has been established. Although these resistance phenomena are very localized, they may have some repercussions on the extensive Onchocerciasis Control Programme being carried out by the World Health Organization in West Africa.

- - - - -

DDT has been widely used in West Africa for the control of blackfly larvae of the S. damnosum s.l. complex.

Between 1960 and 1971, in control campaigns in the Volta basin area, high concentrations of DDT (0.1 ppm/30 min) were applied weekly to rivers (Le Berre et al., 1964; Philippon & Le Berre, 1974). From 1970 onward the treatment supervisors noted a quite marked decrease in the efficacy of DDT on certain stretches of water (the Comoé at Folonzo, the lower Bandama).

At Kainji in Nigeria the effective concentrations of DDT doubled between 1961 and 1968, a sign of a decrease in the susceptibility of the larvae of S. damnosum s.l. (Walsh, 1970).

In Ghana, on the lower reaches of the Volta, Kuzoe & Noamesi (in: Brown & Pal, 1973) also noted a decrease in the efficacy of DDT and a decrease in the LC₅₀ values (obtained by the method of Muirhead-Thomson, 1957).

In Upper Volta, Quélenec & Vervent (1970) showed that in areas of onchocerciasis vector control, S. hargreavesi could rapidly develop resistance to DDT.

Outside Africa, resistance of Simuliidae larvae to DDT has been reported in Japan with S. aokii (Suzuki et al., 1963) and with S. ornatum (Asahina et al., 1966), in the United States and Canada with S. venustum and S. fuscum (West, 1967; Jamback & West, 1970).

MATERIALS AND METHODS

The methodology for testing the susceptibility of blackfly larvae to insecticides proposed by Mouchet et al. (1977) was successfully applied.

Field tests were carried out early in the morning and in the evening. For each concentration two batches of 25 larvae of stages 4 and 5 were used, placed in glass bowls containing 250 ml of preoxygenated distilled water. The tests were repeated two to four times, depending on the number of larvae available. The contact time was three hours and mortality was

¹ This study was supported by a grant from the World Health Organization.

² Medical entomologist, ORSTOM.

³ Medical entomology technician, OCCGE.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

WHO/VBC/77.678
page 2

assessed by totalling the dead and dying larvae for each concentration (high mortality). The dilutions were obtained from standard ethanol solutions supplied by WHO.

Only the tests in which the temperature remained between 20 and 25°C were taken into account. By analysing the results of 20 tests with temephos on S. damnosum s.s. and S. sirbanum, Grébaud & Guillet (1977) showed that within the 20-25°C range and with a contact time of three hours the temperature has no significant effect on the results of the tests. The temperature cannot therefore explain the wide variations in susceptibility that are encountered. In the case of DDT, however, it should be noted that toxicity generally drops as the temperature increases (Hadaway & Barlow, 1957; Fan Cheng & Richard, in: Brown & Pal, 1973).

In Ivory Coast three susceptible populations of different compositions were tested: S. yahense on the Goué at Wa (south-western Ivory Coast, 7°26'N, 8°10'W), S. sanctipauli on the Bandama at Tiassalé (southern Ivory Coast, 5°56'N, 4°49'W), S. damnosum s.s. and S. sirbanum which predominate on the Boa at Tjokoronidougou in the dry season (north-western Ivory Coast, 8°41'N, 7°22'W).

Within the boundaries of phase III of the Onchocerciasis Programme in the Volta Basin Area, four populations of S. damnosum s.s. and S. sirbanum with low susceptibility or resistance to DDT were tested: in Mali on the Banifing II (11°45'N, 7°10'W) and on the Baoulé (12°30'N, 6°50'W), in Benin on the Kiatiko (10°18'N, 1°22'E), and in Togo on the Sossoa (9°42'N, 1°15'E).

A resistant population consisting mainly of S. soubrense was tested at Bouaflé on the Marahoué (central Ivory Coast, 7°N, 5°45'W).

RESULTS

Table 1 gives the results obtained with the three susceptible populations tested in Ivory Coast. The corresponding concentration-mortality regression lines are presented in Figs 1 and 2.

In order to compare these results with those obtained with resistant populations, the arithmetic means of the LC₅₀ and LC₉₅ values were calculated (0.045 and 0.12 ppm respectively). The substantial variations found in the LC₁₀₀ values will be noted. The populations tested on the Bandama and Boa (March 1977) do not display similar susceptibility to those on the Goué and Boa (March 1976). Nevertheless, they are regarded as susceptible in view of the concentration-mortality ratio and the LC₉₅/LC₅₀ ratios (3.3 and 3.4).

Table 2 gives the results obtained from populations with low susceptibility or resistance to DDT. The coefficient of resistance is the ratio between the LC₉₅ observed and the mean LC₉₅ in susceptible populations. The corresponding regression lines (Figs 1 and 2) have the characteristic appearance of DDT resistance: normal mortality at low concentrations and a very marked plateau at high concentrations.

Two levels of resistance were found:

a high level (coefficient of resistance above 21) for the populations of the Banifing II (Mali) and the Marahoué (Ivory Coast);

a moderate level (coefficient of resistance 10.4) for the populations of the Kiatiko (Benin) and the Sossoa (Togo).

DISCUSSION

Up to now DDT resistance in S. damnosum s.l. has never been categorically proved.

The levels of resistance mentioned here for West Africa are higher than those reported by Suzuki et al. (op. cit.) (coefficient of resistance = 12.8) and by West and Jamback & West (op. cit.) (coefficient of resistance = 5-7) in palaeartic and nearctic blackflies.

It is also pointed out that on the Boa the LC₉₅ increased by a factor of 2.7 in one year, indicating a possible regression of DDT susceptibility.

This resistance is occurring in the blackfly populations of three temporary rivers with a low discharge and one permanent river, the Marahoué. None of these rivers had at the time ever been subjected to a blackfly control campaign. They flow through areas where cotton is intensively cultivated, and each rainy season the cotton crop is treated with 8-10 kg of DDT per hectare. Some of this DDT is carried away by the rivers on the account of the very substantial run-off. The exposure of S. damnosum s.l. larvae to low concentrations of DDT for several months may be sufficient to account for the level of resistance mentioned. This phenomenon is commonly observed among the Culicidae.

The agricultural use of DDT is still very widespread in West Africa. Consequently, few data have been collected on the basic susceptibility to DDT of S. damnosum s.l.

On a more general level, and within the current context of the extensive Onchocerciasis Control Programme in West Africa, the mechanisms of the development of insecticide resistance in S. damnosum s.l. are certainly a very complex matter. Two groups of opposing factors must be particularly involved.

Factors favourable to the development of resistance: the very strong selective pressure exerted by the insecticides because of the constantly increasing area of the treated zones (at present one area alone is 700 000 km²) and the frequency of larvicide treatment (once a week) on the one hand and the short duration of the development cycle (8-15 days) on the other hand.

Factors unfavourable to the development of resistance: the phenomena of dispersion and migration, very marked in S. damnosum s.l. females, causing the massive introduction into treated areas of fertilized females from untreated areas. This leads to dilution of any resistance genes present in the treated population and keeps the frequency of such genes below a critical threshold. This phenomenon was recently studied from the theoretical viewpoint by Comins (1977).

CONCLUSION

The level of susceptibility of S. damnosum s.l. larvae to DDT is on the whole rather varied and some cases of high resistance have been reported. Although sporadic and localized, these cases are very important because they definitely prove that S. damnosum s.l. has the capability to develop a certain level of DDT resistance fairly rapidly.

It is likely that the use of DDT in the Regional Onchocerciasis Control Programme would have led to the appearance of widespread resistance to this insecticide. This casts great doubt on the advisability of using DDT analogues in the control of S. damnosum s.l., as cross-resistance phenomena are common in this group of insecticides particularly in the biodegradable analogues. For example, a very high level of cross-resistance is observed between OMS-1476 and DDT in the Culicidae (Quiroga et al., 1976).

At present the only group of insecticides really suitable for use in onchocerciasis control in West Africa remains the organophosphorus compounds; Guillet & Grébaud (unpublished document) have not so far recorded any reduction in susceptibility to temephos in populations treated regularly for more than five years.

WHO/VBC/77.678
page 4

REFERENCES

- Asahina, S., et al. (1966) Insecticide resistance of the larvae of S. ornatum, Jap. J. Ser. Zool., 17, (4), 243-246
- Brown, A. W. A. & Pal, R. (1973) Résistance des arthropodes aux insecticides, Wld Hlth Org. Monogr. Ser. No. 38
- Comins, H. N. (1977) The development of insecticide resistance in the presence of migration, J. Theor. Biol., 64, 177-197
- Grébaut, S. & Guillet, P. (1977) Sensibilité à l'Abate, au Chlorphoxim et au DDT des populations larvaires du complexe S. damnosum dans la phase III du Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la région du Bassin de la Volta, Doc. ronéo. IRO Bouaké, No. 9/Oncho/Rapp/77, 24 pp., multigr.
- Hadaway, A. B. & Barlow, F. (1957) The influence of temperature and humidity upon the action of insecticide. I. During the post treatment period, Ann. trop. Med. Parasit., 51, 187-193
- Jamback, H. & West, A. S. (1970) Decreased susceptibility of blackfly larvae to P.P.'DDT in New York State and Eastern Canada, J. econ. Ent., 63, (1), 218-221
- Le Berre, R., Ovazza, M. & Juge, E. (1964) Résultats d'une campagne larvicide contre S. damnosum Theobald (Diptera, Simuliidae) en Afrique de l'Ouest, Proc. 12th Int. Cong. Ent. London, p. 811
- Mouchet, J. et al. (1977) Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de Simulium damnosum, Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. Parasitol., 15, (1), 55-66
- Muirhead-Thomson, R. (1957) Laboratory studies on the reaction of Simulium larvae to insecticides. II. The reaction of Simulium damnosum larvae to DDT, Amer. J. trop. Med. Hyg., 6, 920-934
- Philippon, B. & Le Berre, R. (1974) Résultats acquis et orientation actuelle des recherches dans la lutte contre le vecteur de l'Onchocercose humaine en Afrique Occidentale francophone (Côte d'Ivoire, Haute-Volta, Mali), Proc. 3rd. Int. Congr. Parasitol., Munich, 2, 990-991
- Quélennec, G. & Vervent, G. (1970) Mesure de la sensibilité aux insecticides des larves de simulies (Diptera, Simuliidae), Cah. ORSTOM, sér. Ent. Med. Parasitol., 8 (1), 21-43
- Quiroga, M. et al. (1976) Action d'un analogue du DDT (OMS 1476) sur des souches de moustiques sensibles et résistantes au DDT, Cah. ORSTOM, sér. Ent. Med. Parasitol., 14 (2), 89-92
- Suzuki, T., Ito, Y. & Harada, S. (1963) A record of black fly larvae resistance to DDT in Japan (Simulium (odagmia) aokii), Jap. J. Exp. Med., 33 (1), 41-46
- Walsh, J. F. (1970) Evidence of reduced susceptibility to DDT in controlling Simulium damnosum (Diptera, Simuliidae) on the river Niger, Bull. Wld Hlth Org., 43, 316-318
- West, A. S. (1967) The susceptibility of blackflies to DDT including field residues, WHO Inf. circ. Insect. resist., 6, 14 pp.

TABLE 1. CHARACTERISTIC VALUES OF POPULATIONS SUSCEPTIBLE TO DDT

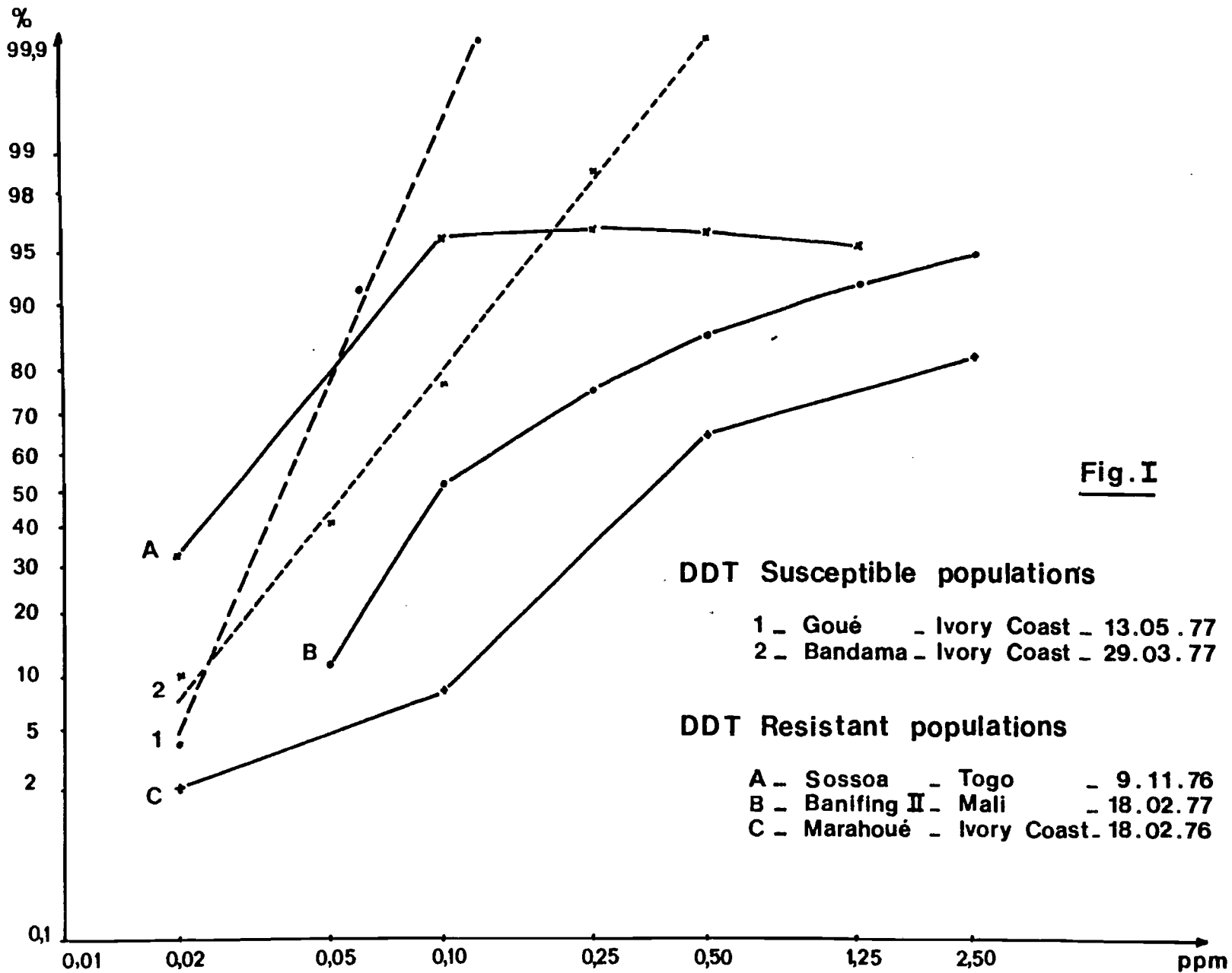
Locality, river, country	Species	Date	LC ₅₀ ppm	LC ₉₅ ppm	Range of LC ₁₀₀	Ratio $\frac{LC_{95}}{LC_{50}}$
Wa, Goué, Ivory Coast	<u>S. yahense</u>	13.05.77	0.037	0.058	0.06-0.12	1.5
Gauthier Falls, Bandama, Ivory Coast	<u>S. sanctipauli</u>	29.03.77	0.053	0.18	0.25-0.50	3.4
Tjokoronidougou, Boa, Ivory Coast	<u>S. damnosum</u> s.s.	9.03.76	0.038	0.064	0.02-0.1	1.6
	<u>S. sirbanum</u> <u>S. soubrense</u> <u>S. sanctipauli</u>	15.03.77	0.052	0.175	0.25-0.50	3.3
Arithmetic mean			0.045	0.12		2.8

TABLE 2. CHARACTERISTIC VALUES OF POPULATIONS RESISTANT TO DDT

Locality, river, country	Species	Date	LC ₅₀ ppm	LC ₉₅ ppm	Range of LC ₁₀₀	Ratio $\frac{LC_{95}}{LC_{50}}$	Coefficient of resistance ^a
Sossoa Togo	<u>S. damnosum</u> <u>S. sirbanum</u>	9.11.76	0.029	1.25	>1.25	43	10.4
Banifing II Mali	<u>S. damnosum</u> <u>S. sirbanum</u>	18.02.77	0.098	>2.5	>2.5	>25.5	>21
Bouafélé Marahoué Ivory Coast	<u>S. soubrense</u> dominant	18.02.76	0.44	>2.5	>2.5	>5.7	>21
Kiatiko Benin	<u>S. damnosum</u> <u>S. sirbanum</u>	3.11.76	0.038	1.25	>1.25	32.8	10.4
Taouba Baoulé Mali	<u>S. damnosum</u> <u>S. sirbanum</u>	14.02.77	0.092	0.62	1.25-2.50	6.7	5.2

^a Ratio of LC₉₅ of resistant population to LC₉₅ of susceptible population.

FIG. 1. CONCENTRATION - MORTALITY REGRESSION LINES
FOR DDT SUSCEPTIBLE AND RESISTANT POPULATIONS



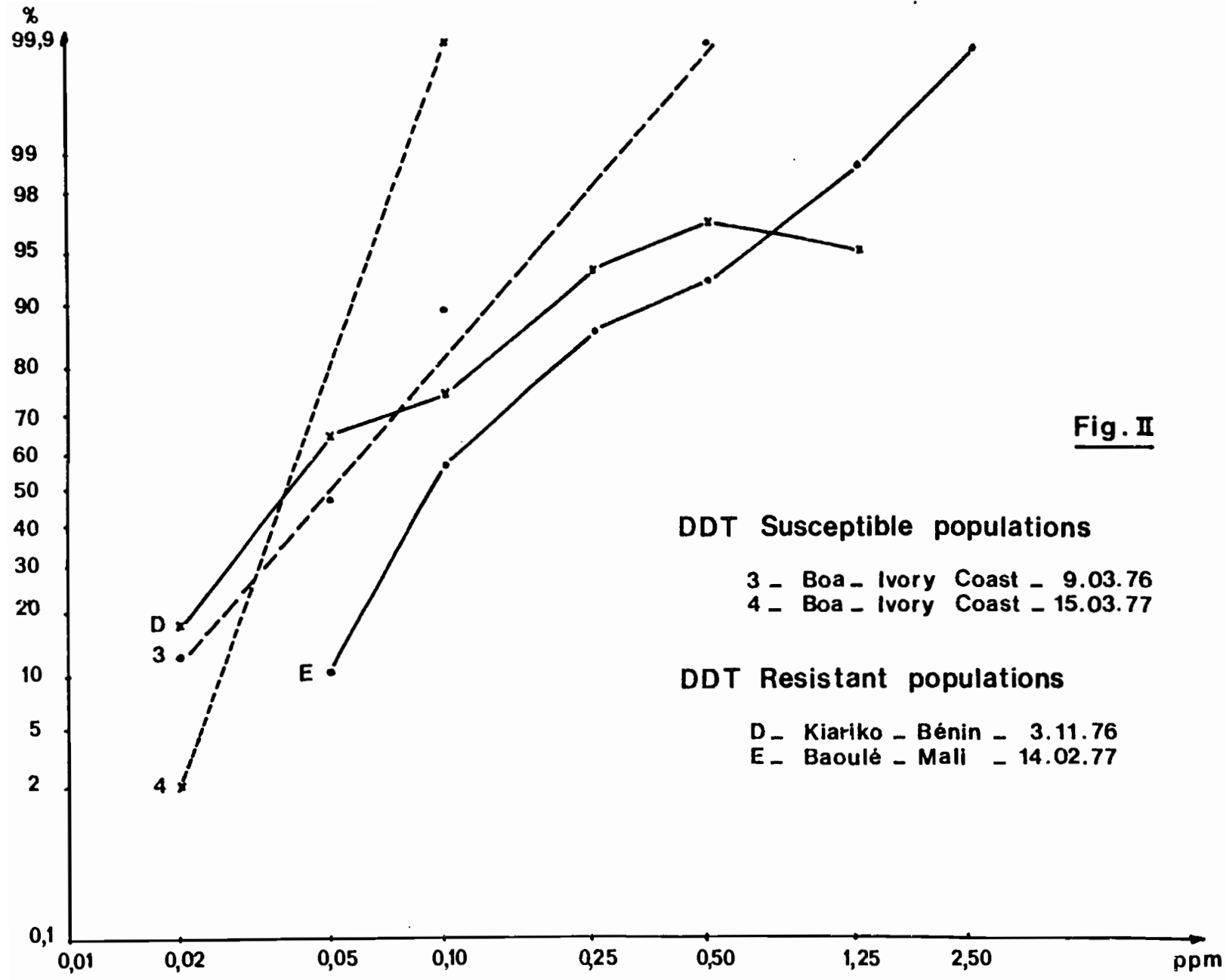
DDT Susceptible populations

- 1 - Goué - Ivory Coast - 13.05.77
- 2 - Bandama - Ivory Coast - 29.03.77

DDT Resistant populations

- A - Sossoa - Togo - 9.11.76
- B - Banifing II - Mali - 18.02.77
- C - Marahoué - Ivory Coast - 18.02.76

FIG. 2. DDT CONCENTRATION - MORTALITY REGRESSION LINES FOR DDT SUSCEPTIBLE AND RESISTANT POPULATIONS



4

MISE EN EVIDENCE D'UNE RESISTANCE AU TEMEPHOS

DANS LE COMPLEXE *Simulium damnosum*

(*S. sanctipauli* et *S. soubrense*)

EN COTE D'IVOIRE.

Mise en évidence d'une résistance au téméphos
dans le complexe *Simulium damnosum*
[*S. sanctipauli* et *S. soubrense*] en Côte d'Ivoire
(Zone du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du Bassin de la Volta)

Pierre GUILLET*
Henri ESCAFFRE**
Moussa OUEDRAOGO***
Daniel QUILLÉVÉRÉ*

Résumé

Des espèces du complexe *S. damnosum* ont pu, en zone de forêt et dans certaines conditions d'isolement, développer rapidement une sérieuse résistance au téméphos. Cette résistance semble se manifester davantage chez *S. sanctipauli* que chez *S. soubrense*.

Mots-clés : *S. damnosum* - Résistance - Téméphos.

Summary

DEMONSTRATION OF RESISTANCE TO TEMEPHOS IN SIMULIUM DAMNOSUM COMPLEX (*S. SANCTIPAULI* AND *S. SOUBRENSE*) IN IVORY COAST

In Ivory Coast, on the lower Bandama River, in forest area, larvae of the *Simulium damnosum* complex have rapidly developed a serious resistance to temephos (abate^(TM)). The resistance ratio to the LC 99,9 level can reach 45. This resistance seems to be more apparent in *S. sanctipauli*. We have noted for this species a high frequency of a heterozygote inversion on the chromosome III L in resistant larvae. Treatments fail completely at dosage 4 to 8 times the normal operational dosage (0,05 mg/l during 10 mn). The resistance occurs on a very limited portion of the river, 65 km long and limited upstream by a dam and downstream by the absence of breeding sites in the final 90 km of the river. The resistant population is currently being controlled with chlorphoxim, an alternative insecticide.

Key words : *S. damnosum* - Resistance - Temephos.

Le programme de lutte contre l'Onchocercose (OCP) entrepris par l'Organisation Mondiale de la Santé en Afrique de l'Ouest repose sur l'utilisation de larvicides chimiques déversés dans les rivières afin d'éliminer les larves des espèces du complexe *S. damnosum* vectrices de cette endémie. Le téméphos, en concentré émulsionnable (abate^(TM)) est utilisé par le

programme depuis sa création en 1974. Cet insecticide, de par sa forte toxicité pour les larves du complexe *S. damnosum* et sa relative innocuité pour la faune non cible, convient parfaitement à cette utilisation et a toujours donné d'excellents résultats. Cependant les captures de simules effectuées par le programme sur le bas Bandama en République de Côte d'Ivoire

* Entomologiste médical de l'O.R.S.T.O.M.-I.R.O., B.P. 1500, Bouaké (Côte d'Ivoire).
** Technicien d'entomologie médicale de l'O.R.S.T.O.M.-I.R.O., B.P. 1500, Bouaké.
*** Technicien d'entomologie O.M.S. au Programme de Lutte contre l'Onchocercose, secteur de Bouaké, B.P. 1474, Bouaké.

4314
B 1435

P. GUILLET, H. ESCAFFRE, M. OUEDRAOGO, D. QUILLÉVÉRÉ

ont montré la présence d'une population de femelles piqueuses anormalement élevée en dépit des traitements. Simultanément, des prospections dans les gîtes ont permis de mettre en évidence la présence de populations larvaires importantes 24 heures ou 48 heures après les traitements.

Une étude des facteurs pouvant expliquer ces échecs a été entreprise. Elle porte sur la sensibilité des larves au téméphos, l'efficacité des traitements, la détermination des espèces concernées et enfin la composition physicochimique de l'eau.

1. PRÉSENTATION DE LA ZONE ÉTUDIÉE

L'échec des traitements ne s'observe que sur le bas Bandama, en aval du barrage hydroélectrique de Taabo, en zone de forêt tropicale. Les derniers gîtes larvaires se situent au niveau de Tiassalé à 65 km du barrage. Ce bief présente un nombre important de gîtes de grande taille notamment au niveau du lieu dit « Les chutes Gauthier » où s'est déroulée toute cette étude (5° 57' N, 4° 50' O).

Le début du traitement de ce bief (mars 1979) est postérieur à la mise en eau du barrage. Le débit est relativement régularisé, variant entre 150 et 250 m³/s. On enregistre cependant des fluctuations journalières dues aux rythmes de fonctionnement des turbines du barrage. L'étendue des gîtes et l'abondance des supports pour les larves sont très favorables au développement d'une population composée d'environ 75 % de *S. sanctipauli* et de 25 % de *S. soudrense* (Vajime et Dunbar, 1975 ; Quillévéré et Pendriez, 1975 ; Vajime et Quillévéré, 1978). Les déplacements des femelles semblent très limités (Le Berre, 1966 ; Quillévéré, 1979). Les captures de femelles effectuées par OCP indiquent que depuis le début des traitements, ceux-ci n'ont pas toujours été efficaces à 100 %. Cela peut s'expliquer en partie par la complexité des gîtes et les fluctuations journalières de débit. Le délai écoulé entre la lecture de l'échelle de crues et le traitement a pu conduire souvent à des erreurs de dosage. Les concordances observées dans les débits indiqués simultanément par les échelles de crues relativement voisines ont permis d'éliminer l'hypothèse d'une éventuelle modification du barrage de l'une ou l'autre d'entre elles.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. La sensibilité des larves a été mesurée suivant la méthode préconisée par Mouchet *et al.* (1977).

Les tests sont effectués dans des bols en verre où sont placées 25 larves de stades IV et V dans 250 ml d'eau distillée. Le contact dure 3 heures à l'issue desquelles est effectuée la lecture de mortalité. La température de l'eau est maintenue entre 20 et 25° C. Le téméphos utilisé est une solution éthanolique de téméphos technique. Le critère adopté pour différencier les larves moribondes des vivantes est la réaction immédiate de repli de ces dernières au contact de la pince. Au cours de la dernière série de tests, les larves moribondes aux concentrations de 0,125 mg/l et plus ont été mises en observation. Dès la fin du test, ces larves sont prélevées, rincées puis transférées dans 250 ml d'eau distillée aérée par un diffuseur relié à un compresseur d'air. La durée de l'observation est de 6 heures.

2.2. L'efficacité des traitements au téméphos a été évaluée en utilisant un dispositif de minigouttières. Celles-ci sont alimentées par gravité avec de l'eau de la rivière préalablement filtrée à 120 µ. Les larves sont installées dans les gouttières au minimum 2 heures avant le début des traitements. En l'absence de traitement, la dérive spontanée des larves dans ce type de gouttières est très faible (1 à 3 % en 24 heures).

2.3. Les larves de *S. damnosum* s. l. survivant dans les tests de sensibilité aux concentrations supérieures ou égales à 0,25 mg/l ainsi que dans les gouttières après les traitements sont fixées dans le liquide de Carnoy pour l'identification spécifique à partir des chromosomes.

2.4. Des échantillons d'eau ont été prélevés en trois points : en amont du barrage, immédiatement en aval et aux chutes Gauthier (à 55 km en aval). Ces échantillons ont été analysés par le laboratoire d'analyses de l'O.R.S.T.O.M. à Abidjan. Des mesures extemporanées de pH ont été effectuées *in situ* à l'aide d'un pH-mètre électrique au moment de la collecte des échantillons. Des prélèvements de phytoplancton ont également été effectués et identifiés au Centre de recherches océanographiques de l'O.R.S.T.O.M. à Abidjan.

3. RÉSULTATS

3.1. Sensibilité des larves au téméphos

3.1.1. SENSIBILITÉ AVANT LES TRAITEMENTS

Deux séries de trois tests ont été effectuées aux chutes Gauthier en janvier et juin 1977. Les deux droites obtenues à partir des récapitulatifs de chaque

RÉSISTANCE AU TÉMÉPHOS DANS LE COMPLEXE *S. DAMNOSUM* EN CÔTE D'IVOIRE

série sont très voisines et parallèles (fig. 1). Les résultats obtenus sont très homogènes et dans tous les cas, la limite supérieure de la CL100 a été de 0,125 mg/l (tabl. I). Il faut noter cependant que la population des chutes Gauthier avait fait l'objet de 7 séries de traitement à l'abate en 1976.

3.1.2. SENSIBILITÉ ACTUELLE DES LARVES

Les résultats obtenus au cours de deux premières séries de tests sont tout à fait semblables. La CL95 est d'environ 0,2 mg/l et la limite supérieure de la CL100 de 0,5 et 0,625 mg/l (tabl. II et III, fig. 1).

Au cours de la troisième série de tests, les résultats obtenus sont plus hétérogènes. Un premier test, réalisé à partir d'un seul support abondamment peuplé de jeunes larves (majorité de stades III et IV) a indiqué une sensibilité presque normale avec une limite supérieure de la CL100 de 0,25 mg/l (tabl. IV). Trois autres tests, réalisés à partir de larves provenant d'un grand nombre de supports ont donné des résultats très différents avec 14,7 % de survivants à 0,312 mg/l et 3,7 % à 0,625 mg/l (1). La pente de la droite de régression est encore plus faible que celles obtenues lors des deux premières séries (tabl. V, fig. 1). Le rapport CL99,9 actuelle/CL99,9 avant traitement atteint des valeurs allant jusqu'à 45.

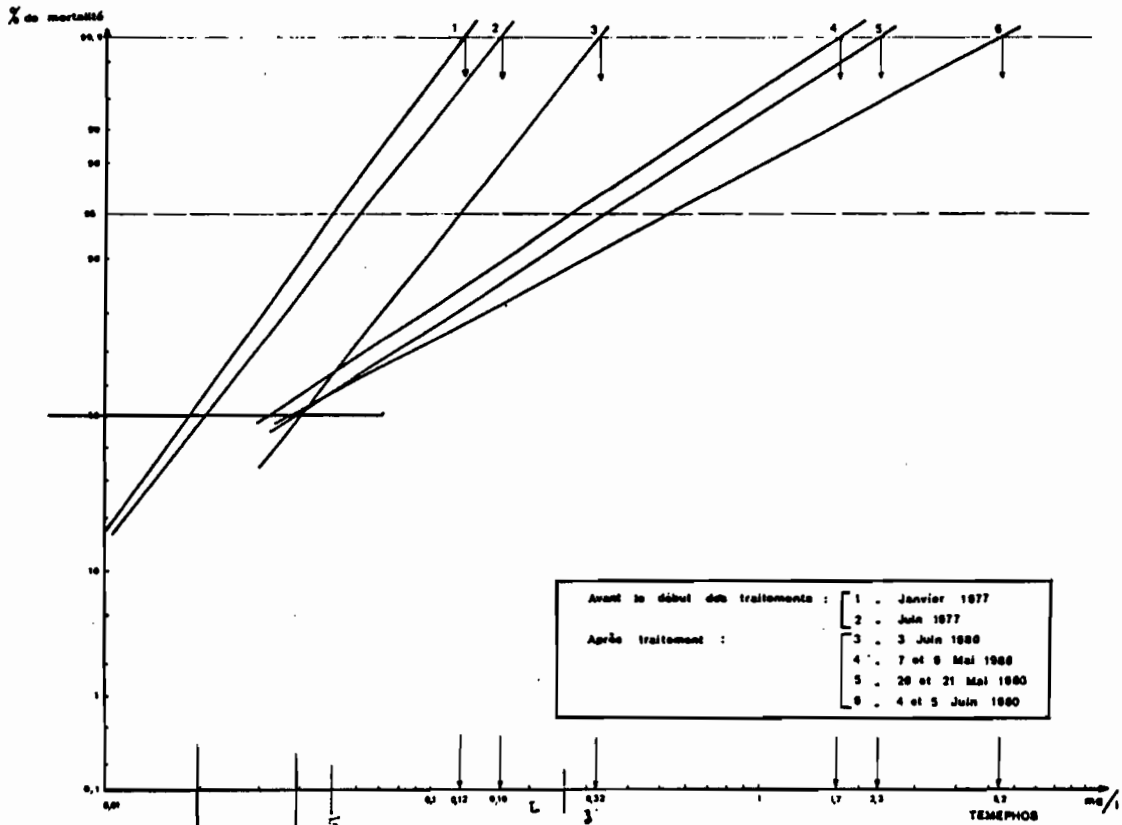


FIG. 1. — Sensibilité des larves de *S. sanctipauli* et *S. soubrense* au téméphos sur le bas Bandama.

(1) Les larves survivantes de ces tests n'ont pas été mises en survie ; en revanche, la totalité des larves moribondes mises en observation sont mortes dans les trois heures qui ont suivi le test.

P. GUILLET, H. ESCAFFRE, M. OUEDRAOGO, D. QUILLÉVÉRE

Sensibilité des larves du complexe S. damnosum (75 % S. sanctipauli, 25 % S. soubrense) au léméphos sur le bas Bandama (Chutes Gauthier)

TABLEAU I

Avant le début des traitements (concentrations exprimées en mg/l)

	Janvier 1977				Juin 1977			
	CL50	CL95	Lim. sup. CL100	nb. larves testées	CL50	CL95	lim. sup. CL100	nb. larves testées
Test n° 1	0,020	0,055	0,125	421	0,021	0,062	0,125	301
Test n° 2	0,019	0,050	0,125	415	0,017	0,049	0,125	337
Test n° 3	0,016	0,047	0,125	346	0,023	0,074	0,125	489

TABLEAU II

Première série de tests (7 et 8/05/80)

Concentration en mg/l	Nombre de larves			% mortalité
	mortes	moribondes	vivantes	
0,625 (4) *	97	11	0	100
0,312 (8)	150	19	7	96
0,156 (5)	88	18	12	89,8
0,078 (4)	73	8	28	74,3
0,039 (4)	47	9	25	69,1
0 (4)	0	1	90	1,1

TABLEAU III

Deuxième série de tests (20 et 21/05/80)

Concentration en mg/l	Nombre de larves			% mortalité	% corrigé
	mortes	moribondes	vivantes		
0,5000 (1) *	13	0	0	100	100
0,2500 (6)	121	12	10	93	92,4
0,1250 (3)	38	14	10	83,8	82,5
0,0625 (3)	31	8	19	67,2	64,6
0	5	0	68	7,3	

* entre parenthèses : le nombre de répliques par concentration.

RÉSISTANCE AU TÉMÉPHOS DANS LE COMPLEXE *S. DAMNOSUM* EN CÔTE D'IVOIRE

*Sensibilité des larves du complexe S. damnosum
(65 % S. sanctipauli, 35 % S. soubrense)
au téméphos sur le bas Bandama (Chutes Gauthier)*

TABLEAU IV
Troisième série de tests (3/06/80)

Concentration en mg/l	Nombre de larves			% mortalité	% corrigé
	mortes	moribondes	vivantes		
0,2500 (4) *	160	1	0	100	100
0,1250 (4)	100	11	4	96,5	96,2
0,0625 (3)	41	17	21	73,4	71,5
0,0312 (3)	9	17	28	48	38,8
0	2	4	86	6,5	—

TABLEAU V
Troisième série de tests (4 et 5/06/80)

Concentration en mg/l	Nombre de larves			% mortalité
	mortes	moribondes	vivantes	
0,625 (10) *	76	29	4	96,3
0,312 (11)	191	35	39	85,3
0,156 (10)	159	35	45	81,1
0,078 (4)	55	11	29	69,5

* entre parenthèses : le nombre de répliques par concentration.

Au cours de la troisième série de tests, des larves de *S. damnosum* s. l. provenant de la basse Comoé (zone non traitée) ont été testées à titre comparatif à la concentration de 0,156 mg/l. La mortalité a été de 100 % sur les 184 larves testées, ce qui indique une sensibilité normale pour cette population.

3.2. Efficacité des traitements au téméphos

Deux séries d'épandages ont été effectuées, l'une avec l'Abate Procida 20 % CE, l'autre avec l'Abate Cyanamid 20 % CE. Lors de ces deux séries, les conditions opérationnelles ont été les mêmes : débit de 180 m³/s, épandage en trois points (une dose à l'entrée du gîte et deux demi-doses 500 à 600 m en aval, au même niveau sur les deux bras principaux du gîte). Les gouttières étaient situées environ 1 000 m en aval du deuxième point d'épandage.

Le premier traitement à l'Abate Procida à 0,1 mg/l pendant 10 mn (le 22-05-80) a provoqué 3,5 % de décrochement des larves et le deuxième à 0,2 mg/l pendant 10 mn le lendemain, 17,9 % de décrochement des larves restant dans les gouttières. Le décrochement global pour ces deux traitements est de 19,1 % (tabl. VI). Dans tous les cas, les larves s'étant nymphosées après passage de la vague d'insecticide ont été comptées comme vivantes.

Le premier traitement à l'Abate Cyanamid à 0,1 mg/l pendant 10 mn (le 5-06-80) a provoqué 25,3 % de décrochement et le deuxième, à 0,4 mg/l pendant 10 mn le lendemain, 41,8 % de décrochement des larves restant dans les gouttières. L'effet global pour les deux traitements est de 52 % (tabl. VII). Lors de ces deux traitements, le décrochement des larves a commencé 3 heures après l'épandage et s'est étalé sur 4 à 5 heures. Passé ce délai, il devient pratiquement nul.

P. GUILLET, H. ESCAFFRE, M. OUEDRAOGO, D. QUILLÉVÉRE

*Efficacité * des traitements au téméphos évaluée à l'aide des Gouttières*

TABLEAU VI
Abate Procida 20 % CE

	% de décrochement des larves			
	stades 2-3	stades 4-5	stades 6-7	total
Premier traitement 0,1 mg/l pendant 10 mn, 22-05-80	0	6,6	3,4	3,5
Deuxième traitement 0,2 mg/l pendant 10 mn, 23-05-80	40	25	13,6	17,9
1 ^{er} et 2 ^e traitements	40 (20) **	30 (30)	14,8 (176)	19,1 (226)

TABLEAU VII
Abate Cyanamid 20 % CE

	% de décrochement des larves			
	stades 2-3	stades 4-5	stades 6-7	total
Premier traitement 0,1 mg/l pendant 10 mn 5-06-80	33,6	38,5	23,8	25,3
Deuxième traitement 0,4 mg/l pendant 10 mn, 6-06-80	76,1	80,6	22,7	41,8
1 ^{er} et 2 ^e traitements	84,1 (101) **	88,1 (109)	41,2 (1613)	52 (1823)

* L'efficacité du deuxième traitement est calculée sur l'effectif de larves restant dans les gouttières. Les larves s'étant nymphosées après le passage de la vague d'insecticide sont considérées comme vivantes.

** Entre parenthèses : le nombre de larves mises en place dans les gouttières.

RÉSISTANCE AU TÉMÉPHOS DANS LE COMPLEXE *S. DAMNOSUM* EN CÔTE D'IVOIRE

Tous les contrôles larvaires effectués dans les gîtes après ces deux séries de traitements ont montré dans tous les cas une importante population larvaire résiduelle, même à moins de 200 m en aval des points d'épandage. Cette population, comme dans les gouttières, est composée à la fois de larves jeunes et âgées.

3.3. Déterminations spécifique des larves du gîte et des larves survivantes aux tests

La population larvaire du gîte Gauthier au moment de l'expérimentation se composait approximativement de 65 % de larves de *S. sanctipauli* et de 35 % de *S. soubrense*. On note chez les larves survivantes aux tests à 0,312 et 0,625 mg/l, ainsi que dans le gîte après deux traitements à l'Abate Cyanamid une forte majorité de *S. sanctipauli* (environ 80 %). Il est également remarquable de noter sur les larves survivantes de *S. sanctipauli* la fréquence d'une inversion hétérozygote sur le III L (située entre les bandes 90 à 95). Il est difficile de numérotter cette inversion ne connaissant pas à l'heure actuelle la totalité des inversions du complexe. La fréquence de cette inversion chez *S. sanctipauli* était de 2 pour 26 dans le gîte contre 15 pour 32 chez les larves survivantes aux tests à 0,625 et 0,312 mg/l.

Étant donné le peu de larves déterminées (40 larves dans le gîte et 82 larves survivantes), il est

difficile d'établir des conclusions définitives. Toutefois, il semble bien que la résistance se manifeste plus chez *S. sanctipauli* que chez *S. soubrense*. La relation apparente entre l'inversion hétérozygote sur le chromosome III L et cette résistance mérite d'être signalée.

3.4. Analyse des eaux du Bandama

Les différences minimales observées dans la composition physico-chimique de l'eau des trois points de prélèvement ne peuvent certainement pas expliquer l'échec des traitements (tabl. V). Aux pH rencontrés, la stabilité du téméphos n'est pas altérée. On enregistre peu de différences au niveau de la composition ionique et de la résistivité. On note cependant une différence importante dans les matières en suspension. Elles sont cinq fois plus abondantes au niveau des chutes Gauthier qu'en amont. On sait actuellement que l'abondance de particules en suspension accroît sensiblement l'efficacité du téméphos (Guillet et Escaffre, 1979).

On constate en aval du barrage la présence d'un peuplement de phytoplancton nettement moins diversifié qu'en amont, avec prédominance très nette de pyrrophytes (*Peridinium* sp.) et présence de quelques diatomées (*Melosia* sp.) et cyanophycées.

Aucune des quelques caractéristiques physico-chimiques des eaux étudiées ne peut expliquer l'échec des traitements à l'abate sur le bas Bandama.

TABLEAU VIII

Composition physico-chimique de l'eau du Bandama

Lieu de prélèvement	pH *	Résistivité Ω/cm à 20° C	Total cations en méq/l	Total anions en méq/l	Matières en suspension en mg/l (séchées à 105° C)	Carbone en % dans les ma- tières sèches	O ² dissous en mg/l	O ² consommé par la matière organique
Amont du barrage de Taabo	7,6	10 000	0,98	1	3,85	13,5	7,58	3,6
Aval immédiat du barrage	6,4	9 708	1,02	1,03	3,99	64,5	7,53	4,2
Chutes Gauthier	7,1	9 900	1,03	1,03	20,31	56,3	7,74	4,4

* Mesure extemporanée.

P. GUILLET, H. ESCAFFRE, M. OUEDRAOGO, D. QUILLÉVÉRÉ

4. DISCUSSION - CONCLUSION

La méthode préconisée par Mouchet *et al.* (*loc. cit.*) a permis de mettre très clairement en évidence la résistance au ténéphos. Cette méthode, qui donne des résultats fiables, est tout à fait adaptée à la détermination de la sensibilité des larves de *S. damnosum* s. l. aux insecticides. Elle vient d'être approuvée par le dernier comité O.M.S. d'experts sur la résistance des vecteurs aux pesticides.

L'analyse des résultats des tests de sensibilité effectués avant le début des traitements et 16 mois après indique que les larves de *S. sanctipauli* et de *S. soubrense* du bas Bandama ont rapidement développé une résistance au ténéphos. Le coefficient de résistance enregistré (jusqu'à 45) a une incidence opérationnelle immédiate et évidente. Une dose 4 à 5 fois supérieure à la dose opérationnelle efficace élimine à peine la moitié des larves présentes dans les gîtes, et ce indépendamment de la formulation de ténéphos employée. Il faudrait probablement des concentrations beaucoup plus élevées pour obtenir une efficacité totale.

Deux éléments confirment cette résistance mise en évidence par les tests. D'une part, le pourcentage de décrochement lors du deuxième traitement à l'Abate Cyanamid n'a pas augmenté proportionnellement à la dose. En augmentant celle-ci de 4 fois, la mortalité des larves n'augmente que de 1,6 fois, ce qui indique que la plupart des larves sensibles ont décroché lors du premier traitement. L'effet du deuxième traitement est donc minimisé du fait qu'il s'applique à des larves génétiquement moins sensibles. Il faut noter cependant que cette moindre sensibilité a été en partie masquée par le premier traitement qui a probablement sensibilisé les larves au ténéphos. Ce phénomène s'observe couramment chez les larves de moustiques lors d'expositions répétées à des doses sublétales d'insecticides. D'autre part, en dépit de concentrations de ténéphos très élevées, les jeunes larves (stades II à IV) n'ont décroché qu'à 70-80 %. Ces larves, plus sensibles que les larves âgées, décrochent en général toutes lors de sous-dosages accidentels sur des populations sensibles.

L'échec des traitements à l'abate ne vient pas d'une moindre efficacité des lots utilisés. Simultanément, ces lots ont donné ailleurs d'excellents résultats. Il n'est pas imputable non plus aux conditions hydrologiques puisqu'un traitement au chlorphoxim (O.M.S. 1197 20 % CE) à 0,05 mg/l pendant 10 mn dans les mêmes conditions opérationnelles a été efficace à 100 %.

Si la résistance aux insecticides chez les simuliés

n'est pas un phénomène couramment observé, c'est probablement que celles-ci n'ont pas fait souvent l'objet de campagnes de lutte systématique. Des baisses de sensibilité au D.D.T. ont été enregistrées aux États-Unis (Jamnback et West, 1970), au Japon (Susuki *et al.*, 1963 ; Asahina *et al.*, 1966) ainsi qu'en Afrique chez *S. damnosum* s. l. (Walsh, 1970 ; Kuzoe et Noamesi, 1973) et *S. hargreavesi* (Quélenec et Vervent, 1970). Récemment un niveau élevé de résistance au D.D.T. a été mis en évidence chez *S. damnosum* s. l. dans la zone du programme (Guillet *et al.*, 1977).

Le développement d'une résistance au ténéphos sur le bas Bandama, 16 mois seulement après le début des traitements, est assez surprenant. Toutefois, un certain nombre de facteurs ont été favorables à son apparition : l'importance de la population et son isolement, le manque d'une efficacité totale des traitements opérationnels et enfin, facteurs communs à toutes les populations de *S. damnosum* s. l., la prolificité des femelles et la brièveté du cycle de développement. L'apparition de cette résistance souligne la nécessité impérieuse pour les traitements d'être systématiquement efficaces à 100 %. La surveillance entomologique du programme repose essentiellement sur la capture de femelles piqueuses. Il serait souhaitable, chaque fois qu'il est possible d'une part de renforcer les contrôles larvaires dans les gîtes après les traitements, d'autre part d'utiliser les doses diagnostiques proposées par Mouchet *et al.* (*loc. cit.*) afin de suivre régulièrement la sensibilité des larves surtout dans les zones où l'on constate une moindre efficacité des traitements.

La population résistante du bas Bandama est actuellement contrôlée à l'aide d'un alternatif du ténéphos : le chlorphoxim qui s'est révélé efficace à 100 % à la dose de 0,05 mg/l pendant 10 mn. Il est difficile de statuer sur l'évolution de la résistance au ténéphos après un certain nombre de cycles de traitement au chlorphoxim. Toutefois, cela souligne la nécessité d'intensifier les recherches dans le domaine de l'utilisation d'autres types de larvicides et notamment les formulations à base de bactéries entomopathogènes telles que le *Bacillus thuringiensis* sérotype H 14.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les responsables du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta qui ont mis à notre disposition tous les moyens matériels nécessaires à la réalisation de cette étude.

Manuscrit reçu au Service des Publications de l'O.R.S.T.O.M. le 17 septembre 1980.

RÉSISTANCE AU TÊMÉPHOS DANS LE COMPLEXE *S. DAMNOSUM* EN CÔTE D'IVOIRE

BIBLIOGRAPHIE

- ASAHINA (S.) *et al.*, 1966. — Insecticide resistance of the larvae of *S. ornatum*. *Jap. J. San Zool.*, 17 (4) : 243-246.
- GUILLET (P.), MOUCHET (J.) et GRÉBAUT (S.), 1977. — D.D.T. resistance in *Simulium damnosum* s. l. (*Diptera* : *Simuliidae*) in West Africa. *Document mimeographié O.M.S., WHO/VBC/77.678*, 7 p.
- GUILLET (P.) et ESCAFFRE (H.), 1979. — La recherche de nouvelles formulations d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. *Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical, Marseille, 13-16 mars 1979, II*, 1169-1178.
- JAMNBACK (H.) et WEST (A. S.), 1970. — Decreased susceptibility of blackfly larvae to P. P' D.D.T. in New York State and Eastern Canada. *J. econ. Ent.*, 63, 1 : 218-221.
- KUZOE, NOAMESI, in BROWN (A. W.) et PAL (R.), 1973. — Resistance des arthropodes aux insecticides. *Wld. Hlth. Org. Monogr. Ser.* n° 38.
- LE BERRE (R.), 1966. — Contribution à l'étude biologique et écologique de *Simulium damnosum* Theobald, 1903 (*Diptera* : *Simuliidae*). *Mém. O.R.S.T.O.M.*, n° 17, 204 p.
- MOUCHET (J.) *et al.*, 1977. — Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de *Simulium damnosum*. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. 15, n° 1 : 55-56.
- QUELENNEC (G.) et VERVENT (G.), 1970. — Mesure de la sensibilité aux insecticides des larves de simulies (*Diptera* : *Simuliidae*). *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. 8, n° 1 : 21-43.
- QUILLEVÈRE (D.), 1979. — Contribution à l'étude des caractéristiques taxonomiques, bioécologiques et vectrices des membres du complexe *Simulium damnosum* présents en Côte d'Ivoire. *Trav. et Doc. O.R.S.T.O.M.*, n° 109, 304 p.
- QUILLEVÈRE (D.) et PENDRIEZ (B.), 1975. — Étude du complexe *Simulium damnosum* en Afrique de l'Ouest. II — Répartition géographique des cytotypes en Côte d'Ivoire. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XIII, n° 3 : 165-172.
- SUSUKI (T.), ITO (Y.) et HARADA (S.), 1963. — A record of blackfly larvae resistance to D.D.T. in Japan (*Simulium (Odagnia) aokii*). *Jap. J. Exp. Med.*, 33, 1 : 41-46.
- VAJIME (Ch. G.) et DUNBAR (R. W.), 1975. — Chromosomal identification of eight species of the subgenus *Edwardsellum* near and including *Simulium (Edwardsellum) damnosum* Theobald (*Diptera* : *Simuliidae*). *Tropenmed. Parasit.*, 26, 1 : 111-138.
- VAJIME (Ch. G.) et QUILLEVÈRE (D.), 1978. — The distribution of the *Simulium damnosum* complex in West Africa with particular reference to the onchocerciasis control programme area. *Tropenmed. Parasit.*, 29 : 473-482.
- WALSH (J. F.), 1970. — Evidence of reduced susceptibility to D.D.T. in controlling *Simulium damnosum* (*Diptera* : *Simuliidae*) on the river Niger. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 43 : 316-318.

5

PRELIMINARY NOTE ON THE APPEARANCE IN IVORY COAST

OF RESISTANCE TO CHLORPHOXIM

IN *Simulium soubrense/sanctipauli* LARVAE

ALREADY RESISTANT TO TEMEPHOS (ABATE)



WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

WHO/VBC/82.850

ENGLISH ONLY

PRELIMINARY NOTE ON THE APPEARANCE IN IVORY COAST OF RESISTANCE TO CHLORPHOXIM
IN SIMULIUM SOUBRENSE/SANCTIPAULI LARVAE ALREADY RESISTANT TO TEMEPHOS (ABATE (R))

by

Dan Kurtak,¹ Moussa Ouedraogo,¹ Michael Ocran,¹
Barro Télé,¹ and Pierre Guillet²

Introduction

Resistance to temephos (OMS 786) in larvae of Simulium soubrense/sanctipauli (two members of the S. damnosum complex in West Africa) was confirmed at Chutes Gauthier on the Lower Bandama River in Ivory Coast in May 1980 (Guillet et al., 1980). The phenomenon has remained limited to S. soubrense/sanctipauli, but has spread to all of the river basins in Ivory Coast normally colonized by that species (Anon., 1981). Resistant S. soubrense larvae now comprise 100% of the S. damnosum s.l. population found in some savanna rivers treated with temephos. Before treatments, S. soubrense was present only as a small component of the S. damnosum s.l. population.

Chlorphoxim (OMS 1197), the only replacement insecticide then operational, was introduced provisionally while the testing of other larvicides continued. In 1980, chlorphoxim was first used at Chutes Gauthier for 11 weekly treatments, beginning in the week of 15 June. There was then a pause of seven weeks due to a lack of the chemical. Treatments were then resumed and continued up to the end of the year (10 more weeks). The results of this last series were considered satisfactory (1-2 flies/man/day), and treatments were suspended. They were not resumed until the week of 10 May 1981. During the suspension period, the monthly average of flies caught/man/day rose from 24 in January to 860 in May. Treatments continued from May until October 1981, but the number of flies fell very slowly, reaching two/man/day only in the first week of September. The catch began to rise again in the second week of September, and reached 2000/man/day in October at which time treatments were stopped and a programme of susceptibility testing began. This paper presents results of those tests.

Methods

Susceptibility tests were carried out with alcohol solutions of technical chlorphoxim (WHO sample) according to the method of Mouchet et al. (1977). This method was officially adopted by the WHO Expert Committee on Vector Biology and Control in 1981 (WHO, 1981) and has been used to gather almost all of the susceptibility data in the Onchocerciasis Control Programme Area. An important modification of the method reported here is the use of "old" or "mature" larvae (7th instar) in some tests. The official (Mouchet) test method requires the use of "young" (4th and 5th instar) larvae. The use of mature larvae was not recommended because the susceptibility of these larvae was found to be less than that of young larvae (Mouchet et al., 1977). Also, the mortalities with mature larvae were very heterogenous and log dose-probit mortality lines with narrow confidence intervals could not be prepared.

¹ World Health Organization, Onchocerciasis Control Programme, B.P. 549 Ouagadougou, Upper Volta.

² Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et l'Onchocercose, B.P. 1500 Bouaké, Ivory Coast.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

WHIO/VBC/82.850

page 2

However, there are several important advantages to the use of mature larvae. Under operational conditions it is often difficult to find large numbers of young larvae. In cases of treatment failure it is often the mature larvae which survive as subjects for susceptibility tests. Long treatment suspensions to allow young larvae to develop undisturbed are not always acceptable for epidemiological reasons. Mature larvae are more robust than young larvae and are easier to handle. Most important, mature larvae can be identified cytotaxonomically. This permits identification of larvae surviving diagnostic doses, which cannot be done with young larvae.

Because of these advantages, the question of using mature larvae was restudied, to determine if resistance could be detected by comparing "resistant" and "susceptible" mature larvae.

As it was believed that some of the heterogeneity of earlier results arose from the inclusion of 6th-instar larvae, the morphological criteria for selection were carefully reviewed. Mature larvae were then defined as those having the filaments of the pupal gills well developed and easily visible in the histoblasts. The histoblasts may be pale or dark. These criteria select mostly 7th-instar larvae (Grenier & Feraud, 1960; Kurtak, 1980).

Parallel tests were done with young and mature larvae from the same breeding site to establish a diagnostic dose for mature larvae. The morphological criteria were checked by examining groups of dead and surviving mature larvae. When it was initially found that among the dead larvae, there were consistently more smaller larvae with less-developed histoblasts than in the surviving group, the criteria were revised to exclude these younger larvae. Once the criteria were fixed as described in the preceding paragraph, the log dose-probit mortality lines obtained paralleled quite closely those for young larvae and had about the same heterogeneity. The mature larvae were found to be about 8-10 times less susceptible than young larvae, but this difference is constant for a given insecticide.

The establishment of diagnostic concentrations for mature larvae has greatly facilitated surveys for resistance.

It is important to exclude 6th-instar larvae from test samples, since it seems that it is during this instar that susceptibility changes rapidly.

Samples of mature larvae were preserved in Carnoy's fixative at the time of each test, for confirmation of cytospecies by chromosome staining. In tests with young larvae, a sample of mature larvae was taken from the same breeding site at the same time. In tests with mature larvae, surviving test larvae themselves were preserved.

When "diagnostic concentration" is referred to, it is equal to 0.0125 mg/l of chlorphoxim for young larvae and 0.125 mg/l for mature larvae.

Probit analysis of the data was carried out by the method of Maximum Likelihood (Finney, 1971) using a Texas Instruments TI 59 Calculator and a programme developed by Dr B. Grab of the Health Statistical Methods Unit, WHO, Geneva.

Results

The results of susceptibility tests at Chutes Gauthier and other sites in the Bandama Basin are presented in Table 1 and Figs 1 and 2. Data from sites outside the Bandama Basin are given in Table 2. A map, Fig. 4, gives locations of the test sites. Comparative data for normal mature larvae from other sites are presented in Table 3 and Fig. 3 (no such data exist for Chutes Gauthier). Due to the large number of lines in Figs 1 and 2, it is not possible to display individual data points. However, statistical analysis of each line is given in Table 4.

In late 1981, the LC₅₀ for chlorphoxim for young larvae at Chutes Gauthier had become eight times higher than in January 1977 and 12 times higher than in February 1981 (Table 1 - Tests 1, 2 and 8 compared with 15 and 16). The upper limit for the LC₁₀₀ increased from 0.0125 mg/l (diagnostic concentration) to 0.05 mg/l. The slope of the log dose-probit mortality line did not change significantly.

For mature larvae, the LC₅₀ at Chutes Gauthier in October 1981 is about eight times the figure for temephos-resistant larvae (Asserekro Test No. 12, Table 1), and at least 10 times the figures for normal populations (Table 3). The upper limit of the LC₁₀₀ is 0.5 mg/l versus 0.03125 mg/l or 0.0625 mg/l for normal populations. The slopes of two of the log dose-probit mortality lines are (Nos. 17 and 24) significantly less for the resistant populations. The absolute values for mature larvae are about 10 times those for young larvae (compare line No. 15, Fig. 1 with line No. 14, Fig. 2).

All mature larvae surviving diagnostic concentrations were identified as S. soubrense/sanctipauli, even when other cytospecies were present in the general population.

By January 1982, the resistance to chlorphoxim covered most of Ivory Coast. All S. soubrense populations in the treated area are now resistant, and the area is the same as for the previous temephos resistance. Only the Black Volta River in Ghana contains S. soubrense resistant to temephos and not to chlorphoxim.

However, farther away from the lower Bandama River the resistance is less "intense" as indicated by LC₅₀, LC₉₅ and LC₁₀₀ values and percentage of survival at the diagnostic dose. For example, at Grechan (No. 21, Table 2) only 4.1% of young larvae survived at the diagnostic dose versus 70.5% at Chutes Gauthier (No. 16, Table 1). An interesting exception to this trend was seen on the Bafing River (Nos. 16 and 17, Table 2), where 100% of the mature larvae survived versus 73% at Chutes Gauthier (Test 14, Table 1).

Discussion

The existence of well-developed resistance to chlorphoxim in S. soubrense/sanctipauli, suspected because of treatment failure, is confirmed by the data presented here. These show large increases in LC₅₀, LC₉₅ and the limit of the LC₁₀₀. The slopes of the log dose-probit mortality lines with young larvae are not, however, reduced as they were with temephos resistance (Guillet et al., 1981). This may indicate greater genetic homogeneity.

The data for mature larvae show the same changes as those for young larvae, although the absolute values are higher. This demonstrates that mature larvae can be used for diagnostic testing, but that the data must be compared with baseline data obtained using mature larvae. If tests with both young and mature larvae are included in baseline surveys, operational flexibility will be gained when follow-up tests are needed.

Operationally significant resistance to chlorphoxim developed in temephos-resistant larvae in a period of five months, according to test results. Even if the starting point is considered to be the first chlorphoxim treatments in 1980, resistance took 16 months to develop. Several factors may have been involved in this rapid development of resistance. Firstly, the population treated was already resistant to temephos. Since temephos and chlorphoxim are both organophosphorus compounds, it is likely that the same enzyme system would detoxify both compounds and resistance to one would predispose for development of resistance to the other. As there was no evidence of cross-resistance¹ early in the period of chlorphoxim use, additional selection was necessary to develop the double resistance² now exhibited by these larvae.

¹ Cross-resistance is here defined as resistance to an insecticide which has never been applied in a strain already resistant to one or several insecticides.

² Double-resistance is here defined as resistance to a replacement insecticide appearing sometime after its introduction.

WHO/VBC/82.850

page 4

Secondly, the dosage rate used for chlorphoxim in the field (0.025 mg/l for 10 minutes) was fixed as low as possible since chlorphoxim is more toxic to non-target organisms than temephos (Dejoux & Troubat, 1976). This may have resulted in less than 100% effective treatments which encouraged rapid selection for resistance.

Once selection began, the relative isolation of the lower Bandama population (Guillet et al., 1980) would favour fixation of the genes for resistance. It is not possible, however, to prove that isolation was essential to development of resistance in this case. Most neighbouring populations of S. soubrense/sanctipauli were also resistant to temephos and being treated with chlorphoxim. Thus flies arriving from other sites would have been exposed to the same selection pressure. Also, since most evidence indicates that flies mate before dispersal, flies arriving from non-treated areas would not "dilute" a resistant population in a successfully treated river. Their susceptible genes would be eliminated when their susceptible offspring were killed by the insecticide treatments (Reiter, 1981). If, however, treatments were not 100% effective due to poor distribution of the insecticide, then resistant and non-resistant larvae would have equal chances of survival and dilution would be a factor.

In regard to the question of the geographic origin of the resistance, the data generally indicate a spread by dispersing flies from the lower Bandama River. However, the results on the Bafing may indicate a secondary source.

The data presented here clearly demonstrate resistance to chlorphoxim by S. soubrense/sanctipauli larvae through most of Ivory Coast. Studies are under way to determine the cross-resistance spectrum of resistant larvae and the effects of synergists of the susceptibility of resistant larvae to chlorphoxim.

ACKNOWLEDGEMENTS

In the Onchocerciasis Control Programme, a report such as this represents the fruits of the efforts of a very large team of staff members at all levels.

First, the support of the Programme Director, Dr E. M. Samba, is gratefully acknowledged.

The authors would like to thank the Chief of Entomological Surveillance, Mr G. Zerbo and the Entomologist for the Western Zone, Dr H. Agoua, for closely watching the situation on the lower Bandama River and calling to our attention that the larval population was resisting treatment.

Mr G. Fiasorgbor and Dr S. E. O. Meredith performed many cytotoxic identifications.

Mr P. Foudiougou and Mr C. Aitchedji, technical officers, organized aerial prospections for the collection of larvae.

Mr J. Deh-Deh, Mr J. Nion, Mr J. B. Gbato, Mr H. S. K. Avissey and Mr J. Agyekum, technician/entomologists, participated in prospections and/or testing.

Finally, one should not forget the faithful service of laboratory assistants and drivers.

REFERENCES

- Anon. (1981) Resistance to temephos in the Simulium damnosum complex. Current situation (August 1981). Foreseeable entomological and epidemiological consequences. Effects on the vector control strategy of the Programme, mimeographed document OCP/EAC 2.4 (Report to Expert Advisory Committee)
- Dejoux, C. & Troubat, J. J. (1976) Toxicité comparée de deux insecticides organophosphorés sur la faune aquatique non-cible en milieu tropical, Rapport No. 1, Laboratoire d'Hydrobiologie de Bouaké, Côte d'Ivoire, O.R.S.T.O.M.

- Finney, D. J. (1971) *Probit analysis*, Cambridge University Press, 333 pp.
- Grenier, P. & Feraud, L. (1960) Etude biométrique et morphologique de la croissance larvaire chez Simulium damnosum - Theobald, Bull. Soc. Path. exot., 53(3), 563-581
- Guillet, P., Escaffre, M., Ouédraogo, M. & Guillévéré, D. (1980) Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe Simulium damnosum (S. sanctipauli et S. soubrense) en Côte d'Ivoire. (Zone du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta), Cah. O.R.S.T.O.M., série. Ent. med. et Parasitol., 18(3), 291-299
- Kurtak, D. (1980) Notes on the selection of larvae of Simulium damnosum s.l. for insecticide susceptibility tests with particular reference to the cytospecies S. soubrense and S. squamosum, mimeographed document Vector Control Unit
- Mouchet, J., Quélenec, G., Berl, D., Sechan, Y. & Grebaut, S. (1977) Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de Simulium damnosum s.l. Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. Méd. et Parasitol., 15(1), 55-66
- Reiter, Paul A. (1981) Migration and the "dilution" of resistance genes, Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg. (In press)
- WHO (1981) Instructions for determining the susceptibility or resistance of black fly larvae to insecticide, WHO unpublished document WHO/VBC/81.811

TABLE 1. SUSCEPTIBILITY TESTS WITH CHLORPHOXIM IN THE BANDAMA RIVER BASIN, IVORY COAST
(chronologically arranged)

No.	Date	Site and river	Map code	Age of larvae	No. of larvae	LC ₅₀ (mg/l)	LC ₉₅ (mg/l)	Upper limit LC ₁₀₀ (mg/l)	Ratio LC ₅₀ /LC ₉₅	% survival ^a at diagnostic dose	Conclusion	Cytotaxonomic ^b identification
1	20/1/77	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Young	335	0.0015	0.005	0.0125	3.0	0	Normal	75% aa 25% so
2	21/1/77	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Young	523	0.0016	0.004	0.0125	2.5	0	Normal	75% aa 25% so
3	4/6/80	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Young	128	-	-	0.0125	-	0	Normal ^c	100% aa
4	14/9/80	Danangoro (Marahoué)	5	Young	231	-	-	0.0125	-	0	Normal ^c	100% so ^d
5	15/9/80	Danangoro (Marahoué)	5	Young	620	0.0023	0.0051	0.0125	2.2	0	Normal ^c	100% so ^d
6	13/1/81	Hermis (Marahoué)	7	Young	66	-	-	0.0125	-	0	Normal ^c	98% so 2% da
7	3/2/81	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Young	292	-	-	0.0125	-	0	Normal ^c	55% so 45% aa
8	4/2/81	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Young	350	0.0011	0.0019	0.0125	1.7	0	Normal ^c	55% so 45% aa
9	11/5/81	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Young	72	-	-	0.0125	-	0	Normal ^c	88% aa 8% so 4% da
10	10/6/81	Sites 2 and 3 (Bou)	8	Young	905	-	-	0.0125	-	0	Normal ^c	100% so
11	4/9/81	Asserekro (Kam)	4	Young	51	-	-	0.0125	-	0	Normal ^c	69% so 18% aa 8% da 5% si
12	7/10/81	Asserekro (Kam)	4	Mature	909	0.014	0.035	0.0625	2.5	0	Normal ^c	77% so 14% aa 9% da
13	20/10/81	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Mature	1 153	>0.125	>0.125	?	?	65.3	Resistant ^c	87% aa 10% so 3% so/aa
14	21/10/81	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Mature	689	0.16	0.36	0.5	2.25	73.5	Resistant ^c	87% aa 10% so 3% so/aa
15	23/10/81	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Young	187	0.014	0.060	0.05	4.3	71.1	Resistant ^c	87% aa 13% so
16	24/10/81	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Young	434	0.019	0.035	0.05	1.8	70.5	Resistant ^c	87% aa 13% so
17	27/10/81	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Mature	215	0.15	1.3	0.5	8.7	61.7	Resistant ^c	88% aa 12% so
18	28/10/81	Kravasso (N'Zi)	3	Mature	215	0.12	0.30	>0.25	2.5	48.5	Resistant ^c	100% so
19	28/10/81	Tiassale (Bandama)	1	Young	88	-	-	>0.0125	-	50.0	Resistant ^c	80% aa 20% da
20	28/10/81	Tiassale (Bandama)	1	Mature	46	-	-	>0.125	-	82.7	Resistant ^c	80% aa 20% da
21	28/10/81	Chutes Gauthier (Bandama)	2	Young	120	0.016	0.03	>0.025	1.9	72.7	Resistant ^c	100% aa
22	15/12/81	Kongasso (Marahoué)	6	Young	115	-	-	>0.0125	-	7.8	Resistant ^c	86% so 10% da 4% so/aa
23	16/12/81	Hermis (Marahoué)	7	Mature	570	0.047	0.14	0.125	3.0	0	Resistant ^c	100% so
24	6/1/82	Latokaha (Bandama Blanc)	9	Mature	572	0.08	0.70	0.25	8.8	26.6	Resistant ^c	100% so
25	6/1/82	Latokaha (Bandama Blanc)	9	Young	26	-	-	>0.0125	-	4	Resistant ^c	100% so

^a 0.0125 mg/l for young larvae and 0.125 mg/l for mature larvae.

^b aa = *Simulium sanctipauli*; so = *S. soubrense*; da = *S. damnosum* s.str.; si = *S. sirbanum*.

^c Resistant to temephos also.

^d Laboratory-reared larvae.

TABLE 2. SUSCEPTIBILITY TESTS WITH CHLORPHOXIM OUTSIDE OF THE BANDAMA BASIN
(chronologically arranged)

No.	Date	Site and river	Map code	Age of larvae	No. of larvae	LC ₅₀ (mg/l)	LC ₉₅ (mg/l)	Upper limit LC ₁₀₀ (mg/l)	Ratio LC ₅₀ /LC ₉₅	% survival at diagnostic dose ^a	Conclusion	Cytotaxonomic ^b identification
1	10/11/81	Bétié (Comod)	11	Matura	370	0.03	0.19	>0.25	6.3	10.8	Resistant ^c	100% so
2	17/11/81	Akakro (Agwegby)	10	Matura	671	0.014	0.03	0.0625	2.1	0	Normal	100% sq
3	29/11/81	Amouakoukro (Comod)	13	Mature	418	0.074	0.21	0.5	3.5	24.4	Resistant ^c	100% so
4	30/11/81	Amiakouassikro (Comod)	12	Mature	615	-	0.15	0.5	-	9.1	Resistant ^c	100% so
5	30/11/81	Amiakouassikro (Comod)	12	Young	194	-	-	>0.0125	-	28.8	Resistant ^c	100% so
6	1/12/81	Amiakouassikro (Comod)	12	Matura	609	0.065	0.26	0.5	4.0	20.2	Resistant ^c	100% so
7	17/12/81	Bac Samien (Sassandra)	22	Young	188	-	-	>0.0125	-	4.3	Resistant ^c	100% so
8	17/12/81	Sarakro (Comod)	14	Matura	652	0.039	0.13	0.5	3.3	5.3	Resistant ^c	100% so
9	17/12/81	Sarakro (Comod)	14	Young	69	-	-	>0.0125	-	5.8	Resistant ^c	100% so
10	9/1/82	Bui Black Volta	15	Matura	102	-	-	0.125	-	0	Normal ^c	100% so
11	13/1/82	Soubré Sassandra	24	Mature	196	-	-	0.125	-	0	Normal	79% so 18% so/so 3% da
12	15/1/82	Zobo N'Zo	23	Mature	71	-	-	0.125	-	0	Normal	100% yah
13	19/1/82	Tjohoronidougou Boa	17	Mature	14	-	-	>0.125	-	17	Resistant ^c	69% so 23% yah 8% da
14	20/1/82	Borotou Bagbe	20	Mature	376	0.11	0.26	0.5	2.4	34.1	Resistant ^c	100% so
15	20/1/82	Borotou Bagbe	20	Young	54	-	-	>0.0125	-	44.5	Resistant ^c	100% so
16	21/1/82	No. 1 Bafing	21	Young	99	-	-	>0.0125	-	15.6	Resistant ^c	100% so
17	21/1/82	No. 1 Bafing	21	Mature	51	-	-	>0.125	-	100	Resistant ^c	100% so
18	22/1/82	No. 1 Tyenba	18	Young	34	-	-	>0.0125	-	3.7	Resistant ^c	41% so 50% da 9% si
19	22/1/82	No. 1 Tyenba	18	Mature	113	-	-	>0.125	-	1.0	Resistant ^c	41% so 50% da 9% si
20	22/1/82	Banandougou Bagbe	19	Matura	118	-	-	>0.125	-	1.5	Resistant ^c	84% so 8% so 8% so/so
21	26/1/82	Crachan Léfraba	16	Young	219	-	-	>0.0125	-	4.1	Resistant ^c	100% so
22	26/1/82	Crachan Léfraba	16	Matura	120	-	-	>0.125	-	2.0	Resistant ^c	100% so

^a 0.0125 mg/l for young larvae and 0.125 mg/l for mature larvae.

^b sa = *Simulium sanctipauli*; so = *S. soubrense*; sq = *S. squamosum*; da = *S. damosum* a.str.; yah = *S. yshense*; si = *S. sirbanum*.

^c Resistant to temephos also.

TABLE 3. SUSCEPTIBILITY TESTS WITH CHLORPHOXIM ON NON-RESISTANT MATURE LARVAE OUTSIDE OF THE BANDAMA BASIN

No.	Date	Site, river and country	No. of larvae	LC ₅₀	LC ₉₅	Upper limit LC ₁₀₀	Ratio LC ₉₅ /LC ₅₀	Cytotaxonomic identification
1	23/9/81	Yabo, Volta Blanche, Upper Volta	409	0.0076 mg/l	0.015 mg/l	0.03125 mg/l	1.97	100% <u>S. sirbanum</u>
2	17/10/81	Akakro, Agnegby, Ivory Coast	671	0.014 mg/l	0.03 mg/l	0.0625 mg/l	2.14	100% <u>S. squamosum</u>

TABLE 4. STATISTICAL ANALYSIS OF LOG DOSE - PROBIT MORTALITY LINES

Fig.	Line	Site and date	Slope	Standard error of slope	Chi ² (n =)	P =	LC ₅₀ (95% confidence interval)	LC ₉₅ (95% confidence interval)
1	1	Chutes Gauthier 20/1/77	3.15	0.421	1.13 (2)	0.568	0.0015 (0.0012-0.0018)	0.0051 (0.0040-0.0075)
1	2	Chutes Gauthier 21/1/77	4.01	0.348	0.066 (1)	0.797	0.0016 (0.0015-0.0018)	0.0042 (0.0036-0.0050)
1	5	Danangoro 15/9/80	4.71	0.395	3.12 (1)	0.08	0.0023 (0.0021-0.0025)	0.0051 (0.0044-0.0061)
1	8	Chutes Gauthier 4/2/81	6.37	two	data	points	0.0011	0.0019
1	15	Chutes Gauthier 23/10/81	2.63	0.417	5.32 (2)	0.07	0.014 (0.011-0.019)	0.060 (0.038-0.13)
1	16	Chutes Gauthier 24/10/81	6.46	0.81	1.39 (1)	0.24	0.019 (0.018-0.021)	0.035 (0.031-0.043)
2	12	Asserekro 7/10/81	4.033	0.248	11.267 (3)	0.01	0.014 (0.010-0.016)	0.035 (0.027-0.060)
2	14	Chutes Gauthier 21/10/81	4.63	0.427	6.85 (1)	0.009	0.16 ^a	0.36 ^a
2	17	Chutes Gauthier 27/10/81	1.73	0.579	0.52 (2)	0.77	0.15 (0.12-0.19)	1.3 (0.75-3.4)
2	23	Mermis 16/12/81	3.56	0.281	0.357 (1)	0.55	0.047 (0.042-0.053)	0.136 (0.108-0.189)
2	24	Latokaha 6/1/82	1.76	0.568	9.51 (2)	<0.01	0.081 ^a	0.70 ^a

^a Heterogeneity does not permit calculation.

FIG.1 DOSE - MORTALITY CURVES FOR SUSCEPTIBILITY TESTS WITH CHLORPHOXIM IN THE BANDAMA BASIN 1977 TO 1981 (YOUNG LARVAE OF SIMULIUM DAMNOSUM S. L.)

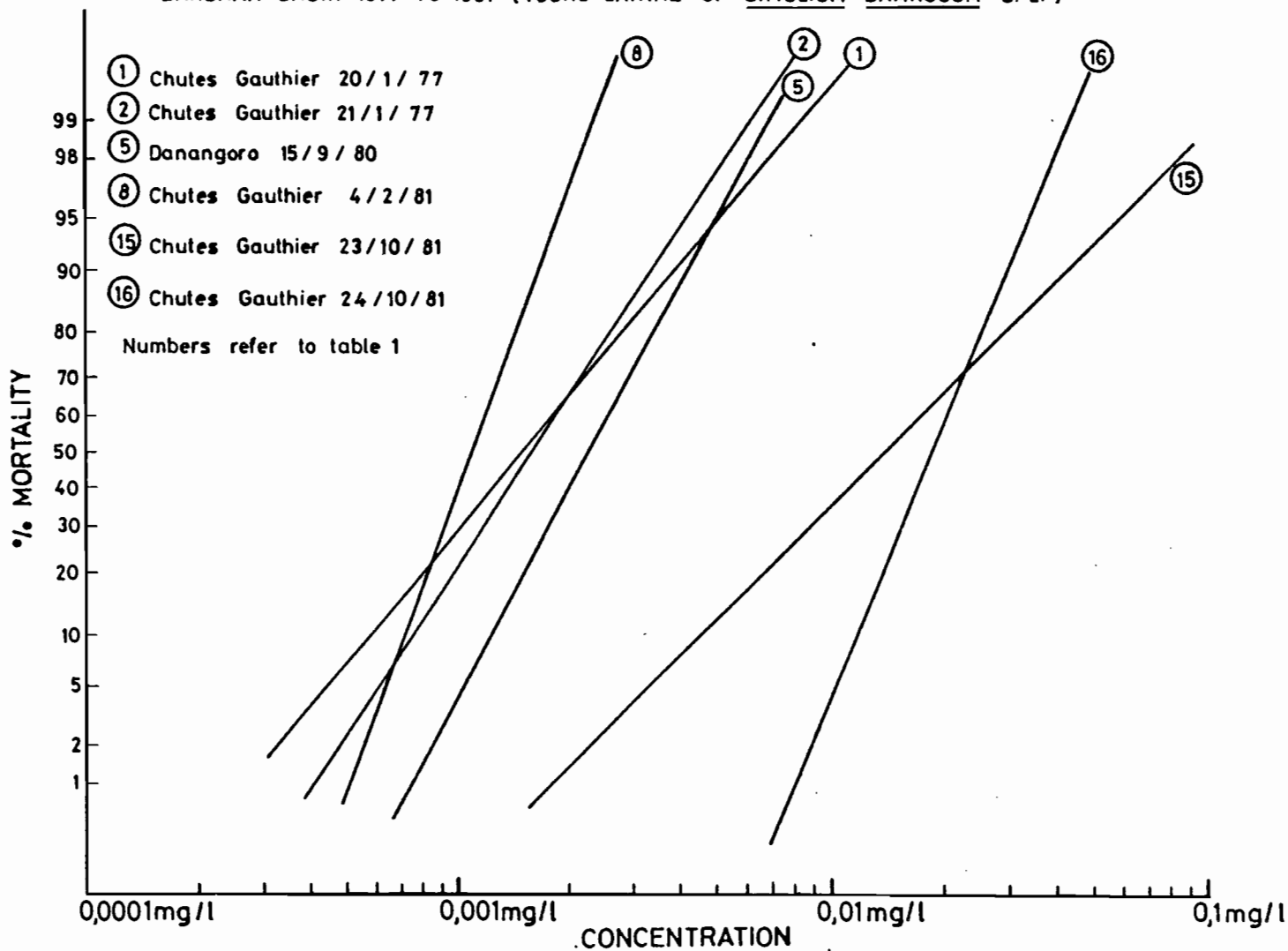


FIG. 2 DOSE - MORTALITY CURVES FOR SUSCEPTIBILITY TESTS WITH CHLORPHOXIM IN THE BANDAMA BASIN (MATURE LARVAE OF SIMULIUM DAMNOSUM S.L.)

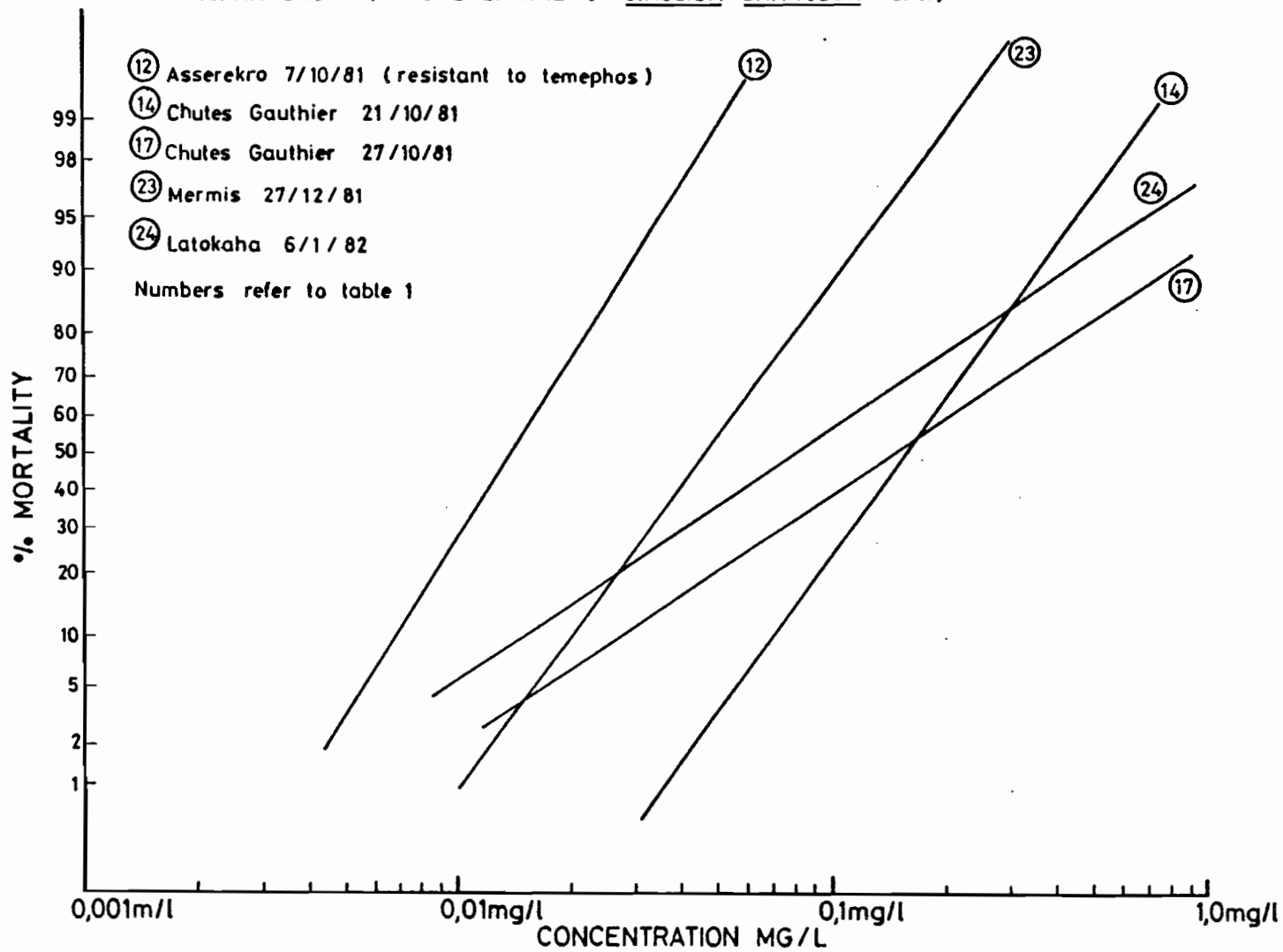


FIG. 3 DOSE - MORTALITY CURVES FOR SUSCEPTIBILITY TESTS WITH CHLORPHOXIM AND NORMAL, MATURE LARVAE OF SIMULIUM DAMNOSUM S. L.

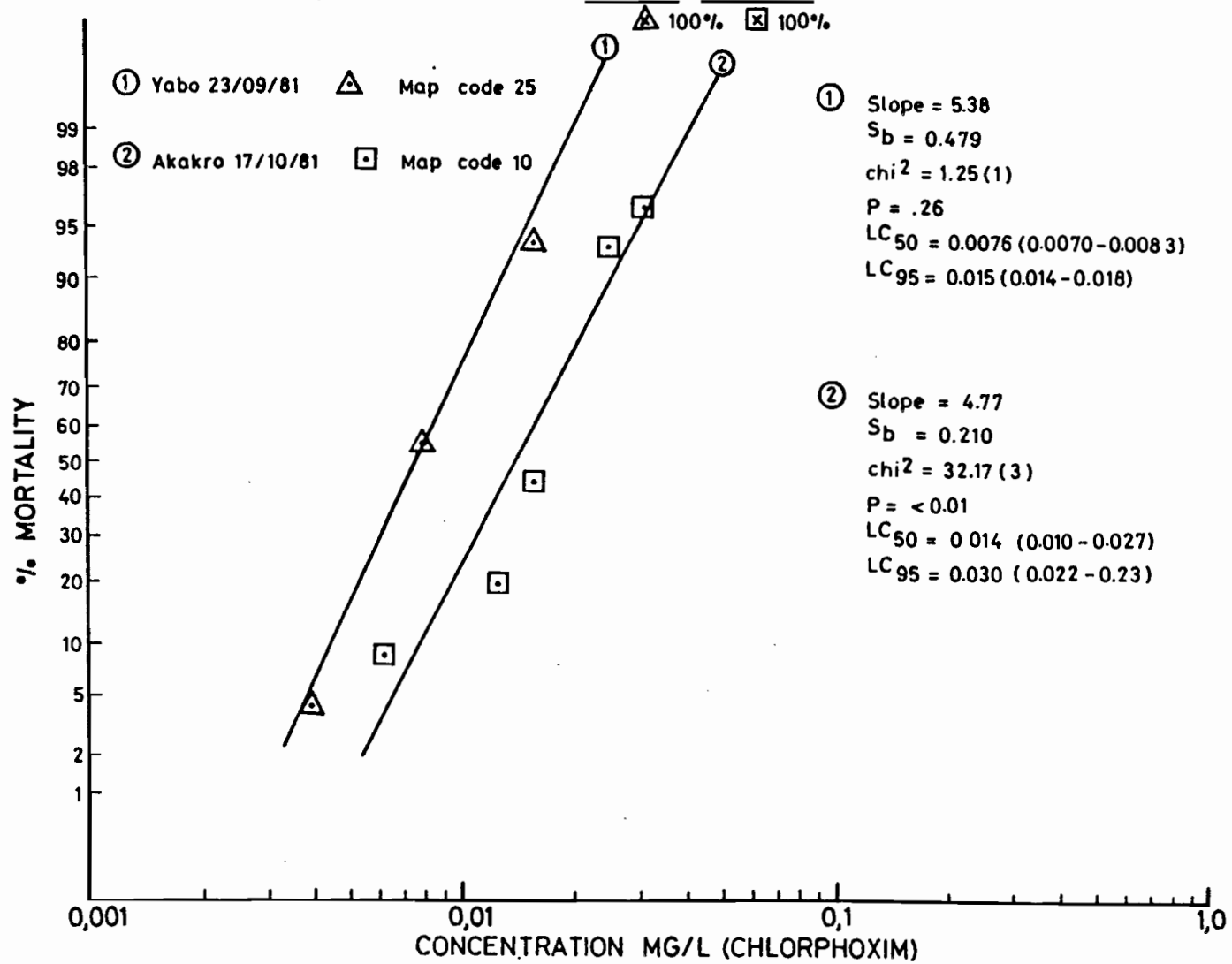
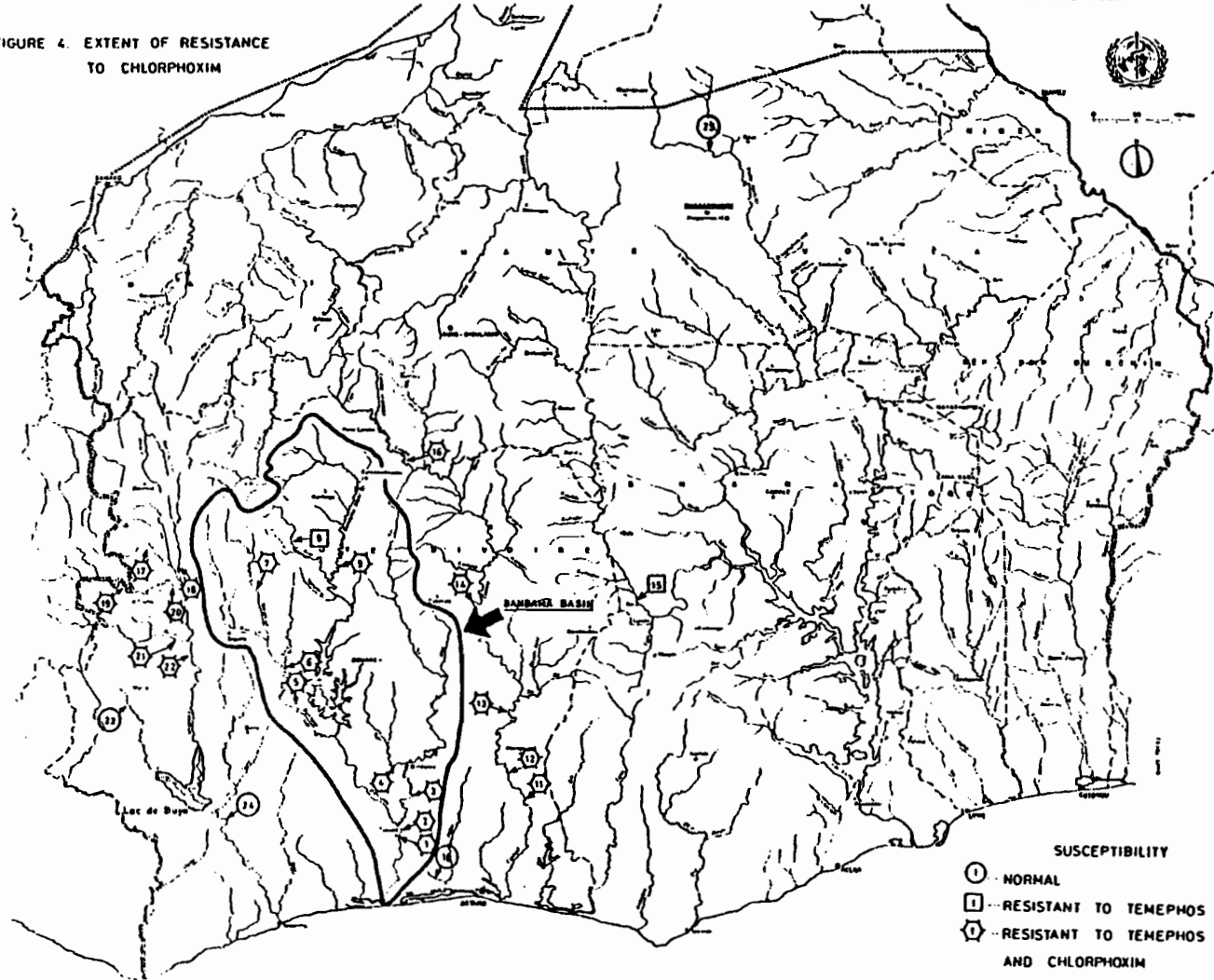


FIGURE 4. EXTENT OF RESISTANCE TO CHLORPHOXIM



6

CROSS-RESISTANCE TO CHLORPYRIFOS-METHYL AND PIRIMIPHOS-METHYL
IN THE LARVAL POPULATIONS OF THE *Simulium damnosum* COMPLEX
ALREADY RESISTANT TO TEMEPHOS IN WEST AFRICA
AND ITS OPERATIONAL SIGNIFICANCE.

CROSS-RESISTANCE TO CHLORPYRIFOS-METHYL AND PIRIMIPHOS-METHYL
IN THE LARVAL POPULATIONS OF THE *Simulium damnosum* COMPLEX
ALREADY RESISTANT TO TEMEPHOS IN WEST AFRICA AND ITS OPERATIONAL SIGNIFICANCE.*

Pierre GUILLET **

Daniel KURTAK ***

INTRODUCTION

When the Onchocerciasis Control Programme (OCP) started in West Africa in 1974, the only insecticide used for operational larvicide treatments was temephos (OMS 786 - Abate [®], an organophosphorus compound (O.P.)). OCP bases its strategy for reduction of onchocerciasis on the reduction of populations of the vectors belonging to the *Simulium damnosum* complex, through larviciding (DAVIES *et al.*, 1978, WALSH *et al.*, 1979).

Though temephos was shown to be a very safe and effective insecticide, the risk of resistance developing under intense selection pressure (weekly treatments) was high. Consequently, at a very early stage, a screening programme was implemented in order to select one or more alternative larvicides. Most of the new compounds tested in this programme were O.P. compounds. Among these, chlorpyrifos-methyl (OMS 1155) and pirimiphos-methyl (OMS 1424) represented about 70 % of the new experimental formulations produced by industry and tested against *S. damnosum* complex larvae (GUILLET and ESCAFFRE, 1979). Chlorphoxim (OMS 1197), another O.P. compound, already selected (LE BERRE *et al.*, 1976, QUILLEVERE *et al.*, 1976, PHILIPPON *et al.*, 1976) was tested in a large scale field trial in the OCP and proved to be as effective as temephos but, apparently, more toxic against non target organisms.

In 1980, a resistance to temephos was detected in two species of the *S. damnosum* complex : *S. soubrense* and *S. sanctipauli* Vajime et Dunbar 1975, breeding in large rivers of the forest area (GUILLET *et al.*, 1980).

* This work was funded by the World Health Organisation.

** ORSTOM / SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE

*** WHO Onchocerciasis Control Programme - BP 549 - OUAGADOUGOU - BURKINA FASO
(ex UPPER VOLTA)

This resistance immediately led to a complete failure of operational treatments in the concerned area, even with increase dosages. It rapidly spread to include most of the area of distribution of those two species in Ivory Coast.

Chlorphoxim was used as an alternative larvicide. Very rapidly, populations which were initially susceptible when resistance to temephos was pointed out, developed a resistance to this compound (KURTAK *et al.*, 1982). This resistance was also first detected at the same place where resistance to temephos was first found. In early 1982, when experiments reported in this paper were carried out, a very high and fairly stable level of resistance to temephos was established in Ivory Coast even in places where treatments with temephos stopped soon after resistance was detected. On the contrary, the resistance to chlorphoxim was unstable, and had reverted in some areas where *Bacillus thuringiensis* H14 has been used.

In so far, as most of the other possible alternative larvicides belonged to the O.P. group, it was urgent to carry out susceptibility tests in order to detect eventual cross-resistance phenomenon. First series of tests were carried out with chlorpyrifos-methyl (C.P.M.) and pirimiphos-methyl (P.I.M.) by far the most promising of the compounds already tested.

Synergists have been commonly associated with insecticides used against agricultural pests as well as in vector control in order to prevent the development of resistance or to minimize its effects. Preliminary investigations were carried out with two usual synergists : piperonyl-butoxide (P.B.) a multifunction oxydases (M.F.O.) inhibitor, and tributyl-phosphorotrithioate (D.E.F. [®]) an hydrolytic esterases inhibitor. These investigations were carried out to provide some informations on the type of enzymes involved in this resistance and also to investigate the possible extension of temephos usefulness by adding appropriate synergists to the formulation.

The evaluation of resistance was exclusively based on susceptibility tests performed with larvae. The filter paper test, a simple technique used for rapid determination of phenotypes with high esterase activity in organophosphate resistant mosquitoes (PASTEUR and GEORGHIOU, 1981), was attempted. Such tests, if applicable to *S. damnosum* s.l. could simplify

the detection of resistance in larval populations and also allow to trace resistant adults and evaluate their distribution and migrations.

MATERIAL AND METHODS.

Cross-resistance tests.

The larval susceptibility tests were performed with the MOUCHET's method (MOUCHET *et al.*, 1977) which is accepted by the World Health Organisation for the determination of blackfly larvae susceptibility to insecticides (W.H.O., 1980). The use of young larvae (4th and 5th instar) was originally recommended but only mature larvae (7th instar) were used in this study. Each group can be routinely used and provides reliable data (KURTAK *et al.*, *loc. cit.*) but mature larvae are more easy to select and to handle. They are about 8 to 10 times less susceptible to temephos than young larvae. Consequently, data must be compared only in the same age group. The procedure in testing for cross-resistance is to run susceptibility tests with both normal and resistant strains of *S. soubrense/sanctipauli* and to look for differences in the characteristic values (LC 50 and especially LC 95), the upper limit of the LC 100 and finally the LC 95/LC 50 ratio. When R/S ratio cannot be calculated with *S. soubrense/sanctipauli* from untreated areas, it is acceptable to use another forest species : *S. yahense* (VAJIME and DUNBAR, *loc. cit.*) which presents the same level of susceptibility to insecticides.

Effect of synergists.

P.B. and D.E.F. (technical material) in alcoholic solution were added at the same time as the insecticide and for the same duration. The toxic effect of synergists alone was first investigated then concentrations from 0.5 to 1.0 mg/l were used, giving no more than 5 to 10 % mortality. Tests were performed with both susceptible (S.-) and resistant (R.-) populations. Experimental formulations of Abate (American Cyanamid Company) with 20 % P.B. or D.E.F. added, were also tested, using a mini-gutter system (exposure period : 10 mn, post-exposure period : 24 h). In susceptibility as well as mini-gutter tests, 4 replicates are usually used for each concentration tested.

Filter paper test for colorimetric detection of esterases. The method used was exactly the one described by PASTEUR and GEORGHIOU (*loc. cit.*). Both mature larvae and adults (24 h old, emerged from pupae) were used, fresh or temporarily stored in deep-freeze or liquid nitrogen. Limited trials were carried out in a specialized laboratory of ORSTOM (Adiopodoumé - Abidjan) using starch gel electrophoresis technique as described in DE STORDEUR (1976).

Only individuals never exposed to temephos or chlorphoxim were used, collected at Chutes Gauthier (Lower Bandama), resistant *S. soubrense/sanctipauli*, and at Akakro (Agnébi river) susceptible *S. yahense*.

RESULTS.

The larvae of *S. soubrense/sanctipauli* already resistant to temephos and chlorphoxim show a significant level of cross-resistance to chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl.

Cross-resistance to C.P.M. was found in the four prospected localities, and R/S ratio at LC 95 level varies from 7.6 to 36.8 (table 1). The level of cross-resistance to P.I.M. (table 2) may be lower (2.5 to 29.8) but is always significant. In one locality on the Upper Bandama (Latokaha), larvae do not show cross-resistance to P.I.M. although cross-resistance to C.P.M. was evident. At time where tests were carried out in these localities, 30 to 50 % larvae of susceptible savannah species were present.

The adjunction of P.B. has a negative effect on the toxicity of temephos (35.1 % mortality versus 49.5 % expected) and chlorphoxim (46.9 % versus 61.4 % expected) (table 3). This negative synergism occurs in S.- as well as in R.-populations.

D.E.F. has a very significant synergistic effect on R.-populations with temephos and chlorphoxim (table 3 and 4) and also with P.I.M. and C.P.M. (table 5). Temephos + D.E.F. on a R.-population is 3 times more effective than temephos alone. On a S.-population, D.E.F. has no effect on

toxicity of temephos and only a slight effect on toxicity of chlorphoxim.

The preliminary informations are confirmed by mini-gutter tests with formulated mixtures (table 6). On a S.-population, Abate (200 g/l temephos emulsifiable concentrate) with P.B. is 2 times less effective than Abate alone, but the adjunction of D.E.F. does not change its efficacy. On a R.-population* P.B. still shows a negative effect and D.E.F. a significant synergism as expected. When Abate alone gives 66.2 % mortality, Abate + D.E.F. gives 92.9 %, but this level of mortality in terms of dosages to be applied, is far below the 99.9 % efficacy required in operational treatments.

The filter paper test performed with mature larvae as well as with adults of the R.-*S. soubrense/sanctipauli* did not allow detection of esterases activity. The spots are faintly stained with R.- as well as S.-individuals. Trials were repeated several times and possible sources of error investigated without success. Similar results were obtained by other investigators (MEREDITH, pers. comm.). With starch gel electrophoresis technique, it was also impossible to differentiate S.- and R.-individuals. On the other hand, this method allows differentiation between *S. yahense* and other species of the *S. damnosum* complex.

DISCUSSION - CONCLUSION.

Chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl can be excluded as replacement larvicide for the treatment of populations already resistant to temephos and chlorphoxim.

The resistance ratio beyond which an insecticide can no longer be used depends on several parameters among which the target, the mode of action and the method of application of the insecticide. In the *S. damnosum* complex, it is now possible to define a threshold in susceptibility parameters beyond which temephos and chlorphoxim are no longer effective enough

* Mixed population with about 60 % R.-species, 40 % S.-species and 11.5 % survival at diagnostic dose of 2.5 mg/l.

to achieve a complete control at realistic dosages. This corresponds to a 4 times increase in the upper limit of the LC 100, 4 to 7 times in the R/S ratio at LC 95 level with 5 to 8 % survival at diagnostic doses (GUILLET *et al.*, *loc. cit.*, KURTAK *et al.*, *loc. cit.*). The R/S ratio at LC 95 level varies from 7 to 37 with C.P.M. and 3 to 30 with P.I.M., so it is clear that these two compounds are useless as replacement insecticides. It should be pointed out that ecological and logistic considerations do not allow increasing the dose to be a solution to resistance in the OCP.

The preliminary results obtained with P.B. indicate that M.F.O. are not involved in the O.P. resistance in the *S. damnosum* complex. On the contrary, the negative correlation noted with both S.- and R.-strains could indicate that M.F.O. may be responsible for some activation of temephos in producing more toxic metabolites (as observed with activation of malathion in malaixon, W.H.O., *loc. cit.*).

The effect of D.E.F. on temephos and chlorphoxim as well as on C.P.M. and P.I.M. R.-strains indicates that hydrolytic esterases are likely to be involved in the resistance mechanism. However adjunction of D.E.F. to the formulation could not extend the usefulness of temephos since dosages required to kill 99.9 % of R.-larvae should still probably be at least 2 to 4 times the usual dosage of temephos against susceptible populations, even with a strong concentration of D.E.F.. Moreover, D.E.F. is a defoliant with a very high mammalian toxicity, the use of which cannot be envisaged due to hazard for man, non target organisms and irrigated cultures along treated rivers. Further investigations should be carried out with D.E.F. and other synergists for a better understanding of resistance mechanisms.

These observations on the activity of P.B. and D.E.F. correlate with studies by GEORGHIOU *et al.* (1975) on an organophosphorus multiresistant strain of *Culex quinquefasciatus* from California.

The filter paper test allows only detection of resistance associated with gene responsible for high esterases activity. It has been used with O.P. resistant *Culex quinquefasciatus* when high esterases activity is associated with a single gene (PASTEUR and GEORGHIOU, *loc. cit.*). O.P. resistance in the *S. damnosum* complex is at least partly dependant on esterases because it is suppressed by D.E.F. but the close association bet-

ween O.P. resistance and a strongly staining esterase as described in *C. quinquefasciatus* (GEORGHIOU *et al.*, 1980) do not apparently exist in *Simulium*, making filter paper test unapplicable.

Moreover, resistance may also be due to glutathione-S-alkyltransferases (G.S.A.T.) (DAUTERMAN, 1980) which are also inhibited by D.E.F. (RANASINGHE and GEORGHIOU, 1979) and appear to be strongly implicated in the development of resistance in mosquitoes (W.H.O., *loc. cit.*).

Subsequent laboratory studies with *S. damnosum* complex larvae confirmed that enzymes associated with O.P. resistance failed to be electrophoretically discernible. Further investigations should be needed on this topic but the filter paper test is attractive only for an easy field detection of R.-larvae as well as adults. The routine use of more sophisticated laboratory techniques should not be of real practical interest in West Africa.

The MOUCHET's test is well adapted for detection and quantitative evaluation of cross-resistance phenomena.

Genetic studies on O.P. resistance in *S. soubrense/sanctipauli* cannot be carried out as long as it will remain impossible to colonize these species and to cross R.- and S.-individuals. However, this is not a severe drawback from practical point of view because most of the studies carried out on resistance in the laboratory (development of resistance and cross-resistance, stability of resistance and sequential pressure with different insecticides) have so far very limited predictive value regarding evolution of resistance in the field and cannot provide reliable guidance for strategy of use of insecticides in vector control programmes.

The cross-resistance to C.P.M. and P.I.M. has reached a so high level that it is realistic to think that cross-resistance phenomena are likely to exist with most of O.P. compounds. This situation limits drastically the number of alternative insecticides which must be searched in other groups.

Organochlorine compounds (O.C.) do not offer favourable prospects because a strong resistance to D.D.T. has already been recorded in the

S. damnosum complex (GUILLET *et al.*, 1977). This resistance probably induced by agricultural use of D.D.T. is unstable, but the use of biodegradable O.C. compounds, if available, should probably led to a rapid development of resistance. Carbamates are usually compounds with moderate to low larvicidal activity.

Stable pyrethroids like permethrine (OMS 1821) and deltamethrine (OMS 1998) have a very high larvicidal activity. However, they offer limited prospects because they are usually more toxic for fishes and non target organisms than other insecticides. Furthermore, resistance to pyrethroids already recorded in mosquitoes (*Anopheles stephensi* and *An. arabiensis*, W.H.O., *loc. cit.*) and commonly in houseflies (KEIDING, 1976) is due to an unspecific Kdr gene which is recessive but confers, when homozygous, a high level of resistance to pyrethroids. On the other hand, cross-resistance between D.D.T. and pyrethroids has already be mentionned in mosquitoes (PRIESTER *et al.*, 1981, PRASITTISUK and BUSVINE, 1977). The D.D.T. resistance may also be due essentially to the Kdr gene, for example in the danish houseflies (KEIDING, *loc. cit.*). If this gene is also involved in D.D.T. resistance in the *S. damnosum* complex, which could explain apparent unstability of this resistance, the resistance to pyrethroids is likely to develop if a compound of this family is regularly used. Moreover, pyrethroids are more and more widely used in cotton protection and this massive use, like with D.D.T. could induce reduced susceptibility to pyrethroids in *Simulium*, whatever they are used or not in the onchocerciasis control.

New alternative larvicides must be sought in groups like insect growth regulators, or other new groups of insecticides. *Bacillus thuringiensis* H14 has been developed for the treatment of R. -populations (GUILLET *et al.*, 1982, LACEY *et al.*, 1982) and is now routinely used. This biocontrol agent could be by far the most promising replacement larvicide if existing formulations can be significantly improved. On going accelerated screening programmes for chemical larvicides as well as *B. thuringiensis* H14 formulations are on the verge of solving problems associated with O.P. resistance in onchocerciasis control.

RESUME

Les larves de *S. soubrense* et *S. sanctipauli*, déjà résistantes au téméphos et au chlorphoxim, présentent une résistance croisée au chlorpyrifos-méthyl et au pirimiphos-méthyl. L'utilisation de ces deux insecticides, qui représentaient pourtant les alternatifs les plus prometteurs du téméphos, ne peut plus être envisagée. Le fort taux de résistance croisée observé permet de penser qu'une résistance croisée doit exister avec la plupart des composés organo-phosphorés.

Des études préliminaires sur l'action des synergistes ont été entreprises. La résistance peut être réduite en utilisant du D.E.F., un inhibiteur d'estérases. Cependant, son utilisation pratique ne peut être envisagée pour prolonger l'action du téméphos lorsque se développe une résistance aux insecticides organo-phosphorés. Les estérases associées à cette résistance n'ont pu être détectées par électrophorèse ou avec la technique simple du papier filtre.

Les nouveaux insecticides de remplacement doivent de préférence être recherchés au sein de nouveaux groupes de composés comme les régulateurs de croissance ou les agents de lutte biologique tels que le *Bacillus thuringiensis* H14.

SUMMARY

Larvae of *S. soubrense* and *S. sanctipauli*, already resistant to temephos and chlorphoxim, show significant cross-resistance to chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl. These two insecticides, which were the most promising among the possible alternative to temephos, can be now regarded as useless as replacement larvicides. This cross-resistance is likely to occur with most of the organophosphate compounds.

Preliminary studies were carried out with synergists. Resistance can be reduced using D.E.F., an esterase inhibitor. However, the use of D.E.F. cannot be envisaged to extend the operational usefulness of temephos. Esterases associated with organophosphate resistance could not be reliably detected by electrophoresis or by the filter paper test technique.

New alternative compounds must be found in new groups of insecticides such as insect growth regulators or biological agents such as *Bacillus thuringiensis* H14.

	Locality and (river)	Lc 50	Lc 95	Lc 95/Lc 50	Upper limit of Lc 100	Resistance Lc 50	ratio R/S Lc 95
Susceptible to temephos	Tetetou (Mono, Togo)	0.016	0.038	2.4	0.0625		
Resistant to temephos	Chutes Gauthier (Lower Bandama)	0.18	1.4	7.8	0.75	11.3	36.8
	Latokaha (Upper Bandama)	0.06	0.29	4.8	> 0.5	3.8	7.6
	Niakaramandougou (Upper Bandama)	0.15	0.62	4.1	0.5	9.4	16.3
	Asserekro (Kan)	0.23	1.3	5.7	> 0.125	14.4	34.2

TABLE 1 : cross-resistance of S. soubrense/sanctipauli to chlorpyrifos-methyl (OMS 1155)

	Locality and (river)	Lc 50	Lc 95	Lc 95/Lc 50	Upper limit of Lc 100	Resistance Lc 50	ratio R/S Lc 95
Susceptible to temephos	Tetetou (Mono, Togo)	0.037	0.084	2.3	> 0.0625		
Resistant to temephos	Chutes Gauthier (Lower Bandama)	0.49	2.5	5.1	> 1.0	13.2	29.8
	Latakaha (Upper Bandama)	0.025	0.08	3.2	0.25	0.68	0.95
	Njakaramandougou (Upper Bandama)	0.061	0.21	3.5	0.25	1.7	2.5
	N'golodougou (Bagbé)	0.15	1.7	11.3	> 0.5	4.1	20.2

TABLE 2 : cross-resistance of S. soubrense/sanctipauli to pirimiphos-methyl (OMS 1424)

	Insecticide	% larval mortality
Susceptible	Temephos 0.05 mg/l	44.3 %
	Chlorphoxim 0.05	56.5
	P.B. 0.5	9.8
	D.E.F. 0.5	11.2
	Temephos + P.B.	35.1
	Temephos + D.E.F.	52.6
	Chlorphoxim + P.B.	46.9
	Chlorphoxim + D.E.F.	69.6
Resistant	Chlorphoxim 0.0625	18
	D.E.F. 0.3	8.4
	Chlorphoxim + D.E.F.	76.2
	Temephos 1.0	26.2
	P.B. 1.0	9.7
	D.E.F. 1.0	7.8
	Temephos + P.B.	15.1
	Temephos + D.E.F.	94.8

TABLE 3 - Synergistic effect of piperonyl-butoxide (P.B.) and D.E.F. on toxicity of temephos and chlorphoxim against susceptible and resistant *Simulium damnosum* complex larvae.

	Chlorphoxim alone	Chlorphoxim + D.E.F. (1/5)
LC 50	0.109 (0.118 - 0.100)	0.046 (0.042 - 0.050)
LC 95	0.24 (0.21 - 0.27)	0.107 (0.093 - 0.128)

TABLE 4 - Effect of D.E.F. on toxicity of chlorphoxim to larvae resistant to chlorphoxim and temephos
(D.E.F. is used at a constant ratio of 5x chlorphoxim)

Insecticide	% larval mortality
OMS 1424 0.0625 mg/l	32.6 %
D.E.F. 0.5 mg/l	6.2 %
OMS 1424 + D.E.F.	73.9 %
OMS 1155 0.0625 mg/l	56.5 %
D.E.F. 0.5 mg/l	4.1 %
OMS 1155 + D.E.F.	92.7 %

TABLE 5 - Synergistic effect of D.E.F. on pirimiphos-methyl (OMS 1424) and chlorpyrifos-methyl (OMS 1155) with resistant larvae.

	Abate EC 20 % temephos	Abate EC 20 % temephos + 20 % P.B.	Abate EC 20 % temephos + 20 % D.E.F.
Susceptible	79.9 % (199)	40.4 % (235)	80.6 % (258)
Resistant	66.2 % (346)	54.7 % (338)	92.9 % (225)

TABLE 6 - Effect of synergists on the efficacy of temephos formulations.
Larval mortality (mature larvae) at 0.8 mg/l during 10 mn and
(number of larvae tested)
- mini-gutter test, reading after 24 h -

BIBLIOGRAPHY

- DAUTERMAN, W. : Role of hydrolases and glutathione transferases in insecticide resistance. In : Pest resistance to pesticides : challenges and prospects, New York (GEORGHIU, G.P. and SAITO, T., ed.)
Plenum Press. 1980.
- DAVIES, J.B., LE BERRE, R., WALSH, J.F. and CLIFF, B. : Onchocerciasis and Simulium control in the Volta River Basin area.
Mosq. News, 38, 1978.466-472.
- GEORGHIU, G.P., ARIATNAM, V., PASTERNAK, M.E. and LIN, C.S. : Organophosphate multiresistance in Culex pipiens quinquefasciatus in California.
J. Econ. Entomol., 68, 1975.461-467.
- GEORGHIU, G.P., PASTEUR, N. and HAWLEY, M.K. : Linkage relationships between organophosphate resistance and a highly active esterase-B in Culex quinquefasciatus from California.
J. Econ. Entomol., 73, 2, 1980.301-305.
- GUILLET, P., MOUCHET, J. and GREBAUT, S. : D.D.T. resistance in Simulium damnosum s.l. (Diptera : Simuliidae) in West Africa.
WHO. Mjm. Doc., WHO/VBC/77.678.
- GUILLET, P. and ESCAFFRE, H. : La recherche de nouvelles formulations d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs de l'Onchocercose en Afrique de l'Ouest.
Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical, Marseille, 13-16 Mars 1979. II, 1169-1178.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., OUEDRAOGO, M. and QUILLEVERE, D. : Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe Simulium damnosum (S. sanctipauli et S. soubrense) en Côte d'Ivoire (zone du programme de lutte contre l'Onchocercose dans la région du bassin de la Volta).
Cah. ORSTOM, sér. Entomol. Méd. Parasitol., 18, 3, 1980. 291-299.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H. and PRUD'HOM, J.M. : L'utilisation d'une formulation à base de Bacillus thuringiensis H 14 dans la lutte contre l'Onchocercose. I. Efficacité et modalités d'application.
Cah. ORSTOM, sér. Entomol. Méd. Parasitol., 20, 3, 1982. 175-180.
- KEIDING, J. : Development of resistance to pyrethroids in field populations of danish houseflies.
Pest. Sci., 7, 1976. 283-291.
- KURTAK, D.C., OUEDRAOGO, M., OCRAN, M., BARRO TELE and GUILLET, P. : Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in Simulium soubrense/sanctipauli larvae already resistant to temephos (Abate®).
WHO. Mjm. Doc., WHO/VBC/82.850.

.../...

- LACEY, L.A., ESCAFFRE, H., PHILIPPON, B., SEKETELI, A. and GUILLET, P. :
Large river treatment with Bacillus thuringiensis H 14 for the
control of Simulium damnosum s.l. in the onchocerciasis control
programme.
Tropenmed. Parasitol., 33, 1982.97-101.
- LE BERRE, R. et al. : Control of Simulium damnosum, vector of human
onchocerciasis in West Africa. II. Conventional treatment trials
of new insecticides and new formulations.
WHO. Mm. Doc., WHO/VBC/76.615.
- MOUCHET, J. et al. : Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides
des larves de Simulium damnosum.
Cah. ORSTOM, sér. Entomol. Méd. Parasitol., 15, 1,1977. 55-56.
- PASTEUR, N. and GEORGHIOU, G.P. : Filter paper test for rapid determination
of phenotypes with high esterase activity in organo-
phosphate resistant mosquitoes.
Mosq. News, 41, 1,1981. 181-183.
- PHILIPPON, B. et al. : Control of Simulium damnosum, vector of human
onchocerciasis in West Africa. VI. Spraying of new insecticide
formulations by helicopter in the rainy season in the Guinea
type Savanna zone.
WHO. Mm. Doc., WHO/VBC/76.619.
- PRASITTISUK, C. and BUSVINE, J.R. : D.D.T. resistant mosquito strains
with cross-resistance to pyrethroids.
Pest. Sci., 8, 5,1977. 527-533.
- PRIESTER, T.M., GEORGHIOU, G.P., HAWLEY, M.K. and PASTERNAK, M.E. :
Toxicity of pyrethroids to organophosphate-carbamate and D.D.T.
resistant mosquitoes.
Mosq. News, 41, 1,1981. 143-150.
- QUILLEVERE, D. et al. : Control of Simulium damnosum, vector of human
onchocerciasis in West Africa. IV. Evaluation by helicopter of
new formulations and simulation of an insecticide operation.
WHO. Mm. Doc., WHO/VBC/76.617.
- RANASINGHE, L.E. and GEORGHIOU, G.P. : Comparative modification of insecticide-
resistance spectrum of Culex pipiens fatigans Wied. by
selection with temephos and temephos/synergist combinations.
Pest. Sci., 10, 1979.502-508.
- STORDEUR, E. de : Esterases in mosquito Culex pipiens : formal genetics
and polymorphism of adult esterases.
Biochem. Genet., 14, 1976.481.
- VAJIME, Ch. G. and DUNBAR, R.W. : Chromosomal identification of eight
species of the subgenus Edwardsellum near and including Simulium
(Edwardsellum) damnosum Theobald (Diptera : Simuliidae).
Tropenmed. Parasit., 26, 1,1975. 111-138.

.../...

WALSH, J.F., DAVIES, J.B. and LE BERRE, R. : Entomological aspects of the first five years of the Onchocerciasis Control Programme in the Volta River Basin area.
Tropenmed. Parasit., 30, 1979. 328-344.

W.H.O. : Resistance of vectors of disease to pesticides.
Technical report 1980. series Nb 655.

EVALUATION DES INSECTICIDES REGULATEURS DE CROISSANCE.

7

EVALUATION DE L'ACTIVITE D'UN INSECTICIDE REGULATEUR DE CROISSANCE,

LE DIFLUBENZURON, SUR LES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*.

I - ETUDE DE QUELQUES FACTEURS CONDITIONNANT L'EFFICACITE.

EVALUATION DE L'ACTIVITE D'UN INSECTICIDE REGULATEUR DE CROISSANCE,
LE DIFLUBENZURON, SUR LES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*.

I - ETUDE DE QUELQUES FACTEURS CONDITIONNANT L'EFFICACITE. *

Pierre GUILLET **
Jean Marc HOUGARD ***
Julien DOANNIO ***
Henri ESCAFFRE ***
Jacques DUVAL ***

INTRODUCTION

La lutte contre l'onchocercose humaine en Afrique de l'Ouest est basée exclusivement sur l'utilisation de larvicides appliqués à un rythme hebdomadaire sur de très vastes étendues. Deux espèces vectrices du complexe *Simulium damnosum* ont rapidement développé une résistance au téméphos, l'insecticide utilisé, ainsi qu'un large spectre de résistance croisée à la plupart des insecticides organophosphorés utilisables (GUILLET *et al.*, 1980, KURTAK *et al.*, 1982, GUILLET et KURTAK, 1985).

Cette résistance, survenue chez *S. soubrense* et *S. sanctipauli*, Vajime et Dunbar 1975, deux espèces transmettant une onchocercose de forêt non pathogène pour l'homme, n'a pas eu d'incidence sur la poursuite et le succès du vaste programme de lutte entrepris contre cette endémie depuis 1974 par l'Organisation Mondiale de la Santé. Toutefois, il est clairement apparu qu'en cas de développement d'une résistance au téméphos, il était difficile de sélectionner un insecticide de remplacement utilisable à grande échelle. L'utilisation d'un agent de lutte biologique, le *Bacillus thuringiensis* H14 a permis

* Ce travail a bénéficié, dans le cadre des accords entre l'ORSTOM et l'OCCGE, d'une subvention de l'Organisation Mondiale de la Santé.

** ORSTOM - SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE.

*** Institut Pierre Richet (IRTO) - BP 1500 - BOUAKE - COTE D'IVOIRE.

de poursuivre les opérations de traitement des populations résistantes, mais les performances des formulations actuellement disponibles font que l'utilisation de cet entomopathogène reste onéreuse et pose des problèmes d'application. Des recherches ont été entreprises pour améliorer les performances des formulations de *B. thuringiensis* H14 et pour sélectionner de nouveaux insecticides utilisables en cas de résistance aux composés organophosphorés.

Il n'existe pas encore de formulation efficace parmi les insecticides de la famille des organochlorés ou des carbamates. Les pyréthri-noïdes, bien qu'ils puissent présenter une efficacité remarquable, restent d'un emploi délicat dans les écosystèmes lotiques (DEJOUX et GUILLET, 1980). Les insecticides régulateurs de croissance ne présentent généralement pas de résistance croisée avec les composés appartenant à d'autres familles d'insecticides. Ils sont donc apparus comme étant a priori prometteurs. Ils représentent à eux seuls une partie importante des nouvelles matières actives actuellement développées par l'industrie.

Ces insecticides n'ont généralement pas d'effet immédiat mais agissent à retardement. Leur activité est donc plus difficile à évaluer que celle des insecticides conventionnels à action rapide. Une méthodologie appropriée a dû être mise au point dans le cas des larves du complexe *S. damnosum* (GUILLET *et al.*, 1985). Les premiers essais ont été réalisés avec le diflubenzuron (Dimilin[®]), un régulateur de croissance à large spectre, très efficace contre les larves de moustiques (CL 50 de l'ordre de 0,05 ppb).

Le diflubenzuron est un dérivé de l'urée très peu toxique pour les mammifères. Il n'agit qu'au moment de la mue larvaire ou nymphale en bloquant la formation de la chitine (POST et VINCENT, 1973). Son action ne s'exerce que sur l'endocuticule, il n'a pas d'effet sur l'ecto et l'épicuticule ni sur les cellules de l'épithélium intestinal (MULDER et GIJSWIJFT, 1973). Le diflubenzuron est essentiellement un larvicide actif par ingestion (GROSSCURT, 1976, LACEY et MULLA, 1978, GROSSCURT, 1978). Il n'a pas de toxicité directe pour les adultes mais affecte la progéniture des femelles traitées, qu'il s'agisse de mouches domestiques (GROSSCURT, 1976, *loc. cit.*) ou de glossines (JORDAN *et al.*, 1979).

Cet insecticide a été largement utilisé contre les larves de moustiques notamment dans le cas de résistance aux insecticides organophosphorés (SCHAEFER *et al.*, 1975, MULLA et DARWAZEH, 1975, SELF *et al.*, 1978, SHARMA *et al.*, 1979, AXTELL *et al.*, 1980). Bien qu'il ait un large spectre d'activité sur les insectes, les effets des traitements sur les organismes non-cibles des gîtes à moustiques ont été modérés. Toutefois, certains groupes tels que les éphémères et les crustacés ont été plus touchés (MIURA et TAKASHI, 1975, MULLA *et al.*, 1975, FARLOW *et al.*, 1978, ALI et MULLA, 1978, COLWELL et SCHAEFER, 1978). Il s'est avéré également toxique pour les larves de simulies lors d'essais au laboratoire et sur le terrain (LACEY et MULLA, 1977, 1978 a et b, Mc KAGUE *et al.*, 1978, LACEY et MULLA, 1979, RODRIGUES, 1982). *

La première partie de ce travail porte sur l'étude de quelques facteurs pouvant conditionner l'activité du diflubenzuron vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum*. Les facteurs étudiés ont été successivement :

- le temps de contact : il a été observé qu'avec ce composé, un temps de contact prolongé donnait de meilleurs résultats qu'un contact bref avec une concentration plus élevée (GROSSCURT, 1978 *loc. cit.*, LACEY et MULLA, 1977 *loc. cit.*).

- la concentration : dans la pratique des traitements antismulidiens, il est difficile d'obtenir un temps de contact prolongé entre les larves et l'insecticide. Il était donc intéressant de vérifier dans cette optique, si ce produit utilisé avec un temps de contact court pouvait quand même donner des résultats satisfaisants en augmentant au besoin les doses appliquées.

- le stade larvaire : les larves âgées sont généralement moins sensibles à l'action de ce composé (LACEY et MULLA, 1978 *loc. cit.*). Cela peut représenter un inconvénient éventuel dans le cas des vecteurs de l'onchocercose, dont les larves ont un développement asynchrone.

- le temps de transit intestinal : le temps de transit intestinal chez les larves du complexe *S. damnosum* (2 à 20 mn selon le stade, ELSEN, 1980) est plus court que chez d'autres espèces de simulies telles que *S. vittatum* (MULLA et LACEY, 1976). Ce facteur peut limiter la quantité de produit absorbée au niveau

* Une revue sur l'utilisation des composés régulateurs de croissance en santé publique a été publiée par MIAN et MULLA (1982) *Residue Reviews*, 84, 27-112.

de l'épithélium intestinal et donc diminuer l'activité du diflubenzuron sur les larves du complexe *S. damnosum*.

- la formulation : l'efficacité des larvicides antisimulidiens dépend étroitement de la formulation utilisée (JAMNBACK et MEAN, 1968, GUILLET et ESCAFFRE, 1979). Il pouvait en être de même dans le cas présent.

MATERIEL ET METHODES

La méthode de base utilisée dans cette étude a été celle décrite par GUILLET *et al.* (1985, *loc. cit.*). Pour le contact, les larves ont été fixées sur des plaquettes métalliques disposées dans une gouttière alimentée en circuit fermé avec de l'eau de rivière. Après le traitement, elles ont été placées dans un dispositif de mise en observation. Un système de filets a permis de récolter les adultes viables (capables de voler), les adultes non viables et les larves mortes. Les filets ont été visités plusieurs fois par jour. On a utilisé dans la plupart des cas des larves âgées (stade 7 à plaques thoraciques bien développées). L'observation a été poursuivie jusqu'à ce que dans les lots témoins la totalité des imagos ait émergé des nymphes formées.

Dans les essais réalisés destinés à mettre en évidence l'influence éventuelle du temps de contact ou de la concentration, les larves ont été traitées soit en conservant le produit temps de contact x concentration constant (respectivement 2,5 et 5 pour des temps de contact allant de 5 à 320 mn), soit, pour un temps d'exposition donné (généralement 10 mn), en augmentant les concentrations (0,1 à 4 mg/l). Dans le premier cas la quantité d'insecticide utilisée reste constante, tandis que dans le deuxième cas elle augmente proportionnellement à la concentration.

Dans certains essais, le temps de transit intestinal des larves a été artificiellement accru. Pour ce faire, les plaquettes contenant les larves ont été placées, immédiatement après le contact, dans de l'eau filtrée stagnante pendant 30 et 60 mn. Dans ces conditions, le transit intestinal qui ne progresse que par bourrage a été bloqué (ELOUARD et ELSSEN, 1977) et l'insecticide a séjourné dans le tube digestif des larves plus longtemps que dans les

conditions normales. Les plaquettes ont ensuite été placées dans le dispositif d'observation.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de réduction d'émergence d'adultes viables c'est-à-dire volant dans le filet*. Ce pourcentage a été corrigé par la loi de combinaison des probabilités indépendantes (formule de Abbott). La limite usuelle d'application de 20 % de mortalité dans les lots témoins n'a pas été appliquée. En effet, le dispositif utilisé permet de récupérer souvent 80 % d'adultes viables dans les témoins, mais ce chiffre a parfois été plus faible. Il en va également de même avec les larves de moustiques pourtant beaucoup plus faciles à manipuler.

Chaque dosage ou temps de contact a été testé sur 2 à 4 répétitions par essai. Le présent travail porte sur 4 séries d'essais échelonnés sur presque une année et réalisés dans deux localités en Côte d'Ivoire avec plusieurs espèces du complexe *S. damnosum*.

Les formulations utilisées (Dimilin) ont été fournies par Philips-Duphar. La plupart des tests ont été réalisés avec une poudre mouillable à 25 %. Ce type de formulation a été choisi car les poudres mouillables ne sont pratiquement jamais les formulations les moins efficaces. Cette observation a été vérifiée avec la plupart des insecticides, qu'ils soient chimiques, biologiques comme le *B. thuringiensis* H14, ou régulateurs de croissance. Il aurait été regrettable de pratiquer les premiers essais avec un nouveau type d'insecticide peut-être très performant en utilisant une formulation d'efficacité médiocre.

Trois autres formulations expérimentales ont été testées. Elles ont été introduites directement dans l'eau des gouttières en agitant celle-ci. En effet, le diflubenzuron est très peu soluble et il peut se former dans les solutions trop concentrées (au delà de 50 mg/l) des gros cristaux de matière active qui diminuent généralement l'efficacité du produit (DUPHAR, comm. pers.).

* % de réduction d'émergence = $100 - \frac{\text{nombre d'adultes viables}}{\text{nombre de larves testées}} \times 100$

RESULTATS

Influence du temps de contact

On constate à travers les résultats des trois séries d'essais (tableaux 1 à 4), que d'une manière générale, l'efficacité du diflubenzuron a augmenté avec le temps de contact. Pour une même quantité de produit appliqué, la réduction d'émergence est passée respectivement de 9,6 à 81,9 % et 17,6 à 77,1 % (tableaux 2 et 4) lorsque le temps de contact a augmenté de 10 à 80 mn et de 80 à 320 mn. Il existait entre les séries une variabilité importante dans les résultats obtenus. Il a été nécessaire d'utiliser une concentration élevée et un temps de contact prolongé pour obtenir dans le meilleur des cas une réduction d'émergence de l'ordre de 80 %.

Influence de la concentration

Même à de fortes concentrations, le diflubenzuron a présenté une efficacité médiocre pour un temps de contact court (10 mn) (tableau 5). Une autre série de tests réalisés avec un temps de contact de 80 mn et 5 concentrations s'échelonnant entre 0,0156 et 0,25 mg/l n'a pas permis d'obtenir plus de 25 % de réduction d'émergence. Ces essais ont également confirmé la variabilité dans les résultats, déjà mentionnée dans la série précédente.

Influence du stade larvaire

Les larves jeunes n'ont pas été plus sensibles à l'action du diflubenzuron que les larves âgées (tableau 6). La mortalité des larves jeunes a augmenté lorsque la concentration est passée de 0,8 à 6,4 mg/l pendant 10 mn, mais n'a pas dépassé 62 % au plus fort dosage.

Influence du temps de transit intestinal

En augmentant artificiellement le temps de transit intestinal, on augmente légèrement l'efficacité (tableau 7). Toutefois, les niveaux de réduction d'émergence obtenus ainsi que leurs différences étaient trop faibles pour que l'on puisse réellement conclure sur l'influence de ce facteur.

Influence de la formulation

On observe entre les formulations des différences significatives d'efficacité (tableau 8). Les meilleurs résultats sont obtenus avec le flowable 48 % mais au plus fort dosage testé ; la poudre mouillable présente une efficacité presque équivalente. Cette observation confirme la validité du choix de cette formulation pour la réalisation des premiers essais. La suspension liquide a une efficacité très faible quelle que soit la concentration testée.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Au cours de ces essais il n'a jamais été possible d'obtenir plus de 80 % de réduction d'émergence avec le diflubenzuron et ce, malgré un temps de contact prolongé ou des concentrations élevées. Ces résultats contredisent ceux obtenus sur *S. vittatum* avec une formulation équivalente (respectivement 96 et 91 % de réduction d'émergence à 0,5 mg/l/15mn et 0,1 mg/l/1h, LACEY et MULLA, 1977 *loc. cit.*). Les larves jeunes du complexe *S. damnosum* ne sont pas plus sensibles que les larves âgées, contrairement à ce qui a également été observé avec *S. vittatum* (LACEY et MULLA, 1977 *loc. cit.*). Chez les moustiques, les larves jeunes de *Culex nigripalpus* ou d'*Aedes taeniorhynchus* sont plus sensibles que les larves âgées (RATHBURN et BOIKE, 1975), tandis que cette différence n'existe pratiquement pas chez *Culex quinquefasciatus* et *Anopheles gambiae*, deux espèces à cycle de développement rapide (BUSVINE *et al.*, 1976). Les larves du dernier stade ont été choisies pour réaliser cette étude parce qu'elles sont beaucoup plus faciles à manipuler et conduisent plus rapidement à l'obtention d'adultes.

L'efficacité dépend de la formulation utilisée. Il s'agit là d'un phénomène commun à tous les larvicides antisimulidiens et qui a également été observé pour le diflubenzuron avec les larves de simuliés (LACEY et MULLA, 1977 *loc. cit.*) et de moustiques (MULLA et DARWAZEH, 1976).

Au cours de nos essais, la vitesse de développement des larves et des nymphes traitées a toujours été identique à celle des lots témoins, contrairement à ce qui a pu être observé avec des larves de *Cx pipiens* pour les-

quelles le traitement semble entraîner un retard à la nymphose et à l'émergence (HAJJAR, 1979). Le cycle de développement larvaire des espèces du complexe *S. damnosum* est très court (8 à 10 jours en moyenne pour 7 stades larvaires) et la brièveté de l'intermue devrait favoriser l'action retard de ce produit. En revanche, la rapidité du transit intestinal pourrait a priori représenter un facteur défavorable, surtout dans le cadre de la présente étude où les larves ont été soumises à une dose unique pendant un temps relativement court. Le fait que les larves jeunes aient un transit 15 à 20 fois plus rapide que celui des larves âgées (ELSEN, *loc. cit.*), peut expliquer qu'en fait elles ne soient pas plus sensibles. L'augmentation de 30 et 60 mn du temps de transit chez les larves âgées n'a semble-t-il pas permis l'assimilation d'une plus grande quantité de matière active. Le blocage étant survenu après 10 mn de contact, le bol alimentaire contenant le produit avait pu parcourir environ les 2/3 du tube digestif dont l'estomac moyen. C'est d'ailleurs au niveau de ce dernier que s'exerce l'action d'un autre produit actif par ingestion, la toxine du *B. thuringiensis* H14 (CHARLES et de BARJAC, 1983).

Il apparaît peu probable, au vu de nos résultats, qu'il suffise d'augmenter sensiblement le temps de contact pour obtenir une efficacité permettant d'envisager l'utilisation de ce produit. L'exposition permanente des larves à de très faibles concentrations ferait appel à des formulations à relargage progressif et à des techniques d'application qui n'existent pas encore.

La méthodologie utilisée n'est pas à mettre en cause dans la faible activité du diflubenzuron sur les larves du complexe *S. damnosum*. En effet, avec cette méthode, les mêmes modalités de traitement des larves ont donné avec d'autres insecticides, qu'ils soient chimiques ou biologiques, qu'ils agissent par contact ou par ingestion, des résultats identiques à ceux obtenus lors d'essais en rivière. La principale difficulté de ce type de test réside dans la récupération systématique d'adultes viables. C'est sur eux qu'il nous a semblé préférable de baser les résultats plutôt que sur les cocons nymphaux vides contrairement à certains auteurs (LACEY et MULLA, 1977, 1978, *loc. cit.*). En effet, le seul comptage des cocons vides, s'il est beaucoup plus simple, ne permet pas de mettre en évidence l'action du produit lorsqu'elle s'exerce sur l'émergence des adultes. Cette action, qui existe pour la plupart des insecti-

cides régulateurs de croissance, peut même être prépondérante dans le cas des mimétiques de l'hormone juvénile.

Les disparités observées dans certains de nos résultats pourraient s'expliquer par le fait que les proportions d'adultes viables récoltés dans les témoins ont été assez variables. Il en va de même avec les tests sur les larves de moustiques dont la manipulation pose moins de problèmes. L'absence de corrélation satisfaisante entre la dose et la mortalité ainsi qu'une forte variabilité inter-tests s'observent également dans les tests sur larves de moustiques (SCHAEFER et WILDER, 1972). La variabilité observée dans le présent travail, si elle peut gêner l'interprétation de certains résultats, n'empêche pas toutefois de constater le manque d'efficacité du diflubenzuron sur les larves du complexe *S. damnosum*.

Avant de conclure sur les perspectives d'utilisation de cet insecticide contre les larves des vecteurs de l'onchocercose, il était nécessaire de tester l'efficacité de plusieurs autres formulations et de réaliser des essais en rivière afin de confirmer nos observations. Les résultats de ces essais ainsi qu'une discussion sur les perspectives offertes par le diflubenzuron constitueront la deuxième partie de ce travail.

SUMMARY ACTIVITY OF DIFLUBENZURON AGAINST S.damnosum COMPLEX LARVAE.
1. SOME FACTORS INFLUENCING THE EFFICACY.

The efficacy of Dimilin^R 25 % WDP was tested against *S. damnosum* complex larvae, the vectors of onchocerciasis in West Africa. Tests were carried out in a recirculating closed system with late instar larvae.

The efficacy was dependent upon exposure time. The mortality did not reach 65 % with a 10 mn exposure time, whatever dosages used up to 6.4 mg/l. The highest mortality recorded (82 %) was reached with a long exposure (80 mn) at a relatively low dosage (0.0625 mg/l). The young larvae were not more susceptible than mature larvae.

The efficacy of 3 experimental formulations was tested and proved to be quite dependent upon formulation. New formulations should be tested and river trials carried out in order to evaluate prospects really offered by diflubenzuron for use in onchocerciasis vector control.

KEY WORDS : diflubenzuron, onchocerciasis, vector control.

RESUME

Le diflubenzuron présente dans l'ensemble une efficacité médiocre contre les larves des vecteurs de l'onchocercose. Avec un temps de contact court (10 mn), la mortalité reste faible quels que soient les dosages utilisés. Elle augmente avec le temps de contact, mais n'a jamais dépassé 82 %. Les larves jeunes ne sont pas plus sensibles que les larves âgées. Enfin, l'efficacité dépend de la formulation utilisée.

MOTS CLES: diflubenzuron, onchocercose, lutte antivectorielle.

Tableaux 1 à 4 - Influence du temps de contact.

Concentration (mg/l) et temps de contact	0	0,5 5 mn	0,25 10 mn	0,125 20 mn	0,0625 40 mn	0,0312 80 mn
% corrigé de réduction émergence	0 (66)*	0 (158)	14,1 (77)	22 (106)	52,5 (104)	50,5 (138)

Tableau 1 - Série 1, Touba 06-83, lot FUN 80-B08A
(temps de contact x concentration = 2,5)

Concentration (mg/l) et temps de contact	0	0,5 10 mn	0,25 20 mn	0,125 40 mn	0,0625 80 mn
% corrigé de réduction émergence	35,2 (91)*	9,6 (198)	12,4 (199)	19,3 (193)	81,9 (162)

Tableau 2 - Série 2, Akakro 01-84, lot FUN 82-L 03D
(temps de contact x concentration = 5)

Concentration (mg/l) et temps de contact	0	0,1 10 mn	0,1 20 mn	0,1 40 mn	0,1 80 mn
% corrigé de réduction émergence	42,3 (71)*	10,1 (154)	37,4 (147)	34,5 (196)	66,9 (162)

Tableau 3 - Série 2, Akakro 01-84, lot FUN 82-L 03D
(temps de contact croissant, concentration constante)

		I			II		
Concentration (mg/l) et temps de contact	0	0,0312 80 mn	0,0156 160 mn	0,0078 320 mn	0,0625 80 mn	0,0312 160 mn	0,0156 320 mn
% corrigé de réduction émergence	23,3 (116)*	8,7 (55)	44,5 (68)	24,4 (100)	17,6 (57)	47,5 (67)	77,1 (85)

Tableau 4 - Série 3, Touba 02-84, lot FUN 82-L 03D
(temps de contact x concentration : I = 2,5 et II = 5)

* nombre de larves utilisées.

% corrigé de réduction d'émergence	Concentration (mg/l/10mn)							
	0	0,1	0,25	0,5	1	1,5	2	4
Série 1, Touba 06-83	27,5 (131)*		16,1 (93)	40,5 (119)	14,5 (172)		0 (77)	0 (83)
Série 2, Akakro 01-84	35,2 (91)	10,1 (154)		9,6 (198)		63,4 (188)		
Série 3, Touba 02-84	23,3 (116)			16,0 (45)	5,2 (55)		25,9 (57)	2,5 (51)

Tableau 5 - Influence de la concentration.
(temps de contact constant 10 mn)

% corrigé de réduction d'émergence	Concentration (mg/l/10mn)						
	0	0,1	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
Série 1, Touba 02-84	30,5 (206)*	2,2 (582)	19,7 (340)	5,2 (480)			
Série 2, Touba 04-84	23,5 (209)			18,8 (127)	21,9 (246)	46,0 (231)	61,7 (194)

Tableau 6 - Efficacité du diélubenzuron sur les larves jeunes (stades 3 à 5)
du complexe *Simulium damnosum*. (temps de contact 10 mn)

* nombre de larves utilisées.

Transit intestinal % corrigé de réduction d'émergence	Témoin	Normal	Blocage 30 mn	Blocage 60 mn
Série 1, Touba 06-83 (0,125 mg/l/10mn)	7,5 (161)*	0,7 (102)	4,9 ± 1,2 (55)	13,8 ± 3,6 (43)
Série 2, Akakro 01-84 (0,5 mg/l/10mn)	42,3 (71)	9,6 ± 1,2 (198)	19,1 ± 2,3 (122)	19,4 ± 2,2 (198)

Tableau 7 - Influence du temps de transit intestinal sur l'efficacité du diflubenzuron. (temps de contact : 10 mn, larves de stade 7)

Concentration (mg/l/10mn) Formulation	0	0,16	0,5	1,5
Poudre mouillable 25 % FUN 82-L03D	20 (84)*	10,1 (154)	9,6 (198)	63,4 (188)
Flowable 48 % FUN 83-J10A	23 (39)	57,0 (151)	62,9 (105)	73,0 (96)
Suspension concentrée 25 % FUN 83-J21A	35,2 (71)	50,7 (158)	67,0 (191)	35,9 (103)
Solution liquide 5 % 204042	35,2 (71)	12,4 (155)	12,7 (173)	16,1 (103)

Tableau 8 - Efficacité comparée (en % de réduction d'émergence) de quatre formulations expérimentales de diflubenzuron. (temps de contact : 10 mn, larves de stade 7)

* nombre de larves utilisées.

BIBLIOGRAPHIE

- ALI, A. et MULLA, M.S. - 1978. Effects of chironomid larvicides and diflubenzuron on nontarget invertebrates in residential-recreational lakes. Environ. Entomol., 7, 21.
- AXTELL, R.C., RUTZ, D.A. et EDWARDS, T.D. - 1980. Field tests of insecticides and insect growth regulators for the control of *Culex quinquefasciatus* in anaerobic annual waste lagoons. J. Amer. Mosquito Contrl. Assoc., 40,36.
- CHARLES, J.F. et de BARJAC, H. - 1983. Action des cristaux de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur l'intestin moyen des larves d'*Aedes aegypti* L. en microscopie électronique. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 134 A, 197-219.
- COLDWELL, A.E. et SCHAEFER, C.H. - 1978. Effects of Dimilin on nontarget organisms during a *chaoborus* field trial. Proc. Papers Calif. Mosquito Control Assoc., 46, 111.
- DEJOUX, C. et GUILLET, P. - 1980. Evaluation of new blackfly larvicides for use in onchocerciasis control in West Africa. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/80.783.
- ELOUARD, J.M. et ELSÉN, P. - 1977. Variations de l'absorption des particules alimentaires et de la vitesse de transit digestif en fonction de certains paramètres du milieu chez les larves de *Simulium damnosum* Theobald 1903 (Diptera : Simuliidae). Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XV (1), 29-39.
- ELSEN, P. - 1980. Le transit intestinal chez les larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera : Simuliidae) en Afrique de l'Ouest. - III - Influence du stade larvaire, du nyctémère et de la saison. Ann. Soc. belge Méd. trop., 60, 203-212.
- FARLOW, J.E., BREAUD, T.P., STEELMAN, C.D. et SCHILLING, P.E. - 1978. Effects of the insect growth regulators diflubenzuron on nontarget aquatic population in a Louisiana intermediate marsh. Environ. Entomol., 7, 199.
- GROSSCURT, A.C. - 1976. Ovicidal effects of diflubenzuron on the housefly (*Musca domestica*). Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 41, 949-963.
- 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. et ESCAFFRE, H. - 1979. La recherche de nouvelles formulations d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical, Marseille, 13-16 mars 1979, 1169-1178.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., OUEDRAOGO, M. et QUILLEVERE, D. - 1980. Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire. (Zone du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta). Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XVIII (3), 291-299.

- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985. Méthodologie pour tester l'efficacité des formulations d'insecticides sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. - II - Composés régulateurs de croissance. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- GUILLET, P. et KURTAK, D.C. - 1985. Cross-resistance to chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl in the larval populations of the *Simulium damnosum* complex already resistant to temephos in West Africa and its operational significance. Soumis pour publication à Tropenmed. Parasitol.
- HAJJAR, N.P. - 1979. Diflubenzuron inhibits chitin synthesis in *Culex pipiens* L. larvae. Mosq. News, 39, 381-384.
- JAMNBACK, H. et MEAN, S.R. - 1968. Formulation as a factor affecting the efficacy of blackfly larvicides. Proc. New Jersey Mosq. Exterm. Ass., 55, 89-94.
- JORDAN, A.M., TREWERN, M.A., BORKOVEC, A.B. et de MILO, A.B. - 1979. Laboratory studies on the potential of three insect growth regulators for control of the tse-tse fly, *Glossina morsitans morsitans* Westwood (Diptera : Glossinidae). Bull. Ent. Res., 69.
- KURTAK, D.C., OUEDRAOGO, M., OCRAN, M., BARRO TELE et GUILLET, P. - 1982. Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae already resistant to temephos (Abate). Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/82.850.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1977. Larvicidal and ovicidal activity of Dimilin against *Simulium vittatum*. J. Econ. Entomol., 70, 370.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1978 a. Factors affecting the activity of diflubenzuron against *Simulium* larvae (Diptera : Simuliidae). J. Amer. Mosquito Contrl. Assoc., 38, 264.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1978 b. Biological activity of diflubenzuron and three new IGRs against *Simulium vittatum* (Diptera : Simuliidae). J. Amer. Mosquito Contrl. Assoc., 3, 377.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1979. Field evaluation of diflubenzuron against *Simulium* larvae. J. Amer. Mosquito Contrl. Assoc., 39, 86.
- Mc KAGUE, A.B., PRIDMORE, R.B. et WOOD, P.M. - 1978. Effects of Altosid and Dimilin on black flies (Diptera : Simuliidae). Laboratory and field tests. Can. Entomologist, 110, 103.
- MIURA, T. et TAKAHASHI, R.M. - 1975. Effects of the IGR TH-6040, on nontarget organisms when utilized as a mosquito control agent. J. Amer. Contrl. Assoc., 35, 154.
- MULDER, R. et GIJSWIJT, M.J. - 1973. The laboratory evaluation of two promising insecticides which interfere with cuticle deposition. Pestic. Sci., 4, 737-745.
- MULLA, M.S., MAJORI, G. et DARWAZEH, H.A. - 1975. Effects of the insect growth regulator Dimilin or TH-6040 on mosquitoes and some nontarget organisms. J. Amer. Mosquito Contrl. Assoc., 35, 211.
- MULLA, M.S. et DARWAZEH, H.A. - 1975. Activity and longevity of insect growth regulators against mosquitoes. J. Econ. Entomol., 68, 791.
- MULLA, M.S. et DARWAZEH, H.A. - 1976. The IGR Dimilin and its formulations against mosquitoes. J. Econ. Entomol., 69, 309.

- MULLA, M.S. et LACEY, L.A. - 1976. Feeding rates of *Simulium* larvae on particulates in natural streams (*Diptera* : *Simuliidae*). Environ. Entomol., 5 (2), 283-287.
- POST, L.C. et VINCENT, W.R. - 1973. A new insecticide inhibits chitin synthesis. Naturwissen Schafte, 60, 431-432.
- RODRIGUES, C.S. - 1982. Ph. D. thesis, University of Guelph, Canada.
- SCHAEFER, C.H. et WILDER, W.H. - 1972. Insect developmental inhibitors: a practical evaluation as mosquito control agents. J. Econ. Entomol., 65 (4), 1066-1071.
- SCHAEFER, C.H., WILDER, W.H. et MULLIGAN III, F.S. - 1975. A practical evaluation of TH6040 as a mosquito control agent in California. J. Econ. Entomol., 68 (2), 183-185.
- SELF, L.S., NELSON, M.J., PANT, C.P. et SALIM USMAN - 1978. Field trials with two insect growth regulators against *Culex quinquefasciatus*. Mosq. News, 38 (1), 74-79.
- SHARMA, V.P., BATRA, C.P. et BROOKS, G.D. - 1979. Laboratory and field evaluation of a growth-regulating compound (TH-6040) against *Culex pipiens fatigans* (*Diptera* : *Culicidae*). J. Med. Entomol., 15 (5-6), 506-509.
-

8

EVALUATION DE L'ACTIVITE D'UN INSECTICIDE REGULATEUR DE CROISSANCE,

LE DIFLUBENZURON, SUR LES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*.

II - EFFICACITE COMPAREE DE QUELQUES FORMULATIONS

ET RESULTATS DES ESSAIS EN RIVIERE.

EVALUATION DE L'ACTIVITE D'UN INSECTICIDE REGULATEUR DE CROISSANCE,
LE DIFLUBENZURON, SUR LES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*.

II - EFFICACITE COMPAREE DE QUELQUES FORMULATIONS
ET RESULTATS DES ESSAIS EN RIVIERE. *

Pierre GUILLET **
Jean Marc HOUGARD ***
Julien DOANNIO ***
Henri ESCAFFRE ***
Jacques DUVAL ***

INTRODUCTION

L'utilisation d'insecticides régulateurs de croissance pourrait représenter l'une des solutions envisageables pour résoudre les problèmes posés par la résistance aux insecticides organophosphorés apparue chez deux espèces de simules du complexe *Simulium damnosum*, les vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest (GUILLET *et al.*, 1985 a).

Les premiers essais à échelle réduite ont été réalisés avec le diflubenzuron (Dimilin[®]), choisi en raison de sa toxicité élevée pour les larves de moustiques. Cet insecticide s'est avéré très peu efficace contre les larves du complexe *S. damnosum*. Il faut un temps de contact relativement long (1 à 5 h) pour obtenir une certaine efficacité mais les pourcentages de réduction d'émergence observés n'ont jamais dépassé 80 % en dépit de concentrations élevées (GUILLET *et al.*, *loc. cit.*). Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus sur *S. vittatum* (LACEY et MULLA, 1977, 1978, RODRIGUES, 1982) dans lesquels le diflubenzuron apparaissait comme un insecticide prometteur.

* Ce travail a bénéficié, dans le cadre des accords entre l'ORSTOM et l'OCCGE, d'une subvention de l'Organisation Mondiale de la Santé.

** ORSTOM - SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE.

*** Institut Pierre Richet (IRTO) - BP 1500 - BOUAKE - COTE D'IVOIRE.

La formulation est toujours un facteur essentiel de l'efficacité des larvicides antisimulidiens (JAMNBACK, 1968, GUILLET et ESCAFFRE, 1979). Il en est de même pour le diflubenzuron (LACEY et MULLA, 1978 *loc. cit.*, GUILLET *et al.*, *loc. cit.*). Afin de confirmer les résultats obtenus dans la première partie de ce travail et pour tenter de sélectionner une formulation plus efficace, onze nouvelles formulations expérimentales ont été testées et des essais en rivière ont été pratiqués.

MATERIEL ET METHODES

Activité comparée des 12 formulations

Onze formulations nouvelles fournies par Philips Duphar ont été testées comparativement à la poudre mouillable sur des larves de stade 7, avec un temps de contact de 20 mn, conformément au protocole mentionné dans la première partie de ce travail. Ces formulations étaient des solutions (SL) et des suspensions concentrées (SC) et Flow, contenant de 1 à 48 % de matière active et différant entre elles par la taille des particules et la nature des solvants et agents tensio-actifs utilisés. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de réduction d'émergence en comparant le nombre d'adultes récoltés viables au nombre de larves initialement testées (GUILLET *et al.*, 1985 b). Après un premier criblage portant sur deux concentrations par produit et deux répétitions, la formulation la plus efficace a été sélectionnée pour une évaluation complémentaire avec 4 concentrations s'échelonnant de 0,1 à 1 mg/l pendant 20 mn.

Essais en rivière

Ces essais ont été réalisés avec la poudre mouillable à 25 % car c'était la seule formulation disponible en quantité suffisante. Trois biefs ont été sélectionnés sur une rivière de savane en Côte d'Ivoire. Les débits ont été mesurés à l'aide d'un moulinet d'hydrologie (Ott[®]). Les traitements ont été effectués avec un fût percé, déplacé d'une berge à l'autre, et contenant une quantité de solution d'insecticide calculée pour s'écouler dans le temps de contact choisi. Une minigouttière (ensemble de 8 descentes, GUILLET *et al.*, 1985 c) a été placée à l'aval de chaque bief traité et alimentée par gravité, l'eau étant filtrée à travers un voile de nylon pour éviter la colonisation de la gouttière par des larves dérivant naturellement dans le bief. Quatre heures après le traitement, des

larves de stade 7 ont été prélevées avec leurs supports naturels collectés dans les parties médiane et aval des biefs traités afin de coloniser des plaquettes métalliques placées dans les gouttières. 24 h après le traitement, les larves ont été retirées des gouttières et placées dans un dispositif de récupération des adultes. Le maintien pendant 24 h des larves dans le bief traité a permis que se manifeste un éventuel effet retard des traitements. Les larves ont été transférées dans les gouttières 4 h après le traitement afin d'éviter une colonisation possible des supports naturels par des larves dérivant depuis les zones non traitées situées en amont, zones où ont été prélevées les larves des lots témoins. Les résultats ont également été exprimés en pourcentages de réduction d'émergence. Les trois biefs ont été traités le même jour :

- Bief 1 : longueur 200 m environ, débit $1,2 \text{ m}^3/\text{s}$, température de l'eau 28°C , dosage $0,1 \text{ mg/l}$ pendant 20 mn soit 480 g de formulation par m^3/s .
- Bief 2 : Longueur 200 m environ, débit $2,3 \text{ m}^3/\text{s}$, dosage $0,2 \text{ mg/l}$ pendant 10 mn soit 480 g de formulation par m^3/s .
- Bief 3 : longueur 150 m environ, débit $1,2 \text{ m}^3/\text{s}$, dosage $0,5 \text{ mg/l}$ pendant 20 mn soit 2400 g de formulation par m^3/s .

RESULTATS

On a observé entre les douze formulations testées des différences d'efficacité très significatives (tableau 1). Deux formulations ont été sensiblement plus efficaces que les autres : les suspensions concentrée SC J21C et Flow J19C.

Même avec une concentration de 1 mg/l pendant 20 mn, la formulation la plus efficace (Flow J19C) ne donne pas 100 % de réduction d'émergence (tableau 2). La mortalité larvaire, insignifiante après 24 h, a atteint 79 % à la concentration de $0,5 \text{ mg/l}$ pendant 20 mn. Le pourcentage de mortalité pendant la nymphose et l'émergence a varié de 20,6 à 57,1 % dans les lots traités contre 8,8 % seulement dans les lots témoins. Ceci indique que l'effet léthal du diflubenzuron s'exerce sur les larves au moment de la mue mais également sur

les nymphes et à l'émergence des adultes.

La mortalité observée au cours des essais en rivière n'a pas dépassé 41 % au plus fort dosage appliqué (0,5 mg/l pendant 20 mn). Elle a atteint au maximum 60 % et ce avec une concentration plus faible (0,2 mg/l) et un temps de contact de 10 mn (tableau 3). L'efficacité dans la partie aval des biefs traités a été nettement supérieure à celle observée dans la partie médiane.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'efficacité du diflubenzuron varie significativement en fonction de la formulation utilisée. Toutefois, elle demeure dans le meilleur des cas nettement insuffisante. Le rôle important joué par la formulation est un phénomène commun à tous les larvicides. Il avait déjà été signalé dans le cas du diflubenzuron (LACEY et MULLA, 1978 *loc. cit.*, GUILLET *et al.*, 1985 *a loc. cit.*). Le test complet réalisé avec la formulation la plus active (Flow J19C) a démontré la relative fiabilité des résultats obtenus à partir d'un criblage avec deux concentrations.

L'efficacité des traitements en rivière n'a pas dépassé 60 %. Il est intéressant de constater que l'effet observé dans la partie aval des biefs traités est nettement supérieur à celui observé dans la partie médiane. Ceci peut s'expliquer par l'étalement de la vague d'insecticide qui entraîne une exposition plus longue à des concentrations plus faibles au fur et à mesure que l'on s'éloigne du point de traitement. Dans les essais réalisés en Amérique du Nord avec la même formulation, les résultats obtenus ont été très variables, de médianes à 0,1 mg/l pendant 15 mn (MOHSEN et MULLA, 1982) à près de 98 % d'efficacité à 0,2 mg/l pendant 60 mn (LACEY et MULLA, 1979).

La méthodologie utilisée pour l'évaluation des composés régulateurs de croissance est un facteur très important qui peut conditionner en partie les résultats obtenus. Les essais réalisés en rivière ont donné des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus avec le dispositif d'évaluation

à échelle réduite utilisé au cours de ce travail. L'efficacité très limitée du diflubenzuron contre les larves du complexe *S. damnosum* ne peut donc pas s'expliquer par la méthodologie employée comme cela a été mentionné dans la première partie de ce travail. Elle pourrait être le fait d'une moindre sensibilité des larves du complexe *S. damnosum* par rapport aux espèces néarctiques, espèces qui présentent également entre elles des différences de sensibilité significatives (LACEY et MULLA, 1978 *loc. cit.*, 1979 *loc. cit.*).

Tenant compte du rôle important joué par la formulation, il aurait été préférable de réaliser les tests en rivière avec la formulation la plus efficace. Malheureusement celle-ci n'était pas disponible en quantité suffisante. Les résultats obtenus avec le Flowable 5 % J21C sont tout à fait comparables à ceux obtenus par LACEY et MULLA (1977 *loc. cit.*) sur *S. vittatum* (96 % de réduction d'émergence à 0,5 mg/l/15mn) avec une formulation cependant moins efficace (poudre mouillable). Ces résultats ne permettent quand même pas d'envisager favorablement l'utilisation du diflubenzuron dans le cadre de la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest et ce, pour plusieurs raisons :

- la dose qui entraîne 96 % de mortalité (0,5 mg/l/20mn) nécessiterait l'utilisation de 12 litres de formulation pour traiter une rivière ayant un débit de 1 m³/s, soit 40 à 80 fois plus que l'Abate actuellement utilisé.

- dans la lutte contre les vecteurs de filariose, dont la gravité des manifestations est liée chez l'homme à un phénomène d'accumulation des piqûres infectantes, il est indispensable d'obtenir une réduction des vecteurs proche de 100 %. Des traitements efficaces même à 95 % entraîneraient le maintien d'une transmission résiduelle supérieure au seuil épidémiologiquement acceptable (dans le cas de l'onchocercose : moins de 1000 piqûres et de 100 larves infectantes d'*Onchocercia volvulus* par homme et par an).

- l'activité du diflubenzuron augmente avec le temps de contact. Il n'existe pas encore de technique d'application et de formulations pour maintenir en permanence une très faible concentration d'insecticide dans les rivières. Si les progrès technologiques permettaient de mettre au point des formulations adéquates, de sérieuses difficultés persisteraient. Le débit des rivières est souvent sujet à de brusques variations, notamment en saison des pluies, de ce fait, il est difficile de maintenir les concentrations d'insecticide à un niveau

constant. Par ailleurs, le développement des algues dans les eaux chaudes (25 à 30° C) est très rapide, ce qui pourrait gêner voire empêcher le relargage de l'insecticide. Ce phénomène a été observé en Afrique de l'Ouest avec des blocs de plâtre imprégnés d'insecticide (LE BERRE, comm. pers.) ou des bandelettes imprégnées de téméphos (Ecopro[®]) (RAYBOULD, comm. pers.) qui se sont montrées totalement inefficaces, constituant même rapidement des supports pour les larves. En revanche, ce type de traitement donne de très bons résultats dans des eaux plus froides en Amérique Centrale avec le téméphos (TAKOAKA *et al.*, 1981), ainsi qu'en Amérique du Nord avec l'Altosid[®] (THOMPSON et ADAMS, 1979).

- enfin, d'une manière plus générale, il serait beaucoup plus difficile d'évaluer l'efficacité des traitements avec des régulateurs de croissance qui ne tuent pas systématiquement les larves et n'empêchent pas la formation des nymphes. L'évaluation ne pourrait plus se faire par contrôle direct dans les gîtes larvaires mais par capture de femelles piqueuses sur appât humain ou captures sur plaques d'aluminium (BELLEC, 1976). Ceci supposerait un renforcement du dispositif d'évaluation entomologique.

Il existe d'autres composés régulateurs de croissance ayant une action comparable à celle du diflubenzuron ou des mimétiques d'hormones juvéniles dont le plus connu est le méthoprène (Altosid). Un programme de criblage a été mis en place pour tenter de sélectionner des composés efficaces. Les résultats de ce criblage feront l'objet d'une autre publication.

SUMMARY ACTIVITY OF DIFLUBENZURON AGAINST *S.damnosum* COMPLEX LARVAE.
2. COMPARATIVE EFFICACY OF 12 EXPERIMENTAL FORMULATIONS AND
RESULTS OF RIVER TRIALS

The efficacy of 12 experimental formulations of diflubenzuron was tested against *S. damnosum* complex larvae, the vectors of onchocerciasis in West Africa. Their efficacy depended upon formulation and the most effective was a 5 % flowable. However, the reduction in adult emergence did not reach 95 % after 20 mn exposure at 1 mg/l. Liquid solutions or "emulsions" were far the less effective.

A 25 % wettable powder was tested under field conditions and its efficacy did not reach 50 % after 20 mn exposure at 0.5 mg/l. The results confirmed those obtained during screening in small scale evaluation procedure. The prospects for use of diflubenzuron in onchocerciasis vector control are discussed and appeared to be very limited.

KEY WORDS : diflubenzuron, formulations, onchocerciasis, vector control.

RESUME

Douze formulations expérimentales de diflubenzuron ont été testées. Leur efficacité dépend beaucoup de la formulation et ne dépasse pas, dans le meilleur des cas, 95 % de réduction d'émergence des adultes à la dose de 1 mg/l pendant 20 mn.

Les essais en rivière ont confirmé les résultats médiocres obtenus au criblage. Les perspectives d'utilisation du diflubenzuron pour la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose apparaissent très limitées.

MOTS CLES : diflubenzuron, formulations, onchocercose, lutte antivectorielle.

Dosage Formulation (mg/l/20mn)	0,05	0,1	0,25	0,5	1
Poudre mouillable 25 % lot commercial		32,5 (254)*		56,1 (53)	
SL 1 % J17C		60,0 (97)		23,9 (127)	
SL 5 % J14A		34,9 (93)			
SL 5 % 204042		0 (60)		17,3 (98)	
Flow 5 % J19C	69,5 (98)		82,4 (82)		
Flow 48 % J10A		24,1 (73)		57,3 (127)	
Flow 48 % J19B		0 (71)		5,8 (45)	
SC 25 % J21A			49,8 (95)		37,5 (101)
SC 25 % J21B			9,1 (58)		47,9 (47)
SC 25 % J21C		6,8 (69)		70,5 (128)	
SC 25 % J24A		28,2 (52)		12,8 (56)	
SC 25 % J24D		0 (75)		25,2 (62)	
Témoin	22,2 (210)				

* nombre de larves utilisées.

Tableau 1 - Efficacité comparée en % corrigés de réduction d'émergence de 12 formulations de diflubenzuron sur des larves du complexe *Simulium damnosum*.

(temps de contact 20 mn, larves de stade 7, lecture 8 jours après le traitement)

Concentration (mg/l/20mn)		0	0,1	0,2	0,5	1
Nombre de larves utilisées		137	142	93	99	78
% mortalité larvaire	24 h	0	0	2,1	1	0
	totale	8,7	35,2	35,5	78,8	60,3
% de nymphose		91,3	64,8	64,5	21,2	39,7
% adultes non viables*		8,8	20,6	23,3	57,1	29
% adultes viables		61,3	25,3	21,5	2,0	5,1
% corrigé de réduction d'émergence		38,7	58,6	64,9	96,7	91,7

* calculé par rapport au nombre de nymphes formées.

Tableau 2 - Activité du diflubenzuron Flowable 5 % FUN 83 J19C sur des larves de stade 7 de *Simulium yahense*.

Traitement	% corrigé de réduction d'émergence	
	Partie médiane bief traité	Partie aval bief traité
Bief 1 0,1 mg/l/20mn	8,3 (63)*	29,5 (236)
Bief 2 0,2 mg/l/10mn	26,2 (134)	59,5 (108)
Bief 3 0,5 mg/l/20mn	19,0 (73)	40,7 (74)
Témoin	27,3 (88)	

* nombre de larves utilisées.

Tableau 3 - Evaluation en rivière de l'efficacité de la poudre mouillable 25 % de diflubenzuron vis-à-vis des larves du complexe *Simulium damnosum*. (larves de stade 7)

BIBLIOGRAPHIE

- BELLEC, C. - 1976. Captures d'adultes de *Simulium damnosum* Theobald 1903 (Diptera : Simuliidae) à l'aide de plaques d'aluminium en Afrique de l'Ouest. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XIV (3), 209-217.
- GUILLET, P. et ESCAFFRE, H. - 1979. La recherche de nouvelles formulations d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical, Marseille, 13-16 mars 1979, 1169-1178.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 a. Evaluation de l'activité d'un insecticide régulateur de croissance, le diflubenzuron, sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. I - Etude de quelques facteurs conditionnant l'efficacité. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 b. Méthodologie pour tester l'efficacité des formulations d'insecticides sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. - II - Composés régulateurs de croissance. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 c. Méthodologie pour tester l'efficacité des formulations d'insecticides sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. - I - Insecticides conventionnels et agents de lutte biologique. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- JAMNBACK, H. et MEAN, S.R. - 1968. Formulation as a factor affecting the efficacy of blackfly larvicides. Proc. New Jersey Mosq. Exterm. Ass., 55, 89-94.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1977. Larvicidal and ovicidal activity of Dimilin against *Simulium vittatum*. J. Econ. Entomol., 70, 370.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1978. Factors affecting the activity of diflubenzuron against *Simulium* larvae (Diptera : Simuliidae). J. Amer. Mosquito Contrl. Assoc., 38, 264.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1979. Field evaluation of diflubenzuron against *Simulium* larvae. J. Amer. Mosquito Contrl. Assoc., 39, 86.
- MOHSEN, Z.H. et MULLA, M.S. - 1982. Field evaluation of *Simulium* larvicides : effects on target and nontarget insects. Environ. Entomol., 11, 309-398.
- RODRIGUES, C.S. - 1982. Ph. D. thesis, University of Guelph, Canada.
- TAKOAKA, H., OCHOA, J.O., TAKAHASHI, M. et TAKAHASHI, H. - 1981. Evaluation of temephos as a larvicide against *Simulium ochraceum* (Diptera : Simuliidae) in Guatemala. J. Med. Entomol., 18 (2), 145-152.
- THOMPSON, B.H. et ADAMS, B.G. - 1979. Laboratory and field trials using Altosid insect growth regulator against black flies (Diptera : Simuliidae) of New Foundland, Canada. J. Med. Entomol., 16, 536.

9

EVALUATION DE L'ACTIVITE DE CINQ INSECTICIDES REGULATEURS DE CROISSANCE

SUR LES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*.

EVALUATION DE L'ACTIVITE DE CINQ INSECTICIDES REGULATEURS DE CROISSANCE
SUR LES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*.*

Pierre GUILLET **
Jean Marc HOUGARD ***
Julien DOANNIO ***
Henri ESCAFFRE ***
Jacques DUVAL ***

INTRODUCTION

Depuis 10 ans, la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest est basée exclusivement sur l'emploi de larvicides utilisés à un rythme hebdomadaire sur près de 800 000 km² pour détruire les larves de simulies appartenant au complexe *Simulium damnosum*, vecteurs de cette maladie.

Deux espèces forestières du complexe *S. damnosum* ont développé une forte résistance au téméphos (GUILLET *et al.*, 1980), puis au chlorpoxim (KURTAK *et al.*, 1982), ainsi qu'une résistance croisée à plusieurs autres composés de la même famille (GUILLET et KURTAK, 1985). De ce fait, l'arsenal des insecticides utilisables pour poursuivre le traitement des populations résistantes s'est considérablement restreint. Un insecticide biologique, le *Bacillus thuringiensis* H14 a été utilisé avec succès, mais les performances des formulations actuelles restent encore insuffisantes. L'utilisation des insecticides régulateurs de croissance est apparue comme l'une des solutions envisageables pour résoudre les problèmes posés par la résistance.

Le premier régulateur de croissance qui fut testé est le diflubenzuron (Dimilin[®]). Plusieurs essais ont été réalisés avec une poudre mouillable, tant à échelle réduite qu'en grandeur réelle, sans qu'il soit possi-

* Ce travail a bénéficié, dans le cadre des accords entre l'ORSTOM et l'OCCGE, d'une subvention de l'Organisation Mondiale de la Santé.

** ORSTOM - SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE

*** Institut Pierre Richet (IRTO) - BP 1500 - BOUAKE - COTE D'IVOIRE.

ble d'obtenir plus de 80 % de réduction d'émergence, même avec des concentrations élevées (jusqu'à 6 mg/l) et/ou des temps de contact prolongés (jusqu'à 320 mn) (GUILLET *et al.*, 1985 a). Par la suite, 12 formulations expérimentales de ce produit ont été testées, et la plus efficace d'entre elles n'a pas permis d'obtenir 100 % de réduction d'émergence à 0,5 mg/l pendant 20 mn (GUILLET *et al.*, 1985 b). Ces performances limitées ne permettent pas, dans l'état actuel des choses, d'envisager l'utilisation de cet insecticide pour la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose.

De nombreux régulateurs de croissance sont produits par l'industrie depuis les années 1970. Certains d'entre eux ont été utilisés contre les larves de moustiques, et un nombre d'essais beaucoup plus limité a été pratiqué contre les larves de simuliés. Le composé le plus connu reste le méthoprène (Altosid[®]), un mimétique d'hormone juvénile utilisé avec succès depuis quelques années, notamment pour le traitement des populations de moustiques résistants aux composés organophosphorés (SCHAEFER et WILDER, 1972, 1973, SCHAEFER et DUPRAS, 1973, MATHIS *et al.*, 1975, SELF *et al.*, 1978, RODRIGUES et WRIGHT, 1978, TEN HOUTEN, 1980, AXTELL *et al.*, 1980). D'autres mimétiques d'hormone juvénile ont été également testés, notamment les aryl-terpénoides (SCHAEFER *et al.*, 1976).

Les phénols substitués représentent un groupe actif uniquement sur les larves de stade 4 jeunes et ont un effet léthal au moment de la nymphose (SCHAEFER et WILDER, *loc. cit.*, SCHAEFER *et al.*, 1974). Un autre groupe important de régulateurs de croissance est celui des urées substituées qui perturbent la formation de la chitine et ont un effet léthal à la mue, au moment de l'apolyse. Ce groupe comprend, en plus du diflubenzuron, des composés très actifs tels que le triflumuron (SIR 8514) et le SIR 6874.

Outre le diflubenzuron, deux régulateurs de croissance ont été testés sur des larves de simuliés : le méthoprène et le triflumuron. Plusieurs essais ont été réalisés en Amérique du Nord avec le méthoprène. Dans la plupart des travaux, les résultats ont été obtenus avec un temps de contact très long (soit 24 h, soit un contact permanent) et n'ont de ce fait pas beaucoup de signification pratique (CUMMINGS et Mc KAGUE, 1973, GARRIS et ADKINS, 1974, DOVE et Mc KAGUE, 1975, Mc KAGUE et WOOD, 1974). Plus récemment, des essais de laboratoire et de terrain ont montré que le méthoprène pouvait être efficace à la concentra-

tion de 0,02 mg/l pendant 30 mn. L'efficacité varie en fonction de l'espèce testée et de la formulation utilisée (THOMPSON et ADAMS, 1979). Des blocs relargant la matière active pendant 48 h ont également été utilisés avec succès (Mc KAGUE *et al.*, 1978). Le triflumuron en poudre mouillable s'est montré plus efficace que le diflubenzuron sur les larves de *S. vittatum*, de même que le SIR 6874 (LACEY et MULLA, 1978).

A la suite des essais réalisés avec le diflubenzuron, l'activité de cinq autres régulateurs de croissance a été testée sur les larves du complexe *S. damnosum*.

MATERIEL ET METHODE

Les essais ont été réalisés conformément à la méthode décrite par GUILLET *et al.* (1985 c). Seules des larves de dernier stade ont été utilisées. Pour le contact, les larves fixées sur une plaquette métallique, ont été introduites dans une gouttière alimentée en circuit fermé avec de l'eau de rivière. Après le traitement, elles ont été placées dans un dispositif de mise en observation. Un système de filet permet de récolter les adultes viables (capables de voler), les adultes non viables et les larves mortes. Les filets sont visités plusieurs fois par jour. L'observation est poursuivie jusqu'à ce que tous les imagos aient émergé des nymphes formées dans le lot témoin. Deux à trois séries d'essais ont été réalisées dans deux localités de Côte d'Ivoire : à Akakro, sur des larves de *S. yahense* Vajime et Dunbar 1975, sensibles aux insecticides, et à Touba, sur une population d'espèces de savane sensibles (*S. damnosum* s.s., et *S. sirbanum* Vajime et Dunbar 1975) mélangées avec des espèces de forêt résistantes (surtout *S. soubrense* Vajime et Dunbar 1975).

Le criblage préliminaire est habituellement réalisé avec un temps de contact de 60 mn. Lorsque le produit montre une certaine efficacité, des tests complémentaires sont entrepris avec un temps de contact de 10 mn seulement qui correspond mieux aux conditions réelles d'utilisation. Quatre composés ont été testés :

- le méthoprène : deux formulations à 10 % de matière active ont été fournies par Zoecon Corp., une suspension de microcapsules à relargage progressif SR 10 et une poudre PS 10 dans laquelle la matière active est encapsulée dans une

substance qui ne se dégrade qu'en milieu très alcalin. Le pH intestinal des larves de simuliés est lui-même très alcalin (UNDEEN, 1979). Les tests avec le méthoprène ont été réalisés pour rechercher la combinaison concentration/temps de contact donnant le meilleur résultat.

- le phénoxy carb, RO 125 EC (Maag) en concentré émulsionnable à 12,5 % de matière active. Comme le méthoprène, ce phénoxy carbamate est un mimétique de l'hormone juvénile.

- le triflumuron, SIR 8514 (Bayer) en concentré émulsionnable à 6 % de matière active. Ce produit, une urée disubstituée, est un inhibiteur de chitine comme le diflubenzuron.

- enfin deux composés nouveaux fournis par Schering, OMS 2016 en poudre mouillable à 50 % et OMS 2017 en poudre mouillable à 25 %.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de réduction d'émergence, en comparant le nombre d'adultes récoltés viables au nombre de larves originalement testées. Ce pourcentage est corrigé par la loi de combinaison des probabilités indépendantes (formule de Abbott), même quand il dépasse 20 % dans les lots témoins (limite usuelle appliquée dans le cas des insecticides conventionnels). En effet, le dispositif utilisé permet de récolter souvent plus de 80 % d'adultes viables, mais ce chiffre reste variable et parfois est plus faible. Pour chaque dosage ou temps de contact, on pratique 2 à 4 répétitions par essai. Le nombre de larves utilisées n'est pas constant car il dépend de la colonisation du dispositif d'évaluation par les larves et leur nombre est difficile à ajuster.

RESULTATS

Méthoprène

Une efficacité totale a été obtenue avec la formulation SR 10 à la concentration de 1 mg/l pendant 40 mn. L'efficacité a diminué proportionnellement au temps de contact (tableau 1). Les deux formulations testées, SR 10 et PS 10 ont présenté sensiblement la même efficacité (respectivement 60,6 et 50,8 % de réduction d'émergence à 1 mg/l pendant 10 mn). Avec un produit temps de contact x concen-

tration constant, l'efficacité a augmenté avec le temps de contact (tableaux 2 et 3). Avec un temps de contact constant (10 mn), l'efficacité du PS 10 a varié de 0 à 56,8 % pour des concentrations allant de 0,03 à 0,9 mg/l.

Phénoxycarb

A la concentration de 0,4 mg/l pendant 10 mn, ce produit a provoqué 100 % de réduction d'émergence (tableau 4). Il a une action relativement similaire à celle du méthoprène. La proportion de nymphes formées a été identique à celle des lots témoins et la mortalité est survenue essentiellement au stade nymphal ou à l'émergence des adultes qui ne parviennent pas à s'envoler. On a observé une corrélation satisfaisante entre la dose et la mortalité, et les résultats obtenus dans les deux localités sont comparables.

Triflumuron

L'efficacité de ce composé s'est avérée très limitée. Il a fallu une concentration de 2 mg/l pendant 10 mn pour obtenir une réduction d'émergence de 80 % (tableau 5). La mortalité survient au stade larvaire ainsi qu'au stade nymphal.

OMS 2016

L'efficacité de ce composé a été médiocre. A la concentration de 1 mg/l pendant 60 mn, la réduction d'émergence était seulement de 70 à 80 % (tableau 6). Il agit surtout sur les larves et on n'a observé pratiquement aucune mortalité au stade nymphal.

OMS 2017

Ce produit a provoqué 100 % de réduction d'émergence à la concentration de 1 mg/l pendant 60 mn (tableau 7). Toutefois, avec un temps de contact court (10 mn), cette efficacité n'était plus que de 51,9 %. La mortalité survient surtout au stade nymphal. On a pu noter une différence très significative dans les résultats obtenus sur les larves sensibles aux composés organophosphorés (Akakro) et sur celles résistantes (Touba). Dans ce dernier cas, lorsque la concentration est multipliée par 9, la mortalité reste inchangée. Cette dernière qui était de 100 % avec la population sensible, n'était plus que de 31 % avec la population résistante à la même concentration.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le méthoprène est beaucoup moins actif sur les larves du complexe *S. damnosum* qu'il ne l'est sur d'autres espèces de simuliés telles que *S. verecundum* et *S. venustum* (THOMPSON et ADAMS, *loc. cit.*) ou *S. canadense* (Mc KAGUE *et al.*, *loc. cit.*). Son efficacité augmente avec le temps de contact comme cela s'observe généralement avec la plupart des régulateurs de croissance. La concentration qui provoque 100 % de réduction d'émergence avec un contact de courte durée est beaucoup trop élevée pour envisager une utilisation de ce produit dans des conditions comparables à celles des insecticides conventionnels tels que l'Abate. L'efficacité limitée du méthoprène vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum* pourrait s'expliquer par une moindre sensibilité comparative aux espèces néarctiques. Parmi ces dernières, on observe déjà des différences de sensibilité importantes (THOMPSON et ADAMS *loc. cit.*).

Le phénoxy carb présente une efficacité totale avec un temps de contact court et une concentration relativement faible. Ses perspectives d'utilisation restent limitées, du moins avec la formulation actuelle. En effet, il faudrait utiliser 5 fois plus de formulation qu'avec l'Abate. Cependant il n'est pas exclu qu'une autre formulation donne de meilleurs résultats.

Le triflumuron a une efficacité médiocre contrairement à ce qui a été observé sur *S. vittatum* (LACEY et MULLA, *loc. cit.*). Il est difficile de comprendre pourquoi cet inhibiteur de chitine est, de même que le diflubenzuron, aussi peu actif sur les larves du complexe *S. damnosum* alors qu'ils présentent tous deux une toxicité remarquable pour les larves de moustiques et une toxicité acceptable pour les larves de *S. vittatum*. Là encore, la formulation peut en partie expliquer ce résultat. Parmi les formulations de diflubenzuron testées, le concentré émulsionnable (LACEY et MULLA *loc. cit.*) et les solutions (GUILLET *et al.*, 1985 b *loc. cit.*) se sont avérées moins efficaces que les formulations particulières. Toutefois, il est peu probable, au vu des résultats obtenus, que l'un de ces deux composés soit suffisamment toxique pour espérer pouvoir sélectionner une formulation utilisable.

Les deux composés fournis par Schering présentent tous deux

une efficacité trop faible pour envisager la poursuite des essais. L'OMS 2017 a bien permis d'obtenir 100 % de réduction d'émergence avec un temps de contact prolongé et une forte concentration. En revanche, avec un temps de contact court, l'efficacité est médiocre. La différence observée entre la population sensible et la population résistante aux insecticides n'a peut-être aucun lien avec le phénomène de résistance. Il importerait toutefois de réaliser d'autres tests comparatifs. En effet, il est intéressant de rappeler que certains enzymes impliqués dans les mécanismes de détoxification des insecticides organophosphorés dégradent également l'hormone juvénile et certains de ses analogues. Ce serait le cas des oxydases à fonction mixte (YU et TERRIERE, 1978), bien que leur rôle soit contestable du fait de leur large spectre d'activité. Par ailleurs elles ne semblent pas être impliquées directement dans la résistance aux composés organophosphorés chez les larves du complexe *S. damnosum* (GUILLET et KURTAK, *loc. cit.*). En revanche, certaines carboxylestérases dégradent spécifiquement l'hormone juvénile et/ou certain de ses analogues (de KORT et GRANGER, 1981). Le méthoprène par exemple, pourrait agir en bloquant la ou les estérases qui dégradent naturellement l'hormone juvénile et permettent la nymphose (DOWNER *et al.*, 1975). Ce lien éventuel entre les estérases responsables de la résistance aux composés organophosphorés chez les larves du complexe *S. damnosum* et celles responsables de la dégradation de l'hormone juvénile ou de certains de ses analogues est purement hypothétique mais méritait d'être proposé.

Aucun des produits testés au cours de ce travail n'a présenté une efficacité suffisante pour envisager une possibilité d'utilisation, du moins avec les formulations actuelles. Il en est probablement de même avec tous les mimétiques de l'hormone juvénile actifs surtout sur les larves âgées (méthoprène et phénoxy carb). Les larves du complexe *S. damnosum* ont un développement asynchrone et continu avec 25 à 30 générations par an. Dans ce contexte, leur traitement, à cet égard et à bien d'autres, pose des problèmes très différents du traitement annuel de la génération de printemps des espèces de simulies néarctiques ou paléarctiques. Seule une formulation remarquablement efficace permettrait, en augmentant les doses, de détruire les jeunes larves.

Certains des problèmes liés à l'utilisation des régulateurs de croissance, tels que le degré requis d'efficacité des traitements, l'utilisation de formulations à relargage progressif et l'évaluation de l'efficacité des traitements, ont déjà été évoqués (GUILLET *et al.*, 1985 b).

Il existe d'autres insecticides qui ont un effet régulateur de croissance avec éventuellement une toxicité immédiate. C'est le cas par exemple de l'ivermectine qui présente un niveau d'efficacité remarquable (GUILLET *et al.*, 1985 d). Un programme de criblage a été mis en place en Afrique de l'Ouest pour tester les nombreux composés régulateurs de croissance actuellement mis au point par l'industrie.

SUMMARY The efficacy of five insect growth regulators against S.damnosum complex larvae;

Five insect growth regulators were tested against late instar *S. damnosum* larvae, the vectors of onchocerciasis in West Africa. Methoprene (Altosid^R) was fully effective only with a long exposure time (1 h) and a high dosage (1 mg/l) which are unsuitable for operational use from technical and economical points of view. The efficacy of the two formulations tested (S.R. 10 and P.S. 10) was identical.

Phenoxy carb (12.5 % EC), another juvenile hormone analog, was fully active at a realistic dosage of 0.4 mg/l during 10 mn. The active ingredient content of the formulation should be increased up to 20-25 % and the efficacy tested against young instar larvae.

Triflumuron (SIR 8514, 6 % EC) and OMS 2016 (50 % WDP) were quite ineffective and did not offer any prospects for use.

OMS 2017 (25 % WDP) was as effective as methoprene. However, efficacy against organophosphate resistant populations was significantly reduced. This phenomenon should be investigated. None of the tested formulations could be used as a larvicide for onchocerciasis vector control.

KEY WORDS : Insect growth regulator, onchocerciasis, vector control.

RESUME

Aucune des cinq formulations de régulateurs de croissance testées ne présente une efficacité suffisante pour envisager son utilisation opérationnelle dans le cadre de la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose. Le phénoxy carb est toutefois relativement actif et une formulation plus concentrée devrait être testée.

MOTS CLES : régulateurs de croissance, onchocercose, lutte antivectorielle.

Concentration (mg/l) et temps de contact	0	1 5 mn	1 10 mn	1 20 mn	1 40 mn	1 80 mn
Nombre de larves utilisées	48	76	106	83	50	52
% de nymphose	83,3	63	78,3	63,9	86	44
% corrigé de réduction d'émergence	27	44,1	60,6	88,6	100	100

Tableau 1 - Altosid [®] SR 10 - (concentration constante, temps croissant).

Concentration (mg/l) et temps de contact	0	0,25 10 mn	0,125 20 mn	0,0625 40 mn	0,0312 80 mn
Nombre de larves utilisées	83	77	120	75	82
% de nymphose	89,2	70,1	51,6	85,3	63,4
% corrigé de réduction d'émergence	15,1	54,1	80,3	71,7	72,7

Tableau 2 - Altosid SR 10 - (produit temps de contact x concentration constant).

Concentration (mg/l) et temps de contact	0	1 10 mn	0,5 20 mn	0,25 40 mn	0,125 80 mn
Nombre de larves utilisées	83	91	107	78	64
% de nymphose	89,2	81,3	80,3	67,9	71,9
% corrigé de réduction d'émergence	15,1	50,8	67	68,3	81,6

Tableau 3 - Altosid PS 10 - (produit temps de contact x concentration constant).

	Touba 05-84, - 1 -				Touba 05-84, - 2 -					Akakro 11-84				
Concentration (mg/l/10mn)	0	0,2	0,4	0,8	0	0,05	0,1	0,2	0,4	0	0,01	0,033	0,1	0,33
Nb. de larves utilisées	44	65	106	88	111	100	97	75	88	58	65	147	125	121
% de nymphose	95,5	78,5	68	59	100	95	94,8	85,2	100	100	99	100	95	97
% corrigé de réduction d'émergence	4,5	98,5	100	100	20,7	50,8	90,9	96,3	100	27,6	49	92,5	95,6	96,6

Tableau 4 - Efficacité du phénoxycarb (RO 125 % EC) sur les larves de dernier stade du complexe *Simulium damnosum*.
(temps de contact 10 mn).

Concentration (mg/l)	Contact 60 mn				Contact 10 mn				
	0	0,1	0,33	1	0	0,1	0,33	1	2
Nombre de larves utilisées	137	123	121	79	137	88	101	106	94
% de nymphose	91,2	82,9	79,3	60,8	91,2	95,2	61,4	84,9	86,2
% corrigé de réduction d'émergence	38,6	28,3	40,6	64,9	38,6	0	41,8	9,2	80,9

Tableau 5 - Efficacité du triflumuron (SIR 8514, 6 % EC) sur les larves de dernier stade du complexe *Simulium damnosum*.

Concentration (mg/l)	Touba contact 60 mn				Akakro contact 60 mn			
	0	0,1	0,3	0,9	0	0,1	0,3	1
Nombre de larves utilisées	137	68	66	111	69	60	97	62
% de nymphose	99,3	85,2	87,8	37,8	92,8	55,0	51,5	48,4
% corrigé de réduction d'émergence	21,2	44,0	59,6	82,3	37,7	41,1	68,5	68,9

Tableau 6 - Efficacité d'un nouveau composé régulateur de croissance l'OMS 2016 (poudre mouillable 50 %) sur les larves de dernier stade du complexe *Simulium damnosum*.

Concentration (mg/l)	Akakro contact 60 mn				Touba contact 60 mn				Akakro contact 10 mn				
	0	0,1	0,3	1	0	0,1	0,3	0,9	0	0,1	0,3	1	2
Nombre de larves utilisées	69	38	123	57	137	52	72	114	66	90	140	80	94
% de nymphose	92,8	36,8	53,7	84,2	99,3	96,1	100	89,4	80,3	91,0	72,1	68,8	78,7
% corrigé de réduction d'émergence	37,7	62,0	89,6	100	21,2	31,7	43,7	31,1	27,3	22,0	32,2	51,9	22,4

Tableau 7 - Efficacité d'un nouveau composé régulateur de croissance l'OMS 2017 (poudre mouillable 25 %) sur les larves de dernier stade du complexe *Simulium damnosum*.

BIBLIOGRAPHIE

- AXTELL, R.C., RUTZ, D.A. et EDWARDS, T.D. - 1980. Field tests of insecticides insect growth regulators for the control of *Culex quinquefasciatus* in anaerobic annual waste lagoons. J. Amer. Mosquito Contrl. Assoc., 40,36.
- CUMMINGS, J.E. et Mc KAGUE, A.B. - 1973. Preliminary studies of effects of juvenile hormone analogues on adult emergence of black flies (Diptera : Simuliidae). Can. Entomol., 105, 509.
- DOVE, R.F. et Mc KAGUE, A.B. - 1975. Effects of insect developmental inhibitors on adult emergence of black flies (Diptera : Simuliidae). Can. Entomol., 107, 1211.
- DOWNER, R.G.H., WIEGAND, M. et SMITH, S.M. - 1975. Suppression of pupal esterase activity in *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae) by an insect growth regulator. Experientia, 31, 1239-1240.
- GARRIS, G.I. et ADKINS, T.R. - 1974. The effects of Altosid, an insect developmental inhibitor on the last instar larvae of *Simulium pictipes*. J. Amer. Mosquito Contrl. Assoc., 34, 335.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., OUEDRAOGO, M. et QUILLEVERE, D. - 1980. Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire. (Zone du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta). Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XVIII (3), 291-299.
- GUILLET, P. et KURTAK, D.C. - 1985. Cross-resistance to chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl in the larval populations of the *Simulium damnosum* complex already resistant to temephos in West Africa and its operational significance. Soumis pour publication à Tropenmed. Parasitol.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 a. Evaluation de l'activité d'un insecticide régulateur de croissance, le diflubenzuron, sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. - I - Etude de quelques facteurs conditionnant l'efficacité. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 b. Evaluation de l'activité d'un insecticide régulateur de croissance, le diflubenzuron, sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. II - Efficacité comparée de quelques formulations et résultats des essais en rivière. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 c. Méthodologie pour tester l'efficacité des formulations d'insecticides sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. - II - Composés régulateurs de croissance. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 d. Etude de l'activité de l'ivermectine sur les larves du complexe *Simulium damnosum* et de son influence sur la transmission de la filaire *Diptalomena dessetae* Bain 1973 par *Aedes aegypti*. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- de KORT, C.A. et GRANGER, N.A. - 1981. Regulation of the juvenile hormone titer. Ann. Rev. Entomol., 26, 1-28.

- KURTAK, D.C., OUEDRAOGO, M., OCRAN, M., BARRO TELE et GUILLET, P. - 1982. Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae already resistant to temephos (Abate). Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/82.850.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1978. Biological activity of diflubenzuron and three new IGRs against *Simulium vittatum* (Diptera : Simuliidae). J. Amer. mosquito Contrl. Assoc., 3,337.
- Mc KAGUE, A.B., PRIDMORE, R.B. et WOOD, P.M. - 1978. Effects of Altosid and Dimilin on black flies (Diptera : Simuliidae). Laboratory and field tests. Can. Entomologist, 110, 103.
- Mc KAGUE, A.B. et WOOD, P.M. - 1974. Effects of insect developmental inhibitors on adult emergence of black flies (Diptera : Simuliidae). Can. Entomologist, 106, 253.
- MATHIS, H.L., REE, H.I., JOLIVET, P.H.A. et SHIM, J.C. - 1975. A field trial of the insect growth inhibitors, OMS 1697 (Altosid) and OMS 1804 against *Culex pipiens* in Seoul, Korea. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/75.494.
- RODRIGUES, C.S. et WRIGHT, R.E. - 1978. Evaluation of the insect growth regulators methoprene and diflubenzuron against floodwater mosquitoes (Diptera : Culicidae) in southwestern Ontario, Canada. Can. Entomologist, 110, 319.
- SCHAEFER, C.H. et WILDER, W.H. - 1972. Insect developmental inhibitors : a practical evaluation as mosquito control agents. J. Econ. Entomol., 65 (4), 1066-1071.
- SCHAEFER, C.H. et WILDER, W.H. - 1973. Insect developmental inhibitors. 2 - Effects on target mosquito species. J. Econ. Entomol., 66 (4), 913-916.
- SCHAEFER, C.H. et DUPRAS, E.F. - 1973. Insect developmental inhibitors. 4 - Persistence of ZR-515 in water. J. Econ. Entomol., 66, 923.
- SCHAEFER, C.H., MIURA, T., MULLIGAN, F.S., III et TAKAHASHI, R.M. - 1974. Insect development inhibitors : biological activity of RE17565, RE17937 and RE18286 against mosquitoes (Diptera : Culicidae) and non-target organisms. Proceedings of the 42th annual conf. of the Calif. Mosq. Control Assoc., 24-27 février 1974, 147-151.
- SCHAEFER, C.H., MIURA, T., WILDER, W.H., MULLIGAN III, F.S. et SCHWARZ, M. - 1976. New arylterpenoid compounds with juvenile hormone activity against mosquitoes. J. Econ. Entomol., 69 (1), 119-122.
- SELF, L.S., NELSON; M.J., PANT, C.P. et SALIM USMAN. - 1978. Field trials with two insect growth regulators against *Culex quinquefasciatus*. Mosq. News, 38 (1), 74-79.
- TEN HOUTEN, A., SITI AMINAH, N., GRATZ, N.G. et MATHIS, H.L. - 1980. Pilot trial with methoprene (OMS 1697) against *Aedes aegypti* in Jakarta, Indonesia. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/80.796.
- THOMPSON, B.H. et ADAMS, B.G. - 1979. Laboratory and field trials using Altosid insect growth regulator against black flies (Diptera : Simuliidae) of Newfoundland, Canada. J. Med. Entomol., 16 (6), 536-546.
- UNDEEN, A.H. - 1979. Simuliid larval midgut pH and its implications for control. Mosq. News, 39, 391-392.
- YU, S.J. et TERRIERE, L.C. - 1978. Metabolism of juvenile hormone I by microsomal oxidase, esterase and epoxide hydrase of *Musca domestica* and some comparisons with *Phormia regina* and *Sarcophaga bullata*. Pest. Biochem. Physiol., 9, 237-246.

10

ETUDE DE L'ACTIVITE DE L'AVERMECTINE MK 936
SUR LES LARVES DES SIMULIES VECTRICES DE L'ONCHOCERCOSE
APPARTENANT AU COMPLEXE *Simulium damnosum*.

ETUDE DE L'ACTIVITE DE L'EVERMECTINE MK 936
SUR LES LARVES DES SIMULIES VECTRICES DE L'ONCHOCERCOSE
APPARTENANT AU COMPLEXE Simulium damnosum. *

P. GUILLET **
J.M. HOUGARD ***
J. DOANNIO ***
H. ESCAFFRE ***
J. DUVAL ***

INTRODUCTION

La lutte contre les vecteurs de l'onchocercose humaine en Afrique de l'Ouest repose exclusivement sur l'utilisation de larvicides appliqués à un rythme hebdomadaire sur de très vastes étendues (764 000 km² d'un seul tenant). Deux espèces du complexe Simulium damnosum, les vecteurs de l'onchocercose, ont rapidement développé une résistance au temephos (GUILLET et al., 1980), puis au chlorphoxim (KURTAK et al., 1982) et enfin une résistance croisée à la plupart des insecticides organophosphorés (KURTAK et al., 1984, GUILLET et al., 1985). Il s'est alors avéré indispensable de sélectionner d'autres larvicides chimiques qui ne présentent pas de résistance croisée avec les organophosphorés ou même avec les organochlorés pour lesquels les larves du complexe S. damnosum peuvent également développer une forte résistance (GUILLET et al., 1977).

Parallèlement aux recherches entreprises pour le développement et l'utilisation de formulations à base de Bacillus thuringiensis H14, un programme intensif de criblage de nouveaux insecticides et de nouvelles formulations a été mis en place en Afrique de l'Ouest. Les recherches se sont orientées entre autres vers de nouvelles familles d'insecticides présentant un mode d'action très différent de celui des insecticides conventionnels.

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

** ORSTOM - SSC, 70 à 74 route d'Alunay, 93140 BONDY - FRANCE

*** Institut Pierre Richet (IRTO) - BP 1500 - BOUAKE - COTE D'IVOIRE

Parmi celles-ci figurent en premier lieu les composés régulateurs de croissance. Un certain nombre d'entre eux ont été testés et se sont révélés beaucoup moins efficaces contre les larves du complexe S. damnosum qu'ils ne le sont contre les larves de moustiques (GUILLET et al., 1985 a, b et c).

Les avermectines représentent un type d'insecticide tout à fait nouveau. Ce sont des lactones macrocycliques obtenues par fermentation d'un actinomycète (Streptomyces avermitilis). Ces substances sont remarquablement toxiques vis-à-vis des nématodes, acariens et insectes (KATCHANSKY et al., 1983, PUTTER et al., 1981, CHABALA et al., 1980, BURG et al., 1979). Elles sont entre autres essayées comme microfilaricides contre un certain nombre d'espèces de filaires animales et expérimentées chez l'homme pour le traitement de l'onchocercose (AZIZ et al., 1982, COULAUD et LARIVIERE, 1982, LARIVIERE et al., 1984).

Une formulation expérimentale a été développée pour l'usage agricole (insecticide, nématicide et acaricide), l'Avermectine MK 936 B₁, en concentré émulsionnable à 18 g/l de matière active, contenant environ 80 % d'avermectine B_{1a} et 20 % de B_{1b}. Cette formulation s'est montrée très toxique pour les larves d'Aedes aegypti (CL 50 = 0,012 mg/l) et a un effet régulateur de croissance avec une forte mortalité au cours du stade nymphal. Les adultes issus de larves traitées à des doses sub-léthales (50-85 %) ne subissent aucune modification de leur capacité vectrice de Molinema dessetae Bain (GUILLET et al., 1985d).

Dans la mesure où elles représentent un type d'insecticide tout à fait nouveau, les avermectines ont été testées contre les larves de différentes espèces vectrices appartenant au complexe S. damnosum. En outre, il était intéressant de vérifier dans quelle mesure leur toxicité pouvait être affectée par la résistance aux organophosphorés.

MATERIEL ET METHODES

La formulation utilisée (concentré émulsionnable 18 g/l, lot L 676-863) a été fournie par le laboratoire de recherches sur les insectes affectant l'homme et les animaux (USDA, Gainesville, USA).

Son efficacité a été testée en mesurant d'une part l'activité larvicide, d'autre part, l'effet léthal au cours de la nymphose et de l'émergence des adultes (effet régulateur de croissance). La méthode utilisée a été décrite par ailleurs (GUILLET et al., 1985c loc. cit.). Les larves prélevées sur leurs supports naturels colonisent des plaquettes métalliques. Au moment du traitement, ces plaquettes sont introduites dans une gouttière fonctionnant en circuit fermé avec la formulation diluée dans 60 l d'eau de rivière. Après un contact de 10 mn, les plaquettes sont enlevées des gouttières de traitement et placées dans un système de déversoir alimenté par gravité avec de l'eau de rivière (circuit ouvert). Des filets permettent de récolter d'une part les larves mortes et les adultes non viables qui sont emportés par le courant, et d'autre part les adultes viables. Lorsque l'effet larvicide seul a été mesuré, la lecture a été effectuée après 24h, 48h et 72h. Pour l'effet régulateur de croissance, les adultes ont été récoltés jusqu'à ce que toutes les nymphes des lots témoins aient émergé.

Les résultats ont été exprimés en pourcentage de réduction d'émergence en fonction du nombre d'adultes viables récoltés par rapport au nombre de larves traitées. Les pourcentages de mortalité larvaire ou de réduction d'émergence ont été corrigés en fonction des témoins par la loi de combinaison des probabilités indépendantes (formule de Abbott). Les valeurs caractéristiques (CL 50) ont été calculées avec un programme d'analyse-probit (FINNEY, 1971) et l'intervalle de confiance donné au seuil de 95 %. Pour chaque série d'essais, 4 à 5 concentrations ont été testées avec 2 à 4 répétitions par concentration. Ces tests ont été réalisés d'une part avec une population larvaire mixte d'espèces sensibles et résistantes aux organophosphorés (S. damnosum s.s. et S. soubrense) et d'autre part avec une population d'une espèce sensible (S. yahense).

RESULTATS

L'Avermectine s'est avérée très toxique pour les larves du complexe S. damnosum. Les larves jeunes (stades 4 et 5) ont été nettement plus sensibles que les larves âgées (stades 6 et 7) (tableau 1). Lorsque la concentration est supérieure à 0,011 mg/l pendant 10 mn, le produit a été très irritant et a eu un effet léthal très rapide. En revanche, aux concentrations plus faibles, la mortalité a évolué lentement jusqu'à 72h après le contact. Entre 24h et 72h, on a relevé une nette diminution de la CL 50 (tableau 2).

L'Avermectine a agit également comme régulateur de croissance en provoquant une forte mortalité chez les nymphes issues des larves survivantes (tableaux 3 à 5). La mortalité totale (larvaire + nymphale) a été 4 fois plus élevée que la seule mortalité larvaire (CL 50 réduction d'émergence = 0,001 mg/l/10mn contre 0,0037 mg/l/10mn pour la mortalité larvaire) (tableaux 2, 3 et 5).

DISCUSSION - CONCLUSION

L'Avermectine agit sur les larves de simulies comme un insecticide conventionnel et a en outre un effet régulateur de croissance qui se manifeste au cours du stade nymphal. Le même type d'action a également été observé chez les larves de moustiques (GUILLET et al., 1985d loc. cit.). Cette formulation d'Avermectine figure parmi les plus toxiques jamais testées sur les larves du complexe S. damnosum. Seuls, certains pyréthrinoides tels que la deltaméthrine ou l'alphaméthrine ont une toxicité équivalente (DEJOUX et GUILLET, 1980, HOUGARD, non publié).

Les avermectines, du fait de leur large spectre d'activité, seraient probablement toxiques pour beaucoup d'organismes non cibles associés aux larves de simulies dans les eaux courantes. La matière active elle-même a une toxicité mammalienne élevée (CL 50 orale chez la souris = 13,6 mg/kg) bien que la toxicité de la formu-

lation soit plus faible (650 mg/kg). Cette dernière reste toutefois au-dessous du seuil généralement admis qui est de 1 000 mg/kg. Cette formulation a quand même été testée dans la mesure où les phénomènes de résistance aux insecticides pourraient amener les responsables de la lutte à reconsidérer progressivement les critères d'acceptabilité des formulations utilisées contre les populations résistantes.

Lorsque les meilleures formulations de B. thuringien-
sis H14 actuellement testées sur le terrain seront commercialisées, leur emploi devrait dans un proche avenir être généralisé pour les traitements de saison sèche (période de basses eaux), tandis que les larvicides chimiques ne seraient plus utilisés que ponctuellement, dans l'espace et dans le temps, en période de hautes eaux. Une alternance judicieuse entre le B. thuringiensis H14 et les larvicides chimiques, tenant compte de la recolonisation des biefs par les organismes non cible dérivant depuis les petits affluents non traités, devrait permettre, là où les phénomènes de résistance l'imposent, l'emploi ponctuel de larvicides plus toxiques que l'abate.

L'efficacité de l'Avermectine devrait être testée au cours d'essais en rivière et son effet sur les invertébrés aquatiques étudié avec soin. Etant donnée la toxicité de ce produit, la mise en oeuvre de ces essais devrait être soumise à l'approbation d'un comité d'éthique. Ces essais permettraient d'évaluer les possibilités d'utilisation ponctuelle pour le traitement de populations résistantes en période de hautes eaux. Notons toutefois que du fait de la toxicité de la matière active et de son large spectre d'activité, les perspectives d'utilisation apparaissent a priori très limitées.

SUMMARY

Avermectine MK 936 (18 g/l EC) was one of the most effective larvicide ever tested against S. damnosum complex larvae, the vectors of onchocerciasis in West Africa. This insecticide is working as an insect growth regulator and the LC 50 and LC 95 were respectively 0.00097 and 0,0027mg/l based on the reduction of adult emergence after a 10 mn exposure time. Its efficacy should be tested under field conditions and its toxicity against non target organisms carefully assessed. However, due to its broad spectrum and high level of activity, the prospects for spraying Avermectine in the rivers for onchocerciasis control appears to be a-priori very limited.

KEY WORDS : Avermectine, larvicide, onchocerciasis, vector control.

RESUME

L'Avermectine est l'un des larvicides les plus toxiques jamais testés contre les larves du complexe S. damnosum, les vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. Elle agit comme un insecticide régulateur de croissance. Les perspectives d'utilisation ponctuelle de l'Avermectine contre les populations résistantes aux organophosphorés apparaissent très limitées du fait de sa toxicité et de son large spectre d'activité.

MOTS CLES : Avermectine, larvicide, onchocercose, lutte.

Concentration (mg/l/10mn)	% corrigés de mortalité des larves		
	Larves jeunes stades 4 et 5	Larves âgées stades 6 et 7	Total stades 4 à 7
0,001	100 (11) *	30 (200)	34,9 (211)
0,0033	92,9 (75)	38,2 (151)	57,1 (226)
0,01	94,9 (42)	87,5 (118)	89,5 (160)
0,033	100 (37)	99,2 (138)	99,4 (175)
0,1	100 (5)	99,3 (167)	99,4 (172)
0	6,1 (33)	12,2 (82)	10,4 (115)
CL 50		0,0038 (34-43)	0,0029 (24-35)

Tableau 1 - Activité immédiate de l'Avermectine sur les larves de Simulium yahense.

(contact 10 mn, lecture après 48h, température 24°C, turbidité de l'eau < 5 JTU)

* () nombre de larves testées

Concentration (mg/l/10mn)	% corrigés de mortalité des larves		
	24h	48h	72h
0,0019	6,5	24	38,5
0,0037	17,2	39,7	45,7
0,011	74,6	88,1	89
0,033	96,4	99,3	99,3
CL 50	0,0075 (60-80)	0,0046 (40-49)	0,0037 (30-40)

Tableau 2 - Evolution de la mortalité des larves de S. yahense 24h, 48h et 72h après le traitement.

(larves âgées de stades 6 et 7, contact 10 mn, température 26°C, turbidité de l'eau < 5 JTU)

Concentration (mg/l/10mn)	0	0,0003	0,0006	0,0012	0,0024	0,0048
Nb. de larves testées	86	154	63	83	107	118
% de nymphose	90,7	74	63,5	28,9	10,3	0,8
% de mortalité nymphale	15,4	15,8	32,5	29	72,7	100
% corrigé de réduction d'émergence	23,3	18,6	43,9	73,1	89,9	100

Tableau 3 - Activité de l'Avermectine sur un mélange de larves de stades 6 et 7 de S. damnosum s.s. sensibles et S. soubrense résistantes aux insecticides organophosphorés. (temps de contact 10 mn, lecture en fin d'émergence).

CL réduction d'émergence à 50 % = 0,00097 mg/l/10mn (0,00095-0,0010).

Concentration (mg/l/10mn)	larves jeunes					larves âgées				
	0	0,0006	0,0012	0,0024	0,0048	0	0,0006	0,0012	0,0024	0,0048
Nb. de larves testées	97	47	85	86	62	137	74	122	103	102
% de nymphose	81,4	59,6	12,9	9,3	0	99,2	70,2	33,6	48,5	20,5
% de mortalité nymphale	17,7	89,3	63,6	100	-	20,6	63,5	87,8	100	95,2
% corrigé de réduction d'émergence	33	90,4	93,0	100	100	21,1	67,4	94,8	100	98,7

Tableau 4 - Activité comparée de l'Avermectine sur des larves jeunes (stades 2 à 5) et âgées (stades 6-7) de S. damnosum s.s. sensibles et S. soubrense résistantes aux insecticides organophosphorés.

(temps de contact 10 mn, lecture en fin d'émergence).

Concentration (mg/l/10mn)	0	0,001	0,0033	0,01
Nb. larves testées	155	277	344	254
% de nymphose	100	74,7	8	3,5
% mortalité nymphale	32,9	44,9	39,3	-
% corrigé réduction d'émergence	32,9	50,0	95,2	99,4

Tableau 5 - Activité de l'Avermectine sur des larves de stades 6 et 7 de S. yahense sensibles aux insecticides organophosphorés.

(lecture en fin d'émergence)

CL réduction émergence à 50 % = 0,0010 mg/l
(0,00098-0,0012)

BIBLIOGRAPHIE

- BURG, R.W. et al. - 1979. Avermectins, a new family of potent anthelmintic agents : producing organism and fermentation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15 (3), 361-367.
- CHABALA, J.C. et al. - 1980. Ivermectin, a new broad spectrum antiparasitic agent. *J. of medical Chemistry*, 23 (10), 1134-1136.
- COULAUD, J. et LARIVIERE, M. - 1982. Traitement de l'onchocercose par une dose unique de 50 mcg/kg d'Ivermectine. In: *Ophthalmologie tropicale et onchocercose. Journées de l'hôpital Claude Bernard, Paris*, 235-237.
- DEJOUX, C. et GUILLET, P. - 1980. Evaluation of new blackfly larvicides for use in onchocerciasis control in West Africa. *Doc. mim. OMS, WHO/VBC/80.783*.
- FINNEY, D.J. - 1971. *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 333p.
- GUILLET, P., MOUCHET, J. et GREBAUT, S. - 1977. DDT resistance in Simulium damnosum s.l. (Diptera : Simuliidae) in West Africa. *Doc. mim. OMS, WHO/VBC/77.678*.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., OUEDRAOGO, M. et QUILLEVERE, D. - 1980. Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe Simulium damnosum (S. sanctipauli et S. soubrense) en Côte d'Ivoire. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, XVIII (3), 291-298.
- GUILLET, P. et KURTAK, D.C. - 1985. Cross-resistance to chlorpyrifos-methyl pirimiphos-methyl in the larval populations of the Simulium damnosum complex already resistant to temephos in West Africa and its operational significance. *Tropenmed. Parasitol.* (soumis pour publication).
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J.M., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 a. Evaluation de l'activité d'un insecticide régulateur de croissance, le diflubenzuron, sur les larves du complexe Simulium damnosum. I - Etude de quelques facteurs conditionnant l'efficacité. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, (soumis pour pub.).
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 b. Evaluation de l'activité d'un insecticide régulateur de croissance, le diflubenzuron, sur les larves du complexe Simulium damnosum. II - Efficacité comparée de quelques formulations et résultats des essais en rivière. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, (soumis pour publication).
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 c. Evaluation de l'activité de cinq insecticides régulateurs de croissance sur les larves du complexe Simulium damnosum. *Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.*, (Soumis pour public.).

- GUILLET, P., SANNIER, C., BARRATHE, J. et ANDRE, M. - 1985 d. Etude de la toxicité de l'Avermectine MK 936 pour les larves d'Aedes aegypti et de son influence sur la transmission de la filaire Molnema dessetae. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., (soumis pour publication).
- KATCHANSKY, M.K., SLONIM, Y.S. et SCHECKNES, Z.S. - 1983. Avermectin, a new insecticide and miticide. *Phytoparasita.*, 11 (2).
- KURTAK, D.C., OUEDRAOGO, M., OCRAN, M., BARRO TELE et GUILLET, P. - 1982. Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in Simulium soubrense/sanctipauli larvae already resistant to téméphos (Abate (R)). Doc. mim. OMS, WHO/VBC/82.850.
- KURTAK, D.C. et al. - 1984. Resistance to insecticides in the Simulium damnosum complex. Operational consequences, development of new chemicals and formulations. Abstract, XI International Congress for Tropical Medecine and Malaria, Calgary, Canada, September 16 - 22, 79.
- LARIVIERE, M . - 1984.
- PUTTER, I., McCONNELL, J.G., PREISER, F.A., HAIDRI, A.A., RICTICH, S.S. et DYBAS, R.A. - 1981. Avermectins : novel insecticides, acaricides and nematicides from a soil micro-organism. *Experientia*, 37, 963-964.
-

11

ETUDE DE LA TOXICITE DE L'AVERMECTINE MK 936

POUR LES LARVES D'*Aedes aegypti*

ET DE SON INFLUENCE SUR LA TRANSMISSION DE LA FILAIRE

Molinema dessetae Bain.

ETUDE DE LA TOXICITE DE L'AVERMECTINE MK 936
POUR LES LARVES D'*Aedes aegypti*
ET DE SON INFLUENCE SUR LA TRANSMISSION DE LA FILAIRE
Molinema dessetae Bain.

P. GUILLET *
C. SANNIER *
J. BARRATHE *
M. ANDRE *

INTRODUCTION

La lutte contre les moustiques, qu'il s'agisse d'espèces vectrices de maladies ou responsables de nuisances, se heurte fréquemment aux problèmes posés par le développement des phénomènes de résistance aux insecticides. Les responsables d'opérations de lutte sont souvent amenés à rechercher de nouveaux insecticides ayant si possible un mode d'action radicalement différent de celui des insecticides conventionnels, ne présentant donc pas de phénomène de résistance croisée. C'est le cas des avermectines, lactones macrocycliques, obtenues par fermentation d'un actinomycète (*Streptomyces avermitilis*). Ces substances ont un large spectre d'activité filaricide, insecticide et acaricide (BURG *et al.*, 1979, CHABALA *et al.*, 1980, PUTTER *et al.*, 1981, KATCHANSKY *et al.*, 1983).

Les avermectines sont actives notamment sur les microfilaraires d'*Onchocerca volvulus*, l'agent de l'onchocercose humaine (AZIZ *et al.*, 1982, COULAUD et LARIVIERE, 1982, ROUGEMONT, 1982, LARIVIERE *et al.*, 1984, PROD'HON *et al.*, 1984). Les microfilaraires d'autres espèces telles que *Dirofilaria immitis* (ANANTAPHRUTI *et al.*, 1983, BLAIR *et al.*, 1983), *Onchocerca lienalis* et *Brugia pahangi* (DEVANEY et HOWELLS, 1984), *Dipetalonema reconditum* (LINDEMAN *et al.*, 1983), sont également très sensibles.

* ORSTOM - SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 - BONDY - FRANCE

Elles agissent également sur les larves de stade 3 de *D. immitis* (BLAIR et CAMPBELL, 1980, BLAIR *et al.*, 1982).

Les avermectines sont aussi très toxiques contre les acariens (tiques, sarcoptes) et les insectes. Elles peuvent agir soit directement sur les parasites internes tels que les larves d'oestridae (oestres et hypodermes) (DRUMMOND *et al.*, 1985), soit comme systémique. Cette action systémique a été mise en évidence avec des glossines gorgées sur chèvres ou lapins traités (DISTELMANS *et al.*, 1983, Anonyme, 1984) et aussi avec des moustiques gorgés sur homme traité avec l'ivermectine (HOUGARD et PROD'HON, 1985).

Dans tous les cas, les avermectines agissent à des doses très faibles, mais beaucoup plus lentement que d'autres filaricides ou insecticides. Il était donc intéressant de tester leur activité sur les larves de moustiques. Par ailleurs, tenant compte de leur toxicité remarquable pour les larves de filaires (microfilaires et stades infestants), on a recherché si elles n'avaient pas d'influence sur la capacité vectrice de moustiques issus de larves traitées à des doses subléthales (DL : 60 à 85 %). Cette étude a été réalisée avec la filaire *Molinema dessetae* (Bain, 1973) du rongeur *Proechimys oris* transmise par *Aedes aegypti*.

MATERIEL ET METHODES

La formulation utilisée était l'Avermectine MK 936 B1 en concentré émulsionnable à 18 g/l (lot L 676-863) fournie par le Laboratoire de Recherches sur les Insectes affectant l'Homme et les Animaux (Gainesville, USA). La matière active a une DL 50 orale chez la souris de 13,6 mg/kg et la formulation de 650 mg/kg. La formulation contient environ 80 % d'Avermectine B1a et 20 % de B1b.

L'activité insecticide a été testée sur des larves d'*A. aegypti* souche Gkep (originaire du Ghana) du quatrième stade larvaire.

Les larves ont été exposées pendant 24 h par lots de 25 dans des gobelets contenant 200 ml d'eau bipermutée, sans nourriture. Elles ont été ensuite rincées et mises en observation jusqu'à ce que toutes les nymphes aient éclos ou soient mortes. Les adultes viables ont été récoltés quotidiennement.

Les résultats ont été exprimés d'une part en pourcentages de mortalité des larves, d'autre part, en pourcentages de réduction d'émergence en fonction du nombre d'adultes viables récoltés par rapport au nombre de larves traitées. Les résultats ont été corrigés en tenant compte des lots témoins avec la loi de combinaison des probabilités indépendantes (formule de Abbott). Trois essais successifs ont été réalisés, chaque essai comprenant 6 concentrations avec 4 lots de 25 larves par concentration. Les valeurs caractéristiques (CL 50 et CL 95) ont été calculées avec un programme d'analyse-probit (FINNEY, 1971) et leurs intervalles de confiance donnés au seuil de 95 %.

Afin d'étudier l'influence de l'Avermectine sur la transmission de la filaire, nous avons dans un premier temps testé la capacité vectrice de notre souche de référence (Bora Bora), comparativement à la souche Gkep fournie par le Muséum d'Histoire Naturelle de Paris. Des lots de femelles ont été gorgés 4 jours après l'émergence sur des hôtes filariens. Les femelles des deux souches ont été gorgées sur le même hôte entre 12 h et 14 h, cette période correspondant au pic diurne de la microfilarémie (PETIT *et al.*, 1977). La microfilarémie a été contrôlée avant le premier repas infestant par ponction de 10 μ l de sang au sinus oculaire. Les femelles de moustiques en état de réplétion ont été sélectionnées et conservées pendant 25 jours à 25° C. Tous les deux jours pendant 15 jours, un cobaye a été placé sur les cages. Au delà, les femelles ne sont plus nourries que de jus sucré. Au 25ème jour, les femelles ont été disséquées dans de l'eau physiologique, tête, thorax et abdomen séparément. Cet essai a été répété trois fois.

Pour l'étude de l'influence de l'Avermectine, des lots de 1500 larves de stade 4 ont été exposés pendant 24 h à des doses subléthales, respectivement à 1×10^{-2} , 2×10^{-2} et 4×10^{-2} mg/l.

Les adultes issus des lots traités, ainsi que ceux des lots témoins, ont été séparés en deux groupes en fonction de leur date d'émergence et gorgés sur hôte filarien au plus tard 4 jours après. La procédure suivie ensuite a été celle décrite plus haut.

RESULTATS

L'Avermectine a présenté une toxicité relativement élevée pour les larves d'*A. aegypti* avec une CL 50 et une CL 95 respectivement de 0,027 (0,023 - 0,031) et 0,28 (0,20 - 0,41) mg/l. L'effet toxique du produit ne s'est manifesté qu'après un délai de 24 h et de façon très progressive. La mortalité au stade nymphal a été importante, notamment aux faibles concentrations où elle dépasse la mortalité larvaire (tableau 1). Les concentrations léthales qui ont provoqué respectivement 50 % et 95 % de réduction d'émergence ont été de 0,012 (0,011 - 0,013) et de 0,047 (0,040 - 0,056) mg/l.

Contrairement à la souche Gkep, la souche Bora Bora n'a pas transmis *M. dessetae* (tableau 2). Les femelles se sont pourtant bien gorgées ; le niveau auquel s'effectue le barrage n'a pas été recherché.

Les femelles issues de larves traitées à des doses d'Avermectine provoquant 60 à 85 % de réduction d'émergence ont eu une capacité vectrice identique à celle de femelles provenant de larves non traitées. Le nombre moyen de stades infestants (larves de stade 3 dans la tête) et leur proportion par rapport au nombre total de stades évolutifs ne sont pas significativement différents dans les lots traités et dans les témoins (tableaux 3 à 5). Lors de la troisième expérimentation, le nombre moyen de stades infestants a été inférieur dans le lot traité, mais l'effectif (8) était trop faible pour que la différence soit significative (tableau 5).

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'Avermectine présente une double action sur les larves de moustiques. Elle a d'une part une toxicité pour les larves, qui se manifeste plus lentement que celle des insecticides conventionnels, et d'autre part, un effet retard qui se manifeste sur les nymphes plusieurs jours après le traitement. On peut à ce titre la considérer comme un insecticide régulateur de croissance. Un effet analogue a été montré chez les larves de simulies (GUILLET *et al.*, 1985).

Si l'on tient compte de la toxicité relativement élevée de la formulation et de son spectre d'activité, ses perspectives d'utilisation dans les milieux aquatiques naturels où se développent les larves de moustiques apparaissent relativement limitées. Toutefois, dans certains milieux clos comme les gîtes larvaires hypogés à *Culex pipiens pipiens* et *C. quinquefasciatus*, l'utilisation de produits relativement toxiques pourrait être envisagée. La résistance au Dursban [®] (chlorpyrifos) touche un nombre sans cesse croissant de populations de moustiques urbains et il est indispensable de sélectionner des insecticides de remplacement aussi performants. La toxicité et la rémanence de l'Avermectine dans ce type de gîtes devrait être évaluée. Il est par ailleurs peu probable qu'existe une résistance croisée avec les insecticides conventionnels. Dans le cas des simulies, la résistance aux organophosphorés n'affecte pas l'efficacité de l'Avermectine (GUILLET *et al.*, *loc. cit.*).

La spécificité de la souche Gkep dans la transmission de *M. dessetae* déjà mentionnée par PETIT *et al.* (*loc. cit.*), a été confirmée au cours de cette étude. En revanche, le nombre moyen de larves infestantes après 25 jours a été significativement plus élevé que celui mentionné par ces auteurs (8-11 contre 5-7).

Les avermectines, bien qu'agissant à des doses infinitésimales sur les larves de filaires (50 µg, BLAIR et CAMPBELL, *loc. cit.*) et d'insectes (0,1 µg chez les oestres, DRUMMOND, *loc. cit.*), n'ont eu,

dans le cadre de cette étude, aucun effet sur le pouvoir vecteur de moustiques issus de larves traitées. La matière active ne doit pas passer chez l'adulte, ou alors en quantités insuffisantes pour affecter le développement des larves de *M. dessetae*. L'effet des insecticides sur la capacité vectrice d'insectes issus de larves traitées n'a jamais été mis en évidence, mais peu de travaux ont été réalisés sur ce sujet (PRASITTISUK *et al.*, 1982, KARCH, 1984 avec la transmission de *Plasmodium yoelii* par *Anopheles stephensi*).

Bien qu'aucun effet sur la transmission n'ait été mis en évidence, ce type d'étude réalisée avec le modèle *M. dessetae*-*P. oris*-*A. aegypti* pourrait être repris avec d'autres modèles, notamment *Aedes polynesiensis* ou *Culex quinquefasciatus*, vecteurs de *Wuchereria bancrofti*, gorgés sur appât humain filarien. Si la capacité vectrice d'adultes issus de larves traitées à des doses provoquant 80 à 90 % de mortalité était altérée, cela permettrait d'envisager l'utilisation des insecticides à des doses 2 à 4 fois plus faibles, et donc de limiter leur impact sur l'environnement. Une telle hypothèse, bien que peu vraisemblable, mériterait d'être vérifiée.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le laboratoire de zoologie des vers du Muséum d'Histoire Naturelle de Paris qui nous a fourni la souche Gkep d' *A. aegypti*, ainsi que des *Proechimys* infestés, pour la réalisation de ce travail.

Nous remercions aussi vivement O. Bain qui a eu la gentillesse de nous familiariser avec le modèle hôte-vecteur-parasite utilisé dans la présente étude.

SUMMARY

The toxicity of Avermectine was tested against fourth instar Aedes aegypti larvae. The LC 50 and LC 95 were respectively 0,012 and 0,047 mg/l based on the reduction of adult emergence. This compound was toxic also against pupae and was working as an insect growth regulator.

Due to its broad spectrum and high level of activity, Avermectine could probably not be used as a larvicide against mosquitoes in most of their breeding places. However, its activity and residual efficacy should be tested in highly polluted water against Culex quinquefasciatus larvae as a replacement insecticide for the treatment of Dursban (chlorpyrifos) resistant populations.

The exposure of larvae to LC 60-85 (24h exposure) did not affect the transmission of Molinema dessetae by females emerged from surviving larvae.

KEY WORDS : Avermectine, A. aegypti, larvicide, M. dessetae, transmission.

RESUME

L'Avermectine agit à très faible dosage sur les larves d'A. aegypti comme un insecticide régulateur de croissance. Le traitement des larves à des concentrations provoquant 60 à 85 % de réduction d'émergence n'affecte pas la transmission de M. dessetae par les femelles issues des larves survivantes.

MOTS CLES : Avermectine, A. aegypti, larvicide, M. dessetae, transmission.

	Concentration (mg/l)						
	0	0,09	0,023	0,009	0,0056	0,0045	0,0014
% mortalité larvaire	5	78	49,8	31,2	15,2	19,4	2,8
% mortalité nymphale	19	22	33,2	16,8	21,8	17,6	16,2
% réduction émergence							
- brut	24	100	83	48	37	37	19
- corrigé	-	100	77,6	31,6	17,1	17,1	0

Tableau 1 - Activité de l'Avermectine MK 936 sur les larves de stade 4 d'Aedes aegypti souche Gkep et sur l'émergence des adultes.

(résultats d'un triple essai, chaque essai portant sur 4 répétitions de 25 larves par concentration)

Série	Sujet	Microflarémie (mf/10 µl sang)	Nombre moyen de stades infestants dans la tête	
			Gkep	Bora Bora
1	1	413	7,7 (25)*	0 (17)
2	1	320	4,9 (18)	0 (16)
3	2	377	8,0 (22)	0 (21)

* nombre de femelles de moustiques disséquées.

Tableau 2 - Nombre moyen de larves infestantes de Molinema dessetae transmises par deux souches différentes d'Aedes aegypti gorgées sur Proechimys oris infestés.

Tableaux 3 à 5 - Infestation comparée par *Molinema dessetae* de femelles d'*Aedes aegypti* souche Gkep provenant de larves non traitées et de larves traitées pendant 24h avec l'Avermectine à trois concentrations différentes.

(les femelles ont été disséquées 25 jours après le repas infestant)

lot	microfilarémie (mf/10 µl sang)	traité (B)			témoin (A)		
		moyenne L ₂ + L ₃ *	moyenne L ₃ tête	% dans tête	moyenne L ₂ + L ₃ *	moyenne L ₃ tête	% dans tête
hôte 1	347	19,5 (18)**	9	46,2 ± 5,3 ***	13,8 (22)	11,2	66,4 ± 5,4
hôte 2	378	20,7 (25)	8,9	43,3 ± 4,4	17,7 (18)	10,1	57,1 ± 5,5

* tête + thorax + abdomen

** nb. de moustiques disséqués

*** intervalle de confiance 95 %

(A) : % de réduction d'émergence = 20,7

(B) : % corrigé de réduction d'émergence = 59,9

Tableau 3 - Première série d'essais : traitement à 0,01 mg/l pendant 24h.

lot	microfilarémie (mf/10 µl sang)	traité (B)			témoin (A)		
		moyenne L ₂ + L ₃ *	moyenne L ₃ tête	% dans tête	moyenne L ₂ + L ₃ *	moyenne L ₃ tête	% dans tête
hôte 1	456	15,1 (19)**	10,8	71,5 ± 5,3 ***	11,1 (18)	8	72,1 ± 6,3
hôte 2	384	15,7 (19)	9,3	59,2 ± 5,7	17 (19)	10,5	61,8 ± 5,4

(A) : % réduction d'émergence = 14,2
(B) : % corrigé de réduction d'émergence = 66,4

1
10
1

Tableau 4 - Deuxième série d'essais : traitement à 0,02 mg/l pendant 24h.

- 222 -

lot	microfilarémie (mf/10 µl sang)	traité (B)			témoin (A)		
		moyenne L ₂ + L ₃ *	moyenne L ₃ tête	% dans tête	moyenne L ₂ + L ₃ *	moyenne L ₃ tête	% dans tête
hôte 2	329	14,5 (8)**	8,9	61,4 ± 9 ***	17,5 (20)	12,2	69,7 ± 4,9

(A) : % de réduction d'émergence = 26,4
(B) : % corrigé de réduction d'émergence = 85,3

Tableau 5 - Troisième série d'essais : traitement à 0,04 mg/l pendant 24h.

* tête + thorax + abdomen
** nb. de moustiques disséqués
*** intervalle de confiance 95 %

RECHERCHES SUR LE *Bacillus thuringiensis* H14
ET PERSPECTIVES OFFERTES PAR LA LUTTE BIOLOGIQUE.

12

ENDOTOXIN OF *Bacillus thuringiensis* H14 :

MODE OF ACTION, FORMULATION AND APPLICATION

AGAINST MOSQUITO AND BLACKFLY LARVAE.

INTERNATIONAL SOCIETY ON TOXINOLOGY
EUROPEAN SECTION

PROCEEDINGS OF THE 6th EUROPEAN SYMPOSIUM
ON ANIMAL, PLANT AND MICROBIAL TOXINS.

Basle, 1984.

ENDOTOXIN OF *Bacillus thuringiensis* H14 :
MODE OF ACTION, FORMULATION AND APPLICATION
AGAINST MOSQUITO AND BLACKFLY LARVAE.
(p. 21 - 31)

P. GUILLET

Trypanosomiasis and Onchocerciasis Research Institute
BP 155 - BOUAKE (IVORY COAST).

Endotoxin of Bacillus thuringiensis H14 : mode of action, formulation
and application against mosquito and blackfly larvae

P. GUILLET

Trypanosomiasis and Onchocerciasis Research Institute
B.P. 1500 - BOUAKE (IVORY-COAST).

Bacillus thuringiensis H14 was isolated in 1977 in Israel from a mosquito breeding pond (1). This isolate was subsequently described as serotype H14, variety israelensis in 1978 (2). The H14 serotype, practically without activity against the larval stage of Lepidoptera was proved to be highly toxic for larvae of a wide range of mosquito (1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8) and black fly species (9, 10, 11).

1. MODE OF ACTION.

Contrary to other serotypes, B.t. H14 produces crystals pleomorphic in shape and size (2). These crystals present a composite structure with several components or subunits differing in size and electron density that may be found separately or in a single inclusion and surrounded by an envelope (12). The larvicidal activity is exclusively associated with the toxin in the crystals and spores are not involved in the intoxication process (3, 13, 14). The δ -endotoxin is a high molecular weight protoxin which is, upon ingestion by susceptible larvae, very rapidly cleaved in smaller subunits in the presence of alkaline pH and suitable proteolytic enzymes in the gut (13, 15, 16, 17).

Very little is known on the mode of action of the toxin. Immediately after ingestion crystals are splitted and 30mn after most of them in the anterior stomach are dissolved and only empty envelopes can be found (18). The pathogenesis observed in mosquito larvae is relatively similar to that seen in Lepidoptera except that with the former death is extremely rapid (15 to 20mn with blackfly larvae treated at LC 100). The midgut epithelium is the main site affected by the toxin (19). Cells of gastric caeca and posterior stomach specialized in the absorption of amino acids and proteins are the most susceptible and are first affected. The first symptoms (cellular hypertrophy and epithelial lysis) are rapidly followed by a complete destruction of the midgut

epithelium (18, 20). It is generally accepted that the toxin of Lepidoptera active serotypes (20, 21, 22) as well as H14 serotype (23) interferes with the ability of larval midgut epithelium to regulate ion permeability. Pathogenesis in black fly larvae is similar to that observed in mosquito larvae (24).

2. PROSPECTS FOR USE UN VECTOR CONTROL.

B.t. H14 presents most of the characteristics required for use as a larvicide in the field of vector control :

- Toxicity : as already mentioned, B.t. H14 is highly toxic for a wide range of mosquito and black fly species. Among mosquitos, Aedes and Culex are more susceptible than Anopheles (this is probably due to the surface feeding habits of anopheline larvae). Different strains of a same species like A.aegypti may present significative differences in their susceptibility to B.t. H14 (7, 25). Variations have also been recorded between different Simulium species (26, 27). Young larvae of mosquito and black fly are 8 to 10 times more susceptible than late instar (11, 27, 28, 29, 30). The efficacy of B.t. H14 is not significantly affected by environmental conditions such as temperature, pH, salinity as long as they remain in their natural range of variations (31, 32, 33, 34). On the other hand, when these factors perturb the normal feeding behaviour of larvae they interfere with efficacy of B.t. H14 (27, 35, 36).

- Stability : the stability of the δ -endotoxin of B.t. H14 is well known, heat stability (1, 3, 4, 5, 37) and storage stability of powders (38, 39, 40) as well as aqueous suspensions (31, 41). Limited data concerning stability of commercial formulations are available. In one study (42) the half-lives of 3 formulations : 1 water dispersible concentrate (W.D.C.) and 2 vettable powders, were respectively 18, 7 and 6 days at 50° C and it was concluded that B.t. H14 formulations are much less stable than the kurstaki formulations. The stability of the same above mentioned W.D.C. was tested in Ivory Coast and it was proved that drums can be stored in the field more than 16 months right in the sun without any loss of efficacy against black fly larvae (43). Actually drums are routinely stored several months in the sun in the Onchocerciasis Control Programme (OCP) in the Volta region area in West Africa and remain fully effective.

- Selectivity : extensive studies have been carried out in the laboratory (mammal safety testing) as well as in the field (environmental safety). They clearly indicate that B.t. H14 is non toxic and non pathogenic to mammals and poses no significant health hazard. It appears also innocuous to nearly all non target organisms by direct challenge in mosquito as well as in black fly larvae breeding environment. Recently it was shown that hydrolyzed toxin is highly toxic for mice upon injection (44). It is not known whether or not the fraction (polypeptide) active against diptera upon ingestion and mammals upon injection are the same. However this information has no practical incidence on the use of B.t. H14 in vector control operations.

Prospects for the development of a resistance : no significant difference in the response to B.t. H14 occurs between insecticide- susceptible and - resistant strains of mosquitos whatever detoxification process involved (dehydrochlorinases, oxidases, esterases, GSH-transferases) (45). The susceptibility of the S.damnosum complex larvae to B.t. H14 is not affected by resistance to organophosphorous compounds (46, 47). The potential for the development of a resistance has been tested using Culex quinquefasciatus larvae. A total of 36 generations have been completed to date under selection pressure. A slightly increased tolerance to B.t. H14 was noted following the ninth generation but larvae recover normal susceptibility immediately after selection pressure have stopped (48). Conclusions allow for optimism regarding the effective use life of B.t. H14.

Mass production : a very rapid advance has been noted in the development of mass production of B.t. H14 adapted from techniques used in the production of other serotypes. In 1982, 600,000 l of formulation have been produced for use in the OCP in West Africa. The quality of 32 batches (about 10,000 l each) was controlled through bioassay with both A.aegypti and Simulium larvae and was proved to be very satisfactory and constant (49).

3. DEVELOPMENT OF FORMULATIONS AND FIELD APPLICATION.

B.t. H14 must be properly formulated to be used against mosquito and black fly larvae. The main role of the formulation is to present the toxin in particles readily ingestible by larvae, to allow spraying and

then to maintain the particles in the larval feeding zone. Formulations are obtained from primary ferment material either in liquid form by direct concentration (water dispersible concentrate, flowable) or spray-dried powders (wetable powders, granules, slow-release briquettes). Problems involved in the development of suitable formulations vary significantly according to the target and requirement for operational spraying.

3.1. Mosquitos.

First series of laboratory experimentations have clearly demonstrated that the activity of B.t. H14 preparations against mosquito larvae was not related to the concentration expressed in weight/volume (e.g. mg/l) as usual with conventional insecticides but in weight/surface (e.g. g/m² or Kg/Ha). This is due to the insolubility of the toxin in water and in most of conventional solvents. For the same reason, activity is negatively correlated with larval density (32, 50, 51). Activity is also highly dependant on water turbidity and nature of the substratum in breeding sites or containers. When used in turbid water, B.t. H14 loses most of its activity. That can be explained by a trophic competition by larvae between natural matters and B.t. H14 particles or binding of crystals with natural particles which accelerates settling rate. When crystals have sunk, they are no longer available to kill larvae, either they are degraded by microorganisms or more simply covered by sediment and out of the larval feeding zone (32, 34, 52, 53).

These observations explain most of the results obtained in the field. B.t. H14 has been tested in a very wide range of mosquito habitats : irrigated pastures (28, 34, 55, 56), rice fields (57, 58, 59, 60, 61, 62), brackish water and salt marshes (33, 63, 64, 65, 66, 67), lagoons (68), wood land and snow pools (69, 70), tree holes (6, 71), tyres and containers (6, 71, 72, 73), and polluted environment : dairy lagoons, storm drains, septic tanks, cess pits, drains (34, 54, 56, 57, 63, 66, 74, 75, 76, 77, 78, 79). Dosages to apply vary from 0.2 to 10 Kg/Ha according to the nature of breeding site and the formulation used. The residual activity of conventional formulations (wetable powders or liquid suspensions) is very short (1 to 3 days) whatever dosages applied. Usually, treatments must be repeated weekly. In polluted environment, dosages must be increased 2 to 4 times and a tremendous increase

in dosages (e.g. 200 times) do not extend significantly residual activity. B.t. H14 has some persistence in clear water breeding sites without sediment like tyres and small containers.

With recently improved formulations it is possible to achieve a complete control, at least in clear water habitats, using no more than 0.1 Kg/Ha (80). Breeding sites covered by a plant canopy remains difficult to treat with conventional formulations. They can be treated from now with new granules formulations which give satisfactory results with 5 to 10 Kg/Ha. Adsorption of B.t. H14 powder on a substrate like sand provides excellent results in polluted environment with only 0.15 Kg/Ha (81). New slow release briquettes are presently under field evaluation. With a rate of 1 briquette / 70-80 M² a good control could be achieved with a significant increase in residual activity. Briquettes could also be very useful to control containers-breeding mosquitos (82).

From a general point of view, the improvement of B.t. H14 larvicides for mosquito control relates principally to the physical characteristics of formulations. From most of laboratory bioassays it appears that field efficacy of formulations is not correlated with potency in A.aegypti I.U./mg determined by standard titration in the laboratory. It is common to find a 200 I.U./mg formulation more effective in the field than a 5,000 I.U./mg one. The production of very high potency primary products is now feasible and will probably represent a non negligible part of the improvement of formulations. But firstly physical characteristics of formulations must be improved according to the feeding biology of the target and particularities of its breeding environment. At that time dosages in I.U./Ha could be significantly reduced, residual activity extended and then B.t. H14 could be used in a really cost effective manner.

3.2. Black flies.

Contrary to mosquitos, black fly larvae are breeding in fast running water. They stay firmly attached on supports and collect food by filtration of suspended particles drifting in the river water by means of specialized cephalic fans. Larvae indistinctly ingest all kind of particles in a range from 0.1 μ to 200 μ approximatively. Big particles are trapped in cephalic fans by direct interception (active filtration). Ingestion

depends on size and concistence of particles and on the larval stage. Fine particles (0.1 to 5 μ) are trapped by an other mechanism. They are sticked on a muco-substance which coats the inner part of cephalic fans (passive filtration) and are more or less retained according to their physico-chemical properties like electro-static charge.

The only practical way to control black flies, almost in tropical area, is to suppress larval populations. Suitable larvicides are poured in the rivers immediately upstream the larval breeding sites. Contact between larvae and formulation is usually very brief. The efficacy of a black fly larvicide is estimated by the dosage itself (usually in mg/l applied to the discharge of the river during 10mn : mg/l/10mn) and the carry, a very important parameter, which is the distance downstream the treatment point along which the larvicide remains fully effective. Carry is usualy dependant on the discharge of the treated river but a great deal also on the formulation itself. A formulation may present a satisfactory level of efficacy but a very short carry whatever discharge rate.

First laboratory bioassays and field trials have demonstrated the high level of toxicity of B.t. H14 for black fly larvae (9, 10, 11, 26, 83). Later on formulations have been field tested in temperate (84, 85, 86, 87) as well as in tropical (46, 47, 88, 89) areas.

In 1980 a strong resistance to temephos (Abate^R), an organo-phosphorous compound, have been recorded in 2 forests species of the S.damnorum complex, vectors of onchocerciasis, in the OCP area (90). This resistance was rapidly followed by a resistance to chlorphoxim, an other O.P. compound (91), and finally a cross resistance to most of the O.P. compounds usable in public health. In 1982 B.t. H14 was the only alternative for the continuation of larviciding in the zones where resistance has occured. A water dispersible concentrate is used at a dosage of 1.6 mg/l/10mn. Its carry during rainy season is limited in practice to 8-10 km. Even using very big helicopters for spraying, it is impossible to treat routinely rivers with discharge higher than 50 M³/s. In addition the high viscosity of the formulation much complicates spraying operations. Consequently researchs have been carried out in order to improve formulations.

The first experimentations clearly demonstrated that the efficacy of formulations is much more dependant on the formulation itself than on the active ingredient (toxin) content in A.aegypti I.U./mg (27, 92, 93). Taking into account the important role of the formulation, studies have been carried out to determine the best type of formulation to develop. There are generally 2 types of formulations : either the particles are big aggregates of B.t. H14 (mean size 10 to 30 μ) or they are suspensions of dispersed spores and crystals. The efficacy of the former which are usually wetttable powders increases with increasing size of clumps up to an optimum (40 to 70 μ) varying from one formulation to the other and according to larval instar. The addition of a cement to aggregate spores and crystals decreases the efficacy considerably. This efficacy, in most cases, varies proportionally with the exposure period, long exposure at low concentrations giving better results. Under natural conditions these formulations decrease the efficacy significantly with water turbidity by a competitive selection between B.t. H14 particles and the uptake of natural particles by blackfly larvae (47). Consequently these formulations are much less effective during the rainy season than during the dry season with the lower turbidity in the rivers. On the contrary, the efficacy of formulations with isolated spores and crystals remains the same whatever turbidity in the rivers. Their efficacy is not dependant on the exposure time (a one minute exposure is sufficient) and finally the high number of active particles (crystals) confers to this type of formulations a better carry than with the previous one in which the number of particles is much lower. These observations as well as operational requirements have demonstrated that the best type of formulation to develop for use (aerial spraying) in onchocerciasis control are liquid suspensions of dispersed crystals. Improvement of such formulations relates mainly to the increase in endo-toxin content of self-dispersive preparations.

A screening programme has been developed in West Africa (Ivory Coast) for the evaluation of experimental formulations. Presently more than 200 formulations produced by 4 companies have been tested under simulated field conditions. 6 of them have reached the stage of field evaluation. At present 2 formulations only have reached the stage of operational use. From recent bioassays and field evaluations it appears that in the near

future, with normal or asporogenic strain, it should be possible to obtain B.t. H14 formulations giving 100% mortality at 0.8 mg/l/10mn with suitable physical characteristics. Nevertheless the probability is low, even with improved formulations, to achieve a satisfactory carry (e.g. 20 Km or more). On that point, B.t. H14 probably will never be competitive with good formulations of chemical insecticides like Abate and Chlorphoxim of which the carry is 40 to 60 km during rainy season (high discharge rate in the rivers). On the contrary B.t. H14 will be competitive for the dry season treatments (low discharges) where carry is always very limited whatever the insecticide and the formulation used.

CONCLUSION.

The development of B.t. H14 for mosquito and black fly control has been extremely rapid and probably sometimes too much. This bio-control agent presents several very interesting characteristics but its use must be limited to situations where it is or it will be cost-effective and when it provides significant benefits in terms of environmental safety and resistance to insecticides

In the field of mosquito control it was noted that potency of primary unformulated products was satisfactory but they must be properly formulated in order to reduce applied dosages and to increase the residual efficacy. B.t. H14 still remains relatively expensive compared with chemical larvicides. In addition to situations where environment protection is a priority, its use is undoubtedly profitable in rotational use with chemical insecticides in mosquito control programmes. Thus it could provide a significant decrease in the selection pressure by chemicals and delay the appearance of resistance. B.t. H14 has been successfully used in a very wide range of mosquito habits but one must keep in mind that, if it is a very attractive bio-control agent, it cannot be used in situations where larviciding with chemical insecticides is not feasible.

B.t. H14 was early introduced in operational black fly control immediately after resistance to insecticides has occurred. Researches to find out the best type of formulation and then to improve it have started jointly. 2 years later progress relates to a doubled level of efficacy of formulations and improvement in their physical characteristics. The use of an asporogenic strain do not present practical significant advantages except when drinking water must be treated. But a such strain seems to produce high potency products, and could replace in the near future the normal strains.

The use of B.t. H14 in Onchocerciasis Control Programme in West Africa proves that this agent can be routinely used in a very large scale vector control operation in tropical area. Up to the present its use in an emergency situation due to resistance to insecticides was very costly. This situation will change when the new improved formulations will be commercially available. At that time the use of B.t. H14 could be restricted to the dry season treatments where it is competitive with chemical larvicides. In return it should be extended to the treatment of most of the OCP area. This treatment scheme should represent, as already mentioned, a significant decrease in the process of selection pressure by chemical insecticides as well as in the pressure on environment in very sensitive ecological situations.

References.

- (1) Goldberg, L. and Margalit, J. (1977) *Mosquito News* 37, 355-358.
- (2) de Barjac, H. (1978) *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 286D, 797-800. - (3) de Barjac, H. (1978) *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 286D, 1175-1178. - (4) de Barjac, H. (1978) *Entomophaga* 23, 309-319 - (5) Vankova, J. et al. (1978) *Proc. Int. Colloquium Invertebr. Pathology*, 219-222. - (6) Garcia, R. and Desrochers, B. (1979) *Mosquito News* 39, 541-544. (7) Dempah, J. and Coz, J. (1979) *WHO/VBC/79.719*. - (8) Sinègre, G. et al. (1979) *WHO/VBC/79.743*. - (9) Undeen, A. and Nagel, W. (1978) *Mosquito News* 38, 524-527. - (10) Weiser, J. and Vankova, J. (1978) *Proc. Int. Colloquium Invertebr. Pathology* 243-244. - (11) Guillet, P. and de Barjac, H. (1979) *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 289D, 549-552. - (12) Charles, J. and de Barjac, H. (1982) *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 133A, 425-442. - (13) Tyrell, D. et al. (1979) *App. Environm. Microbiol.* 38, 656-658. - (14) Larget, I. and de Barjac, H. (1981) *Bull. Soc. Pathol. exot.* 74, 216-227. - (15) Tyrell, D.J. et al. (1981) *J. Bacteriol.* 145, 1052-1062.
- (16) Chilcott, C. et al. (1981) *WHO/VBC/81.835*. - (17) Thomas, W.E. and Ellar, D.J. (1983) *J. Cell. Sci.* 60, 181-197. - (18) Charles, J. and de Barjac, H. (1983) *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 134A, 197-218.
- (19) de Barjac, H. (1978) *C.R. Acad. Sci. (Paris)* 286D, 1629-1632. - (20) Charles, J. and de Barjac, H. (1981) *Entomophaga* 26, 203-212. - (21) Angus, T.A. (1968) *J. Invertebr. Pathol.* 11, 145-150. - (22) Fast, P.G. and Morrison, I.K. (1972) *J. Invertebr. Pathol.* 20, 208-211. - (23) Nickerson, K.W. (1982) *Proc. Int. Coll. Invertebr. Pathol.* 22, 139-140. - (24) Lacey, L.A. and Federici, B.A. (1979) *J. Invertebr. Pathol.* 33, 171-182. - (25) de Barjac, H. and Coz, J. (1979) *Bull. Wld Hlth Org.* 57, 139-141. - (26) Undeen, A. and Berl, L. (1979) *Mosquito News* 39, 742-745. - (27) Molloy, D. et al. (1981) *J. Econ. Entomol.* 74, 61-64.
- (28) Mulla, M.S. and Federici, B.A. (1982) *Proc. Int. Coll. Invertebr. Pathol.*, 466-472. - (29) Mc Laughlin, R.E. (1981) Unpublished W.H.O. Document. - (30) Wraight, S. et al. (1981) *J. Inv. Pathol.* 38, 78-87. - (31) Sinègre, G. et al. (1980) *WHO/VBC/80.770*. - (32) Sinègre, G. et al. (1981) *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.* 19, 155-159. - (33) Sinègre, G. et al. (1979) *Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical, Marseille*, 1277-1281. - (34) Ignoffo, C. et al. (1981) *Mosquito News* 41, 85-93. - (35) Gaugler, R. and Molloy, D. (1980) *Environ. Entomol.* 9, 704-708. - (36) Lacey, L.A. et al. (1978) *Environ. Entomol.* 7, 583-588. - (37) Dempah, A. (1979) Unpublished ORSTOM Document. - (38) Guillet, P. et al. (1979) *WHO/VBC/80.756*. - (39) Prasertphon, S. (1979) Unpublished WHO Document TDR/BCV/SWG.79/WP.26. - (40) Dempah, J. and Coz, J. (1980) *WHO/VBC/80.767*. - (41) Sinègre, G. (1980) *WHO/VBC/80.769*. - (42) Ignoffo, C.M. et al. (1982) *Environ. Entomol.* 11, 409-411. - (43) Guillet, P. et al. (1982) *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.* 20, 181-185. - (44) Thomas, W.E. and Ellar, D.J. (1983) *J. Cell. Sci.* 60, 181-197. - (45) Sun, C. et al. (1980) *Mosquito News* 40, 614-618. - (46) Lacey, L. et al. (1982) *Tropenmed. Parasit.* 33, 97-101. - (47) Guillet, P. et al. (1982) *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.* 20, 175-180. - (48) Georghiou, G. (1983) Unpublished WHO Document. - (49) Guillet, P. (1983) Unpublished Document to W.H.O. - (50) Sinègre, G. et al. (1981) *Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol.* 19, 157-163. - (51) Garcia, R. (1981) Unpublished Document to W.H.O. - (52) Ramoska, W. et al. (1982) *J. Econ. Entomol.* 75, 1-4. - (53) Van Essen, F. and Hembree, S. (1982) *Mosquito News* 42, 66-72. - (54) Mulla, M. et al. (1980) *Proc. and Pap. Calif. Mosq. and Vector Control.* 48, 25-27. - (55) Schnetter, W. et al. (1981) *Mitt. dtsch. Gesallg. Angew. Entomol.* 2, 195-202. - (56) Mulligan, F. et al. (1980)

J. Econ. Entomol. 73, 684-688. - (57) Balaraman, K. et al. (1983) Indian J. Med. Res. 77, 38-43. - (58) Garcia, R. et al. (1981) Proceedings, Symposium on Rice Field mosquito control, University of California, Davis, 85-91. - (59) Washino, R. and Garcia, R. (1980) University of California, Mosquito Control Research, Annual Report, 62-63. - (60) Hembree, S. et al (1980) Mosquito News 40, 67-70. - (61) Dame, D. et al. (1981) Mosquito News 41, 540-546. - (62) Washino, R. and Brown-Westerdahl, B. (1981) University of California, Mosquito Control Research, Annual Report, 75-77. - (63) Sinègre, G. et al. (1979) WHO/VBC/79.747. - (64) Garcia, R. and DesRochers, B. (1980) Proc. Calif. Mosquito and Vector Cont. Assoc. 48, 37-39. - (65) Garcia, R. et al. (1980) Calif. Agric. 34, 18-19. - (66) Garcia, R. et al. (1981) University California, Mosquito Control Research, Annual Report, 66-68. - (67) Purcell, B. (1981) Mosquito News 41, 476-484. - (68) Schaefer, C.H. and Kirnowardoyo, S. (1983) Mosquito News 43, 325-328. - (69) Lüthy, P. et al. (1980) Bull. Soc. Entomol. Suisse 53, 3-9. - (70) Snow, K.R. (1984) Int. Pest. Contr. 26, 12-14. - (71) De Maio, J. et al. (1981) Mosquito News 41, 765-769. - (72) Ramoska, W. et al. (1981) J. Kansas Ent. Society 54, 56-60. - (73) Klein, J.M. (1982) Unpublished ORSTOM Document. - (74) Sinègre G. et al. (1980) Parasitologia 22, 213-221. - (75) De Barjac, H. et al (1980) Bull. Soc. Pathol. Exot. 73, 315-321. - (76) Sudomo, M. et al. (1981) WHO/VBC/81.836. - (77) Eldridge, B. and Callicrate, J. (1982) Mosquito News 42, 102-105. - (78) Rampal, L. et al. (1983) Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 14, 101-105. - (79) Hougard, J.M. et al (1983) Cah. ORSTOM, Sér. Ent. Méd. et Parasitol. 21, 111-117. - (80) Mulla, M.S. and Federici, B.A. (1983) University of California, Mosquito Control Research, Annual Report, 54-58. - (81) Garcia, R. et al. (1983) University of California Mosquito Control Research, Annual Report, 52-53. - (82) Lacey, L.A. (1984) Mosquito News 44, 26-32. - (83) Undeen, A.H. and Colbo M.H. (1980) Mosquito News 40, 181-184. - (84) Frommer, R.L. et al. (1980) Mosquito News 41, 339-347. - (85) Frommer, R.L. et al. (1980) Mosquito News 41, 331-338. - (86) Molloy, D. and Jamnback, H. (1981) J. Econ. Entomol. 74, 314-318. - (87) Chilcott, C.N. et al (1982) WHO/VBC/82.859. - (88) Undeen, A.H. et al (1981) Mosquito News 41, 37-40. - (89) Gaugler, R. et al (1983) Entomophaga 28, 309-315. - (90) Guillet, P. et al. (1980) Cah. ORSTOM Sér. Ent. Méd. Parasitol. 18, 291-299. - (91) Kurtak, D. (1982) WHO/VBC/82.850. - (92) Guillet P. and Escaffre, H. (1979) WHO/VBC/79.735. - (93) Guillet, P. et al. (1982) Proc. Int. Colloquium. Invertebr. Pathol. 460-465.

13

TOXICITE DE *Bacillus thuringiensis* VAR. *israelensis*
POUR LES LARVES DE SIMULIES VECTRICES DE L'ONCHOCERCOSE.

PATHOLOGIE. — *Toxicité de Bacillus thuringiensis var. israelensis pour les larves de Simulies vectrices de l'Onchocercose.* Note (*) de **Pierre Guillet et Huguette de Barjac**, présentée par Pierre Lépine.

Éprouvée sur le terrain en rivières infestées, la poudre primaire R 153-78 de *B. thuringiensis var. israelensis*, titrant 3000 U.T.I. *Aedes aegypti* par milligramme se révèle très toxique pour les larves de Simulies, en particulier pour celles de *Simulium damnosum* s.l. La concentration létale 100 en 24 h est de $0,2 \cdot 10^{-6}$ pour un traitement de 10 mn. Cette remarquable toxicité, spécifique pour les larves de Diptères tels que Moustiques et Simulies, est liée aux propriétés spéciales de la protéine des cristaux de la bactérie qui montre une nette individualité sérologique et chimique par rapport aux protéines des cristaux des autres sérotypes de *B. thuringiensis*, pathogènes essentiels des larves de Lépidoptères. Ces premiers résultats sont très prometteurs et permettent d'envisager avec la poursuite des recherches, l'utilisation à grande échelle de *B. thuringiensis var. israelensis* comme insecticide biologique dans la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose en Afrique intertropicale.

On field trials in infested streams, the primary powder R 153-78 made of B. thuringiensis var. israelensis with a potency of 3,000 I.T.U. Aedes aegypti/milligramme is very toxic for Blackfly larvae, especially for Simulium damnosum s.l. larvae. The lethal concentration 100, in 24 h, is $0,2 \times 10^{-6}$ for a 10 min. treatment. This high toxicity, specific for Diptera larvae such as Mosquitoes and Blackflies, is related to the special characteristic of the bacterial crystal protein which has a clear serological and chemical individuality compared to the crystal proteins of the other B. thuringiensis serotypes essentially pathogenic for Lepidoptera larvae. These preliminary results are very promising and could lead, on further research, to the utilization of B. thuringiensis var. israelensis on large scale for onchocerciasis vector control in Africa.

Un bacille sporulé a été isolé en Israël par Goldberg et Margalit [7] à partir de prélèvements de boues et de larves de *Culex* dans un gîte larvaire à mortalité anormale. Cette bactérie a été identifiée par de Barjac [1] comme appartenant à l'espèce *B. thuringiensis* et représentant un nouveau sérotype (H_{14}), individualisé sous le nom d'*israelensis*. Cette bactérie est très toxique pour les larves de Moustiques, ce qui devrait en faire un excellent moyen de lutte contre les nuisances et les maladies dues à ces Insectes ([2] à [5]).

B. thuringiensis var. israelensis se montre également toxique pour les larves de Simulies. L'activité de l'étalon international de ce bacille, élaboré par l'Institut Pasteur sous forme d'une poudre « IPS 78 » titrant 1 000 Unités Toxiques Internationales (U.T.I.) par milligramme, a été prouvée en essais de laboratoire [9]. Il nous a paru intéressant d'effectuer des expérimentations sur le terrain en Côte-d'Ivoire afin d'étudier les possibilités d'utilisation de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* comme larvicide contre les Simulies, en particulier contre *Simulium damnosum* s.l., complexe d'espèces vectrices de l'Onchocercose humaine en Afrique intertropicale.

A cet effet, nous avons utilisé la poudre « R-153-78 » distribuée par l'Institut Pasteur, comme larvicide expérimental contre les Moustiques et les Simulies. Ce produit est une poudre primaire non formulée, de fabrication industrielle et constituée du mélange spores-cristaux obtenu par centrifugation de cultures de *B. thuringiensis var. israelensis*. Considéré à 100 % de matière active, il titre 3000 U.T.I. *Aedes aegypti* par milligramme d'après la méthode élaborée par de Barjac et Larget [6]. Mis en suspension aqueuse, il est épandu dans les rivières selon la technique d'une seule bande transversale légèrement en amont du gîte à traiter (technique du « vide-vite » utilisée en routine pour les traitements opérationnels). Différentes concentrations ont été éprouvées. Dans tous les cas, pour utiliser le même système qu'avec les insecticides chimiques, le dosage est exprimé en parties par million appliquées au volume d'eau à traiter s'écoulant en 10 mn (par exemple, $0,1 \cdot 10^{-6}/10$ mn équivaut à 210 000 U.T.I. *A. aegypti* par litre.

L'ensemble des tests a porté sur des populations pré-imaginales de *Simulium damnosum* s.l., *S. cervicornutum* Pomeroy, *S. unicornutum* Pomeroy et *S. groupe alcocki*. Deux groupes d'essais ont été réalisés. Dans un premier groupe, l'efficacité de *B. thuringiensis* var. *israelensis* est éprouvée dans un système de cages flottantes *in situ*, mis au point par Guillet et Escaffre pour l'évaluation préliminaire en rivière des larvicides antisimulidiens utilisables dans la lutte contre l'Onchocercose. Trois essais ont été réalisés simultanément pour chacune des quatre concentrations employées : 0,0312-0,0625-0,125 et 0,2.10⁻⁶. Le temps d'épandage est toujours de 10 mn. Le second groupe d'essais a été fait en « grandeur réelle » sur le Goué, petite rivière de forêt de la région de Danané, abondamment peuplée de larves de *S. yahense*, du groupe *S. damnosum* s.l. Tous ces essais ont été faits en collaboration avec M. Escaffre (O.R.S.T.O.M.).

Les résultats sont relevés 24 h après le traitement en examinant les supports naturels peuplés de larves de *S. damnosum* s.l., préalablement repérés. Ce type d'essais ne fournit qu'un résultat qualitatif. Seul un traitement provoquant systématiquement 100 % de mortalité est considéré comme efficace.

TABLEAU I

Mortalité en 24 h des larves de *S. damnosum* traitées *in situ* en cages flottantes avec *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

	Concentrations de R 153-78 (10 ⁻⁶ /10 mn)				
	0 : témoin	0,0312	0,0625	0,125	0,2
Larves L ₁ L ₂ L ₃ :					
nombre éprouvé.....	97	104	73	104	85
mortalité (%).....	9,2	50 ± 9,6	93,1 ± 5,8	100	100
Larves L ₄ L ₅ :					
nombre éprouvé.....	111	242	257	298	172
mortalité (%).....	6,3	30,5 ± 5,8	78,2 ± 5	99,6	100
Larves L ₆ L ₇ :					
nombre éprouvé.....	65	144	216	77	81
mortalité (%).....	4,6	21,5 ± 6,7	62,5 ± 6,4	93,2 ± 5,5	100
Larves au total :					
nombre éprouvé.....	273	490	546	479	338
mortalité (%).....	6,9	32 ± 4,1	74 ± 3,7	98,7 ± 1	100

Le premier groupe d'essais, en cages flottantes, a donné les résultats exposés au tableau I. On peut voir que la concentration létale 100 (CL 100) est dans l'ensemble comprise entre 0,125 et 0,2.10⁻⁶/10 mn. Les larves jeunes sont, comme il fallait s'y attendre, plus sensibles que les larves âgées, fait déjà observé dans le cas des Moustiques [3]. Ici, avec les Simulies, la CL 100 des premiers stades L₁ à L₃ paraît se situer entre 0,0625 et 0,125.10⁻⁶/10 mn.

Comme chez les larves de Moustiques, la mortalité est très rapide, intervenant dans l'heure qui suit le traitement (entre 45 et 60 mn). Contrairement au cas des insecticides chimiques, les larves de Simulies tuées par *B. thuringiensis* var. *israelensis* ne se détachent pas immédiatement de leur support. Par exemple, à la concentration de 0,2.10⁻⁶/10 mn, 9,5 % seulement des larves de *S. damnosum* ont décroché 6 h après le traitement. Passé ce délai, sous l'action combinée des bactéries, de la température élevée et de la vitesse du courant, beaucoup de larves totalement décomposées échappent au comptage.

Cela conduit généralement à sous-estimer la mortalité aux concentrations inférieures à la CL 100.

Le deuxième groupe d'essais en rivière, en vraie grandeur, a donné les résultats exposés tableau II. Avec $0,1 \cdot 10^{-6}/10$ mn, la mortalité est partielle et irrégulière, certains endroits du gîte étant beaucoup plus atteints que d'autres. Par contre, à $0,2 \cdot 10^{-6}/10$ mn, on obtient toujours 100 % de mortalité sur l'ensemble des *Simulidae*.

Ces essais confirment sur le terrain la forte toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves de *S. damnosum* s.l. précédemment mise en évidence au laboratoire. La poudre R 153-78, non formulée, est plus toxique pour les larves de Simulies que les composés organiques de synthèse tels que le téméphos (OMS 786) ou le chlorphoxim (OMS 1197) formulés en poudres mouillables. On peut penser qu'une formulation adéquate améliorerait encore son efficacité.

TABLEAU II

Mortalité en 24 h de l'ensemble des larves de Simulies
par traitement en vraie grandeur de la rivière Goué avec *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

	Débit (m ³ /s)	Concentrations de R 153-78 ($10^{-6}/10$ mn)	
		0,1	0,2
Essai du 6 avril 1979...	1,3	Mortalité partielle et irrégulière	-
Essai du 5 avril 1979...	1,8	-	100 % de mortalité
Essai du 18 mai 1979...	1,2	-	100 % de mortalité

Ces essais confirment également la spécificité très marquée du sérotype H₁₄ *israelensis* à l'égard des larves de certains Diptères. Comme dans le cas des Moustiques, les autres sérotypes connus de *B. thuringiensis* spécifiques des Lépidoptères, n'ont sur les Simulies qu'une très faible activité. Ainsi, la plus forte mortalité observée par Lacey et Mulla [8] sur *S. vittatum* avec 13 autres de ces souches a été de 88 % pour une concentration massive de $10 \cdot 10^{-6}$ en traitement de 24 h.

Cette spécificité de *B. thuringiensis* var. *israelensis* est vraisemblablement liée à la nature de ses cristaux responsables de sa toxicité. Des tests immunologiques par précipitation en gel d'Ouchterlony démontrent en effet l'absence de parenté antigénique entre la protéine des cristaux du sérotype H₁₄ var. *israelensis* et celles des cristaux des autres sérotypes pathogènes essentiels des Lépidoptères.

Les sérums anti-cristaux H₁₄ ne réagissent pas avec les cristaux de ces autres sérotypes et vice-versa. En outre, l'analyse quantitative de la composition en acides aminés des cristaux de la variété *israelensis* montre qu'elle est différente de celle des cristaux des autres variétés étudiées jusqu'à présent.

Jointe à ses remarquables propriétés, l'innocuité de *B. thuringiensis* var. *israelensis* pour les Mammifères, les Poissons et la faune non cible en général, en fait un insecticide biologique de premier plan pour le contrôle des larves de Simulies. Les recherches continuent dans le but d'une éventuelle utilisation à grande échelle dans les campagnes de lutte contre l'Onchocercose entreprises en Afrique de l'Ouest par l'O.M.S.

(*) Remise le 17 septembre 1979.

[1] H. DE BARJAC, *Comptes rendus*, 286, série D, 1978, p. 797.

[2] H. DE BARJAC, *Comptes rendus*, 286, série D, 1978, p. 1175.

[3] H. DE BARJAC, *Entomophaga*, 23, 1978, p. 309.

- [4] H. DE BARJAC, *La Recherche*, 93, 1978, p. 911.
- [5] H. DE BARJAC et J. COZ, *Bull. Org. mond. Santé*, 57, 1979, p. 139.
- [6] H. DE BARJAC et I. LARGET, *Mosquito News*, 1979 (sous presse).
- [7] L. J. GOLDBERG et J. MARGALIT, *Mosquito News*, 37, 1977, p. 355.
- [8] L. A. LACEY et M. S. MULLA, *J. Invert. Path.*, 30, 1977, p. 46.
- [9] A. H. UNDEEN et W. L. NAGEL, dans l'Annual Report 1978, R.U.V.P., Memorial University of Newfoundland.

*O.R.S.T.O.M., Institut de Recherches sur l'Onchocercose,
I.R.O. Bouaké, Côte-d'Ivoire
et Institut Pasteur, Lutte Biologique,
25, rue du Docteur-Roux, 75015 Paris.*

EVALUATION DE *Bacillus thuringiensis israelensis* de BARJAC

POUR LA LUTTE CONTRE LES LARVES DE *Simulium damnosum* s.l.

I - RESULTATS DES PREMIERS ESSAIS REALISES SUR LE TERRAIN.



WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

WHO/VBC/79.730

FRANCAIS SEULEMENT
(with summary in English)

EVALUATION DE BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENسيس DE BARJAC
POUR LA LUTTE CONTRE LES LARVES DE SIMULIUM DAMNOSUM s.l.
I. RESULTATS DES PREMIERS ESSAIS REALISES SUR LE TERRAIN

par

P. Guillet¹ et H. Escaffre²

1. INTRODUCTION

Bacillus thuringiensis est utilisé depuis de nombreuses années pour la lutte contre certains parasites des cultures, tous les sérotypes découverts avant 1977 étant presque spécifiques pour la lutte contre les larves de Lépidoptères bien que certaines souches aient aussi une efficacité limitée contre les larves de moustiques (Hall et Hall, 1977) et de simulies (Lacey et Mulla, 1977). La découverte du sérotype 14 de B. thuringiensis (Goldberg et Margalit, 1977), décrit ultérieurement par de Barjac (1978a) comme B.t. israelensis a ouvert de nouvelles perspectives à l'emploi de cet entomopathogène dont l'endotoxine a une action presque spécifique pour les larves de moustiques (de Barjac, 1978 a et b - de Barjac et Coz, 1979 - Sinègre et al., 1979) et de simulies (Undeen et Nagel, 1978 - Weiser et Vankova, 1978 - Undeen et Berl, 1979) tout en présentant une grande innocuité pour la faune non-cible (Weiser et Vankova, 1978 - Sinègre et al., 1979 - Dejoux, 1979).

Les campagnes de lutte actuellement en cours en Afrique occidentale reposant actuellement exclusivement sur l'emploi de formulations larvicides à base de téméphos nous avons jugé indispensable de déterminer si B.t. israelensis pouvait constituer un larvicide opérationnellement utilisable pour ces campagnes. Les essais préliminaires sur le terrain ont été réalisés en Côte d'Ivoire à partir de l'Institut de Recherches sur l'Onchocercose de l'Organisation de Coopération et de Coopération pour la Lutte contre les grandes Endémies (OCCGE).

2. MATERIELS ET METHODES

La formulation de B.t. israelensis utilisée a été la poudre primaire R-153.78 préparée à des fins expérimentales par le groupe Roger Bellon-Biochem. Cette poudre primaire qui nous a été remise par le Dr H. de Barjac de l'Institut Pasteur de Paris est constituée d'un mélange de spores et de cristaux de B.t. israelensis dilué dans une grande masse de matière inerte provenant du processus de production par fermentation.

La comparaison de l'efficacité de la poudre primaire R-153.78 avec celle de la formulation de référence IPS.78 proposée par le Centre international de Référence pour B. thuringiensis situé à l'Institut Pasteur de Paris a été faite par divers spécialistes.

¹Entomologiste médical ORSTOM, Institut de Recherches sur l'Onchocercose de l'OCCGE, Bouaké, Côte d'Ivoire.

²Technicien entomologiste ORSTOM, Institut de Recherches sur l'Onchocercose de l'OCCGE, Bouaké, Côte d'Ivoire.

R 879

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles.

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

WHO/VBC/79.730
Page 2

Selon le groupe Roger Bellon-Biochem le titre de la poudre primaire serait de 3.500 unités internationales de B.t. israelensis par milligramme, mais cette information est donnée sous toutes réserves car la méthode de détermination du titre n'est pas encore normalisée (Dempah et Coz, 1979).

La poudre primaire est difficilement dispersible dans l'eau. Lors de sa mise en suspension, il se forme des agrégats sphériques dont la taille moyenne varie de 27 à 29 microns avec des extrêmes de 5,7 et 100 microns.

L'ensemble des tests a été réalisé sur des populations préimaginales de Simulium damnosum s.l., S. cervicornutum Pomeroy, S. unicornutum Pomeroy et S. groupe alcocki.

L'efficacité de la poudre primaire R-153.78 a été testée initialement dans les cages flottantes destinées à l'évaluation préliminaire en rivière des larvicides antisimulidiens utilisables dans la lutte contre l'onchocercose (Dejoux, 1975 - Guillet, 1978 - Guillet & Escaffre, 1979). Trois essais ont été réalisés simultanément pour chacune des 4 concentrations testées. Le temps d'épandage était de 10 minutes.

Des essais en grandeur réelle ont été réalisés sur le Goué, petite rivière de forêt de la région de Danané, abondamment peuplée de larves de S. yahense (Vajimé et Dumbar, Quillévé et Pendriez, 1975) appartenant au groupe S. damnosum s.l.

La poudre primaire diluée au préalable dans l'eau a été épandue dans la rivière sous forme d'une seule bande transversale légèrement en amont du gîte à traiter (technique du "vide-vite" utilisée en routine pour les traitements opérationnels). Le contrôle d'efficacité a été effectué 24 heures après le traitement sur des supports naturels peuplés de larves de S. damnosum s.l. repérées au préalable.

Ce type d'essais ne fournit qu'un résultat qualitatif; seul un traitement provoquant 100 % de mortalité étant considéré comme efficace.

La teneur de la poudre primaire en endotoxine de B.t. israelensis n'étant pas connue nous avons, pour simplifier les calculs, considéré cette poudre primaire comme de la matière active pure et exprimé le dosage en milligrammes par litre appliqués au volume d'eau s'écoulant en 10 minutes au niveau des gîtes traités.

3. RESULTATS

3.1 Essais en cages flottantes

La CL100 est comprise entre 0,125 et 0,2 mg/litre pendant 10 minutes (tableau no. 1). Bien qu'il ne s'agisse pas à proprement parler d'un test de sensibilité, les pourcentages de mortalité obtenus ont été reportés sur un papier logprobit (graphique no. 1).

Les larves âgées (stades 6 et 7) sont moins sensibles que les jeunes larves (stades 1, 2, 3). La mortalité intervient 45 à 60 minutes après le traitement. Contrairement ce qui se passe avec les insecticides organiques de synthèse, les larves tuées par l'endotoxine de B.t. israelensis ne se détachent pas immédiatement de leurs supports. A la concentration de 0,2 mg/l pendant 10 minutes seulement un faible pourcentage des larves de S. damnosum s.l. ont décroché 6 heures après le traitement (contre 72 % pour les larves d'autres espèces de simulies). Après ce délai, sous l'action de la température élevée et de la vitesse du courant, beaucoup de larves qui décrochent sont totalement décomposées et échappent au comptage. Cela conduit généralement à sous-estimer la mortalité aux concentrations inférieures à la CL100.

3.2 Essais en rivière

A 0,2 mg/l pendant 10 minutes la poudre primaire provoque 100 % de mortalité sur l'ensemble des Simuliidés (tableau no. 2). A 0,1 mg/l l'effet est partiel et irrégulier, certaines parties du gîte étant beaucoup plus atteintes que d'autres.

4. DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Ces essais préliminaires sur le terrain confirment l'efficacité potentielle de B.t. israelensis pour la lutte contre les vecteurs africains de l'onchocercose appartenant au complexe S. damnosum déjà mise en évidence lors d'essais en gouttière (Undean et Berl, 1979). Ils confirment également la grande supériorité du sérotype israelensis sur les autres sérotypes de B. thuringiensis pour la lutte contre les larves de similies évalués par Lacey et Mulla (1977) sur S. vittatum; ces auteurs n'avaient en effet obtenu que des mortalités inférieures ou égales à 88 % en employant des concentrations de 10 mg/l appliquées pendant 24 heures, ce qui suggère un ordre de grandeur d'efficacité environ 4 000 fois plus faible que celui de la poudre primaire R-153.78 de B.t. israelensis. Une faible partie de cette différence d'efficacité pourrait provenir de la température de l'eau durant les essais (Sinègre et al., 1979 - Lacey et Federici, 1979) et d'une plus faible teneur intrinsèque en endotoxine des formulations employées par Lacey et Mulla; l'essentiel de la différence provient indiscutablement des sérotypes de B. thuringiensis employés pour produire l'endotoxine.

La poudre primaire R-153.78 de B.t. israelensis s'est d'emblée montrée plus efficace vis-à-vis des larves de S. damnosum s.l. que le téméphos et le chlorphoxime lorsqu'ils sont appliqués sous forme de poudre dispersable dans l'eau. Elle est cependant nettement inférieure à ces insecticides lorsqu'ils sont appliqués sous forme de concentrés émulsionnables qui non seulement détruisent les larves de similies immédiatement en aval du point de traitement mais ont aussi une portée efficace allant de plusieurs kilomètres à plusieurs dizaines de kilomètres.

L'innocuité de l'endotoxine de B.t. israelensis pour la faune non-cible (Weiser et Vankova, 1978 - Sinègre et al., 1979 - Dejoux, 1979) fait cependant de cet entomopathogène un agent très prometteur pour la lutte contre les larves des vecteurs de l'onchocercose. Les recherches vont donc être continuées pour mettre au point des formulations mieux adaptées à l'épandage en rivière et déterminer leur portée efficace.

REMERCIEMENTS

Tous nos remerciements vont à nos collègues qui nous ont encouragés dans ce travail et ont contribué à le rendre possible. Nous souhaiterions nommer, en particulier, à ce titre Mademoiselle de Barjac, Institut Pasteur de Paris, par l'intermédiaire de laquelle nous avons reçu la poudre primaire R-153.78 de Roger Bellon-Biochem, Monsieur Dejoux, hydrobiologiste de l'ORSTOM qui a participé à nos essais et la Division de la Biologie et du Contrôle des Vecteurs de l'Organisation mondiale de la Santé qui nous a communiqué les données bibliographiques dont nous avons besoin pour préparer notre étude.

REFERENCES

- de Barjac, H. (1978a) Une nouvelle variété de Bacillus thuringiensis très toxique pour les moustiques, B. thuringiensis var. israelensis, sérotype 14, C.R. Acad. Sci. (Paris), 286 D, 797-800
- de Barjac, H. (1978b) Toxicité de Bacillus thuringiensis var. israelensis pour les larves d'Aedes aegypti et d'Anopheles stephensi, C.R. Acad. Sci. (Paris), 286 D, 1175-1178

WHO/VBC/79.730

Page 4

- de Barjac, H. & Coz, J. (1979) Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustiques à Bacillus thuringiensis var. israelensis, Bull. Wld. Hlth Org., 57, 139-141
- Dejoux, C. (1975) Nouvelle technique pour tester in situ l'impact de pesticides sur la faune aquatique non-cible, Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. et Parasitol., 13, 75-80
- Dejoux, C. (1979) Recherches préliminaires concernant l'action de Bacillus thuringiensis israelensis de Barjac sur la faune d'invertébrés d'un cours d'eau tropical. Document miméographié OMS, WHO/VBC/79.721, Genève, 11 pp.
- Dempah, J. et Coz, J. (1979) Essais de Bacillus thuringiensis israelensis sur les moustiques, Document miméographié OMS, WHO/VBC/79.719, Genève, 10 pp.
- Goldberg, L. J. et Margalit, J. (1977) Bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univittatus, Aedes aegypti and Culex pipiens, Mosquito News, 37, 355-358
- Guillet, P. (1978) Search for new formulations suitable for use against the larvae of onchocerciasis vectors in West Africa, Document miméographié OMS, OCP/SWG/78.19, 9 pp.
- Guillet, P. et Escaffre, H. (1979) La recherche de nouvelles formulations d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs d'onchocercose en Afrique de l'Ouest. Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical, 1979, Marseille. A paraître.
- Hall, I. M., Arakawa, K. Y., Dulmage, H. T. et Correa, J. A. (1977) The pathogenicity of strains of Bacillus thuringiensis to larvae of Aedes and to Culex mosquitoes, Mosquito News, 37, 246-251
- Lacey, L. A. et Federici, B. A. (1979) Pathogenesis and midgut histopathology of Bacillus thuringiensis in Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae), J. Invertebr. Pathol., 33, 171-182
- Lacey, L. A. et Mulla, M. S. (1977) Evaluation of Bacillus thuringiensis as a biocide of blackfly larvae (Diptera-Simuliidae), J. Invertebr. Pathology, 30, 46-49
- Quillévéré, D. et Pendriez, B. (1975) Etude du complexe Simulium damnosum en Afrique de l'Ouest - II. Cah. ORSTOM, Sér. Ent. méd. Parasitol., 13, 165-172
- Sinègre, G., Gaven, B. et Jullien, J. L. (1979) Evaluation de l'activité larvicide de Bacillus thuringiensis var. israelensis sur les Culicidés. Performances comparées des formulations commerciales. Impact du produit sur la faune non-cible, Document miméographié, EID no. 40, Montpellier, 23 pp.
- Undeen, A. et Berl, D. (1979) Laboratory studies of effectiveness of Bacillus thuringiensis var. israelensis against Simulium damnosum larvae, Mosquito News, 39, sous presse
- Undeen, A. H. et Nagel, W. L. (1978) The effect of Bacillus thuringiensis ONR 60A strain (Goldberg) on Simulium larvae in the laboratory, Mosquito News, 38, 524-527
- Weiser, J. et Vankova, J. (1978) Toxicity of Bacillus thuringiensis 1897 for blackflies and other freshwater invertebrates, Proc. Int. Colloquium Invertebr. Pathology and XIe Ann. Meet. Soc. Invertebr. Pathol., 243-244

RESUME

Une poudre primaire de Bacillus thuringiensis israelensis préparée à titre expérimental à l'échelle industrielle a été évaluée sur le terrain en Côte d'Ivoire contre les larves de Simulium damnosum s.l. Immédiatement en aval du point d'épandage, pour une dose équivalente à une concentration de 0,2 mg/l pendant 10 minutes, elle a provoqué la disparition totale des larves de simulies.

SUMMARY

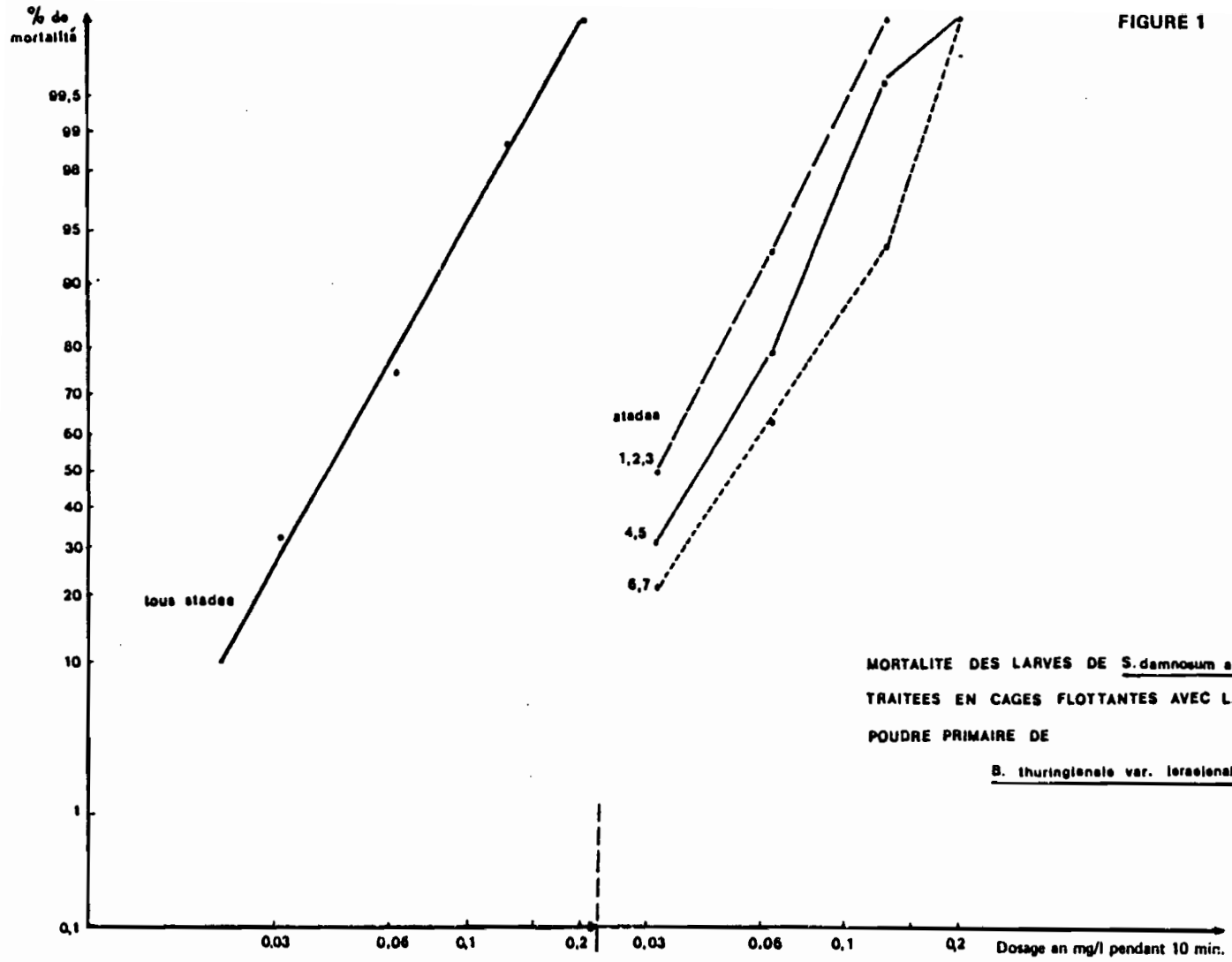
A primary powder of Bacillus thuringiensis israelensis experimentally produced at the industrial level has been evaluated as blackfly larvicide against onchocerciasis vectors belonging to the Simulium damnosum complex in a small river of southern Ivory Coast, West Africa. A complete kill of blackfly larvae immediately downstream of the dosing point was obtained with dosages equivalent to a concentration of 0.2 mg/l of primary powder during 10 minutes. The results are considered as extremely encouraging as the primary powder was not formulated for that purpose and greater effectiveness could be obtained with formulations specifically developed for blackfly control. The impact of the treatment on non-target organisms was nil (WHO/VBC/79.721).

Mortalité	Stades 1, 2 et 3		Stades 4 et 5		Stades 6 et 7		TOTAL	
	Nb de larves testées	% de mortalité	Nb de larves testées	% de mortalité	Nb de larves testées	% de mortalité	Nb de larves testées	% de mortalité
0,0312	104	50 ± 9,6	242	30,5 ± 5,8	144	21,5 ± 6,7	490	32 ± 4,1
0,0625	73	93,1 ± 5,8	257	78,2 ± 5	216	62,5 ± 6,4	546	74 ± 3,7
0,1250	104	100	298	99,6	77	93,2 ± 5,5	479	98,7 ± 1
0,2	85	100	172	100	81	100	338	100
Témoin	97	9,2	111	6,3	65	4,6	273	6,9

Tableau I. Mortalité des larves de *S. damnosum* s.l. traitées en cages flottantes avec la poudre primaire de Bacillus thuringiensis israelensis

Rivière	Date	Débit	Dosage en mg/l pendant 10 minutes	Effet sur les larves de simulies
Goué	5.04.79	1,8 m ³ /s	0,2	100 % de mortalité chez l'ensemble des larves de Simuliidae
Goué	18.05.79	1,2 m ³ /s	0,2	
Goué	6.04.79	1,3 m ³ /s	0,1	Effet partiel irrégulier

Tableau II. Essais en rivière de la poudre primaire de Bacillus thuringiensis israelensis contre les larves de simulies



WHO/VBC/79.730
 Page 7

15

EVALUATION DE *Bacillus thuringiensis israelensis* de BARJAC

POUR LA LUTTE CONTRE LES LARVES DE *Simulium damnosum s.l.*

II - EFFICACITE COMPAREE DE TROIS FORMULATIONS EXPERIMENTALES.



WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

WHO/VBC/79.735

FRANCAIS SEULEMENT
(with summary in English)

EVALUATION DE BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENسيس DE BARJAC
POUR LA LUTTE CONTRE LES LARVES DE SIMULIUM DAMNOSUM s.l.
II. EFFICACITE COMPAREE DE TROIS FORMULATIONS EXPERIMENTALES

par

P. Guillet¹ et H. Escaffre²

1. INTRODUCTION

Des essais préliminaires sur le terrain ont montré que l'endotoxine de B. t. israelensis pourrait être à la base de la production de larvicides ayant une grande efficacité vis-à-vis des larves de simuliés appartenant au complexe S. damnosum (Guillet et Escaffre, 1979a) tout en ayant une innocuité presque totale pour la faune non-cible des rivières traitées (Dejoux, 1979). Ces essais préliminaires ayant été effectués à l'aide de la poudre primaire R.153-78 préparée à des fins expérimentales par le groupe Roger Bellon-Biochem, il nous a paru intéressant de les compléter en utilisant des présentations plus élaborées de l'endotoxine de B. t. israelensis déjà évaluées contre les larves de moustiques dans le sud de la France (Sinègre et al., 1979). Notre évaluation de trois formulations expérimentales a été faite dans le sud de la Côte d'Ivoire où avaient déjà pris place les expérimentations concernant la poudre primaire R.153-78; la poudre primaire a été employée également, à titre de référence.

2. MATERIELS ET METHODES

Les trois formulations expérimentales utilisées avaient été élaborées à partir de la poudre primaire R.153-78 et se présentaient sous les formes suivantes :

- (a) un concentré émulsionnable à 5 % de poudre primaire;
- (b) une formulation aqueuse concentrée à 10 % de poudre primaire;
- (c) une poudre mouillable dispersible dans l'eau à 50 % de poudre primaire.

L'ensemble des essais a été réalisé sur des populations préimaginales de Simulium damnosum s.l., S. cervicornutum, S. unicornutum, ainsi que sur des larves appartenant au groupe S. alcocki.

Les essais ont été effectués en rivière à l'aide de cages flottantes (Guillet et Escaffre, 1979b) pour chacune des formulations. La poudre mouillable à 50 % a aussi été employée lors d'essais à plus grande échelle sur le terrain.

Les méthodes employées ont été les mêmes que celles utilisées pour l'évaluation des larvicides conventionnels (Guillet, 1978) et lors de l'étude de la poudre primaire (Guillet et Escaffre, 1979a). Les concentrations ont été exprimées en milligrammes par litre de poudre primaire appliqués au volume d'eau à traiter s'écoulant en 10 minutes.

¹Entomologiste médical ORSTOM, Institut de Recherches sur l'Onchocercose de l'OCCGE, Bouaké, Côte d'Ivoire.

²Technicien entomologiste ORSTOM, Institut de Recherches sur l'Onchocercose de l'OCCGE, Bouaké, Côte d'Ivoire.

WHO/VBC/79.735

Page 2

3. EVALUATION PHYSIQUE DES FORMULATIONS

Le concentré émulsionnable se disperse relativement bien dans l'eau mais une proportion importante de la formulation reste en surface et ne s'incorpore à l'eau qu'après un léger brassage. La formulation aqueuse concentrée, de consistance semi-pâteuse, ne se disperse pas spontanément dans l'eau et sombre instantanément au fond du récipient servant à diluer ce concentré. Une fois mélangées de façon homogène à un certain volume d'eau ces deux formulations se mélangent facilement à un volume d'eau beaucoup plus important et leur sédimentation semble relativement lente.

La poudre mouillable se disperse aisément dans l'eau mais des agrégats de 1 à 2 mm de diamètre persistent même après un vigoureux brassage. Ainsi que nous l'avons déjà indiqué dans notre précédente note la poudre primaire est difficilement dispersible dans l'eau.

Après la mise en suspension des différentes formulations la taille moyenne et les tailles extrêmes des particules ainsi obtenues varient considérablement d'une formulation à une autre (tableau n° 1). Les suspensions de poudre primaire et de poudre mouillable contiennent des agrégats sphériques (figure 1) ayant des diamètres moyens respectifs de 29,1 et 14,2 microns (correspondant respectivement à des extrêmes de 5,7 - 100 et 2,3 - 87,4 microns). La suspension obtenue à partir de la formulation aqueuse concentrée est composée presque exclusivement de spores-cristaux isolés avec quelques petits agrégats n'excédant pas 5,7 microns. La suspension créée à partir du concentré émulsionnable contient des agrégats de petite taille (9,5 microns) et d'un nombre important de spores-cristaux isolés.

4. EVALUATION BIOLOGIQUE DES FORMULATIONS

Les observations faites lors de l'évaluation comparée de la poudre primaire et des trois formulations expérimentales sont résumées dans le tableau n° 2. Elles permettent de conclure, en dépit d'une certaine hétérogénéité des résultats obtenus avec la poudre mouillable et le concentré émulsionnable que, pour une même concentration de matière active, plus la suspension obtenue contient de petites particules, moins elle est active vis-à-vis des larves de simulies. L'efficacité de la formulation aqueuse est pratiquement nulle. Une évaluation à plus grande échelle de la poudre mouillable a donné des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus en cages flottantes, avec une mortalité de 100 % des larves de simulies lors d'un traitement à 0,4 mg/l pendant 10 minutes et un effet très modeste pour une application à 0,2 mg/l pendant 10 minutes (tableau n° 3).

5. DISCUSSION DES RESULTATS

Les études les plus récentes faites sur la taille des particules ingérées par les larves de simulies appartenant au complexe *S. damnosum* (Elsen, 1979) ont montré que bien que la majorité des particules observées dans le tube digestif des larves des stades 2 à 7 aient moins de 5 microns ces larves pouvaient toutefois, dès le stade 2, ingérer des particules indéformables de 9 x 18 microns et des particules déformables de 26 x 29 microns. Il est probable qu'au cours de l'ingestion certaines des grandes particules sont morcelées contribuant à diminuer la fréquence relative de telles particules dans le tube digestif. Cette fréquence relative des classes de taille des particules ingérées peut donner une fausse idée de l'importance réelle de ces classes dans l'alimentation et l'intoxication des larves de simulies. Si l'on exprime les observations en terme de masse ingérée on constate que les particules de 9,5 microns et plus, bien que peu abondantes, représentent une masse beaucoup plus importante que les nombreuses particules d'une taille plus faible.

On doit tenir compte par ailleurs de ce que la poudre primaire est un mélange contenant notamment des débris de cellules végétatives d'une densité spécifique proche de l'unité et des spores-cristaux dont la densité est voisine de 1,28 (Sharpe et al., 1975). Lors de la mise en suspension dans l'eau les grosses particules composites restent donc mieux en suspension que les spores-cristaux isolés et les petits agglomérats de spores-cristaux. Plus la suspension contient de fines particules et plus la matière active, constituée par les cristaux d'endotoxine, et les spores-cristaux, sédimentera rapidement.

Il est difficile de dire actuellement lequel des deux phénomènes précités joue le plus grand rôle pour réduire l'efficacité des formulations expérimentales produisant une grande abondance de petites particules. Des études sont en cours pour étudier ce problème et essayer de déterminer les caractéristiques optimales que devront avoir les formulations de B. t. israelensis pour être opérationnellement efficaces contre les larves de simulies.

6. STABILITE DE L'ENDOTOXINE DE B. T. ISRAELENIS EN MILIEU TROPICAL

A l'issue des essais décrits dans la présente note, les reliquats des formulations expérimentales et de la poudre primaire ont été laissés sur le lieu de l'expérimentation et ont été ainsi exposés à des températures souvent élevées. Trois semaines plus tard une nouvelle série d'essais effectués avec la poudre primaire et la poudre mouillable a montré que ces deux formulations avaient perdu une partie importante de leur efficacité. Ce phénomène est en cours d'étude.

7. CONCLUSIONS

La toxicité sélective de l'endotoxine de B. t. israelensis pour les larves de simulies ouvre des perspectives intéressantes pour la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose en Afrique tropicale. Il conviendrait toutefois de déterminer la stabilité de cette endotoxine dans les conditions habituelles de stockage des insecticides en zone tropicale et de préciser, lors de recherches opérationnelles, quelles caractéristiques physiques devraient avoir les particules contenant l'endotoxine pour assurer la destruction des larves de simulies immédiatement en-dessous du point de traitement et sur une distance aussi longue que possible en aval.

8. REMERCIEMENTS

Tous nos remerciements vont à ceux de nos collègues qui nous ont encouragés dans ce travail et ont contribué à le rendre possible. Nous souhaiterions nommer à ce titre, en particulier, Mademoiselle H. de Barjac, Institut Pasteur de Paris, et Messieurs Ph. d'Oultremont et L. Charmoille, du Laboratoire Roger Bellon, qui nous ont fourni les échantillons de B. t. israelensis utilisés, Monsieur C. Dejoux, Hydrobiologiste de l'ORSTOM, qui a participé à nos essais, et la Division de la Biologie et du Contrôle des Vecteurs de l'Organisation mondiale de la Santé qui nous a communiqué une partie de la documentation utilisée pour préparer notre étude.

SUMMARY

A primary powder of Bacillus thuringiensis israelensis experimentally produced at the industrial level, R.153-78, has been evaluated against blackfly larvae belonging to the Simulium damnosum complex at the same time and under the same field conditions as three experimental formulations derived from this primary powder: one 50% water dispersible powder, one 10% water-based concentrate and one 5% emulsifiable concentrate. Once mixed with water prior to application to the breeding sites the primary powder and the wdp produced suspensions with respectively large and moderately large particulate aggregates containing the B. t. israelensis endotoxin. The emulsifiable concentrate produced a suspension with fine particules and the water-based concentrate resulted in a suspension containing mostly free "spore-crystal" particules. The biological effect on blackfly larvae, for a given concentration of R.153-78, was inversely proportional to the size of the particules, the water-based concentrate being ineffective and the wdp being noticeably less effective than the primary powder itself. Studies are underway to determine if the influence of the particule size is related to the amount of primary powder ingested by blackfly larvae, to the differential sedimentation of inert ingredient and "spore-crystal" particules, or both.

RERERENCES

- de Barjac, H. (1978a) Une nouvelle variété de Bacillus thuringiensis très toxique pour les moustiques, B. thuringiensis var. israelensis, sérotype 14, C.R. Acad. Sci. (Paris), 286 D, 797-800
- Dejoux, C. (1979) Recherches préliminaires concernant l'action de Bacillus thuringiensis israelensis de Barjac sur la faune d'invertébrés d'un cours d'eau tropical. Document miméographié OMS, WHO/VBC/79.721, Genève, 11 pp.
- Elsen, P. (1979) La nature et la taille des particules ingérées par les larves du complexe Simulium damnosum dans les rivières de Côte d'Ivoire (Diptera Simuliidae). Rev. Zool. afr., 93, 476-484
- Guillet, P. et Escaffre, H. (1979a) Evaluation de Bacillus thuringiensis israelensis de Barjac pour la lutte contre les larves de Simulium damnosum s.l. I. Résultats des premiers essais réalisés sur le terrain. Document miméographié OMS, WHO/VBC/79.730, Genève, 7 pp.
- Guillet, P. et Escaffre, H. (1979b) La recherche de nouvelles formulations d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs d'onchocercose en Afrique de l'Ouest. Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical, 1979, Marseille. A paraître.
- Sharpe, E.S., Nickerson, K. W., Bulla, L. A. et Aronson, J. N. (1975) Separation of spores and parasporal crystals of Bacillus thuringiensis in gradients of certain X-ray contrasting agents. Applied Microbiology, 30, 1052-1053
- Sinègre, G., Gaven, B. et Jullien, J. L. (1979) Evaluation de l'activité larvicide de Bacillus thuringiensis var. israelensis sur les Culicidés. Performances comparées des formulations commerciales. Impact du produit sur la faune non-cible. Document miméographié, EID no.40, Montpellier, 23 pp.

	Poudre primaire	Poudre mouillable à 50 Z	Concentré émulsionnable à 5 Z	Concentré aqueux à 10 Z
Nombre de mesures	348	397	350	-
Taille moyenne en μ	29,1	14,2	9,5	Spores & cristaux isolés 1,5 - 2,5
Ecart type	16	11,3	2,6	-
Taille maximum en μ	100	87,4	20,7	5,7
Taille minimum en μ	5,7	2,3	3,4	1,5

Tableau n° 1. Taille des particules après mise en suspension aqueuse de la poudre primaire R.153-78 et de 3 formulations expérimentales de B. thuringiensis israelensis dérivées de cette poudre primaire

Formulation	Concentrations de poudre primaire R.153-78 utilisées, en mg/l pendant 10 minutes					
	0,1		0,2		0,4	
	Nombre de larves testées	% de mortalité	Nombre de larves testées	% de mortalité	Nombre de larves testées	% de mortalité
Poudre primaire	329	94,4	247	100	-	-
poudre mouillable à 50%	430	4,4	538	13,5	188	100
Concentré émulsionnable à 5%	1760	3,3	529	35,5	211	23,2
Concentré aqueux à 10%	1983	0,3	701	5,4	141	5,7
Témoin	227	4,6	382	3,5	153	8

Tableau n° 2. Mortalité des larves de *S. damnosum* s.l. traitées en cages flottantes avec la poudre primaire R.153-78 et trois formulations expérimentales de *B. thuringiensis israelensis*

Rivière	Date	Débit	Dosage en mg/l pendant 10mn	Effet sur les larves de similies
Goué	7.06.79	1,6m ³ /s	0,4	100 % de mortalité
Goué	8.06.79	2,3m ³ /s	0,2	effet très partiel

Tableau n°3. Essais en rivière d'une poudre mouillable de *B. thuringiensis israelensis* à 50 % de poudre primaire R.153-78

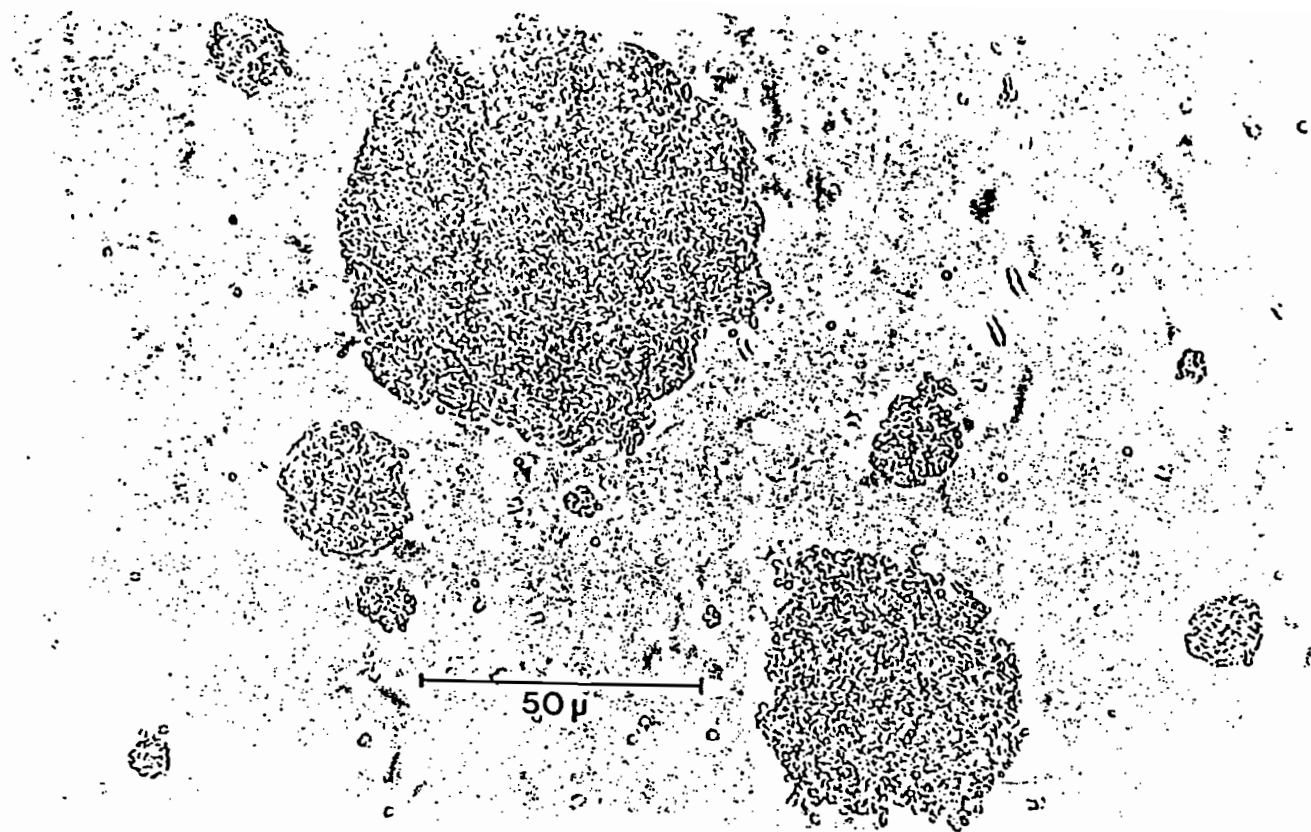


Figure 1. Agrégats observés lors de la mise en suspension dans l'eau de la poudre primaire R.153-78 de B. t. israelensis

16

EVALUATION DE *Bacillus thuringiensis* SEROTYPE 14 de BARJAC

POUR LA LUTTE CONTRE LES LARVES DE *Simulium damnosum s.l.*

III - DONNEES PRELIMINAIRES SUR LA SEDIMENTATION DE L'ENDOTOXINE
DANS L'EAU ET SUR SA STABILITE EN ZONE TROPICALE.



WORLD HEALTH ORGANIZATION
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ

WHO/VBC/80.756

FRANCAIS SEULEMENT
(with summary in English)

EVALUATION DE BACILLUS THURINGIENSIS SEROTYPE 14 DE BARJAC
POUR LA LUTTE CONTRE LES LARVES DE SIMULIUM DAMNOSUM S.L.

III. DONNEES PRELIMINAIRES SUR LA SEDIMENTATION DE L'ENDOTOXINE
DANS L'EAU ET SUR SA STABILITE EN ZONE TROPICALE

par

P. GUILLET,* J. DEMAHA** et J. COZ***

1. INTRODUCTION

Le Bacillus thuringiensis sérotype 14 a été testé sur le terrain contre les larves de Simulium damnosum s.l. sous forme de poudre primaire R 153.78 (Guillet & Escaffre, 1979a) et de formulations plus élaborées (Guillet & Escaffre, 1979b). Ces essais ont permis de constater que les formulations étaient d'autant moins efficaces qu'elles présentaient des particules de petite dimension. Une formulation composée de spores et cristaux libres n'a pratiquement aucune efficacité. Il nous a paru intéressant de voir si ce phénomène était dû à une sédimentation accélérée de la matière active dans les formulations à petites particules ou à une ingestion insuffisante de matière active lorsque la taille des particules diminue. Par ailleurs, nous avons constaté lors de ces essais une perte d'efficacité notable d'un échantillon de poudre primaire après trois semaines de stockage sur le terrain. Nous avons contrôlé au laboratoire l'activité biologique de cet échantillon et entrepris une étude de la stabilité du Bacillus thuringiensis sérotype 14 stocké sous abri en zone tropicale pendant une période d'un an.

2. MATERIEL ET METHODES

Cette étude a été réalisée avec des larves d'Aedes aegypti. Tous les tests ont été effectués conformément à la méthode OMS pour la détermination de la sensibilité des larves de moustiques aux insecticides (OMS, 1963) dans de l'eau permutée à pH 4,8.

2.1 Sédimentation des formulations

Dans un premier temps, nous avons déterminé les limites de la CL₁₀₀ de quatre formulations : poudre primaire, poudre mouillable à 50 %, concentré aqueux à 10 % et concentré émulsifiable à 5 %. Toutes les concentrations sont exprimées en % ou en mg/l de poudre primaire considérée comme de la matière active pure. Ultérieurement, nous avons introduit dans des éprouvettes un litre de suspension aqueuse à 40 mg/l de chacune des trois premières formulations. Des prélèvements à la pipette ont été effectués en surface, au milieu et aux trois quarts de la profondeur à des intervalles de temps définis. Chacun des prélèvements a été dilué et testé à la limite supérieure de la CL₁₀₀ sur quatre lots de 25 larves L₄ d'Aedes aegypti souche Réao (Tuamotus).

* Entomologiste médical de l'ORSTOM, Institut de Recherches sur l'Onchocercose de l'OCCGE, Bouaké, Côte d'Ivoire.

** Pharmacien stagiaire de la Côte d'Ivoire, ORSTOM-SSC, Bondy, France.

*** Pharmacien, Docteur es Sciences, Chef du Laboratoire de Recherches en Entomologie médicale, ORSTOM-SSC, Bondy, France.

The issue of this document does not constitute formal publication. It should not be reviewed, abstracted or quoted without the agreement of the World Health Organization. Authors alone are responsible for views expressed in signed articles

Ce document ne constitue pas une publication. Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou résumé ni d'aucune citation sans l'autorisation de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les opinions exprimées dans les articles signés n'engagent que leurs auteurs.

voir aussi numéro
1979 n° 9943

WHO/VBC/80.756
Page 2

2.2 Stabilité de la toxine en zone tropicale

En vue d'étudier la stabilité de la poudre primaire dans les conditions tropicales, de nombreux échantillons contenus dans de petites boîtes cylindriques en plastique rigide avec couvercles ont été expédiés à Bouaké (Côte d'Ivoire). Une partie de boîtes a été ouverte, l'autre a été maintenue fermée. Régulièrement des lots ouverts et fermés sont réexpédiés à Bondy (France) et leur activité est testée dans des conditions standardisées.

Par ailleurs, un sachet ouvert en plastique transparent contenant cette poudre a été stocké trois semaines sur le terrain et, de ce fait, exposé à des températures souvent élevées. L'activité biologique de tous ces échantillons a été testée sur des larves d'*Ae. aegypti* souche Meya (Congo) en comparaison avec un lot témoin de poudre primaire conservé au laboratoire d'entomologie médicale de l'ORSTOM à Bondy.

3. RESULTATS

3.1 Activité comparée de trois formulations (poudre mouillable, concentré émulsifiable et concentré aqueux)

La poudre mouillable et le concentré émulsifiable ont une efficacité double de celle du concentré aqueux (tableau 1). L'efficacité de la poudre primaire est intermédiaire. Celle-ci titrait dans les conditions de l'expérience 2100 UI B.t 14/mg par rapport au standard IPS 78 fixé à 1000 UI B.t 14/mg (de Barjac, 1979; Dempah & Coz, 1979).

La lecture des résultats (tableau 1, graphique N° 1) montre que les CL₅₀ sont les suivantes :

- Concentré émulsifiable à 5 %	- CL ₅₀ : 0,078 mg/l
- Poudre mouillable à 50 %	- CL ₅₀ : 0,088 mg/l
- Poudre primaire R.153.78	- CL ₅₀ : 0,12 mg/l
- Concentré aqueux	- CL ₅₀ : 0,17 mg/l

Comme on le voit, l'activité insecticide est donc liée à la formulation.

3.2 Etude biologique de la sédimentation de quelques formulations de B.t 14 (poudre primaire, poudre mouillable, concentré aqueux)

Les sédimentations de la poudre primaire et de la poudre mouillable semblent s'opérer de façon identique (tableau N° 2). Elles sont régulières et déjà perceptibles après 30 minutes. Après quatre heures, 50 à 75 % de la matière active ont sédimenté. Au bout de 24 heures, la quasi-totalité se trouve au fond de l'éprouvette. En revanche, aucune sédimentation n'est décelable pour le concentré aqueux après 24 heures; à 48 heures, la sédimentation, en termes de perte de toxicité, est du même ordre de grandeur que celle de la poudre primaire après 30 minutes.

Si l'on remet en fin d'expérience les particules en suspension par agitation de l'éprouvette, on obtient des résultats identiques à ceux obtenus au temps zéro (tableau N° 2). La matière active sédimente donc plus ou moins vite mais ne subit, sur une période de 48 heures, aucune altération de son activité biologique.

3.3 Stabilité de la toxine en zone tropicale

La poudre conservée fermée a une toxicité analogue à celle du témoin après trois mois de stockage. En revanche, la toxicité de la poudre conservée ouverte, sur le terrain ou sous abri, diminue légèrement. Toutefois, si on la déshydrate une heure à 85°C, sa toxicité redevient analogue à celle du témoin (tableaux Nos 3 et 4).

En fait, la température ne peut pas être considérée comme un facteur de dégradation de l'endotoxine, puisqu'une exposition de 24 heures à 80°C n'entraîne pas de baisse de l'activité (Dempah, 1979).

4. DISCUSSION DES RESULTATS

Les observations concernant les effets de sédimentation des particules de B.t 14 sur la mortalité des larves de moustiques concordent sensiblement avec celles effectuées par Sinègre (1979) dans le midi de la France. Lors de la série d'essais réalisés précédemment (Guillet & Escaffre, loc. cit.), nous avons pu constater que l'efficacité des formulations de B.t 14 contre les larves de simulies était directement proportionnelle à la taille des particules. Il nous est maintenant possible d'affirmer que ces différences, dans les conditions expérimentales de tests sur les larves de simulies, ne sont pas dues à une sédimentation des petites particules mais à une ingestion insuffisante lorsque la taille diminue. A concentration égale, les larves de simulies ingèrent donc avec les agrégats de poudre primaire (diamètre moyen 29 μ) une quantité de matière active beaucoup plus importante qu'à partir des cristaux isolés du concentré aqueux dont la taille moyenne est de l'ordre du micron. Il est probable que la poudre primaire et la poudre mouillable n'aient, dans les conditions opérationnelles de traitement, qu'une portée efficace limitée du fait de la sédimentation des grosses particules ou de leur désagrégation en particules beaucoup plus fines.

Il ne semble pas que l'endotoxine du B.t 14 subisse de profonde altération après trois mois de conservation en zone tropicale. Nous avons noté (Guillet & Escaffre, loc. cit.) une baisse d'activité de la poudre; en fait nous pensons actuellement que cette moindre efficacité observée était due à un excès d'humidité. Cette poudre, relativement hygroscopique, était stockée à l'air libre dans une atmosphère saturée d'humidité. Notons également que sur la poudre conservée à l'air libre s'est développé un important mycélium cryptogamique qui peut également interférer lors de la pesée des substances actives.

5. CONCLUSION

Bien que les premiers résultats obtenus demandent à être confirmés, il semble que la toxine du B.t 14 possède une bonne stabilité dans les conditions de stockage en zone tropicale. Cette stabilité se rapprocherait donc de celles des autres sérotypes de Bacillus thuringiensis couramment utilisés en agriculture.

L'efficacité des formulations de B.t 14 contre les larves de Simulium damnosum s.l. dépend essentiellement de la taille des particules. Les grosses particules jouent, en termes de masse ingérée, un rôle beaucoup plus important que les petites particules. Les résultats obtenus permettent d'orienter les recherches dans la mise au point de nouvelles formulations antismulidiennes. Ces recherches concernent essentiellement la distribution de taille des particules, leur résistance à la désagrégation et leur densité. Les améliorations portées dans le sens d'une moindre sédimentation permettront, en outre, d'améliorer les performances du B.t 14 contre les larves de moustiques.

Il est important de souligner que ce type de recherches ne concerne pas uniquement B.t 14 mais pourrait s'appliquer à la plupart des insecticides présentés en formulations particulières d'un type analogue.

6. REMERCIEMENTS

Tous nos remerciements vont à ceux de nos collègues qui nous ont encouragés dans ce travail et ont contribué à le rendre possible. Nous souhaiterions nommer à ce titre, en particulier, Mademoiselle H. De Barjac, Institut Pasteur de Paris, Messieurs Ph. D'Oultremont et L. Charmoille, du Laboratoire Roger Bellon, qui nous ont fourni les échantillons de B.t 14 utilisés, et la Division de la Biologie et du Contrôle des Vecteurs de l'Organisation mondiale de la Santé qui a discuté les résultats et conclusions et nous a communiqué une partie importante de la documentation utilisée pour préparer cette étude.

7. SUMMARY

Studies were carried out (a) to assess the sedimentation of Bacillus thuringiensis endotoxin and the efficacy of different formulations and (b) to determine the stability of the endotoxin under tropical conditions.

Four formulations were tested against Ae. aegypti larvae by the WHO susceptibility test: 5% emulsifiable concentrate, 50% water-dispersible powder, primary powder R.153.78 and water-based concentrate. The efficacy of the wdp and the EC was twice that of the water-based concentrate, the primary powder being intermediate between the two. It was concluded that the insecticidal activity depends upon the formulation.

The sedimentation of the primary powder and the wdp were identical: after 30 min. sedimentation was noticeable, after 4 h 50-75% of the active material had precipitated and after 24 h virtually all was at the bottom of the test-tube. In contrast, for the water-based concentrate no sedimentation could be detected after 24 h and after 48 h the sedimentation in terms of loss of toxicity was the same as for the primary powder after 30 min. When the particles were resuspended by shaking, identical results were obtained as at 0 time. Thus the active ingredient sediments out more or less quickly over a 48 h period but there is no change in its biological activity if the particles are agitated and resuspended.

With regard to the stability of the toxin under tropical conditions, after three months the unopened powder had the same toxicity as the control while the opened powder lost toxicity slightly. When water was removed from the latter (1 h at 85°C), however, its toxicity was again the same as the control. There was no reduction in activity when the powders were subjected to 80°C for 24 h. The authors conclude that while these preliminary results need to be confirmed, it seems that the toxicity of Bacillus thuringiensis 14 has good stability under tropical conditions of storage.

The role of particle size in connexion with the use of Bacillus thuringiensis 14 for the control of Simulium damnosum larvae is discussed as well as the indication that such research can be applied to other similar particulate insecticides.

8. BIBLIOGRAPHIE

- Barjac, H., de (1979) Note sur la préparation d'une formulation de référence, IPS-78 pour le titrage biologique des formulations expérimentales et industrielles du sérotype H-14 de Bacillus thuringiensis, WHO/VBC/79.741, 6 pp.
- Barjac, H., de & COZ, J. (1979) Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustiques à Bacillus thuringiensis var. israelensis, Bull. Org. mond. Santé, 57 (1), 139-141
- Dempah, J. (1979) Essais de Bacillus thuringiensis israelensis sur les moustiques. Rapp. D. E. A. Ento. Med., Fac. des Sciences, Paris XI, et Lab. ORSTOM, Bondy, France
- Dempah, J. & Coz, J. (1979) Essais de Bacillus thuringiensis israelensis sur les moustiques. Document mimeographié OMS, WHO/VBC/79.719, 10 pp.
- Guillet, P. & Escaffre, H. (1979a) Evaluation de Bacillus thuringiensis israelensis de Barjac pour la lutte contre les larves de Simulium damnosum s.l. - I - Résultats des premiers essais réalisés sur le terrain. Document mimeographié OMS, WHO/VBC/79.730, 7 pp.
- Guillet, P. & Escaffre, H. (1979b) Evaluation de Bacillus thuringiensis israelensis de Barjac pour la lutte contre les larves de Simulium damnosum s.l. - II - Efficacité comparée de trois formulations expérimentales. Document mimeographié OMS, WHO/VBC/79.735, 7 pp.
- OMS (1963) Insecticide Resistance and Vector Control. Thirteenth Report of the WHO Expert Committee on Insecticides. Org. mond. Santé Sér. Rapp. techn., 265, 51-61
- Sinègre, G., Graven, B. & Jullien, J. L. (1979) Evaluation de l'activité larvicide de Bacillus thuringiensis var. israelensis sur les culicidés. Performances comparées des formulations commerciales. Impact du produit sur la faune non cible. Document mimeographié, E. I. D. N° 40, Montpellier, 23 pp.

TABLEAU 1. SENSIBILITE D'Aedes aegypti SOUCHE REAO (TUAMOTUS) A QUATRE FORMULATIONS DE Bacillus thuringiensis SEROTYPE 14

RHO/VBC/80.756
Page 6

Formulations Concentrations en mg/l	Poudre primaire R - 153.78 ^a		Poudre mouillable 50 %		Concentré aqueux 10 %		Concentré émulsionnable 5 %	
	n ^b	% m ^c	n	% m	n	% m	n	% m
0,50	100	100	100	100	100	98	100	100
0,25	100	93	100	100	100	84	100	100
0,125	100	60	100	79	99	28,2	99	85,8
0,0625	99	7,7	100	29	100	3	100	31
0	100	0	100	0	100	0	100	1

^a Dans les conditions de l'expérience, cette poudre titrait 2100 UI B.t 14/mg.

^b n = nombre de larves par concentration.

^c % m = % de mortalité brute.

TABLEAU 2. SEDIMENTATION DE TROIS FORMULATIONS DE BACILLUS THURINGIENSIS SEROTYPE 14
 EXPRIMEE EN % DE MORTALITE SUR DES LARVES D'Aedes Aegypti SOUCHE REAO (TUAMOTUS)

Formulations	Poudre primaire : 0,2 mg/l				Poudre mouillable : 0,2 mg/l				Concentré aqueux : 0,4 mg/l			
	1 ^a	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Temps zéro	100	100	97	-	98	98	86	-	100	100	99	-
30 minutes	94	95	92	-	-	-	-	-	99	100	99	-
60 minutes	89	87	92	-	71	80	72,7	-	100	100	99	-
2 heures	55	67	94	-	-	-	-	-	99	99	100	-
4 heures	33,3	47,4	52	-	24	31,3	33	-	99	96	99	-
24 heures	7	7	10	100	7	14	8	97	99	99	97	-
48 heures	-	-	-	-	-	-	-	-	82,8	92	95	100

^a 1 : en surface; 2 : à la moitié de la profondeur; 3 : aux 3/4 de la profondeur;
 4 : après agitation du contenu de l'éprouvette.

WHO/VBC/80.756
Page 8

TABLEAU 3. ACTIVITE BIOLOGIQUE (MORTALITE %) DE LA POUDRE PRIMAIRE R 153-78 DE BACILLUS THURINGIENSIS SEROTYPE 14 STOCKEE SOUS ABRI A BOUAKE (COTE D'IVOIRE)

Concentrations en mg/l	0	0,025	0,05	0,1	0,2
Témoïn conservé à Bondy	0 (100)	68 (75)	79 (100)	95 (100)	98,7 (75)
Trois semaines fermé	0 (100)	72 (175)	85,7 (175)	98,2 (175)	97 (100)
Trois semaines ouvert	0 (100)	28,8 (170)	53,1 (175)	87,6 (275)	99 (100)
Six semaines fermé	0 (100)	21,8 (142)	31,5 (171)	74,1 (174)	98,9 (99)
Six semaines ouvert	0 (75)	0 (100)	5,8 (172)	32,9 (170)	72,5(175)
Six semaines ouvert déshydraté 1 heure à 85°C	0 (75)	-	20 (50)	78 (50)	96 (75)
Trois mois fermé	100 (100)	-	57 (100)	90,9 (99)	100 (100)
Trois mois ouvert	0 (98)	-	7 (100)	32 (100)	81 (99)
Trois mois ouvert déshydraté 1 heure à 85°C	0 (99)	-	14,1 (99)	39,4 (99)	81,8 (99)

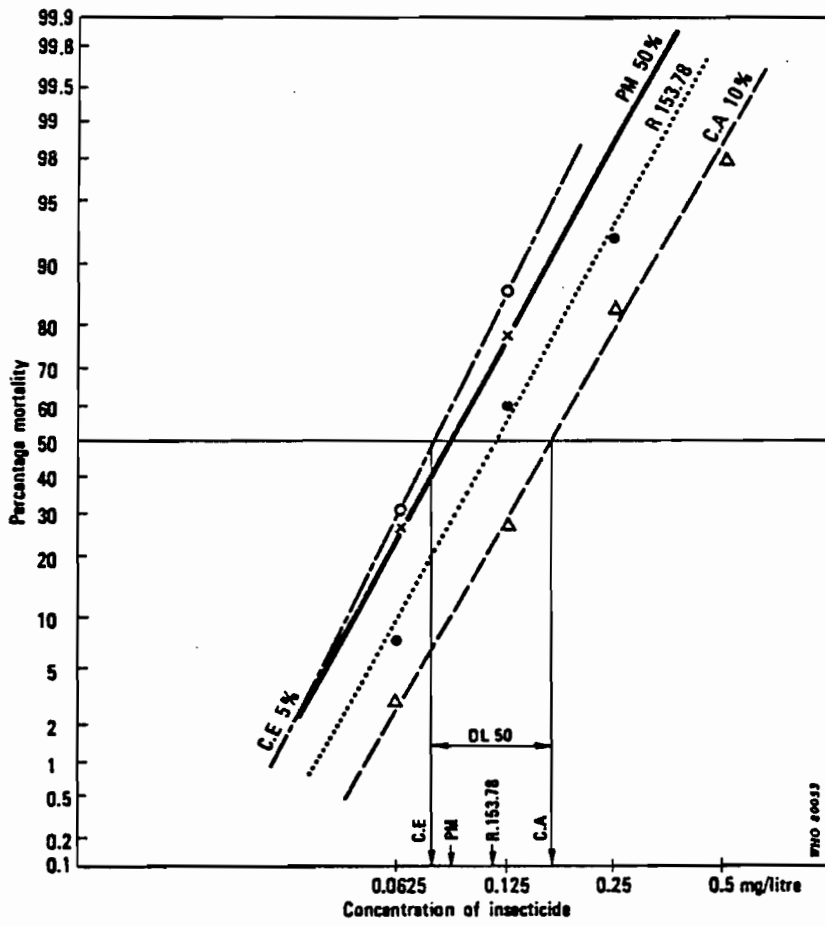
(entre parenthèses, le nombre de larves testées)

TABLEAU 4 : ACTIVITE BIOLOGIQUE DE LA POUDRE PRIMAIRE R 153-78 DE BACILLUS THURINGIENSIS SEROTYPE 14 STOCKEE OUVERTE TROIS SEMAINES SUR LE TERRAIN

Concentrations en mg/l	Témoïn conservé à Bondy		Trois semaines ouvert sur le terrain	
	n ^a	% m ^b	n	% m
0,20	-	-	223	98
0,10	74	94,6	221	78,3
0,05	73	47,9	218	32,1
0,025	48	20,8	74	4
0	-	-	100	0

^a n : nombre de larves par concentration.
^b % m : % de mortalité brute.

GRAPH 1
LARVAE SPECIES: AEDES AEGYPTI (SOUCHE REAO - TUAMOTUS)
Insecticide: *Bacillus thuringiensis* s. 14



ETUDE DES FACTEURS CONDITIONNANT L'EFFICACITE
DES PREPARATIONS A BASE DE *Bacillus thuringiensis* H14
VIS-A-VIS DES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum* s.l.
(Diptera : Simuliidae)

I - INFLUENCE DE LA NATURE ET DE LA TAILLE DES PARTICULES.

ETUDE DES FACTEURS CONDITIONNANT L'EFFICACITE DES PREPARATIONS A BASE DE

Bacillus thuringiensis H14 VIS-A-VIS DES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*

(Diptera : Simuliidae)

I - INFLUENCE DE LA NATURE ET DE LA TAILLE DES PARTICULES.*

Pierre GUILLET **

Henri ESCAFFRE ***

Jean Michel PRUD'HOM ***

Siaka BAKAYOKO ***

INTRODUCTION

Les premiers essais de terrain du *Bacillus thuringiensis* H14 contre les larves des espèces du complexe *Simulium damnosum*, vecteurs de l'onchocercose en Afrique intertropicale, ont été réalisés avec une poudre primaire non formulée R-153.78 (Bellon Biochem) (GUILLET et de BARJAC, 1979, GUILLET et ESCAFFRE, 1979 a). Les résultats obtenus furent si encourageants que 3 formulations expérimentales ont été immédiatement produites par l'industrie. Il fut alors démontré que l'efficacité de ces 3 formulations dépendait de la taille des particules en suspension (GUILLET et ESCAFFRE, 1979 b). Des résultats comparables ont été obtenus aux Etats-Unis avec les mêmes formulations testées sur des larves de *S. vittatum* Zetterstedt (MOLLOY *et al.*, 1981). Les auteurs montrèrent également que les formulations sous forme d'émulsions inhibaient le fonctionnement des pièces buccales, conduisant rapidement à un arrêt total de la prise de nourriture.

Du fait des perspectives remarquables offertes par la toxine du *B. thuringiensis* H14, des recherches ont été entreprises pour déterminer

* Ce travail a bénéficié, dans le cadre des accords conclus entre l'ORSTOM et l'OCCGE, d'une subvention du programme spécial PNUD, Banque Mondiale, OMS, de recherches et de formation concernant les maladies tropicales.

** ORSTOM - SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE

*** Institut Pierre Richet (IRTO) - BP 1500 - BOUAKE - COTE D'IVOIRE

les formulations qui seraient le mieux adaptées aux opérations de lutte contre les vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest et pour étudier les facteurs qui conditionnent leur efficacité.

La toxine du *B. thuringiensis* H14 est insoluble dans l'eau et les solvants organiques usuels, de ce fait, toutes les formulations sont nécessairement de type particulaire. Les particules peuvent être constituées de spores et cristaux d'endotoxine séparés (0,5 à 1,5 μ , concentrés aqueux dispersibles) ou au contraire agrégés entre eux (poudres mouillables). Ces agrégats sont de taille tout à fait variable selon les formulations.

Les larves de similies vivent fixées sur des supports dans les zones de courant rapide des rivières et se nourrissent des particules naturelles en suspension dans l'eau qu'elles filtrent au moyen d'un appareil buccal très spécialisé. Le rythme de préhension et d'ingestion de ces particules dépend de leur taille et de leur consistance. Les larves ingèrent des éléments de taille d'autant plus grosse qu'elles sont âgées. Enfin, les larves du complexe *S. damnosum* ingèrent davantage de nourriture lorsque la turbidité de l'eau et la quantité d'éléments figurés augmente (KURTAK, 1978, 1979, ELOUARD et ELSEN, 1977, ELSEN *et al.*, 1978, ELSEN, 1979, ELSEN et HEBRARD, 1979, ELSEN, 1980 a et b).

Dans la mesure où la toxine du *B. thuringiensis* H14 n'est active que par ingestion, il n'est pas surprenant, du fait des modalités de nutrition des larves de similies, que l'efficacité des formulations dépende de la nature et de la taille des particules qui les constituent. Des recherches ont donc été entreprises pour étudier l'influence de ces deux facteurs sur l'efficacité des formulations afin de permettre à l'industrie de mettre au point des nouvelles formulations aussi efficaces que possible et adaptées aux conditions d'utilisation. Pour cela, quatre expérimentations différentes ont été réalisées successivement.

Expérience 1

Influence de la fragmentation des agrégats sur l'efficacité d'une poudre primaire.

Matériel et méthodes.

Une suspension à 5 g/l de la poudre primaire R-153.78 (3500 U.I. *Aedes aegypti*/mg) (500 ml dans une fiole jaugée de 1 l) a été homogénéisée à la main. On a ensuite continué à homogénéiser la suspension avec un agitateur magnétique et des billes de verre pour fragmenter les agrégats en suspension. 20 ml de cette suspension ont été prélevés avant le début de l'agitation puis 5, 20 et 40 mn après et testés immédiatement sur des larves du complexe *S. damnosum* dans un dispositif de minigouttières. Cette expérience a été répétée deux fois. La taille des particules de chacun de ces prélèvements a été mesurée sur 300 agrégats environ avec une cellule de Nageotte. Au fur et à mesure de l'agitation, les agrégats se fragmentent, tandis que la proportion de spores et cristaux séparés augmente. Ces derniers n'ont toutefois pas été pris en compte dans le calcul de la taille moyenne des particules car ils représentent une quantité pondéralement négligeable par rapport à la masse des grosses particules.

Les suspensions ont été testées à la concentration de 0,1 mg/l pendant 10 mn. Des larves de tous stades ont été utilisées et séparées seulement au moment de la lecture des résultats en larves âgées (stades 6 et 7, longueur de la postgena $\geq 350 \mu$) et larves jeunes (stades 2 à 5, longueur de la postgena $< 350 \mu$).

Résultats.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1. Plus la poudre primaire est agitée, plus les agrégats se fragmentent et moins le produit est efficace. La liaison entre la taille des agrégats et l'efficacité est aussi significative vis-à-vis des larves jeunes que des larves âgées (r^2 respectivement de 0,94 et 0,97). Cette expérimentation n'a pas été poussée au-delà de 40 mn car les agrégats présents au bout de ce laps de temps se sont avérés très difficiles à fragmenter.

Temps d'agitation (mn)		0	5	20	40
Taille moyenne des agrégats (en μ)		26,3	13,5	11,6	6,4
% de mortalité et (nb. de larves testées)	larves jeunes	61,8 \pm 6,5 (223)	38,3 \pm 9,4 (107)	42,7 \pm 8,6 (131)	26,4 \pm 6,0 (216)
	larves âgées	55,2 \pm 6,8 (211)	32,3 \pm 8,2 (129)	34,9 \pm 9,4 (103)	22,8 \pm 6,0 (198)

Tableau 1 - Effet de la fragmentation des agrégats sur l'efficacité d'une suspension de poudre primaire R-153.78. (dosage 0,1 mg/l/10 mn, 2 répliques).

Table 1 - Effect of splitting up aggregates of R-153.78 primary powder with a magnetic stirrer on the efficacy against *S. damnosum* complex larvae. (dosage 0,1 mg/l/10 mn, minigutter test).

On peut déduire de cette expérimentation que la taille moyenne des particules, qui confère à la suspension de poudre primaire R-153.78 la meilleure efficacité est égale ou supérieure à 26 μ .

Expérience 2

Efficacité comparée de différentes fractions granulométriques d'une même poudre.

Matériel et méthodes.

Une poudre expérimentale a été obtenue (Bt 673, 6000 U.I. *A. aegypti*/mg, Bellon Biochem) en augmentant la cohésion des agrégats d'une poudre primaire par l'adjonction d'un liant. Le produit a été ensuite confié à un laboratoire spécialisé qui en a extrait par triage à sec deux échantillons, l'un à particules plus fines que la poudre d'origine, l'autre à particules plus grosses. Les tailles obtenues se répartissent comme suit :

Taille (μ)	0-10	10-20	20-30	30-40	40-50	50-60	60-70	70-80	80-90
Poudre d'origine (moyenne = 35μ)	5 %	12 %	18 %	35	17	7	4	2	-
Echantillon fin (moyenne = 18 μ)	16	42	32	9	1	-	-	-	-
Echantillon gros (moyenne = 45 μ)	-	-	6	18	42	19	8	5	2

Tableau 2 - Répartition de la taille des particules de la poudre Bt 673 et des deux échantillons qui en ont été extraits.

Les tests ont été réalisés dans le système des minigouttières et les larves ont été séparées à la lecture du test en trois groupes :
 stades 2 et 3 (postgena < 200 μ), stades 4 et 5 (postgena 200 à 350 μ),
 et stades 6 et 7 (postgena ≥ 350 μ).

Quatre essais ont été réalisés à la dose de 1,6 mg/l pendant 10 mn.

Résultats.

Les résultats sont présentés dans le tableau 3.

Taille moyenne des particules	% mortalité larvaire et (nb. larves testées)			
	stades 2-3	4-5	6-7	tous stades
Témoin	2 (127)	3 (241)	2 (156)	1,3 (524)
Fines : 18 μ	48,8 ± 6,2 (262)	51,7 ± 3,9 (644)	40,0 ± 3,7 (693)	46,2 ± 2,5 (1599)
Normales : 35 μ	89,7 ± 11,3 (29)	59,4 ± 7,6 (165)	68,5 ± 4,7 (391)	67,0 ± 3,9 (585)
Grosses : 45 μ	65,4 ± 5,1 (347)	74,2 ± 3,1 (776)	85,3 ± 2,8 (625)	75,9 ± 2,0 (1748)

Tableau 3 - Influence de la taille moyenne des particules d'une poudre Bt 673 (Bellon Biochem) sur l'efficacité vis-à-vis de différents stades larvaires. (1,6 mg/l/10 mn).

Table 3 - Influence of mean particle size on the efficacy of Bt 673 powder (Bellon Biochem) against different larval instar groups. (dosage 1,6 mg/l/10 mn, 4 replicates).

L'efficacité de la poudre Bt 673 augmente avec la taille moyenne des particules. La liaison la plus significative est obtenue avec les larves âgées ($r^2 = 0,998$) et reste très significative pour les larves de stades intermédiaires ($r^2 = 0,90$). En revanche la mortalité des larves jeunes, qui augmente considérablement de 18 à 35 μ décroît significativement au-delà, car les petites larves ne peuvent plus ingérer les grosses particules non friables. Dans tous les cas, l'échantillon fin est moins efficace que l'échantillon d'origine. La taille moyenne optimum des particules pour la poudre Bt 673 se situe entre 34 et 40 μ . Au-delà de 40 μ , l'efficacité vis-à-vis des larves âgées continue d'augmenter mais la formulation serait moins efficace pour le traitement de populations larvaires composées en majorité de larves jeunes.

Expérience 3

Efficacité comparée de 4 fractions granulométriques d'une poudre mouillable.

Matériel et méthodes.

100 g de poudre mouillable ABG 6108 (Abbott) lot 6478-194 (1000 U.I. *A. aegypti*/mg) ont été passés à travers un jeu de tamis à mailles décroissantes (120 à 40 μ) pendant 30 mn sur un vibreur réglé au maximum de l'intensité. 7 fractions granulométriques ont été récoltées et 4 testées (< 40 μ , 50 à 63 μ , 80 à 100 μ et > 120 μ), comparativement à la poudre non tamisée. Les tests d'efficacité ont été réalisés comme dans l'expérience précédente mais avec un dosage de 0,8 mg/l/10 mn.

Résultats.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4. Comme dans le cas de l'expérience précédente, l'efficacité de la poudre mouillable varie en fonction de la taille des particules. La taille optimum est de l'ordre de 55 μ pour les larves jeunes et 90 μ pour les larves âgées. La fraction inférieure à 40 μ est dans tous les cas moins active que la poudre d'origine tandis que, globalement, les fractions 50 à 63 et 80 à 100 μ sont plus efficaces. La taille optimum des particules se situe donc pour cette poudre aux environs de 50 à 60 μ .

Fraction granulométrique	% de mortalité larvaire et (nb. larves testées)			
	stades 2-3	4-5	6-7	tous stades
< 40 µ	4,3 (280)	5,1 (294)	5,2 (328)	4,8 (902)
50 à 63 µ	44,2 ± 9,7 (104)	33,0 ± 7,0 (179)	25,1 ± 5,5 (251)	31,5 ± 4,0 (534)
80 à 100 µ	14,5 ± 4,7 (227)	40,9 ± 6,6 (225)	34,0 ± 5,3 (315)	30,3 ± 3,3 (767)
> 120 µ	0 (902)	0,9 (355)	2,4 (383)	1,2 (1640)
non tamisée	-	26,8 ± 13,8 (41)	19,3 ± 6,6 (145)	19,7 ± 5,7 (186)
témoin	1,8 (167)	3,2 (189)	0 (127)	1,9 (483)

Tableau 4 - Efficacité comparée de 4 fractions granulométriques d'une poudre mouillable ABG 6108 (Abbott) vis-à-vis de différents groupes de stades larvaires. (dosage 0,8 mg/l/10 mn).

Table 4 - Comparative efficacy of 4 samples sieved from a wetttable powder ABG 6108 (Abbott) against different larval instar groups. (dosage 0,8 mg/l/10 mn, 2 replicates).

Expérience 4

Volume de particules ingéré par les larves traitées avec différentes formulations

Matériel et méthodes.

Des larves de stade 7 ont été disposées dans un système de minigouttières (GUILLET *et al.*, 1985) fonctionnant en circuit fermé avec 150 l d'eau filtrée (filtre Esser [®]). En plus, un filtre de piscine a été placé entre la pompe et la gouttière pour que la quantité de particules en suspension dans l'eau reste toujours très faible. Il a été démontré que dans ces conditions, le transit intestinal des larves de simuliés, qui progresse uniquement par bourrage, est pratiquement nul (ELOUARD et ELSÉN, *loc. cit.*).

Trois heures après la mise en place des larves dans les gouttières, on y introduit pendant 30 s une suspension à 5 g/l de poudre fluorescente rouge (Radiana[®]). Immédiatement après, les larves sont exposées pendant 2 mn à une concentration de 200 mg/l de différentes formulations, puis exposées à nouveau pendant 2 mn à la poudre fluorescente. Les larves sont ensuite tuées avec de l'eau chaude et meurent dans une position rectiligne très favorable à l'observation ultérieure, puis sont conservées dans une solution à 10 % de formol. Elles sont ensuite disséquées, la longueur de la postgena mesurée, et le bol alimentaire ingéré, constitué de particules de *B. thuringiensis* H14, bien visible entre deux bandes fluorescentes, est dessiné à la chambre claire. A ce niveau, généralement le 2ème segment abdominal, le tube digestif est cylindrique ce qui permet de calculer aisément la masse de particules (volume du bol) ingérées pendant le traitement. Un témoin a été réalisé avec seulement deux traitements à la poudre fluorescente espacés de 2 mn. 7 formulations ont été utilisées :

- 2 poudres primaires : R-153.78 et Bt B1 45 (8800 U.I.) (Bellon Biochem)
- 2 poudres mouillables : RB 50 % (1750 U.I.) (Bellon Biochem) et ABG 6-108 (Abbott).
- 1 poudre Bt B1 42-43 (8200 U.I.) (Bellon Biochem) du même type que la poudre mentionnée dans l'expérience 2.
- 2 suspensions aqueuses : SA 10 % (Bellon Biochem) et SAN 402 WDC (Sandoz).

Deux fois 2 essais ont été réalisés pour chaque formulation. Cette expérimentation a été réalisée dans une localité de savane, puis répétée également en zone de forêt sur des espèces différentes du complexe *S. damnosum*. La taille moyenne des agrégats a été mesurée également sans tenir compte des spores et cristaux libres. Les résultats sont présentés séparément pour les larves de stade 7 jeunes (plaques thoraciques blanches) et les larves de stade 7 âgées (plaques thoraciques noires). Les larves de stade 6 ont été éliminées.

Résultats.

Les résultats sont présentés dans le tableau 5.

On note tout de suite qu'il n'y a pas de différence entre les larves de stade 7 jeunes et âgées, ce qui infirme l'hypothèse souvent avancée que les larves de stade 7 âgées (stade pharate-nymphe) ne se nourrissent plus. Cette observa-

tion a également été faite au cours d'autres expérimentations relatives à la nutrition des larves âgées.

Formulation (titre U.I. <i>A. aegypti</i> /mg)	R-153.78 (3500)	Bt B1 45 (8800)	RB 50 % (1750)	Bt B1 42-43 (8200)	ABG 6108 (1000)	Témoin	
Taille moyenne des particules	29,1 µ	20,3 µ	14,2 µ	13,5 µ	25 µ	--	
CL 50 (mg/l/10mn)	0,038	0,019	0,25	3,2	1,1	--	
CL 100 (mg/l/10mn)	0,2	0,1	0,4	6,4	3,2	--	
Volume ingéré	stade 7 jeunes	531,4*±37,2 (131)**	344,5±27 (117)	499,2±39,8 (128)	112,2±10,7 (122)	214,5±33,3 (100)	30,2 (96)
	stade 7 âgées	454,3*±52 (57)**	341,1±38 (59)	523,4±65,4 (61)	118,8±16,1 (57)	225,7±28,2 (59)	27,9 (41)

* 10^{-4} mm^3

** nb de larves utilisées.

Tableau 5 - Relation entre la taille moyenne des particules, l'efficacité et le volume ingéré par les larves pour 5 formulations différentes. (traitement à 200 mg/l pendant 2 mn, 2 fois 2 répliques).

Table 5 - Relationship between mean particle size, efficacy and the volume ingested by larvae exposed to a high concentration (200 mg/l) during 2 mn with 5 different formulations. (2 x 2 replicates).

On constate que la masse ingérée par les larves varie significativement selon la formulation utilisée. Elle est en relation directe avec les niveaux d'efficacité observés ($r^2 = 0,71$ au niveau des CL 50 et 0,79 au niveau des CL 95). En comparant les poudres mouillables RB 50 % et ABG 6108, on constate que la seconde qui est 4fois moins active, est beaucoup moins bien ingérée. Les poudres RB 50 % et R-153.78 sont aussi bien ingérées l'une que l'autre, mais la dernière contenant 2 fois plus d'endotoxine est 2 fois plus efficace au niveau de la CL 100, ce qui est logique. La poudre Bt B1 42-43, dont les particules ne sont pas friables, est mal ingérée par les larves (5 fois moins que la poudre primaire R-153.78), ce qui explique son niveau d'efficacité

médiocre. Des résultats exactement comparables ont été obtenus en forêt et ne sont pas de ce fait reportés.

Les deux concentrés aqueux n'ont pas été mentionnés dans le tableau 4. En effet, au fort dosage utilisé (200 mg/l), les larves cessent totalement de se nourrir. Elles retrouvent un comportement trophique normal dès la fin du traitement. On ne retrouve pas pour ces larves un bol de formulation ingérée, les deux bandes rouges étant continues.

Aucun effet inhibiteur apparent n'a été noté au cours du traitement avec les 5 autres formulations. Les larves observées sous microscope stéréoscopique présentent un rythme de repli des éventails céphaliques apparemment inchangé malgré l'exposition à de fortes concentrations de formulations. Un temps de contact court a du être retenu, ce qui explique le recours à une forte concentration, afin de pouvoir déceler la masse ingérée. La toxine du *B. thuringiensis* H14 agit très rapidement et un temps de contact court était nécessaire pour s'assurer qu'au cours du traitement les larves ne seraient pas affectées par l'action paralysante de la toxine qui possède des propriétés neurotoxiques (CHILCOTT *et al.*, 1984). Dans la pratique, les larves soumises à la CL 100 meurent 15 à 20 mn après le début du traitement.

On a pu constater au cours de cette expérimentation, que la quantité de produit ingéré, qui est en corrélation étroite avec le niveau d'efficacité observé, dépend apparemment beaucoup plus du type de poudre que de la taille moyenne des agrégats. Ceci s'explique probablement par la consistance des particules qui, plus ou moins friables ou compressibles, sont plus ou moins bien ingérées par les larves. L'efficacité d'une poudre de *B. thuringiensis* H14 dépend donc de la rapidité avec laquelle les larves peuvent en un temps limité, capter et ingérer le maximum d'agrégats dérivant à portée de leurs pièces buccales. Il n'a pas été tenu compte dans l'interprétation de ces résultats, du titre biologique des formulations utilisées (exprimé en Unités Internationales *A. aegypti*/mg) car les valeurs mentionnées par les fabricants ne correspondent pas toujours à la valeur réelle qui n'a pu être déterminée à l'époque où ces essais ont été réalisés.

DISCUSSION - CONCLUSION

On a pu mettre en évidence, à travers quatre expériences différentes, un degré de corrélation élevé entre la taille des agrégats de spores et cristaux qui se forment lors de la mise en suspension des formulations de *B. thuringiensis* H14 et leur efficacité vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum*. La valeur moyenne conférant la meilleure efficacité sur l'ensemble des stades larvaires se situe pour les formulations étudiées, entre 30 et 50 μ . Au-delà, l'efficacité vis-à-vis des larves âgées continue d'augmenter tandis qu'elle diminue très rapidement vis-à-vis des larves jeunes.

Si l'influence de la taille des particules est très significative pour chaque formulation étudiée, il faut noter que leur efficacité dépend également de la nature des particules. Les particules de certaines formulations sont moins bien ingérées, notamment lorsque la cohésion des agrégats a été artificiellement augmentée, ce qui entraîne une diminution d'efficacité très significative.

Il paraissait souhaitable, au vu de nos résultats, d'orienter les formulateurs vers la mise au point de formulations à grosses particules, la taille optimum pour chacune d'elles restant à déterminer expérimentalement.

Pour être utilisables opérationnellement dans la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose, les formulations, qui sont appliquées par voie aérienne, doivent être liquides et aussi concentrées que possible, tout en restant suffisamment fluides pour se disperser spontanément lorsque la formulation pure est pulvérisée en amont des rapides où se développent les larves. La mise au point et la production industrielle de formulations répondant à ces exigences se heurtent dans la pratique à de nombreuses difficultés, surtout dans le cas de formulations constituées de grosses particules. Celles-ci séparent beaucoup plus rapidement que les spores et cristaux séparés, entraînant une diminution probable de leur portée efficace (distance sur laquelle le traitement garde toute son efficacité en aval du point d'épandage). De plus,

le fractionnement des agrégats, par suite du brassage dans les rapides, entraînerait également une diminution de la portée. Nous avons vu que l'utilisation d'un adjuvant destiné à augmenter la cohésion des agrégats ne représentait pas une solution envisageable. Enfin, les grosses particules en suspension aqueuse ont tendance à précipiter et à prendre en masse dans le fond des récipients de stockage.

Tous les essais mentionnés dans le présent travail ont été réalisés en période de basses eaux (saison sèche) pendant laquelle la turbidité de l'eau est la plus faible. La poursuite de ces essais au cours d'une saison des pluies, qui est habituellement une période peu propice, nous a permis de constater que les formulations à grosses particules, si performantes soient-elles dans certaines conditions, perdent beaucoup de leur efficacité lorsque la turbidité de l'eau augmente à la suite d'une crue et durant toute la saison des pluies. Ces essais, qui nous ont finalement conduits à opter pour les formulations à très fines particules (spores et cristaux séparés), feront l'objet de la deuxième partie de ce travail.

RESUME

Quatre séries d'expériences ont permis de démontrer que l'efficacité des formulations de *B. thuringiensis* H14 dépend étroitement de la taille des particules. La taille moyenne optimum pour les formulations étudiées se situe entre 30 et 50 μ . Ces formulations, qui sont les plus efficaces au cours de la saison sèche (eau claire), perdent leur efficacité en saison des pluies (eaux turbides) et ne sont donc pas adaptées à l'utilisation opérationnelle dans la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose.

SUMMARY

Four series of experiments were carried out in order to investigate the influence of the mean particle size on the efficacy of *B. thuringiensis* H14 formulations against *S. damnosum* complex larvae.

In the first experiment, a 5 g/l primary powder suspension was agitated using a magnetic stirrer. Big spore-crystal clumps were progressively broken during agitation process and the efficacy of the suspension decreased proportionally to decreasing size (table 1).

In the experiment 2, two granulometric fractions were sorted from a dusty powder and tested comparatively to the original powder (table 2). The fraction with the biggest particles (45 μm) was the most effective, but mortality recorded with young larvae decreased when mean particle size was beyond 35 μm (table 3).

In the experiment 3, four granulometric fractions were sieved from a wettable powder. The most active fraction was the 50-63 μm one (table 4).

In the experiment 4, larvae were exposed in filtered water to a high concentration (200 mg/l) during 2 mn with 7 different formulations. Before and after exposure, larvae were fed with fluorescent red dye. The ingested bolus of formulation was easily visible between the 2 red bands of ingested dye and drawn with a stereo microscope drawing apparatus. The ingested volume of powder formulations was closely related to their efficacy and to the type of particles rather than to their mean particle size (table 5). No feeding inhibition was detected during the 2 mn exposure period. On the contrary, feeding inhibition was evident with water dispersible concentrates and the ingested volume was not detectable.

As a whole, the efficacy of *B. thuringiensis* H14 formulations used was closely related to their mean particle size but also to the consistency of these particles. The efficacy increased with size up to an optimum of 35-50 μm according to the formulation used. The use of a cement in order to prevent desaggregation of clumps decreased larval ingestion rate and, consequently, the efficacy of the formulation.

Liquid suspensions with big clumps are difficult to perform at industrial level. In the second part of this work, advantages and drawbacks encountered in the use of this type of formulations will be compared with those of fine particle suspensions like Teknar[®] and discussed in the light of the feeding behaviour of blackfly larvae.

BIBLIOGRAPHIE

- CHILCOTT, C.N., KALMAKOFF, J. and PILLAI, J.S. - 1984. Neurotoxic and haemolytic activity of a protein isolated from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals. FEMS Microbiol. Lett., 25, 259-263.
- ELOUARD, J.M. et ELSSEN, P. - 1977. Variations de l'absorption des particules alimentaires et de la vitesse de transit digestif en fonction de certains paramètres du milieu chez les larves de *Simulium damnosum* Theobald 1903, (Diptera, Simuliidae). Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XV (1), 29-39.
- ELSEN, P., QUILLEVERE, D. et HEBRARD, G. - 1978. Le transit intestinal chez les larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera, Simuliidae) en Afrique de l'Ouest. 1 - Influence du sexe et de l'espèce. Ann. Soc. belge Méd. trop., 58, 209-217.
- ELSEN, P. et HEBRARD, G. - 1979. Le transit intestinal chez les larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera, Simuliidae) en Afrique de l'Ouest. 2 - Influence de la température de l'eau, de la concentration des particules et de la nature de ces particules. Ann. Soc. belge Méd. trop., 59, 49-58.
- ELSEN, P. - 1979. La nature et la taille des particules ingérées par les larves du complexe *Simulium damnosum* dans les rivières de Côte d'Ivoire. Rev. Zool. afr., 93, 476-484.
- ELSEN, P. - 1980. Le transit intestinal chez les larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera, Simuliidae) en Afrique de l'Ouest. 3 - Influence du stade larvaire, du nycthemère et de la saison. Ann. Soc. belge Méd. trop., 60, 203-212.
- ELSEN, P. - 1980. Contribution à l'étude écologique des populations pré-imaginales du complexe *Simulium damnosum* Théobald 1902 en Afrique de l'Ouest. Thèse de 3^e cycle, Université de Paris XI.
- GUILLET, P. et de BARJAC, H. - 1979. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves de simuliées vectrices de l'onchocercose. C.R. Acad. Sc. Paris, 289, D., 549-552.
- GUILLET, P. et ESCAFFRE, H. - 1979. Evaluation de *Bacillus thuringiensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l. - I - Résultats des premiers essais réalisés sur le terrain. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/79.730.
- GUILLET, P. et ESCAFFRE, H. - 1979. Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l. - II - Efficacité comparée de trois formulations expérimentales. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/79.735.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985. Méthodologie pour tester l'activité des larvicides sur les simuliées du complexe *Simulium damnosum*. I - Insecticides conventionnels et agents de lutte biologique. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol. (soumis pour publication).

- KURTAK, D.C. - 1978. Efficiency of filter feeding of blackfly larvae (*Diptera, Simuliidae*). *Can. J. Zool.*, 56 (7), 1608-1623.
- KURTAK, D.C. - 1979. Food of blackfly larvae (*Diptera, Simuliidae*) : seasonal changes in gut contents and suspended material at several sites in a single watershed. *Quaestiones Entomologicae*, 15, 357-374.
- MOLLOY, D., GAUGLER, R. and JAMNBACK, H. - 1981. Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of blackfly larvae. *J. Econ. Entomol.*, 74, 61-64.
-

ETUDE DES FACTEURS CONDITIONNANT L'EFFICACITE
DES PREPARATIONS A BASE DE *Bacillus thuringiensis* H14
VIS-A-VIS DES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum* s.l.

(Diptera : Simuliidae)

II - INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT
ET DE LA QUANTITE DE PARTICULES NATURELLES
EN SUSPENSION DANS L'EAU.

ETUDE DES FACTEURS CONDITIONNANT L'EFFICACITE DES PREPARATIONS A BASE DE
Bacillus thuringiensis H14 VIS-A-VIS DES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*

(Diptera : Simuliidae)

2 - INFLUENCE DU TEMPS DE CONTACT ET DE LA QUANTITE DE
PARTICULES NATURELLES EN SUSPENSION DANS L'EAU. *

Pierre GUILLET**

Henri ESCAFFRE***

Jean Michel PRUD'HOM***

Siaka BAKAYOKO***

INTRODUCTION

Dans la première partie de ce travail, il a été démontré que les formulations de *Bacillus thuringiensis* H14 étaient d'autant plus efficaces vis-à-vis des larves du complexe *Simulium damnosum* qu'elles sont constituées de particules (agrégats de spores et cristaux d'endotoxine) d'une taille moyenne élevée (GUILLET *et al.*, 1985). On observe une corrélation étroite entre le niveau d'efficacité des formulations et la quantité de particules ingérées au cours du traitement. Cette quantité dépend, outre la taille moyenne des particules, de leur nature et de leur consistance. La relation taille des particules/efficacité a également été observée chez *S. vittatum* Zetterstedt avec les mêmes formulations (MOLLOY *et al.*, 1981, 1984).

La deuxième partie de ce travail a été réalisée pour rechercher si l'efficacité des formulations pouvait également varier en fonction d'autres facteurs tels que la turbidité de l'eau dans laquelle elles sont employées ou le temps de contact des larves avec la formulation.

* Ce travail a bénéficié, dans le cadre des accords conclus entre l'ORSTOM et l'OCCGE, d'une subvention du programme spécial PNUD, Banque Mondiale, OMS, de recherches et de formation concernant les maladies tropicales.

** ORSTOM - SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE

*** Institut Pierre Richet (IRTO) - BP 1500 - BOUAKE - COTE D'IVOIRE

La turbidité des cours d'eau en zone tropicale est une donnée très fluctuante. Une montée rapide des eaux (orage) ou l'installation de débits élevés (saison des pluies) s'accompagne la plupart du temps d'une augmentation très forte de la turbidité et de la quantité de particules naturelles en suspension. Les larves de simuliés se nourrissent de ces particules, et lorsque leur abondance relative augmente, il pourrait y avoir compétition, au niveau de la capture et de l'ingestion entre les particules naturelles et celles de *B. thuringiensis* H14. L'abondance des particules en suspension est par ailleurs un facteur qui conditionne le développement de populations préimaginales du complexe *S. damnosum* (LE BERRE, 1966), ainsi que celui d'autres espèces (GRENIER, 1948).

Les traitements larvicides opérationnels, dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest, sont réalisés par voie aérienne. La formulation est épandue immédiatement en amont des rapides où se développent les larves. Le temps de passage de la vague de formulation est très court immédiatement en aval du point de traitement et augmente au fur et à mesure qu'on s'en éloigne, tandis que la concentration instantanée diminue. Il était donc intéressant de rechercher dans quelle mesure l'efficacité des formulations pouvait varier en fonction du temps de contact.

L'étude de l'influence des différents facteurs pouvant conditionner l'efficacité des formulations de *B. thuringiensis* H14 a été entreprise en vue de définir le type de formulation le mieux adapté aux contraintes de la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose, des particularités du comportement trophique des larves du complexe *S. damnosum* ainsi que de la qualité des eaux dans lesquelles elles se développent.

MATERIEL ET METHODES

Les essais ont été réalisés avec 3 formulations différentes :

- le Vectobac[®] 6108 II-ES (Abbott) lot 8278-223 titrant 1500 U.I. *A. aegypti*/mg, suspension huileuse qui s'émulsionne en donnant des agrégats sphériques d'une taille moyenne de 50 μ environ,
- le Vectobac ABG 6108, poudre mouillable titrant 1000 U.I. *A. aegypti*/

mg, avec une taille moyenne des particules de 25 μ environ,
- le Teknar[®] 402 WDC (Sandoz), suspension aqueuse de très fines particules titrant 600 U.I. *A. aegypti*/mg.

Les tests ont été réalisés dans le dispositif des minigouttières alimentées avec de l'eau de rivière (GUILLET *et al.*, 1985 b). Le contact des larves avec l'insecticide est généralement de 10 mn, suivi d'une période d'observation de 24 h à la fin de laquelle on note la mortalité. 4 à 5 concentrations sont testées avec 4 répétitions. Les CL 50 sont déterminées par tracé sur papier log-probit lorsqu'à l'évidence les différences observées sont très significatives, ou dans le cas contraire, calculées sur ordinateur avec un programme d'analyse-probit (FINNEY, 1971). Tous les résultats présentés dans cette étude ont été obtenus avec des larves âgées de stades 6 et 7 à plaques thoraciques bien développées.

La turbidité de l'eau a été mesurée extemporanément avec une mallette d'analyse des eaux (Hach[®]) et exprimée en unités de titre formaldéhyde (FTU). Les matières totales en suspension, exprimées en mg/l, ont été mesurées à partir d'échantillons prélevés au cours des tests et envoyés au laboratoire d'analyse des eaux de l'ORSTOM (Abidjan). Au cours d'une série d'essais, la quantité de matières en suspension a été artificiellement augmentée par apport de sédiments naturels, de la boue prélevée dans la rivière et tamisée à 120 μ . La suspension de boue, plus ou moins diluée, a été introduite dans les gouttières 15 mn avant, et pendant l'application des formulations de *B. thuringiensis* H14.

Parallèlement, on a réalisé une série d'essais où les larves ont été exposées aux mêmes dilutions de sédiments mais sans insecticide. Cette expérimentation avait pour but de vérifier si les sédiments seuls n'étaient pas susceptibles de modifier le rythme de nutrition et de transit intestinal s'ils étaient présents en trop grande quantité. A cet effet les larves dans les gouttières ont été exposées pendant 30 s à une suspension de poudre fluorescente rouge, puis pendant 10 mn à la suspension de sédiments et immédiatement fixées dans une solution de formol à 10 %. La progression du bol alimentaire a été mesurée au laboratoire avec une chambre claire permettant de déterminer le coefficient de remplissage du tube digestif. Seules les larves de dernier stade larvaire ont été utilisées. Dans ces essais, on a comparé les

résultats obtenus dans l'eau de la rivière (12 mg/l de matières en suspension) et en présence de trois dilutions de la suspension de sédiments (respectivement 46, 84 et 130 mg/l). Les essais ont été répétés 4 fois.

L'influence de la durée du traitement a été déterminée en comparant, pour une même quantité de produit appliqué, l'efficacité du traitement lorsque celui-ci dure respectivement : 1, 3, 9, 27 ou 54 mn. A un temps de contact court correspond une concentration instantanée élevée et inversement.

RESULTATS

Dans les conditions naturelles, l'efficacité de la formulation Vectobac II-ES à grosses particules dépend étroitement de la turbidité de l'eau dans laquelle elle est utilisée. Lorsque la turbidité croit de 25 à 45 FTU, la CL 50 augmente de 175 fois (graphique 1). Pour un même dosage (0,4 mg/l/10 mn), la mortalité varie de 5 à 98,9 % en fonction de la turbidité. En revanche, l'efficacité du Teknar constitué de très fines particules, n'est pas affectée par les variations de turbidité (graphique 2).

Des résultats relativement similaires ont été obtenus lorsque la turbidité de l'eau a été artificiellement augmentée : l'efficacité du Vectobac II-ES décroît proportionnellement à l'augmentation de la quantité de matières en suspension (graphique 3). L'efficacité du Teknar reste inchangée jusqu'à un taux de 84 mg/l de matières en suspension. Au-delà, on note une légère diminution. Le rythme de nutrition des larves reste constant quelle que soit la quantité de matières en suspension depuis 12 mg/l (conditions naturelles) jusqu'à 130 mg/l.

L'efficacité du Vectobac (poudre mouillable ou suspension II-ES) varie avec la durée de contact. Lorsque celle-ci augmente de 1 à 54 mn, la mortalité augmente proportionnellement de 56,6 à 96,2 % (graphiques 4 et 5). L'efficacité du Teknar reste pratiquement constante quelle que soit la durée du contact.

DISCUSSION - CONCLUSION

L'efficacité des formulations de *B. thuringiensis* H14 vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum* est conditionnée par un certain nombre de facteurs parmi lesquels les modalités de nutrition des larves. Pour discuter les résultats obtenus dans les deux parties de ce travail, il importe de différencier nettement, comme cela a été fait, les formulations à grosses particules constituées d'agrégats de spores et cristaux d'une taille moyenne supérieure à 20 μ d'une part, et les suspensions de spores et cristaux séparés (0,5 à 5 μ) d'autre part.

Les grosses particules sont interceptées dans les mailles des soies prémandibulaires constituant les éventails céphaliques. Régulièrement, la larve replie ses éventails et ingère les particules retenues. Les particules ingérées sont d'autant plus grandes qu'elles sont friables ou compressibles (ELSEN, 1979). Les larves peuvent également ingérer de très fines particules colloïdales (0,1 μ et moins, WOTTON, 1976). Ces particules, qui ne peuvent pas être interceptées mécaniquement du fait de leur taille, sont retenues par adhésion sur une substance muqueuse qui recouvre toute la partie des soies filtrantes ou de leurs microtiches exposées au courant (ROSS et CRAIG, 1979). Il s'agit là, contrairement à la capture des grosses particules, d'un phénomène de filtration passive, les larves ingérant les fines particules lorsque à chaque repli des éventails céphaliques, elles brossent et ingèrent le mucus.

Le transit intestinal des larves du complexe *S. damnosum* s'opère par bourrage et dépend donc de la quantité de particules ingérée par les larves (ELOUARD et ELSÉN, 1977). On a pu constater qu'il était pratiquement indépendant de la quantité de particules en suspension dans l'eau. De ce fait, lorsque celle-ci augmente, le rendement du processus de filtration (nombre de particules passées/nombre de particules ingérées) diminue. Ce phénomène a été bien étudié chez des espèces de simuliés néarctiques (KURTAK, 1978). Dans ces conditions, il y a compétition au niveau de l'ingestion, entre les particules naturelles et les particules de *B. thuringiensis* H14 dont le nombre reste constant.

Cette compétition explique pourquoi l'efficacité du Vectobac,

et d'une manière plus générale, des formulations à grosses particules, diminue lorsque la turbidité de l'eau augmente. C'est ainsi que l'efficacité de la poudre primaire R-153.78 (Bellon Biochem) à 0,2 mg/l/10 mn était de 100 % en saison sèche contre 35,7 % seulement en saison des pluies (turbidité 40 FTU).

Les formulations à très fines particules ont une efficacité relativement constante du fait de leur adhésion sur le mucus des soies céphaliques. Ce mucus recouvre une surface équivalente à la surface frontale des éventails céphaliques et peut retenir rapidement une quantité de cristaux suffisante pour intoxiquer les larves. Dans ce cas, la compétition avec les particules naturelles ne semble pas jouer.

Ces essais ont permis de montrer que les formulations à grosses particules telles que les poudres mouillables ou le Vectobac II-ES, qui dans certaines conditions ont une efficacité remarquable, ne sont pas adaptées à l'utilisation opérationnelle dans la lutte contre l'onchocercose. Leur efficacité en saison des pluies diminue considérablement alors que c'est à cette époque que les débits des rivières et donc les quantités de formulation à appliquer sont les plus élevés. De plus, dans la pratique des traitements, surtout au cours de la saison sèche où chaque gîte doit être traité individuellement, le temps d'exposition des larves est relativement bref, ce qui minimise leur efficacité. Ce phénomène a également été constaté avec le Vectobac en Amérique du Nord (FROMMER *et al.*, 1981).

A la suite de ce travail et des essais en rivière du Teknar (GUILLET *et al.*, 1982, LACEY *et al.*, 1982) les compagnies produisant les formulations de *B. thuringiensis* H14 pour la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest ont été systématiquement orientées vers la mise au point de suspensions auto-dispersibles prêtes à l'emploi et composées comme le Teknar, de très fines particules. Les problèmes rencontrés dans l'amélioration des performances de ces formulations, tant en ce qui concerne leur efficacité que leurs caractéristiques physiques, feront l'objet d'une autre publication.

RESUME

Les formulations de *B. thuringiensis* H14 constituées de grosses particules ont une efficacité vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum* qui diminue considérablement lorsque la turbidité de l'eau des rivières dans lesquelles elles sont employées augmente. Il en est de même lorsque le temps de contact avec les larves est bref. Au contraire, l'efficacité des suspensions à très fines particules n'est pas affectée et de ce fait, ce type de formulation est beaucoup mieux adapté à l'utilisation opérationnelle contre les larves des vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest.

SUMMARY

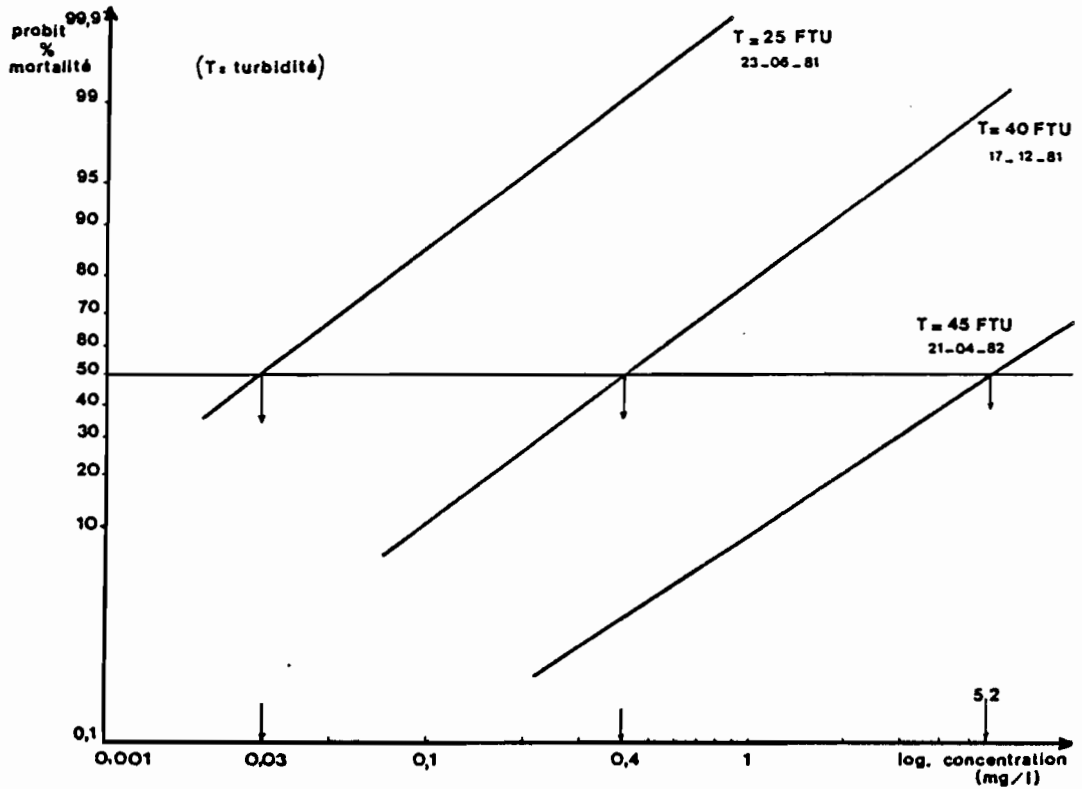
The efficacy of *B. thuringiensis* H14 formulations against *S. damnosum* complex larvae depends, among different factors, of their mean particle size (either they are individualized spores and crystals or big aggregates), the river water turbidity and the length of exposure time.

The efficacy of formulations with big particles sharply decreases when the river water turbidity increases. Under natural conditions, the efficacy of Vectobac 6108 II-ES (a suspension with 50 μm particles) decreases about 175 times when turbidity increases from 25 to 45 Formaldehyde Turbidity Units (FTU). Under the same conditions, the efficacy of Teknar, a suspension of individualized spores and crystals, is not significantly affected.

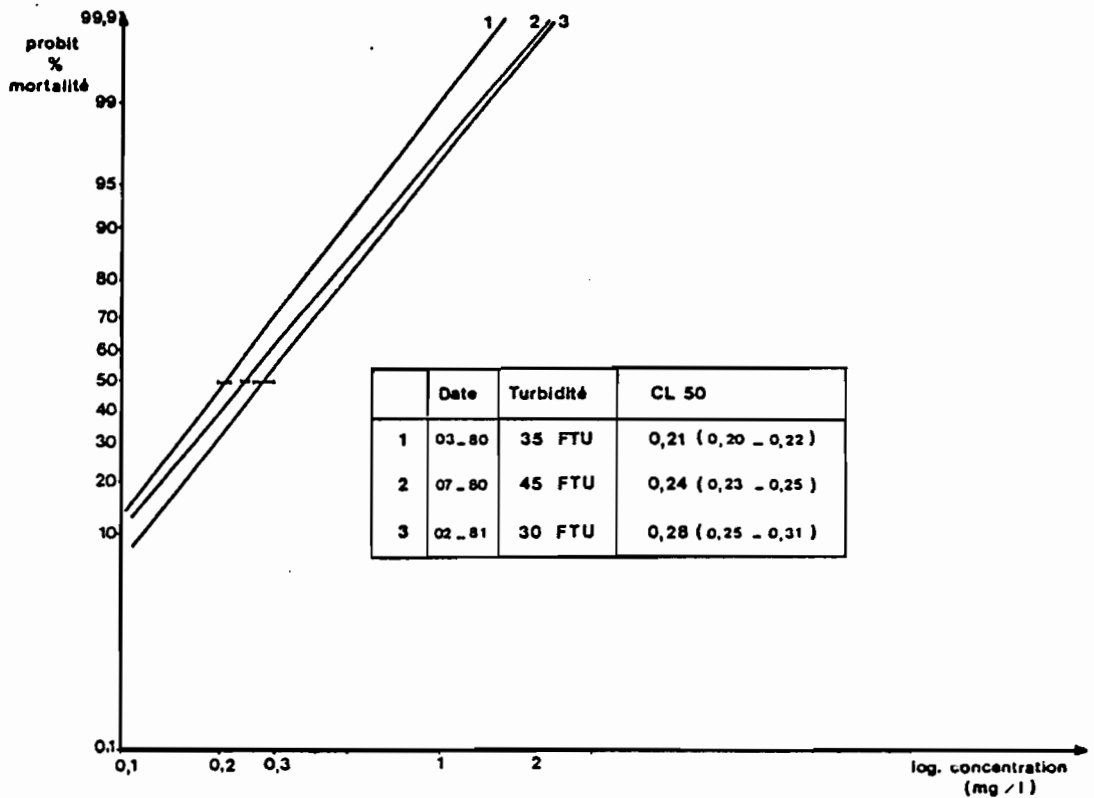
The decreased efficacy under field conditions is not likely to be due to feeding inhibition, but rather to a competition between *B. thuringiensis* H14 and natural particles when their content in the river water increases.

The efficacy of formulations with big particles increases with length of exposure time up to 54 mn. In the same conditions, the efficacy of Teknar remains fairly constant.

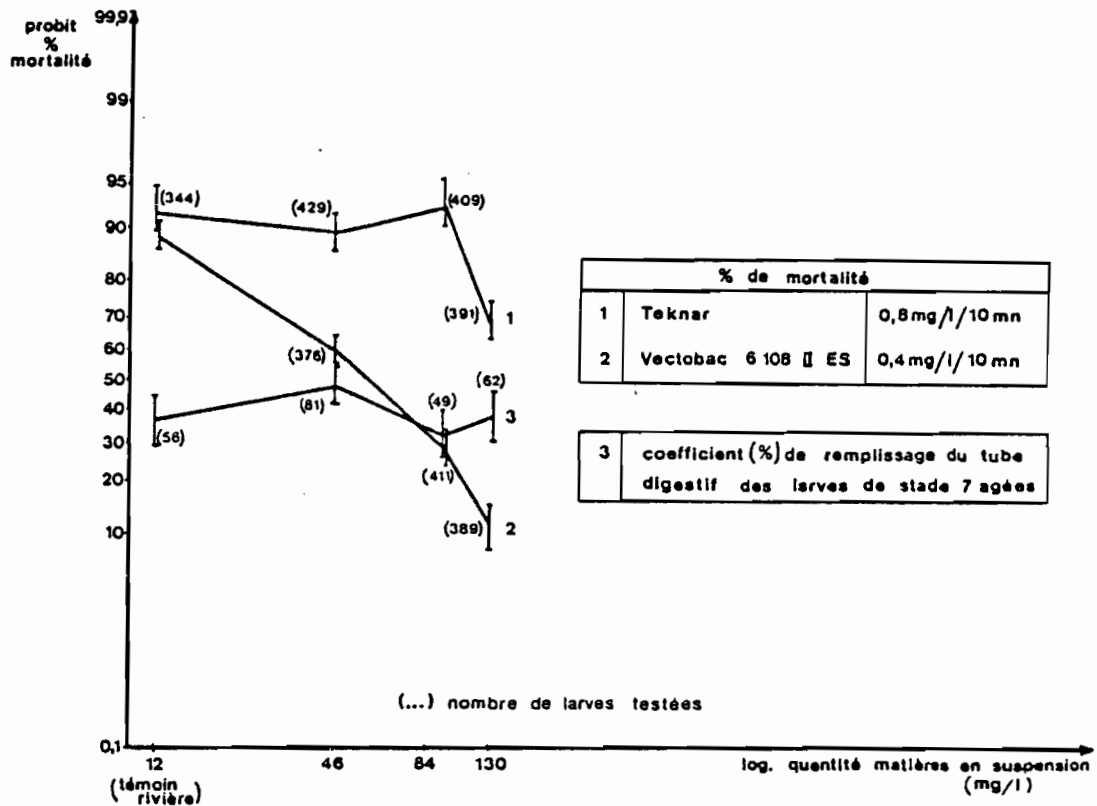
Consequently, the formulations with big particles, among which under certain conditions are presently the most effective formulations, do not fit to the requirements for use in operational control of the larvae of the onchocerciasis vectors. Following this study, industrial companies have been systematically oriented towards the development of self-dispersible suspensions of individualized spores and crystals that may be applied without any previous dilution in the rivers.



Graphique 1 - Efficacité du Vectobac 6108 II-ES comparée sur 4 essais en fonction de la turbidité de l'eau. (tests en minigouttières, larves de stade 6 et 7)
Comparative efficacy of the Vectobac 6108 II-ES suspension according to changes in river water turbidity. (mini-gutter tests, 6th and 7th instar larvae)

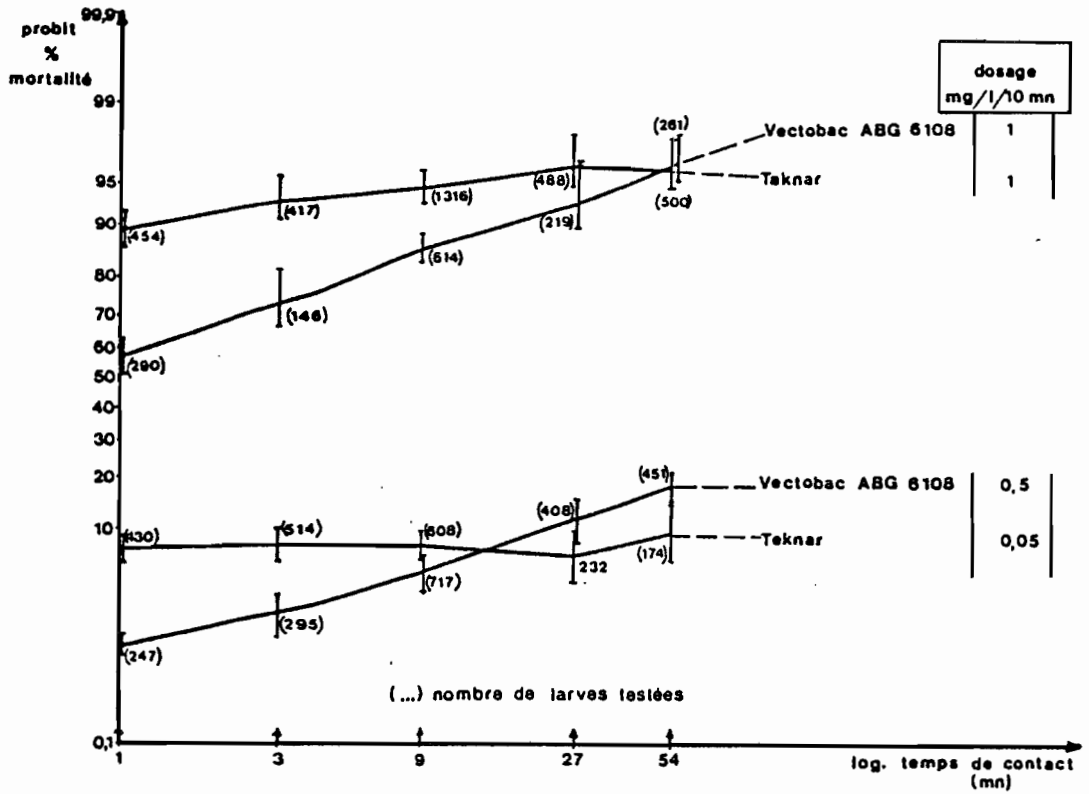


Graphique 2 - Efficacité du Teknar comparée sur 3 essais différents en fonction de la turbidité de l'eau. (tests en minigouttières, larves de stade 6 et 7)
Comparative efficacy of Teknar WDC according to changes in river water turbidity. (mini-gutter tests, 6th and 7th instar larvae)

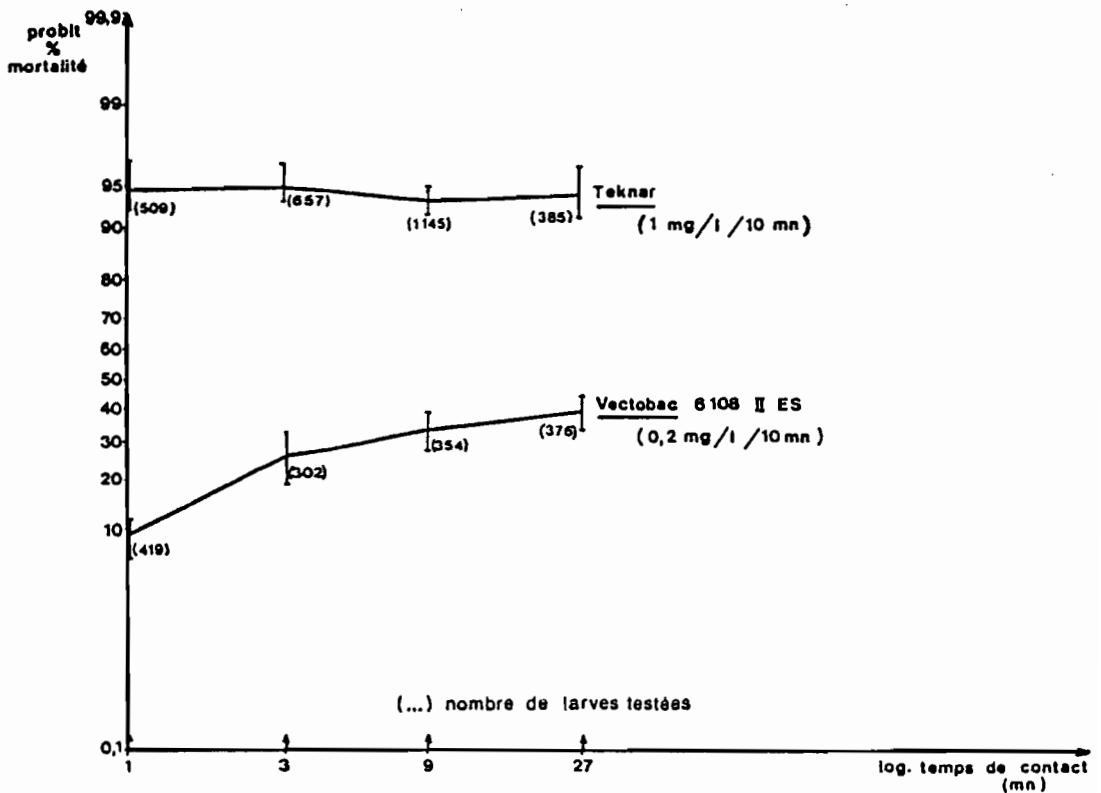


Graphique 3 - Variations de l'efficacité de 2 formulations et du coefficient de remplissage du tube digestif (en %) en fonction de la quantité totale de particules en suspension dans l'eau. (tests en minigouttières, larves de stade 7)

Changes in efficacy of 2 formulations and in gut filling (percentage) according to suspended matters in water. (mini-gutter tests, 7th instar larvae)



Graphique 4 - Influence du temps de contact sur l'efficacité de deux formulations.
(produit temps de contact x concentration constant)
Influence of the exposure time on the efficacy of two formulations.
(exposure time x concentration constant)



Graphique 5 - Influence du temps de contact sur l'efficacité de deux formulations.
(produit temps de contact x concentration constant)
Influence of the exposure time on the efficacy of two formulations.
(exposure time x concentration constant)

BIBLIOGRAPHIE

- ELOUARD, J.M. et ELSÉN, P. - 1977. Variations de l'absorption des particules alimentaires et de la vitesse de transit digestif en fonction de certains paramètres du milieu chez les larves de *Simulium damnosum*. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., 15, 29-39.
- ELSÉN, P. - 1979. La nature et la taille des particules ingérées par les larves du complexe *Simulium damnosum* dans les rivières de Côte d'Ivoire. Rev. Zool. Afr., 93, 476-484.
- FINNEY, D.J. - 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 333p.
- FROMMER, R.L., HEMBREE, S.C., NELSON, J.H., REMINGTON, M. et GIBBS, P.H. - 1981. The evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in reducing *Simulium vittatum* (Diptera : Simuliidae) larvae in their natural habitat with no extensive aquatic vegetative growth. Mosq. News, 41, 339-347.
- GRENIER, P. - 1948. Contribution à l'étude biologique des simuliés de France. Physiol. Comp. et Oecol., 1 (3), 165-330.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H. et PRUD'HOM, J.M. - 1982. L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. - I - Efficacité et modalités d'application. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XX (3), 175-180.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., PRUD'HOM, J.M. et BAKAYOKO, S. - 1985 a. Etude des facteurs conditionnant l'efficacité des préparations à base de *Bacillus thuringiensis* H14 vis-à-vis des larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera : Simuliidae). Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 b. Méthodologie pour tester l'efficacité des formulations d'insecticides sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. - I - Insecticides conventionnels et agents de lutte biologique. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- KURTAK, D.C. - 1978. Efficiency of filter feeding of black fly larvae (Diptera : Simuliidae). Can. J. Zool., 56 (7), 1608-1623.
- LACEY, L.A., ESCAFFRE, H., PHILIPPON, B., SEKETELI, A. et GUILLET, P. - 1982. Large river treatment with *Bacillus thuringiensis* H14 for the control of *Simulium damnosum* s.l. in the onchocerciasis control programme. Tropenmed. Parasitol., 33, 97-101.
- LE BERRE, R. - 1966. Contribution à l'étude biologique et écologique de *Simulium damnosum* Théobald 1903. Mem. ORSTOM, 17, 204p.
- MOLLOY, D., GAUGLER, R. et JAMNBACK, H. - 1981. Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of black fly larvae. J. Econ. Entomol., 74, 61-64.
- MOLLOY, D., WRAIGHT, S.P., KAPLAN, B., GERARDI, J. et PETERSON, P. - 1984. Laboratory evaluation of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquito and black fly larvae. J. Agric. Entomol., 1(2), 161-168.
- ROSS, D.H. et CRAIG, D.A. - 1980. Mechanisms of fine particle capture by larval blackflies (Diptera : Simuliidae). Can. J. Zool., 58(6), 1186-1192.
- WOTTON, R.S. - 1976. Evidence that blackfly larvae can feed on particles of colloidal size. Nature, 261, 697.

19

L'UTILISATION D'UNE FORMULATION A BASE DE *Bacillus thuringiensis* H14

DANS LA LUTTE CONTRE L'ONCHOCERCOSE EN AFRIQUE DE L'OUEST.

I - EFFICACITE ET MODALITES D'APPLICATION.

L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest

1 — Efficacité et modalités d'application (1)

Pierre GUILLET (2)
Henri ESCAFFRE (2)
Jean-Michel PRUD'HOM (3)

Résumé

L'apparition d'une résistance aux insecticides organo-phosphorés chez les larves du complexe *S. damnosum* fait du *Bacillus thuringiensis* H14 le seul larvicide de remplacement actuellement utilisable pour le traitement des zones de résistance. La formulation Teknar[®] (Sandoz) a été testée lors d'essais à échelle réduite et en rivière et ses modalités pratiques d'utilisation ont été précisées. Son utilisation opérationnelle, si elle est déjà possible, nécessite une adaptation des dispositifs d'application utilisés dans les traitements de routine à l'Abate[®]. Il apparaît indispensable d'augmenter l'efficacité du Teknar et d'améliorer ses caractéristiques physiques.

Mots-clés : Complexe *S. damnosum* — Onchocercose — *Bacillus thuringiensis* H14 — Efficacité — Utilisation opérationnelle.

Summary

THE USE OF A *Bacillus thuringiensis* H14 FORMULATION FOR ONCHOCERCIASIS CONTROL IN WEST AFRICA.
1 — EFFICACY AND USE MODALITIES

Bacillus thuringiensis H14 has been proved to be an excellent biocontrol agent for black fly larvae, especially for *Simulium damnosum* complex larvae, the onchocerciasis vectors in Africa. As *S. damnosum* larvae had developed a strong resistance to organophosphorus compounds, *B. thuringiensis* H14 was actually the only alternative that could be used for the treatment of zones where resistance occurred. The Teknar[®] (Sandoz) formulation, among most of the experimental formulations tested represents the best compromise between the level of effectiveness (0.8 to 1.6 mg/l during 10 mn) and physical characteristics that enable its use in aerial treatments.

The mortality is not exposure time related. The formulation has to be previously diluted with 20 % of water for helicopter treatments. In these conditions, it can be used with success in operational treatments practically in similar conditions as Abate[®]. Nevertheless in order to achieve systematically 100 % of efficacy at each aerial pouring (dose : 1.6 mg/l/10 mn) the mode of application has to be slightly adapted.

In order to enable treatments in the wet season with high discharges in the rivers and to reduce their cost it appears to be necessary to increase the effectiveness of the formulation and to improve its physical characteristics.

Key words : *S. damnosum* complex — Onchocerciasis — *Bacillus thuringiensis* H14 — Efficacy — Operational use.

(1) Cette recherche a reçu le support financier du Programme Spécial P.N.U.D.-Banque Mondiale-O.M.S. de Recherches et de Formation concernant les Maladies Tropicales, dans le cadre des accords passés entre l'O.R.S.T.O.M. et l'O.C.C.G.E.

(2) Entomologiste médical O.R.S.T.O.M., I.R.T.O., BP. 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire.

(3) Technicien d'entomologie médicale O.R.S.T.O.M., I.R.T.O., BP. 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire.

2744
B 852

P. GUILLET, H. ESCAFFRE, J.-M. PRUD'HOM

L'étude de la toxicité du *Bacillus thuringiensis* H14 vis-à-vis des larves de moustiques et de simules a déjà fait l'objet d'un nombre important de travaux. Les premiers essais réalisés sur les larves des espèces du complexe *Simulium damnosum*, vecteurs de l'onchocercose humaine en Afrique intertropicale ont permis de démontrer l'efficacité remarquable des produits primaires tels que le standard IPS 78 ou la poudre R 153-78 tant au laboratoire (Undeen et Berl, 1979) que sur le terrain (Guillet et de Barjac, 1979). Le niveau d'efficacité enregistré lors des essais en rivière a permis d'envisager favorablement une utilisation opérationnelle dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. Cette utilisation nécessite la mise au point de formulations appropriées, utilisables en traitements aériens. Un programme d'évaluation de ces formulations a été mis en place à Bouaké en Côte d'Ivoire. Vingt six formulations différentes de *B. thuringiensis* H14 ont été testées au stade IV (évaluation sur le terrain à échelle réduite, utilisation de gouttières) et cinq au stade V (essais de saison sèche en rivière). Parmi celles-ci, le Teknar[®], produit par les Laboratoires Sandoz, présente un niveau d'efficacité et des caractéristiques physiques (stabilité, dispersabilité, suspensibilité...) qui permettent d'envisager son emploi dans certaines conditions opérationnelles.

La mise en évidence d'un haut niveau de résistance au téméphos chez les larves du complexe *S. damnosum* en Côte d'Ivoire (Guillet *et al.*, 1980a) et, depuis, la mise en évidence d'une résistance croisée avec d'autres composés organophosphorés dont le chlorphoxim (Kürtak *et al.*, 1982) ont fait du *B. thuringiensis* H14 un alternatif très prometteur pour la continuation des opérations de traitement dans les zones de multirésistance aux organophosphorés.

Des essais aux stades IV et V ont permis de préciser les modalités d'utilisation du Teknar dans les conditions opérationnelles.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. La formulation

Le Teknar est une suspension aqueuse concentrée de spores et cristaux de *B. thuringiensis* H14. Son titre biologique est d'environ 600 unités internationales *A. aegypti* par milligramme. Sa viscosité est élevée (> à 2000 CP à 18°C) et ne permet pas une dispersion spontanée dans l'eau. Sa suspensibilité est excellente : aucune sédimen-

tation décelable en eau calme après 24 heures (Guillet *et al.*, 1980b). La formulation doit être préalablement diluée dans l'eau avant de pouvoir être utilisée dans les traitements larvicides anti-simulidiens. Les essais au stade IV ainsi que les premiers traitements en rivière ont été réalisés avec un échantillon de 5 litres reçu en mars 1980 et les autres essais avec un lot de 2 000 litres reçu en septembre 1980.

1.2. Évaluation au stade IV

L'évaluation se fait sur le terrain à l'aide d'un système de minigouttières. Ces gouttières, par groupes de 8 en parallèle, sont alimentées par gravité avec de l'eau de la rivière filtrée à travers une grille à mailles de 120 μ . Les larves (150 à 250 par gouttière) sont introduites dans chaque gouttière 3 heures avant le début du traitement. Tous les stades larvaires sont utilisés. La durée du traitement est habituellement de 10 min mais peut être modifiée à volonté. Le décompte de la mortalité s'effectue 24 heures après le traitement et les larves sont comptées et identifiées au laboratoire. Le pourcentage de mortalité des larves du complexe *S. damnosum* est exprimé par groupe d'âge : stades I à III, stades IV et V, stades VI et VII ainsi que pour l'ensemble des larves. Les larves intoxiquées par le *B. thuringiensis* H14 ne dérivent pas et doivent être détachées manuellement. Pour chacune des concentrations testées, 4 répliques sont effectuées portant sur 2 jours différents. La température de l'eau est notée lors de chaque essai. La faible amplitude généralement observée ($\pm 5^\circ\text{C}$ en moyenne) n'influe pas sur l'activité du *B. thuringiensis* H14. La concentration létale 50 est déterminée à l'aide d'un programme d'analyse log-probit sur calculatrice TI 59 et l'intervalle de confiance est donné au seuil de 95 %.

1.3. Évaluation au stade V

Ces évaluations consistent en des traitements sur un gîte (rapide) ou une portion de gîte au cours de la saison sèche. Le débit du bief à traiter est calculé avant chaque essai. La vitesse du courant est mesurée avec un moulinet d'hydrologie ou un tube de Pitot. Le traitement s'effectue en une bande transversale légèrement en amont du gîte (traitement en ligne). La température de l'eau est notée au moment du traitement. Il n'est généralement pas pratiqué d'analyse des matières en suspension,

BACILLUS THURINGIENSIS DANS LA LUTTE CONTRE L'ONCHIOCERCOSE. I

ni de mesure de turbidité. Les supports larvaires naturels sont repérés avant traitement et 24 heures après. L'efficacité est jugée totale lorsqu'aucune larve ne subsiste sur les supports repérés ainsi que sur d'autres supports, et presque totale lorsque l'on peut retrouver çà et là une ou quelques larves âgées. Lorsqu'on retrouve régulièrement des larves, même en faible nombre, l'efficacité est considérée comme partielle. Seul un traitement provoquant 100 % de mortalité est considéré comme efficace. Ce type de traitement donne une indication sur le niveau d'efficacité de la formulation et son comportement en rivière. Il ne laisse rien présager de la portée qui ne peut être évaluée qu'au cours de traitements en saison des pluies lorsque le débit des rivières est important.

Des traitements de saison sèche au Teknar ont également été réalisés avec un hélicoptère équipé du système vide-vite dans des conditions exactement similaires aux conditions opérationnelles en diluant préalablement la formulation avec 20 % d'eau.

2. RÉSULTATS

2.1. Essais au stade IV

Lors des essais en gouttières, la CL 50 observée est de 0,24 mg/l de formulation pendant 10 mn (I.C. : 0,23-0,25) et la limite supérieure de la CL 100 de 1,6 mg/l/10 mn (tabl. I). La mortalité survient dans les trois heures qui suivent le traitement. Six heures après, elle n'augmente plus significativement par rapport à celle du lot témoin.

On n'observe pas de relation significative entre le temps de contact et la mortalité des larves lorsque les traitements sont effectués aux concentrations proches de la CL 100. La mortalité ne varie pas significativement, que les larves soient exposées respectivement à 10 mg/l/1 mn, 3,3 mg/l/3 mn, 1,1 mg/l/9 mn ou 0,37 mg/l/27 mn (tabl. II). Lors d'une exposition à 0,12 mg/l/54 mn on observe toutefois une légère diminution d'efficacité. Toutes ces concentrations équivalent en termes de volume de formulation utilisé à 1 mg/l/10 mn. Les jeunes

TABLEAU I

Efficacité en gouttières du Teknar (Sandoz)

Dosage en mg/l/10 mn ^x	Pourcentage de mortalité et (nombre de larves testées)			
	Stades 1 à 3	Stades 4 et 5	Stades 6 et 7	tous stades
0,2 (4)	46 (376)	34,9 (375)	39,9 (534)	40,2 ± 4,2 (1305)
0,4 (4)	94,2 (309)	68,3 (265)	60,7 (468)	72,6 ± 3,2 (1042)
0,8 (4)	97,2 (285)	94,6 (258)	85,6 (436)	91,3 ± 1,8 (979)
1,6 (4)	100 (249)	100 (324)	100 (382)	100 (955)
0 (2)	0,9 (103)	2,5 (119)	1,3 (148)	1,6 (370)

x entre parenthèses : le nombre de répliques

CL 50 = 0,24 mg/l/10 mn (0,23 - 0,25)

CL 90 = 0,99 mg/l/10 mn (0,91 - 1,1)

P. GUILLET, H. ESCAFFRE, J.-M. PRUD'HOM

TABLEAU II

Relation entre le temps de contact et la mortalité des larves traitées au Teknar en gouttières
(le rapport dosage x temps de contact est constant et équivaut à 1 mg/l/10 minutes)

	Dosage appliqué et temps de contact (8 répliques par combinaison)				
	10 mg/l/ 1 minute	3,3 mg/l/ 3 minutes	1,1 mg/l/ 9 minutes	0,37 mg/l/ 27 minutes	0,18 mg/l/ 54 minutes
Pourcentage de mortalité et (nombre de larves testées)	96,3 ± 1,2 (975)	96,9 ± 1,1 (1021)	93,7 ± 1 (2207)	94,9 ± 1,6 (708)	91,9 ± 1,8 (908)

TABLEAU III

Efficacité en rivière du Teknar (dilution préalable dans 50 % d'eau, traitements manuels)

Dosage en mg/l/10mn	Rivière	Débit en m ³ /s	Date	Effet observé
1,6	FéréDougouba (savane)	1,6	3/04/80	Efficacité totale et très rapide sur tout le gîte
1,6	FéréDougouba	2	4/04/80	Efficacité totale et très rapide sur tout le gîte
0,8	FéréDougouba	4,3	9/07/80	Efficacité totale sur tout le gîte
0,8	Goué (forêt)	2	7/07/80	Efficacité totale sur tout le gîte
0,4	FéréDougouba	3,8	10/07/80	Efficacité partielle - restent quelques larves âgées
0,4	Goué	2	7/07/80	Efficacité partielle - restent quelques larves âgées

BACILLUS THURINGIENSIS DANS LA LUTTE CONTRE L'ONCHOCERCOSE. I

larves (stades I à III) sont plus sensibles que les larves âgées (stades VI et VII) : CL 50 de 0,21 contre 0,3 mg/l ; toutefois, la limite supérieure de la CL 100 est la même pour ces deux groupes de stades (tabl. I).

2.2. Essais au stade V

Au cours des traitements au sol, avec une formulation préalablement diluée avec 50 % d'eau, on obtient une efficacité totale à 0,8 mg/l/10 mn soit 480 cc de Teknar par m³/s de débit. Ces essais ont été réalisés aussi bien en rivières de savane (la FéréDougouba, peuplée essentiellement par *S. soubrense* et *S. damnosum s.s.*) qu'en rivières de forêt (le Goué, peuplé par *S. yahense*) dans lesquelles les effets observés ont été similaires (tabl. III). La mortalité des larves survient très rapidement et l'on observe à 1,6 mg/l/10 mn une mortalité totale trois heures seulement après le traitement.

Sans dilution préalable, la formulation est inefficace, même au dosage de 3,2 mg/l/10 mn. La dilution minimum pour obtenir 100 % de mortalité à 1,6 mg/l/10 mn est de 20 % d'eau dans la formulation. Durant ces essais de différentes dilutions en rivière, c'est le deuxième lot de Teknar qui a été utilisé (2 000 l). Avec ce lot, il a été impossible d'obtenir 100 % de mortalité à 0,8 mg/l/10 mn, même en diluant la formulation avec 50 % d'eau.

Le traitement hélicoptère effectué gîte par gîte (conditions de saison sèche, débit 5,5 m³/s) sur la FéréDougouba (bief de 100 km de long) dans les conditions opérationnelles (vide-vite, concentration 1,6 mg/l, dilution 20 % d'eau, 39 points d'épandage) a donné un résultat très encourageant. Sur les 9 points où les contrôles ont été effectués avant et après traitement, 7 ont démontré une efficacité totale. Sur deux gîtes, il restait çà et là une ou quelques larves âgées. Mise à part la nécessité de diluer la formulation, le traitement s'est déroulé exactement comme s'il s'agissait de l'Abate habituellement utilisé.

3. DISCUSSION — CONCLUSION

Parmi les différentes formulations de *B. thuringiensis* H14 testées jusqu'à présent en rivières, le Teknar est celle qui présente le meilleur compromis entre l'efficacité antismulidienne et les contraintes de son emploi dans les traitements aériens.

Cette formulation est quatre à huit fois moins efficace que la poudre primaire R 153-78 bien que

celle-ci ne soit en fait pas une formulation (Guillet et de Barjac, *op. cit.*). Dans les deux cas, ainsi que cela est observé avec la plupart des formulations de *B. thuringiensis* H14, les larves jeunes sont plus sensibles. Cette différence a été également notée avec des espèces néarctiques chez lesquelles elle peut être nettement plus accentuée que chez *S. damnosum* s.l. (Molloy *et al.*, 1981). Ceci n'est toutefois pas un phénomène général, certaines formulations de *B. thuringiensis* H14 à grosses particules ($\geq 45 \mu$) étant toujours plus efficaces sur les larves âgées que sur les larves jeunes et ce d'autant plus que la taille moyenne des particules est plus grande.

Le Teknar est nettement plus efficace vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum* qu'il ne l'est vis-à-vis d'autres espèces de simuliés. Ceci s'explique d'une part du fait que *S. damnosum* s.l. est plus sensible au *B. thuringiensis* H14 que d'autres espèces (Undeen et Berl, *op. cit.*), d'autre part que les conditions de milieu varient beaucoup d'une région à l'autre, notamment le débit (traitement de *S. ochraceum* au Guatemala, Undeen *et al.*, 1981) et la température de l'eau (Molloy *et al.*, *op. cit.*). Parmi les facteurs intrinsèques, le rythme d'ingestion des particules nettement plus élevé chez *S. damnosum* s.l. que chez d'autres espèces (Elsen et Hébrard, 1979 ; Elouard et Elsen, 1977 ; Mulla et Lacey, 1976) joue très probablement un rôle prépondérant.

L'absence de relation entre le temps de contact et la mortalité des larves est un facteur favorable à l'utilisation du Teknar. En effet, dans la pratique, le temps de contact larve/formulation est la plupart du temps très court (quelques secondes).

Toutefois, en saison des pluies, dans la partie aval de la portée utile, les larves sont exposées longtemps à des concentrations plus faibles. Dans les deux cas, l'efficacité du Teknar reste satisfaisante. Cela explique qu'au cours d'un épandage de saison des pluies, la portée efficace du Teknar ait été supérieure à 20 km (Lacey *et al.*, *comm. pers.*). Les résultats obtenus au cours des traitements hélicoptères permettent d'envisager favorablement l'utilisation opérationnelle du Teknar. Toutefois, il s'est avéré difficile d'obtenir systématiquement 100 % de mortalité alors que cela était toujours le cas lors des traitements au sol. Si, globalement, les modalités de traitement utilisées pour l'Abate conviennent pour le Teknar, certaines adaptations légères seront toutefois nécessaires pour obtenir systématiquement 100 % d'efficacité à

1,6 mg/l/10 mn. Les problèmes liés à l'utilisation opérationnelle du Teknar, actuellement en cours, corroborent cette observation.

Les quantités de formulation à appliquer restent 3 à 6 fois supérieures à celles de l'Abate. L'utilisation du Teknar pose donc de réelles difficultés logistiques (trop faible autonomie de traitement des hélicoptères) et s'avère être très onéreuse. L'apparition d'une résistance aux composés organophosphorés fait que cette formulation est actuellement la seule utilisable dans le traitement des zones de résistance. Ceci souligne la nécessité absolue d'améliorer le niveau d'efficacité de la formulation actuelle (augmentation de la teneur en δ -endotoxine

P. GUILLET, H. ESCAFFRE, J.-M. PRUD'HOM

et meilleure fluidité). Les résultats obtenus avec des nouvelles formulations de Teknar ainsi qu'une étude sur sa stabilité au stockage en zone tropicale font l'objet d'autres publications.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les Responsables du Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la Région du Bassin de la Volta qui ont mis à notre disposition tous les moyens matériels nécessaires à la réalisation de cette étude.

Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M.
le 14 juin 1982.

BIBLIOGRAPHIE

- ELSEN (P.) et HÉHARD (G.), 1979. — Le transit intestinal chez les larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera, Simuliidae) en Afrique de l'Ouest. II. Influence de la température de l'eau, de la concentration des particules et de la nature de ces particules. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 59 : 49-58.
- ÉLOUARO (J.-M.) et ELSÉN (P.), 1977. — Variations de l'absorption des particules alimentaires et de la vitesse du transit digestif en fonction de certains paramètres du milieu chez les larves de *Simulium damnosum* Theobald 1903 (Diptera Simuliidae). *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XV, n° 1 : 29-39.
- GUILLET (P.) et BARJAC (H. H.), 1979. — Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves de simuliés vectrices de l'onchocercose. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 289, sér. D : 549-552.
- GUILLET (P.), ESCAFFRE (H.), OUEËDRAOGO (M.) et QUILLÉVÉNÉ (D.), 1980a. — Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire (zone du Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la Région du Bassin de la Volta). *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XVIII, n° 3 : 291-299.
- GUILLET (P.), ДЕМПАН (J.) et COZ (J.), 1980b. — Évaluation de *Bacillus thuringiensis* sérotype H14 pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l. III. Données préliminaires sur la sédimentation de l'endotoxine dans l'eau et sur sa stabilité en zone tropicale. *Doc. miméogr. OMS, WHO/VBC/80.756*, 9 pp.
- KURTAK (D.), OUEËDRAOGO (M.), OGRAN (M.), BARRÉ TELE et GUILLET (P.), 1982. — Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae already resistant to temephos (Abate®). *Doc. miméogr. OMS*, (à paraître).
- MOLLOY (D.), GAUGLER (R.) et JAMNACK (H.), 1981. — Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of black fly larvae. *J. Econ. Ent.*, 74, 1 : 61-64.
- MULLA (M. S.) et LACEY (L. A.), 1976. — Feeding rates of *Simulium* larvae on particulates in natural streams (Diptera : Simuliidae). *Env. Ent.*, 5, 2 : 283-287.
- UNDEEN (A. H.) et BERL (D.), 1979. — Laboratory studies on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against *Simulium damnosum* (Diptera : Simuliidae) larvae. *Mosq. News.*, 39, 4 : 742-745.
- UNDEEN (A. H.), TAKAOKA (H.) et HANSEN (K.), 1981. — A test with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac as a larvicide for *Simulium ochraceum*, the central american vector of onchocerciasis. *Mosq. News*, 41, 1 : 37-40.

20

LARGE RIVER TREATMENT WITH *Bacillus thuringiensis* (H14)

FOR THE CONTROL OF *Simulium damnosum s.l.*

IN THE ONCHOCERCIASIS CONTROL PROGRAMME.

PURCHASED BY THE
U. S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE
FOR OFFICIAL USE

M 1334

Heft 2 33. Jahrgang Juni 1982

Seite 69-136

Sonderdruck

Tropenmedizin und Parasitologie

Organ der Deutschen Tropenmedizinischen Gesellschaft

Herausgeber:

H.-H. Schumacher, Hamburg
R. Garms, Hamburg
E. Mannweiler, Hamburg

Beirat:

A. A. Buck, Washington
M. Dietrich, Hamburg
B. O. L. Duke, Genf
F. Hörchner, Berlin
H. Jusatz, Heidelberg

Begründet von

E. G. Nauck

Tropenmed. Parasit. 33 (1982) 97-101

Large River Treatment with *Bacillus thuringiensis* (H-14) for the Control of *Simulium damnosum* s.l. in the Onchocerciasis Control Programme*

L.A. Lacey¹, H. Escaffre², B. Philippon¹, A. Sékétéli¹, P. Guillet²

¹Onchocerciasis Control Programme, Ouagadougou, Upper Volta

²Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et l'Onchocercose, Bouaké, Côte d'Ivoire

Large River Treatment with *Bacillus thuringiensis* (H-14) for the Control of *Simulium damnosum* s.l. in the Onchocerciasis Control Programme*

L.A. Lacey¹, H. Escaffre², B. Philippon¹, A. Sékétéli¹, P. Guillet²

¹Onchocerciasis Control Programme, Ouagadougou, Upper Volta

²Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et l'Onchocercose, Bouaké, Côte d'Ivoire

Summary

Complete mortality of *Simulium damnosum* Theobald s.l. larvae was obtained along a 19 km stretch of the Marehoué River including and downstream of the Danangoro rapids complex in the Bandama Basin of Ivory Coast after treatment with 1.5 ppm/10 min of the Sandoz 402-1-WDC formulation of *Bacillus thuringiensis* Berliner serotype H-14. Partial control was observed for an additional 15 km. The level of control was especially encouraging considering the low concentration (0.8%) of active ingredient in the Sandoz formulation. Additionally, the treated population has demonstrated resistance to temephos (Abate®), the larvicide currently utilized in the Onchocerciasis Control Programme. Other species of *Simulium* were somewhat less affected by the treatment; living larvae were found 4 km downstream of the treatment point. Reinvasion of the Danangoro complex, ostensibly by drifting larvae of *Simulium* spp., was detected the day after treatment. Non-target organisms, including Ephemeroptera and Chironomid midges, were observed before and after treatment and were apparently not affected. In a second test, 0.8 ppm/10 min of the Sandoz formulation was tested against *S. damnosum* s.l. and three other *Simulium* species in the N'Zi River in Ivory Coast utilizing a gutter bioassay apparatus. Six hours after treatment 91% of the *S. damnosum* s.l. larvae had died. The other species responded with 91-100% mortality.

Die Bekämpfung von *Simulium damnosum* s.l. in einem großen Fluß des Onchocerciasis Control Programms mittels *Bacillus thuringiensis* (H-14)

Mit einer einmaligen Applikation der *Bacillus thuringiensis*-Formulierung 402-1-WDC von Sandoz in einer Dosierung von 1.5 ppm/10 min konnten die Larven-Populationen von *Simulium damnosum* s.l. eines 19 km langen Abschnitts des Marahoué (Bandama Becken, Elfenbeinküste) auf der Höhe der Danangoro-Stromschnellen und unterhalb davon vollständig vernichtet werden. Auf weiteren 15 km wurde eine Reduktion der Larvenpopulationen beobachtet. Der Erfolg dieser Bekämpfung ist einmal wegen der geringen Konzentration der aktiven Substanz der Sandoz-Formulierung, zum anderen wegen der Resistenz der betroffenen Larvenpopulationen gegen das allgemein im Onchocerciasis Control Programm eingesetzte Insektizid Temephos (Abate®) besonders ermutigend. Andere Simuliidenarten wurden durch die Bekämpfung weniger beeinträchtigt: überlebende Larven wurden 4 km unterhalb der Applikationsstelle gefunden. Eine Wiederbesiedlung der Stromschnellen - offensichtlich durch driftende Arte der Begleitfauna, einschließlich der Trichoptera, Ephemeroptera und Chironomidae wurden vor und nach der

Bekämpfung nachgewiesen, sie waren durch die Bekämpfung offensichtlich nicht geschädigt worden. In einem weiteren Versuch wurde die Sandoz-Formulierung in einer Dosierung von 0.8 ppm/10 min an *S. damnosum* s.l. und anderen Simuliidenlarven in Fließbächen im N'Zi, Elfenbeinküste getestet. Sechs Stunden nach der Applikation waren 91% der *S. damnosum* s.l.-Larven eingegangen; bei den Larven der anderen Simuliidenarten wurden Mortalitätsraten von 91-100% beobachtet.

Introduction

The Onchocerciasis Control Programme (OCP) has enjoyed considerable success in the suppression of *Simulium damnosum* Theobald s.l. with the larvicidal application of temephos (Abate®, 0,0,0',0'-tetramethyl 0,0'-(thio-di-4,1-phenylene), Walsh et al. 1979). In March 1979 the original 654,000 km² under treatment was extended to include an additional 110,000 km² in southern Ivory Coast. Virtually every active breeding site in the 764,000 km² area under treatment receives a weekly application of larvicide. The effective concentration varies between 0.05 and 0.1 ppm/10 min depending on river discharge and velocity, which in turn are subject to large seasonal variations according to rainfall.

In certain rivers, such as the Marahoué and the lower Bandama below Kossou Dam, treatment has only been in effect since March 1979. It is in this area that failures of regular treatment were first suspected. In March 1980 biting rates at Chutes Gauthier on the Lower Bandama increased steadily in spite of weekly larviciding and by June biting rates of up to 2377 flies/man per day were observed. Susceptibility testing on larvae of *S. damnosum* s.l. using the Mouchet test (Mouchet et al. 1977) confirmed the existence of resistance to temephos at Chutes Gauthier (Guillet et al. 1980).

The occurrence of this resistance has led to an intensification of the search for alternative insecticides that are environmentally acceptable for the larvicidal control of the black fly vectors. Recent control successes with the microbial insecticide, *Bacillus thuringiensis* Berliner (serotype H-14) against *S. damnosum* s.l. under laboratory and field conditions (Undeen and Berl 1979, Guillet and de Barjac 1979) and against other species of black flies (Undeen and Colbo 1980, Frommer et al. 1981, Molloy and Jamnback 1981, Undeen et al. 1981) indicate that this agent

*Mention of a commercial or proprietary product does not constitute an endorsement by the USDA

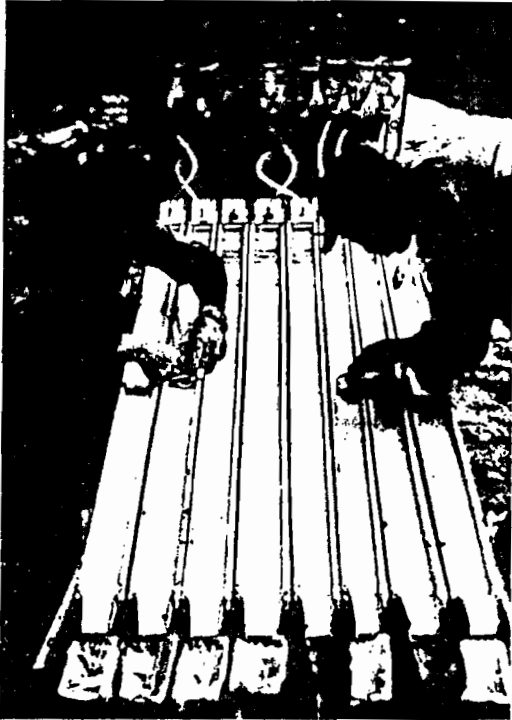


Fig. 1 Gutter bioassay apparatus

offers an alternative means of control with possible implementation within the near future.

This paper presents results from a large-scale field trial of the Sandoz 402-1-WDC formulation of *B. thuringiensis* (H-14) at the Danangoro rapids complex on the Marahoué River in South Central Ivory Coast (Lat. 7° 11' N; Long. 5° 56' W) and a smaller trial conducted at Timbé on the N' Zi River.

Material and Methods

The 40-km stretch of the Marahoué River between Danagoro village and a point 6 km west of Bouaflé was selected as the treatment location because there is resistance to temephos in the local population of black flies, an abundance of breeding sites, and a lack of slow segments of the river. The Danangoro rapids complex begins 6 km below Danagoro village. After bifurcating, the Marahoué is further divided into several water courses of various sizes. Stream velocities in excess of 1 m/sec are the average for the complex. Below the complex, the various streams coalesce to form a single waterway.

One week prior to treatment, 12 breeding sites were selected within the main channels of the Danagoro rapids complex for placement of artificial substrates in fast current. One substrate consisted of a strip of ribbed plastic ribbon (26 x 2 cm) similar to the artificial substrate of Williams and Obeng (1962) and the other a "mini-broom" of the type used by Elouard (personal communication) for the sampling of non-target fauna. Both were fastened to a small triangle constructed of bailing wire (2.5 cm on a side), which in turn was tied to trailing vegetation with heavy fishing line. Three such artificial substrates were placed in each of the 12 sampling sites.

The day before treatment, the Marahoué was prospected by boat from the village of Danangoro to a point 34 km downstream from the proposed treatment application zone just above the complex. When natural breeding sites were found they were marked with a strip of red cloth. Twenty-two sites were marked, including a control near Danangoro village and the remainder between the rapids and 34 km downstream. The evening before treatment a gutter bioassay system (Fig. 1), similar to that of Wilton and Travis (1965), was set up on the bank of the right channel of the complex. Water which was coarsely filtered to prevent intake of leaves and other debris was supplied from the river by siphon. Larvae of *S. damnosum* s.l. (probably *S. soubrense* Vajime and Dunbar, based on previous cytotoxicity (Meredith 1980, unpublished OCP internal report) collected within the complex were placed in the gutters and allowed to attach.

On the morning of treatment (September 17, 1980) one artificial substrate was removed from each of the 12 sampling sites and preserved in 80% alcohol. The control larvae at Danangoro and the natural breeding sites downstream were re-prospected immediately before treatment. Based on unpublished reports of Guillet and Escaffre that 1.6 ppm/10 min of the Sandoz 402 formulation (based on the total formulation) produced 100% mortality in *S. damnosum* s.l. larvae in small streams, 1.5 ppm/10 min of the formulation was selected for the first large-scale trial. The Sandoz 402 technical information sheet states that 0.8% of the formulation is "active ingredient" plus 99.2% inert ingredients. The actual concentration of "active ingredient" during a 10-min treatment period, therefore, was only 0.012 ppm.

A discharge rate of 457 m³/sec (temp. 26.8 °C, pH 7.2) was measured the morning of treatment at the Bouaflé bridge, 40 km below the treatment site. In order to produce the desired concentration of *B. thuringiensis* (H-14) formulation, 416.4 liters of the 402 formulation (22 containers, 5 US gal. each) were utilized. This was diluted with a minimum of 80% water in 55-liter metal barrels and mixed to provide a readily miscible suspension. Due to the bulk of the material (770 l), it was added to the river in seven increments (two 55-liter barrels each trip). Each increment was applied in a transverse band using a small boat with an attached metal frame to secure the barrels in a horizontal position (Fig. 2). Simultaneously with the first addition of formulation 2.5 km above the complex, floats were placed in the water to determine the travel of the treated water column. Subsequent additions of the formulation were made at those points in the river to which the floats had drifted. This provided less initial dilution, a tighter "front" of formulation and better effective carry. The final addition of formulation was made 10 m above the divergence of the Marahoué which marks the top of the complex. The closest sampling sites were 500 m below the final point of application.

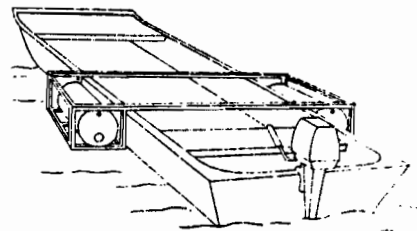


Fig. 2 Delivery apparatus for the application of *B. thuringiensis* suspension

Immediately after treatment, water temperature was determined with a mercury thermometer and pH with a Hellige® comparator. At 20 and 50 hours post-treatment, artificial substrates were collected and placed in alcohol and the marked natural breeding sites were inspected for living, moribund and dead *Simulium* larvae. Specimens of *Simulium* spp. and non-target insects on natural substrates were also preserved in 80% alcohol.

After returning to the laboratory at Bouaké, the artificial substrates were washed in 80% alcohol and the attached insects removed. *Simulium damnosum* s.l. larvae were separated from other *Simulium* spp. and both groups were counted. The non-target insects were also separated and deposited with the O.R.S.T.O.M. Hydrobiology Laboratory, Bouaké for subsequent analysis.

A test at 0.8 ppm of the Sandoz formulation was conducted on the N'Zi River near Timbé. Due to the paucity of *S. damnosum* s.l. larvae in the N'Zi at that time, the assessment of carry was not feasible. Efficacy was studied using the gutter apparatus, which was placed at the side of the river 200 m downstream from the Timbé bridge. *Simulium damnosum* s.l. larvae were collected from an isolated breeding site upstream with the aid of a helicopter. Other species of *Simulium* were collected from the Lato, a small stream nearby.

The larvae were allowed to acclimate overnight in the gutters, which were supplied with pumped river water. Prior to treatment, pupae were removed from the gutter. A concentration of 0.8 ppm/10 min of the Sandoz formulation was applied after suspending the material in 60% water. Three transverse bands of the inoculum were applied from the Timbé bridge over a 5-min period. A river discharge of 21 m³/sec required 10.1 liters of the formulation to produce the desired concentration. Turbulence of the river assured sufficient mixing of the formulation prior to reaching the intake of the pumps which supplied water to the bioassay apparatus.

Three and 6 hours after treatment mortality was assessed by collecting the larvae that had been caught in the nets at the end of each gutter (Fig. 2). Those larvae that remained attached after death were removed with forceps. The larvae were placed in 80% alcohol and subsequently counted and identified in the laboratory. Due to logistic considerations, the test was terminated 6 hours after treatment. Larvae which were still alive at that time were also preserved in alcohol for counting and identification.

Results and Discussion

Within 6 hours of treatment all of the *S. damnosum* s.l. larvae in the gutter apparatus located in the Danangoro complex were detached or dead and still secured in place. Inspection of the artificial substrates 20 hours after treatment revealed only 6 *S. damnosum* s.l. larvae and these were probably the result of drift from upstream populations. Natural substrates where large numbers of 7th instars of *S. damnosum* s.l. had been found the previous day were completely devoid of larvae. Although there was a large reduction in the numbers of the other *Simulium* species on the artificial substrates (Table 1), several larvae were found on natural substrates within the rapids complex 20 hours post-treatment. These probably also resulted from post-treatment drift from the untreated area upstream, but may have also been due to lower susceptibility. The uniform results at all of the sampling sites throughout the Danangoro complex at 20 hours indicate that the larvicide was fairly well distributed into the various channels.

Tab. 1 Average number of *Simulium* spp. on artificial substrates in the Danangoro rapids before and after a 1.5 ppm/10 min application of the Sandoz 402 formulation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) (September 17-19, 1980)

Species	Mean No. larvae ± S.E./substrate		
	Pre-treatment	Hours post-treatment	
		20	50
<i>Simulium damnosum</i> s.l.	40.1±11.8	0.5±.4	10.3±2.8
<i>S. unicornutum</i>	40.3± 9.3	2.0±.7	10.8±2.8
<i>S. tridens</i>	14.3± 5.4	0.7±.4	4.3±1.7
<i>S. schoutedeni</i>	1.5± .9	0.3±.3	0.4± .2
Total larvae	1.154	41	309

Within 50 hours post-treatment, larvae of *Simulium* spp. including *S. damnosum* s.l. had increased in numbers on the artificial substrates in the Danangoro complex, ostensibly as the result of drift and post-treatment hatch. Inspection of the natural substrates at Danangoro village (control) at 20 and 50 hours post-treatment revealed no natural reduction of the untreated larvae.

Natural substrates below the rapids were devoid of living *S. damnosum* s.l. larvae as far as 19 km downstream. Moribund larvae and very few survivors were observed between 19 and 28 km. Several surviving larvae of *S. damnosum* s.l. were found at the 28 km point.

Larvae of *S. schoutedeni* Wanson were found alive only 4 km downstream from the treatment point indicating a possible lower susceptibility to *B. thuringiensis* (H-14). The numbers of larvae of *S. schoutedeni* and other species, however, were fairly low (1-4/site per 10-15 min search) between the 4 and 20 km points but increased sharply below that section. Differential susceptibility to *B. thuringiensis* in mosquitoes and black flies has been demonstrated in previous investigations (Lacey et al. 1978, de Barjac and Coz 1979, Lacey and Lacey 1981, Molloy et al. 1981).

Of the species utilized in our studies, only *S. damnosum* s.l. is a vector of *Onchocerca volvulus*. With the exception of *S. tridens* none of the other species are anthropophilic. *Simulium tridens* is only considered an accidental man biter, with preferred hosts being fowl and equids (Phillippon 1978). The main advantage of differential susceptibility to *B. thuringiensis* (H-14) in such innocuous species is the lessened disruption to the food chain by the regular application of a larvicide which concomitantly controls the vector species. At higher dosages, however, survivors of these species would undoubtedly be affected.

On the second day of post-treatment prospection, moribund larvae of *S. damnosum* s.l. were still found between the 19 and 34 km sites indicated either delayed development of disease symptoms due to the cumulative effects of the diluted formulation and prolonged exposure to *B. thuringiensis* (H-14) or a retarded pathogenesis in larvae that were affected earlier by a low concentration of the formulation. These symptoms were not observed in larvae in the gutter apparatus in the rapids complex, where death followed the addition of the formulation within 6 hours.

Table 2 presents the number of non-target insects found on the artificial substrates in the Danangoro complex immediately before treatment and 20 and 50 hours post-treatment. The number of Trichoptera was too low to enable an accurate measurement of any possible adverse effects caused by the Sandoz formulation. No apparent ill-effects were observed with the other non-target fauna. Post-treatment prospection of natural substrates between Danangoro rapids and Bouaké revealed an abundance of Ephemeroptera and evidence of Trichoptera and Chironomidae. A detailed analysis of the effects of the Sandoz formulation on non-target fauna will be presented by the O.R.S.T.O.M. Hydrobiology Laboratory at a later date.

The success of the Danangoro study was due to a variety of factors. *Simulium damnosum* s.l. has already demonstrated a high level of susceptibility to *B. thuringiensis* (H-14) (Undeen and Berl 1979, Guillet and de Barjac

Tab. 2 Non-target fauna collected from artificial substrates in the Danangoro rapids before and 20 and 50 hours after treatment with 1.5 ppm/10 min of the Sandoz 402 formulation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) (September 17-19, 1980)

Taxon	Pre-treatment	Number collected	
		Hours post-treatment	
		20	50
Emphemeroptera			
<i>Tricorythidae</i>	49	70	133
<i>Pseudocloeon bertrandi</i>	-	-	1
<i>Centropitulum</i> spp.	3	1	4
<i>Afrobaetides</i> sp.	-	2	-
<i>Caenomedea</i> spp.	1	-	-
Totals	53	73	138
Trichoptera			
<i>Cheumatopsyche falcifera</i>	8	4	9
<i>C. digitata</i>	1	-	1
<i>Orthotrichia</i> sp.	1	-	-
Totals	10	4	10
Chironomidae			
<i>Nanocladius</i> sp.	2	4	4
<i>Cricotopus quadri-fasciatus</i>	1	1	-
<i>Tanytarsus</i> sp.	7	2	5
<i>Cryptochironomus</i> sp.	-	-	1
<i>Strictochironomus</i> sp.	14	13	8
Totals	24	20	18

1979). The elevated water temperature undoubtedly influenced the level of activity in this test. Lacey et al. (1978) and Molloy et al. (1981) have reported a positive correlation between temperature and activity of *B. thuringiensis* against black flies. The high discharge and velocity of the Marahoué were responsible for the ideal carry that was observed. Working with streams varying in discharge from 200 to 3,400 liters/min, Undeen and Colbo (1980) found a positive correlation between the size of the stream and distance of effective downstream carry of inoculum. The Sandoz formulation was shown to be effective in earlier trials with *S. damnosum* s.l. (Guillet and Escaffre, unpublished data). The diluent apparently allows suspension of individual spores and crystals and does not interfere with the fine particle capture mechanisms of the larvae.

The results of the N'Zi River test at 0.8 ppm/10 min are presented in Table 3. Although additional tests are needed prior to any definite conclusions regarding efficacy of Sandoz 402 at 0.8 ppm, it is evident that the limits of effective control are in the vicinity of this concentration. Six hours after treatment those larvae which survived (all late instars) showed no signs of loss of vitality, although at this lower concentration one might expect additional mortality over the next 24 hours.

The data in Table 3 indicate a more uniform mortality response of *Simulium* spp. to *B. thuringiensis* than in the Danangoro test. However, comparison of the two tests regarding differential species susceptibility would be hazardous due to variation of several parameters: the close proxim-

Tab. 3 The larvicidal activity of Sandoz 402 formulation of *Bacillus thuringiensis* (H-14) at 0.8 ppm/10 min against *Simulium* spp. on the N'Zi River (November 7, 1980)

Species	Total larvae utilized	% Cumulative post-treatment mortality	
		3 h	6 h
<i>Simulium damnosum</i> s.l.	522	76	91
<i>S. cervicornutum</i>	425	83	95
<i>S. hargreavesi</i>	35	66	91
<i>S. unicornutum</i>	8	100	-

imity of the exposed larvae to the treatment point, the nature in which the test was conducted (gutter apparatus), the change in species composition of the test population and the small stream origin for all of the species except *S. damnosum* s.l.

Although preliminary in nature, the high mortality and excellent carry obtained in these studies show that *B. thuringiensis* (H-14), even at a concentration as low as 0.8 % active ingredient has potential as an alternative to conventional larvicides for the control of *Simulium* vectors of onchocerciasis. The minimal effects of *B. thuringiensis* (H-14) on non-target organisms (Dejoux 1979, Colbo and Undeen 1980, Molloy and Jamnback 1981) and the reduced possibility that *Simulium* spp. could become resistant to the complex of proteins that make up the δ -endotoxin are additional benefits which enhance the feasibility of making this agent operational.

In order to become operational, activity/mg of formulation should be increased and (without changing the nature of the diluents) the suspension should be such that the undiluted formulation could be added directly to the river and mix readily without prior suspension in water.

Additional studies, in a variety of stream types and hydrological conditions against other cytospecies of the *S. damnosum* complex, and at additional concentrations are warranted. In an area of the Onchocerciasis Control Programme where resistance to temephos had developed rapidly in comparison with the rest of the programme, *B. thuringiensis* (H-14) may provide a long-lasting innocuous solution to a complicated problem.

Acknowledgements

A small army of personnel were responsible for the application of inoculum and assessment of results. In alphabetical order they were: T. Barro (OCP), C. Dejoux and J.-M. Elouard (ORSTOM), M. Ocran, M. Ouedraogo and P. Pangalet (OCP), J.-M. Proud'hon (OCCGE), A. Somé, G. Zerbo and P. Zou (OCP). Jean-Marc Elouard was especially helpful in identifying black fly and non-target species and in providing advice and companionship in the field. The assistance and skill of the Viking helicopter pilots were indispensable. We thank Drs. A1 Undeen of the ARS, USDA and Dan Molloy of the New York State Science Service for their comments on the manuscript. We are grateful for the artistic and clerical help of Ms. Barbara Gibbs. The final manuscript was prepared by Ms. Jackie Bickner.

Literature

de Barjac, H., J. Coz: Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustiques à *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Bull. Wild. Hlth. Org. 57 (1979) 139-141

- Colbo, M.H., A.H. Undeen: Effect of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on non-target insects in stream trials for control of Simuliidae. Mosq. News 40 (1980) 368-371
- Dejoux, C.: Recherches préliminaires concernant l'action de *Bacillus thuringiensis* de Barjac sur la faune d'invertébrés d'un cours d'eau tropical. WHO. Minneograph Document WHO/VBC/79.721 (1979) 11 p.
- Frommer, R.L., S.C. Hembree, J.H. Nelson, M.P. Remington, P.H. Gibbs: The evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in reducing *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) larvae in their natural habitat with no extensive aquatic vegetative growth. Mosq. News 41 (1981) 339-347
- Guillet, P., H. de Barjac: Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves de Simulies vectrices de l'Onchocercose. C. R. Acad. Sc. Paris, t. 289 Ser. D. (1979) 549-552
- Guillet, P., H. Escaffre, M. Ouedraogo, D. Quillévéré: Mise en évidence d'une résistance au temephos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire (Zone du programme de Lutte Contre l'Onchocercose dans la région du bassin de la Volta). Cah. ORSTOM, sér. ent. Méd. et Parasitol. 18 (1980) 291-299
- Lacey, L.A., J.M. Lacey: The larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) against mosquitoes of the Central Amazon Basin. Mosq. News 41 (1981) 266-270
- Lacey, L.A., M.S. Mulla, H.T. Dulmage: Some factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against black flies. Environ. Entomol. 7 (1978) 583-588
- Molloy, D., H. Jamnback: Field evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a black fly biocontrol agent and its effect on nontarget stream insects. J. Econ. Entomol. 74 (1981) 314-318
- Molloy, D., R. Gaugler, H. Jamnback: Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of black fly larvae. J. Econ. Entomol. 74 (1981) 61-64
- Mouchet, J., G. Quélenec, D. Berl, Y. Séchan, S. Grébaud: Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de *Simulium damnosum*. Cah. ORSTOM, sér. Ent. inéd. et Parasitol. 15 (1977) 55-66
- Philippon, B.: L'Onchocercose humaine en Afrique de L'Ouest. ORSTOM Doc. Tech. no. 37 (1978) 197 pp
- Undeen, A.H., D. Berl: Laboratory studies on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac against *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) larvae. Mosq. News 39 (1979) 742-745
- Undeen, A.H., M.H. Colbo: The efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against black fly larvae (Diptera: Simuliidae) in their natural habitat. Mosq. News 40 (1980) 181-184
- Undeen, A.H., H. Takaoka, K. Hansen: A test of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac as a larvicide for *Simulium ochraceum*, the Central American vector of onchocerciasis. Mosq. News 41 (1981) 37-40
- Walsh, J.F., J.B. Davies, R. Le Berre: Entomological aspects of the first five years of the onchocerciasis control programme in the Volta River Basin. Tropenmed. Parasit. 30 (1979) 328-344
- Williams, T.R., L. Oheng: A comparison of two methods of estimating changes in *Simulium* larval populations with a description of a new method. Ann. Trop. Med. Parasitol. 56 (1962) 259-261
- Wilton, D.P., B.V. Travis: An improved method for simulated stream tests of black fly larvicides. Mosq. News 25 (1965) 118-123

Dr. L.A. Lacey, Insects Affecting Man and Animals Research Laboratory, ARS-USDA, P.O. Box 14565, Gainesville, Florida 32604, USA
 Mr. H. Escaffre, Mr. P. Guillet, Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et l'Onchocercose, B.P. 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire
 Dr. B. Philippon, Mr. A. Sékétéli, World Health Organization, Onchocerciasis Control Programme, B.P. 549, Ouagadougou, Haute Volta

L'UTILISATION D'UNE FORMULATION A BASE DE *Bacillus thuringiensis* H14

DANS LA LUTTE CONTRE L'ONCHOCERCOSE EN AFRIQUE DE L'OUEST.

II - STABILITE DANS LES CONDITIONS DE STOCKAGE EN MILIEU TROPICAL.

L'utilisation d'une formulation à base de
Bacillus thuringiensis H14 dans la lutte
contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest

II — Stabilité dans les conditions de stockage en milieu tropical (1)

Pierre GUILLET (2)
Henri ESCAFFRE (2)
Jean-Michel PRUD'HOM (3)

Résumé

La formulation Teknar[®] (Sandoz) à base de *Bacillus thuringiensis* H14 présente une stabilité remarquable dans les conditions de stockage en milieu tropical. Après 16 mois de stockage à Bouaké (Côte d'Ivoire) sous abri comme en plein soleil, cette formulation conserve toute son efficacité vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum*. Les dilutions d'eau qu'il est nécessaire de réaliser pour son utilisation sont également stables pendant plus de 6 mois.

Mots-clés : Complexe *S. damnosum* — Onchocercose — *Bacillus thuringiensis* H14 — Stabilité stockage.

Summary

THE USE OF A *Bacillus thuringiensis* H14 FORMULATION FOR ONCHOCERCIASIS CONTROL IN WEST AFRICA. II — STORAGE STABILITY

The Teknar[®] formulation, a water based dispersible concentrate of *Bacillus thuringiensis* H14 (Sandoz) stored during 16 months right in the sun in a tropical country (at Bouaké, Ivory Coast) remains fully effective against *S. damnosum* complex larvae. The mean maximum temperature in the sun during this storage was 32,3° C with a maximum of 35,6° C. No difference was observed between batches stored in the sun and in an air-conditioned room. The formulation has to be diluted with 20 % of water before its use and this dilution is also quite stable more than 6 months. Storage stability does not represent in any way a factor limiting the operational use of *B. thuringiensis* H14 in onchocerciasis control programmes.

Key words : *S. damnosum* complex — Onchocerciasis — *Bacillus thuringiensis* H14 — Storage stability.

La formulation Teknar[®] (Sandoz) à base de *Bacillus thuringiensis* H14 présente une efficacité vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum* ainsi que des caractéristiques physiques qui per-

mettent d'envisager favorablement son utilisation opérationnelle dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose (Guillet *et al.*, 1982). Cette utilisation pose toutefois de sérieux problèmes logistiques

(1) Cette recherche a reçu le support financier du Programme Spécial P.N.U.D.-Banque Mondiale-O.M.S. de Recherches et de Formation concernant les Maladies Tropicales, dans le cadre des accords passés entre l'O.R.S.T.O.M., et l'O.C.C.G.E.

(2) Entomologiste médical O.R.S.T.O.M., I.R.T.O., BP. 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire.

(3) Technicien d'entomologie médicale de l'O.R.S.T.O.M., I.R.T.O., BP. 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire.

2742
B 852

dans la mesure où les quantités à appliquer demeurent élevées (1,6 mg/l/10 mn soit 960 cc par m³ de débit) et où il est nécessaire de diluer préalablement la formulation avec de l'eau avant de l'utiliser. Du fait de l'apparition d'une résistance au téméphos (Guillet *et al* 1980a) et plus récemment d'une résistance croisée à un autre composé organophosphoré, le chlorphoxim (Kurtak *et al.*, 1982), le Teknar demeure le seul alternatif valable pour le traitement des zones où se manifeste la résistance.

La δ -endotoxine du *B. thuringiensis* H14 possède une stabilité remarquable. La poudre primaire R 153-78 conservée sous récipient hermétique en zone tropicale (Bouaké, Côte d'Ivoire) (Guillet *et al.*, 1980b) ou en suspension aqueuse au laboratoire (Sinègre, 1980) conserve pendant plus de six mois toute sa toxicité. Contrairement à la poudre primaire, les formulations telles que le Teknar contiennent un certain nombre d'ingrédients (inhibiteurs de fermentation, agents tensioactifs...) susceptibles d'affecter la stabilité de la toxine. De plus l'utilisation opérationnelle du Teknar suppose un stockage prolongé des fûts en plein soleil sur les aires de ravitaillement (durée minimum de un an). En outre, la dilution de la formulation juste avant utilisation s'avère être difficilement réalisable et devrait être faite par avance.

Une étude a été entreprise sur la stabilité de la formulation Teknar dans diverses conditions de stockage en milieu tropical ainsi que sur la stabilité des dilutions prêtes à l'emploi.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. La formulation

Le Teknar est une suspension concentrée de spores et cristaux de *B. thuringiensis* H14. Son titre biologique est d'environ 600 unités internationales *Aedes aegypti* par milligramme. Sa viscosité est élevée (2 000 CP à 18°C) et l'on n'observe avec le temps aucune sédimentation des matières solides dans les fûts. Les tests ont été réalisés avec un lot de 2 000 l parvenu en Côte d'Ivoire au mois de septembre 1980.

1.2. Les conditions de stockage

Trois fûts de plastique blanc d'origine ont été stockés à Bouaké respectivement en plein soleil, sous abri dans un magasin et dans un local climatisé

pendant les heures chaudes (bureau). Les prélèvements ont été effectués après 4, 6, 10 et 16 mois, en milieu de fût après agitation. En plein soleil, tout au long de la période de stockage, la moyenne des températures maxima a été de 32,3°C variant de 29,5 à 35,6°C. Sous abri, la température moyenne a été de 25,6°C (moyenne des maxima : 30,9°C et des minima : 21,4°C). En local climatisé, la température moyenne est de l'ordre de 24°C et les variations sont relativement faibles (\pm 3°C). Des lots de formulation dilués avec 20 % d'eau du robinet ont également été stockés en récipients de verre sous abri et testés au bout de 1, 2, 4, 20, 45 et 180 jours.

1.3. Le contrôle de l'efficacité des lots

Les lots correspondant à différentes durées de stockage ont été testés à l'aide d'un dispositif de minigouttières.

La méthodologie a été décrite précédemment (Guillet *et al.*, 1982). Les dilutions préalables ont été testées comparativement à une dilution préparée extemporanément à partir du lot conservé en local climatisé. Deux tests complets ont été réalisés avec ce lot après 10 et 16 mois de stockage afin de pouvoir comparer les valeurs caractéristiques à celles d'un lot n'ayant subi aucun stockage prolongé. Les tests ont été réalisés à Akakro sur le Goué, petite rivière de forêt peuplée par *S. squamosum* et à Touba sur la Férédougouba, grande rivière de savane peuplée par *S. soubrense* résistant au téméphos.

2. RÉSULTATS

A la concentration de 0,3 mg/l/10 mn, on peut observer une différence significative d'efficacité entre les lots : après 4 et 10 mois de stockage, le lot conservé en local climatisé présente une efficacité supérieure aux autres tandis que l'on observe exactement l'inverse après 16 mois de stockage. En revanche, la mortalité des larves exposées à une concentration de 1,6 mg/l/10 mn, proche de la CL 100, ne permet de déceler aucune différence significative d'efficacité quelles que soient la durée et les conditions du stockage (tabl. I). Les tests complets réalisés après 10 et 16 mois de stockage confirment ces résultats dans la mesure où l'on n'observe entre les lots testés aucune différence significative au niveau des CL 50 et CL 95 (tabl. II). Après 16 mois de stockage, les droites de régression

BACILLUS THURINGIENSIS DANS LA LUTTE CONTRE L'ONCHOCERCOSE. II

TABLEAU I

Efficacité du Teknar en fonction de la durée et des conditions de stockage (tests en gouttières, 4 répliques par lot)

Nombre de mois de stockage	Conditions de stockage	Lieu	Concentration testée (mg/l/10 mn)	Mortalité observée et (nombre de larves tuées tous stades)
4	Bureau	Akakro	0,3	83,7 ± 3,4 (535)
	Magasin	Akakro	0,3	64,3 ± 5,2 (513)
	Soleil	Akakro	0,3	65,6 ± 4,6 (610)
6	Bureau	Akakro	1,6	95,2 ± 2,3 (353)
	Magasin	Akakro	1,6	95,4 ± 1,9 (462)
	Soleil	Akakro	1,6	96,6 ± 1,8 (413)
10	Bureau	Touba	0,3	30,6 ± 8,7 (350)
	Magasin	Touba	0,3	24,5 ± 8,7 (383)
	Soleil	Touba	0,3	20,9 ± 9,1 (368)
16	Bureau	Akakro	0,3	39,9 ± 5,3 (807)
			1,6	97,9 ± 1 (711)
	Magasin	Akakro	0,3	48,8 ± 5,3 (696)
			1,6	94,4 ± 1,8 (628)
	Soleil	Akakro	0,3	52,1 ± 5,3 (635)
			1,6	98,5 ± 0,9 (670)

obtenues à partir des lots conservés en local climatisé et au soleil présentent une linéarité et un parallélisme (test du χ^2) qui permettent de calculer la puissance relative du premier lot par rapport au second. Celle-ci est de 1.1 ce qui traduit un niveau d'efficacité parfaitement semblable pour les deux lots.

Les dilutions de Teknar obtenues en rajoutant 20 % d'eau à la formulation s'avèrent être extrêmement stables et l'on n'enregistre aucune perte d'efficacité après 6 mois de stockage (tabl. III).

3. DISCUSSION — CONCLUSION

La formulation Teknar de *Bacillus thuringiensis* H14 présente une stabilité remarquable et après 16 mois de stockage en plein soleil, on n'enregistre aucune perte d'efficacité vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum*. Les variations observées à la concentration de 0,3 mg/l/10 mn sont probablement dues aux conditions de milieu (turbidité de l'eau) et aux espèces du complexe *S. damnosum* concernées. A une concentration voisine de la

P. GUILLET, H. ESCAFFRE, J.-M. PRUD'HOM

TABLEAU II

Efficacité du Teknar en fonction de la durée et des conditions de stockage, exprimée en fonction des valeurs caractéristiques (calculées à partir de tests complets : 4 concentrations et 3 répliques par concentration)

Conditions de stockage	Lieu des tests	Valeurs caractéristiques		
		CL 50*	CL 95*	Pente
Aucun stockage	Touba	0,24 (0,23 - 0,25)	1,0 (0,91 - 1,1)	2,7
10 mois magasin	Touba	0,38 (0,27 - 0,52)	1,23 (0,81 - 3,4)	3,2
16 mois magasin	Akakro	0,35 (0,28 - 0,43)	1,0 (0,75 - 1,8)	3,5
16 mois soleil	Akakro	0,29 (0,20 - 0,42)	0,85 (0,5 - 3,3)	3,5

* entre parenthèses : l'intervalle de confiance au seuil de 95 %.

TABLEAU III

Conservation du Teknar dilué avec 20 % d'eau, stockage sous abri.
Tests en minigouttières à la concentration de 1,6 mg/l/10 minutes

Lieu des tests	A k a k r o				T o u b a			A k a k r o	
	0	1	2	4	0	20	45	0	160
Durée de stockage en jours	0	1	2	4	0	20	45	0	160
Mortalité observée et (nombre de larves testées, tous stades)	95,2 ± 2,3 (353)	95 ± 1,7 (661)	92,2 ± 2,5 (464)	98,6 ± 0,6 (1243)	99,1 (347)	100 (307)	99,5 (411)	96,7 ± 1,2 (889)	95,3 ± 1,7 (674)

BACILLUS THURINGIENSIS DANS LA LUTTE CONTRE L'ONCHOCERCOSE. II

CL 100, ces variations disparaissent totalement. Le lot faisant l'objet de cette étude présente une efficacité en gouttières légèrement inférieure à celle d'autres lots de Teknar précédemment testés. Il a été stocké sous abri dès son arrivée en Côte d'Ivoire.

La formulation diluée dans l'eau s'avère également très stable et l'efficacité vis-à-vis des larves de simulies demeure inchangée. Des tests biologiques sur *A. aegypti* n'ont pas été réalisés simultanément dans la mesure où le critère essentiel était l'efficacité vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum*. En tout état de cause, il est peu probable que le titre biologique de la formulation ait été altéré au cours du stockage.

Il est à noter que la température enregistrée au cours de la présente étude n'a jamais été excessive. Il serait souhaitable de contrôler également la stabilité de la formulation stockée dans des zones à climat plus chaud et contrasté, notamment en zone de savane soudanienne à la limite nord de répartition de *S. damnosum s.l.*

Le Teknar présente dans les conditions de stockage sur le terrain en milieu tropical une stabilité comparable, si ce n'est meilleure, à celle des larvicides conventionnels tels que l'Abate® (CF). La stabilité des dilutions préparées sur place

permettrait d'envisager l'acheminement vers les points d'utilisation de formulations plus concentrées à diluer sur place. Cela diminuerait sensiblement le coût du transport intercontinental et faciliterait l'acheminement vers les aires de stockage en brousse. Ceci ne serait réalisable bien entendu qu'avec des formulations à base d'eau telles que le Teknar ou le bactimos® liquide (Solvay), sous réserve que cette concentration plus élevée n'altère pas leur stabilité au stockage.

Si la stabilité du Teknar et celle probable d'autres formulations à base de *B. thuringiensis* H14 constitue un facteur favorable pour son utilisation dans le cadre d'un programme de lutte contre l'onchocercose, il n'en demeure pas moins indispensable d'améliorer les performances des formulations existantes.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les responsables du Programme OMS de Lutte contre l'Onchocercose dans la Région du Bassin de la Volta qui ont mis à notre disposition tous les moyens matériels à la réalisation de cette étude.

Manuscrit reçu au Service des Éditions de l'O.R.S.T.O.M.
le 14 juin 1982.

BIBLIOGRAPHIE

GUILLET (P.), ESCAFFRE (H.), Ouedraogo (M.) et Quillévéné (D.), 1980a. — Mise en évidence d'une résistance au ténéphos dans le complexe *S. damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire (Zone du Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la Région du Bassin de la Volta). *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XVIII, n° 3 : 291-299.

GUILLET (P.), DEMPAN (J.) et Cox (J.), 1980b. — Évaluation de *Bacillus thuringiensis* H14 pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum s.l.* III. Données préliminaires sur la sédimentation de l'endotoxine dans l'eau et sur sa stabilité en zone tropicale. *Doc. mimeogr. OMS, WHO/VBC/80.756*, 9 pp.

GUILLET (P.), ESCAFFRE (H.) et PRUD'HOM (J.-M.), 1982. — Évaluation du tekna® (Sandoz) (402 W.D.C.) contre

les larves du complexe *S. damnosum*. I. Efficacité en gouttières et évaluation en rivière. *Doc. ronéo. OCCGE*, n° 1/IRTO/Rap/82.

KURTAK (D.), Ouedraogo (M.), Ocran (M.), Bamro Tele et Guillet (P.), 1982. — Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae already resistant to tenephos (Abate®). *Doc. mimeogr. OMS*, (à paraître).

SINÈGRE (G.), 1980. — Contribution à la normalisation des épreuves de laboratoire concernant des formulations expérimentales et commerciales du sérotype H14 de *Bacillus thuringiensis*. I. Stabilité des suspensions d'épreuve et détection des éventuels contaminants chimiques toxiques pour les larves de moustiques. *Doc. mimeogr. OMS, WHO/VBC/80.769*.

22

PRODUCTION DE MASSE D'UN AGENT DE LUTTE BIOLOGIQUE,

LE *Bacillus thuringiensis* H14,

POUR LA LUTTE CONTRE LES VECTEURS DE L'ONCHOCERCOSE

EN AFRIQUE DE L'OUEST.

PRODUCTION DE MASSE D'UN AGENT DE LUTTE BIOLOGIQUE,
LE *Bacillus thuringiensis* H14,
POUR LA LUTTE CONTRE LES VECTEURS DE L'ONCHOCERCOSE
EN AFRIQUE DE L'OUEST.*

Pierre GUILLET **
Julien DOANNIO ***
Jean Marc HOUGARD ***
Henri ESCAFFRE ***
Jacques DUVAL ***

INTRODUCTION

Les premiers essais de terrain du *Bacillus thuringiensis* H14 contre les larves du complexe *Simulium damnosum* ont été réalisés en Afrique de l'Ouest dès 1979 (GUILLET et de BARJAC, 1979, GUILLET et ESCAFFRE, 1979 a). Les résultats ont été très encourageants et rapidement l'industrie a proposé plusieurs formulations expérimentales (GUILLET et ESCAFFRE, 1979 b). Des recherches ont alors été entreprises pour définir le type de formulation le mieux adapté à une éventuelle utilisation dans le cadre du programme de lutte contre l'onchocercose entrepris par l'Organisation Mondiale de la Santé dans la région du bassin de la Volta (GUILLET *et al.*, 1985 a et b).

Rapidement une formulation a été sélectionnée, le SAN 402 WDC dont l'efficacité et les caractéristiques physiques ont permis d'envisager favorablement l'utilisation. Des essais en grandeur réelle ont été réalisés pour en définir les modalités pratiques. La concentration donnant une efficacité totale sur tous les stades larvaires était de 1,6 mg/l pendant 10 mn. Pour se disperser correctement après l'application dans les gîtes larvaires, la formulation a dû être au préalable diluée avec 20 % d'eau. Sans dilution, le produit se disperse mal et son efficacité est alors médiocre (GUILLET *et al.*, 1982 a). Dans une rivière à fort débit, un traitement expérimental a eu une portée efficace (distance en aval du point de traitement sur laquelle l'efficacité reste

* Ce travail a bénéficié, dans le cadre des accords passés entre l'ORSTOM et l'OCCGE, d'une subvention de l'Organisation Mondiale de la Santé.

** ORSTOM - SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE

*** Institut Pierre Richet (IRTO) - BP 1500 - BOUAKE - COTE D'IVOIRE

totale) de 20 km (LACEY *et al.*, 1982). Enfin cette formulation a pu être stockée plus d'un an sur le terrain sans que l'on observe de perte d'efficacité (GUILLET *et al.*, 1982 b). Les performances du SAN 402 WDC, bien qu'en dessous de celles d'un bon larvicide chimique tel que l'Abate[®] se sont avérées remarquables pour un agent de lutte biologique.

En 1980, une résistance au téméphos (Abate) est apparue chez deux espèces forestières du complexe *S. damnosum* (*S. soubrense* et *S. sanc-tipauli* Vajime et Dunbar, 1975) dans l'aire du programme de lutte contre l'onchocercose (GUILLET *et al.*, 1980). Le chlorphoxim, un autre composé organophosphoré, a été utilisé en remplacement de l'Abate mais une résistance à ce composé s'est également développée rapidement (KURTAK *et al.*, 1982). Dès 1981, l'utilisation du *B. thuringiensis* H14 est alors apparue comme la seule solution envisageable pour la poursuite des traitements dans les zones concernées par la résistance. C'est la raison pour laquelle cet agent de lutte biologique dont une formulation acceptable avait été sélectionnée, a très rapidement atteint le stade de l'utilisation opérationnelle.

Dans la routine des traitements, il s'est avéré nécessaire d'appliquer, selon la saison, entre 3 et 20 fois plus de *B. thuringiensis* H14 que d'Abate. Il importait donc, pour envisager son utilisation à grande échelle, que l'industrie puisse produire massivement des formulations de qualité rigoureusement constante. En 1982, il a été produit suffisamment de Teknar[®] (nom commercial du SAN 402 WDC) pour couvrir les besoins du programme de lutte en 1982 (241 000 l) et en 1983 (300 000 l).

Il n'existait alors et n'existe toujours pas de spécifications particulières pour les formulations de *B. thuringiensis* H14. La seule garantie réside dans la teneur en endotoxine. Cette teneur exprimée en Unités Internationales, se mesure par titrage biologique des formulations avec des larves d'*Aedes aegypti* en référence à une préparation standard. Un contrôle basé sur le titre *A. aegypti* a été réalisé à la demande de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) avant que les fûts ne soient expédiés. Dès leur réception en Afrique de l'Ouest, des prélèvements ont été effectués pour contrôler l'efficacité de quelques lots vis-à-vis des larves de l'insecte cible, les larves du complexe *S. damnosum*. Ces contrôles ont été réalisés parce qu'il n'existe

* produit par Sandoz.

pas de relation systématique entre le titre des formulations exprimé en Unités Internationales (U.I.) *A. aegypti*/mg et leur efficacité vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum* (GUILLET *et al.* 1982 c). Seul le contrôle basé sur l'efficacité vis-à-vis des larves de simuliés pouvait donc fournir une information pertinente.

Cette efficacité a été évaluée à l'aide d'un dispositif d'évaluation à échelle réduite. Un tel dispositif permet de mesurer l'efficacité dans des conditions optimums à partir de suspensions homogènes, sans que la dispersion spontanée puisse être prise en compte. Les contrôles de qualité doivent donc porter également, comme cela est le cas pour la plupart des formulations de pesticides, sur les caractéristiques physiques. Parmi celles-ci, la viscosité, dans le cas du Teknar, joue un rôle important car elle conditionne dans une certaine mesure la dispersion spontanée du produit et donc son efficacité lors des traitements en rivière.

Il était donc important de vérifier outre leur efficacité, que la viscosité des différents lots était suffisamment constante pour qu'une dilution avec 20 % d'eau garantisse systématiquement une bonne dispersion. En effet, pour des raisons de logistique (capacité de chargement des hélicoptères de traitement), les formulations doivent normalement être aussi concentrées que possible et appliquées sans dilution préalable. Dans le cas du Teknar, la dose utilisée (1,6 mg/l/10mn avec 20 % d'eau) représente la limite au-delà de laquelle il ne peut pratiquement plus être appliqué.

MATERIEL ET METHODES

- Prélèvements : Un fût a été prélevé au hasard par l'OMS dans chacun des 32 lots reçus au moment de cette étude. Après agitation, 125 ml ont été prélevés à la pipette entre le tiers inférieur des fûts et la surface, en remontant pendant l'aspiration. Ils ont été stockés à 4° C dans des flacons de verre.

- Tests d'efficacité : Ils ont été réalisés avec le dispositif des mini-gouttières utilisé pour l'évaluation de l'efficacité des formulations de *B. thuringiensis* H14 (GUILLET *et al.* 1985 c). Le temps d'exposition des larves est de 10 mn et la lecture s'effectue après 24 h. Ce dispositif donne des résultats tout à fait identiques à ceux obtenus sur le terrain. Les tests ont été réalisés

avec des larves de stades 6 et 7 de *S. yahense* Vajime et Dunbar 1975, une espèce forestière du complexe *S. damnosum*. Un premier criblage a été réalisé à la concentration de 1,6 mg/l pendant 10 mn qui doit normalement donner 100 % de mortalité. Le criblage a été répété dans le cas des lots ayant donné moins de 98 % de mortalité. A partir de 98 %, l'efficacité est considérée comme satisfaisante. Pour comparer plus précisément les niveaux d'activité des différents lots, des tests complets ont été réalisés avec 5 concentrations ; ils ont été répétés 3 fois.

- Titration biologique : Il a été réalisé avec des larves d'*A. aegypti* souche Bora Bora conformément au protocole défini par l'OMS (ANON., 1981). Des larves de stade 4 jeune ont été utilisées 72 h après l'éclosion. L'élevage des larves a été réalisé dans des conditions standardisées à 29° C. La préparation de référence utilisée a été l'IPS 80 (de BARJAC, 1981) un standard intérimaire titrant dans notre laboratoire 15 000 U.I. *A. aegypti*/mg par rapport à l'ancien standard IPS 78 (de BARJAC, 1979). Un triple essai a été pratiqué pour chaque lot. Les résultats des tests d'efficacité et ceux du titrage biologique ont été interprétés avec un programme d'analyse-probit (FINNEY, 1971) permettant de calculer les valeurs caractéristiques et leurs intervalles de confiance au seuil de 95 %.

- Caractéristiques physiques : Ne disposant pas alors de matériel spécialisé, un test simple a été mis en oeuvre. Les temps d'écoulement des 5 premiers ml dans une pipette de 10 ml ont été mesurés à la température de 25° C. Ce test, dans lequel on mesure un écoulement par gravité, donne une indication sur la viscosité cinématique du produit. Quatorze lots choisis au hasard ont été utilisés. Le temps d'écoulement a été mesuré pour le produit pur puis dilué avec 10, 20, 30 et 40 % d'eau du robinet. Parallèlement, on a observé la dispersion dans des éprouvettes en verre de 1 l, l'orifice de la pipette étant maintenu à 15 cm au-dessus de l'éprouvette. On a recherché une relation empirique entre le temps d'écoulement de la formulation pure et la quantité d'eau devant être rajoutée pour obtenir une bonne dispersion. Celle-ci a été jugée satisfaisante lorsque l'on a obtenu un nuage homogène sans formation d'agrégats qui sédimentent rapidement.

A la demande de l'OMS, une étude préliminaire a été réalisée par un laboratoire spécialisé dans les formulations de pesticides. Cette étude

a porté entre autre sur la viscosité, la teneur en matière sèche et la densité de 8 lots. Les premiers résultats nous ont été aimablement communiqués (HENRIET, comm. pers.).

RESULTATS

Sur les 32 lots de Teknar testés, 30 ont eu au criblage à 1,6 mg/l/10mn une efficacité égale ou supérieure à 98 %. Seuls 2 lots ont eu une efficacité insuffisante (moins de 95 %) sur 2 essais successifs réalisés avec deux prélèvements. Ce sont ces 2 lots qui après un essai complet ont eu les CL 50 et CL 90 les plus fortes. La CL 50 moyenne des 32 lots était de 0,17 mg/l/10mn avec un coefficient de variation de 19,5 %. La CL 90 moyenne était de 0,47 mg/l/10mn avec un coefficient de variation de 8,7 % (tableaux 1 et 2).

Les résultats obtenus sur larves de moustiques sont plus homogènes. La CL 50 moyenne était de 0,3 mg/l avec un coefficient de variation de 2,7 % seulement sur les 17 lots testés. Les titres biologiques s'échelonnent entre 735 et 1322 U.I. *A. aegypti*/mg avec une moyenne de 1000 U.I. (tableaux 1 et 2). Il n'existe pas de corrélation entre les CL 50 observées sur simuliées et sur moustiques ($r^2 < 0,1$). Les deux lots les moins efficaces sur simuliées avaient un titre biologique supérieur à 1000 U.I.

Des résultats nettement moins homogènes ont été enregistrés au niveau des caractéristiques physiques. Le temps d'écoulement de 5 ml de formulation non diluée a varié de 5,2 à 22,6 s soit un écart de 335 % (tableau 3). Dans le cas d'une dilution avec 20 % d'eau, cet écart était encore de 130 %. Sur 14 lots, 4 seulement se dispersent correctement et 10 ont nécessité une dilution de 30 à 40 %. Les résultats obtenus dans le laboratoire spécialisé ont également permis de constater une importante variabilité entre les lots. Sur 8 échantillons, l'écart sur la matière sèche était de 37 % et celui sur la viscosité de 67 % (HENRIET, comm. pers.).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les lots de Teknar étaient représentatifs d'une production industrielle d'environ 600 000 l. Durant la fermentation du bacille et la concentration finale de la culture, le seul critère d'efficacité dont dispose le formulateur est la teneur en endotoxine déterminée par titrage biologique sur larves de moustiques. Le fait que les CL 50 *A. aegypti* mesurées au cours de la présente étude aient eu un coefficient de variation de 2,7 % seulement, démontre que la firme maîtrise parfaitement la fermentation et l'ajustement du titre de ses préparations. Les valeurs observées sur les 32 lots ont toujours été nettement supérieures au minimum garanti qui est de 600 U.I. *A. aegypti*/mg.

Les résultats obtenus sur les larves du complexe *S. damnosum* ont été moins homogènes bien que dans l'ensemble très satisfaisants. Dans la mesure où il n'existe pas de relation systématique entre le titre biologique des préparations et leur efficacité vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum* (GUILLET *et al.*, 1982o, *loc. cit.*), les firmes qui ne disposent pas d'élevage de simulies* ne peuvent pas contrôler l'efficacité de leurs formulations destinées à la lutte antisimulidienne. C'est ce qui explique que 2 lots, en dépit d'un titre biologique supérieur à 1000 U.I. *A. aegypti*/mg, aient pu présenter une efficacité insuffisante vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum*. Globalement, l'efficacité observée vis-à-vis des larves de moustiques a donc été parfaitement satisfaisante, et les résultats obtenus sur simulies, en l'absence de moyens de contrôle, ont été très encourageants.

En revanche, les variations observées au niveau des caractéristiques physiques représentent un inconvénient sérieux. Dans de nombreux traitements (agricoles ou antimoustiques) les formulations de ce type sont diluées dans un "tank" avant application. Leur dispersion spontanée importe peu, et des variations au niveau de la viscosité sont sans importance. Il en va différemment dans le cas des traitements larvicides contre les vecteurs de l'onchocercose. Nous avons vu que le produit doit être appliqué pur ou aussi peu dilué que possible et se mélanger spontanément au contact de l'eau. Une varia-

* Il n'existe pas encore d'élevage d'espèces de simulies néarctiques et a fortiori d'espèces du complexe *S. damnosum* permettant d'envisager concrètement ce contrôle.

tion même minime au niveau de la viscosité de la formulation peut modifier le résultat des traitements. Ceci est d'autant plus vrai, qu'en raison des quantités à appliquer, le *B. thuringiensis* H14 est utilisé à la limite de la CL 100, pratiquement sans marge de sécurité. Le moindre changement au niveau de la dispersion se traduit alors inmanquablement par une diminution de l'efficacité des traitements. Dans le cadre d'un programme de lutte contre l'onchocercose qui vise à l'interruption de la transmission de la maladie, ceci n'est pas acceptable car les traitements doivent être systématiquement efficaces à 100 %. Par ailleurs, l'utilisation de dosages plus élevés ou d'une dilution supérieure à 20 % ne peuvent pas être envisagées.

Les résultats des tests préliminaires sur les caractéristiques physiques des différents lots n'ont qu'une valeur indicative. Si ces caractéristiques n'ont pas pu être mesurées aussi précisément et systématiquement qu'elles auraient dû l'être, la variabilité observée était quant à elle bien réelle et cause de plusieurs échecs constatés lors de traitements opérationnels.

Il est apparu indispensable de définir des normes propres aux formulations de *B. thuringiensis* H14 car celles-ci restent à de nombreux égards très différentes des formulations de pesticides conventionnels. Dans le cas des larvicides antisimulidiens, ces normes devront garantir à l'utilisateur une bonne dispersion spontanée de la formulation. Le *B. thuringiensis* H14 peut être produit en très grandes quantités et les garanties d'efficacité sont de plus en plus satisfaisantes. Des progrès restent encore à faire dans le domaine des caractéristiques physiques qui doivent être améliorées et demeurer parfaitement constantes. Dans le cas de la lutte antisimulidienne, une formulation autodispersible ayant une efficacité totale à 0,5 - 0,8 mg/l/10mn pourrait concurrencer valablement les meilleurs larvicides chimiques pour les traitements de saison sèche (GUILLET *et al.*, 1984).

L'emploi généralisé du *B. thuringiensis* H14, même limité aux périodes de basses eaux dans le cas des traitements antisimulidiens, est très souhaitable car il entraînerait une diminution de la pression de sélection par les insecticides chimiques ainsi que de la pression sur l'environnement dans des situations écologiques souvent très sensibles. Prévenir le développement ou l'extension de la résistance aux insecticides et préserver l'environnement constituent les impératifs majeurs pour le programme de lutte contre l'onchocercose. Le *B. thuringiensis* H14, par ses caractéristiques exceptionnelles, a dans ce contexte, un rôle indiscutable à jouer.

Lots	Larves du complexe <i>Simulium damnosum</i>				Larves <i>Aedes aegypti</i>	
	% mortalité à 1,6 mg/l/10mn		CL 50 mg/l/10mn	CL 90 mg/l/10mn	CL 50 mg/l	Titre en U.I./mg
	série 1	série 2				
20.111	99,2		0,38 ± 0,06*	0,80		
20.141	95,2	98,1	0,31 ± 0,02	0,80		
21.131	95,0	99,4	0,24 ± 0,024	0,80	0,32 ± 0,09	938
21.321	99,3		0,12 ± 0,034	0,30		
21.331	94,8	64,9	0,39 ± 0,032	0,98	0,29 ± 0,02	1049
21.341	99,1		0,14 ± 0,02	0,33		
21.381	98,6		0,19 ± 0,026	0,54	0,41 ± 0,03	735
21.431	99,1		0,14 ± 0,021	0,50		
21.481	100		0,28 ± 0,027	0,66	0,24 ± 0,09	1038
21.491	99,5		0,16 ± 0,026	0,45		
21.501	99,7		0,23 ± 0,022	0,65	0,32 ± 0,091	946
21.521	99,7		0,12 ± 0,004	0,39	0,33 ± 0,02	901
21.671	100		0,18 ± 0,04	0,41	0,28 ± 0,09	1083
21.681	99,6		0,20 ± 0,006	0,52	0,28 ± 0,03	1064
21.701	100		0,21 ± 0,01	0,39	0,37 ± 0,03	806
21.711	99,1		0,21 ± 0,019	0,47	0,27 ± 0,019	1119

* intervalle de confiance 95 %.

Tableau 1 - Evaluation comparative des lots de Teknar (*Bacillus thuringiensis* H14) sur larves âgées (stades 6 et 7) du complexe *Simulium damnosum* et sur larves d'*Aedes aegypti* souche Bora Bora (stades 4 jeunes).

Lots	Larves du complexe <i>Simulium damnosum</i>				Larves <i>Aedes aegypti</i>	
	% mortalité à 1,6 mg/l/10mn		CL 50 mg/l/10mn	CL 90 mg/l/10mn	CL 50 mg/l	Titre en U.I./mg
	série 1	série 2				
21.712	99,5		0,21 ± 0,019*	0,46		
21.731	100		0,21 ± 0,016	0,42		
21.741	99,2		0,14 ± 0,021	0,35	0,29 ± 0,040	1024
21.742	93,6	99,3	0,17 ± 0,019	0,41	0,28 ± 0,031	1083
21.751	100		0,14 ± 0,015	0,40	0,23 ± 0,032	1322
22.141	100		0,21 ± 0,015	0,34		
22.142	100		0,25 ± 0,010	0,56	0,28 ± 0,048	1087
22.173	98,1		0,05 ± 0,003	0,33		
22.181	91,6	87,8	0,29 ± 0,040	0,94	0,28 ± 0,032	1071
22.191	98,1		0,06 ± 0,002	0,31		
22.201	95,9	99,3	0,07 ± 0,033	0,47	0,31 ± 0,044	955
22.211	100		0,10 ± 0,021	0,37		
22.231	95,4	99,1	0,04 ± 0,003	0,41		
22.241	100		0,20 ± 0,014	0,32		
22.261	100		0,21 ± 0,013	0,41	0,37 ± 0,050	822
22.271	100		0,20 ± 0,010	0,36		

* intervalle de confiance 95 %.

Tableau 2 - Evaluation comparative des lots de Teknar (*Bacillus thuringiensis* H14) sur larves âgées (stades 6 et 7) du complexe *Simulium damnosum* et sur larves d'*Aedes aegypti* souche Bora Bora (stades 4 jeunes).

Lots	0 %	10 %	20 %	30 %	40 %
20.141	13,2	7,5	5,4	4,6	<u>3,9</u>
21.321	5,2	3,9	<u>3,1</u>	2,8	2,6
21.331	9,0	6,3	5,6	<u>4,6</u>	4,3
21.381	6,3	4,4	<u>3,5</u>	3,1	2,8
21.431	10,6	5,9	4,5	<u>3,5</u>	3,1
21.481	15,4	8,8	6,3	4,8	<u>4,4</u>
21.501	20,9	11,7	7,1	5,7	<u>4,8</u>
21.701	22,6	9,8	6,3	4,9	<u>4,1</u>
21.731	-	8,4	5,5	<u>4,4</u>	4,0
21.742	6,9	4,9	<u>3,8</u>	3,1	2,7
22.141	18,1	8,0	5,6	4,5	<u>3,9</u>
22.181	6,1	4,0	<u>3,3</u>	2,9	2,5
22.211	15,7	8,0	5,5	4,6	<u>3,8</u>
22.291	14,9	8,1	4,9	<u>4,1</u>	3,4

Tableau 3 - Temps d'écoulement en secondes de 5 ml de Teknar (viscosité cinématique) en fonction de la dilution (volume-volume) avec de l'eau du robinet à 25° C.

Les valeurs soulignées indiquent les taux de dilution pour lesquels la formulation se dispersait correctement (nuage de fines particules sans agrégats).

BIBLIOGRAPHIE

- ANON., - 1981. Informal consultation on standardization of *Bacillus thuringiensis* H14. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/81.828.
- de BARJAC, H. - 1979. Note sur la préparation d'une formulation de référence, IPS-78, pour le titrage biologique des formulations expérimentales et industrielles du sérotype H14 de *Bacillus thuringiensis*. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/79.741.
- de BARJAC, H. et LARGET, I. - 1981. Properties of the interim standard IPS 78 and proposal of a new reference preparation IPS 80 for the establishment of an international standard. Doc. Mim. OMS, TDR/BCV/IC.81.1/WP.5, (non publié).
- FINNEY, D.J. - 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 333p.
- GUILLET, P. et de BARJAC, H. - 1979. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves de similies vectrices de l'onchocercose. C.R. Acad. Sc. Paris, 289, D., 549-552.
- GUILLET, P. et ESCAFFRE, H. Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l.
- 1979 a. I - Résultats des premiers essais réalisés sur le terrain. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/79.730.
 - 1979 b. II - Efficacité comparée de trois formulations expérimentales. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/79.735.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., OUEDRAOGO, M. et QUILLEVERE, D. - 1980. Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire. (Zone du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta). Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XVIII (3), 291-299.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H. et PRUD'HOM, J.M. L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest.
- 1982 a. I - Efficacité et modalités d'application. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XX (3), 175-180.
 - 1982 b. II - Stabilité dans les conditions de stockage en milieu tropical. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XX (3), 181-185.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H. et PRUD'HOM, J.M. - 1982 c. *Bacillus thuringiensis* H14, a bio-control agent for onchocerciasis control in West Africa. IIIrd International Colloquium of the Society of Invertebrate Pathology, Brighton, 6-10 septembre 1982.
- GUILLET, P., KURTAK, D.C., HOUGARD, J.M., DUVAL, J. et ESCAFFRE, H. - 1984. Present status and prospects for use of *Bacillus thuringiensis* H14 in onchocerciasis control. XI International congress for Tropical Medicine and Malaria, Calgary, september 16-22, 1984.

- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., PRUD'HOM, J.M. et BAKAYOKO, S. Etude des facteurs conditionnant l'efficacité des préparations à base de *Bacillus thuringiensis* H14 vis-à-vis des larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera : Simuliidae). Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- 1985 a. I - Influence de la nature et de la taille des particules.
 - 1985 b. II - Influence du temps de contact et de la quantité de particules naturelles en suspension dans l'eau.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J. - 1985 c. Méthodologie pour tester l'efficacité des formulations d'insecticides sur les larves du complexe *Simulium damnosum*. - I - Insecticides conventionnels et agents de lutte biologique. Soumis pour publication aux Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol.
- KURTAK, D.C., OUEDRAOGO, M., OCRAN, M., BARRO TELE et GUILLET, P. - 1982. Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae already resistant to temephos (Abate). Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/82.850.
- LACEY, L.A., ESCAFFRE, H., PHILIPPON, B., SEKETELI, A. et GUILLET, P. - 1982. Large river treatment with *Bacillus thuringiensis* H14 for the control of *Simulium damnosum* s.l. in the onchocerciasis control programme. Tropenmed. Parasitol., 33, 97-101.
-

23

PRESENT STATUS AND PROSPECTS
FOR USE OF *Bacillus thuringiensis* H14
IN ONCHOCERCIASIS CONTROL.

PRESENT STATUS AND PROSPECTS FOR USE OF *Bacillus thuringiensis* H14

IN ONCHOCERCIASIS CONTROL

Pierre GUILLET*

When resistance to temephos and other organophosphate compounds was pointed out in the *Simulium damnosum* complex (1, 2, 3), *B. thuringiensis* H14 appeared, in 1982, to be the only alternative available for the continuation of larviciding in the zones where resistance had occurred. For this reason, *B. thuringiensis* H14, of which a suitable formulation was already tested (4, 5) and commercially available, was immediately introduced in the Onchocerciasis Control Programme (OCP) treatment scheme.

B. thuringiensis H14 presents several of the characteristics required for use as a larvicide in onchocerciasis control :

- efficacy : the non-formulated primary products (freeze-dried or spray-dried) are highly toxic against blackfly larvae (LC100 from 0.05 to 0.2 mg/l during 10 mn). The efficacy of experimental or commercial formulations already tested is lower (LC100 from 0.4 to more than 3.2 mg/l/10mn).

- stability : the stability of the *B. thuringiensis* H14 endotoxin is well known (6). The storage stability of the commercial formulation used in the OCP was tested in Ivory Coast and it was shown that 25 l drums can be stored in the field for more than 16 months in the open sun without any significative loss of efficacy against *Simulium* larvae (7).

- selectivity : extensive studies have been carried out in the laboratory (mammal safety tests) and in the field (environmental safety) which clearly proved the innocuity of *B. thuringiensis* H14. Recently it was shown that the endotoxin, which is in fact a protoxin, when hydrolized (in vitro or in the gut of susceptible insects) is highly toxic for mammals upon injection but, fortunately, completely not toxic upon ingestion (8). It is not known whether or not the fraction of the toxin (polypeptide) active against diptera upon ingestion and mammals upon injection is the same. However, this information has no practical incidence on the use of

* ORSTOM / SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE

B. thuringiensis H14 in vector control operations.

- prospects for development of resistance : no significant difference in the response to *B. thuringiensis* H14 was found between insecticide susceptible and resistant strains of mosquitoes, no matter what detoxification process was involved (dehydrochlorinases, oxidases, esterases...) (9). The susceptibility of *S. damnosum* complex larvae is not affected by resistance to organophosphate compounds (10). The potential for laboratory development of resistance has been tested using *Culex quinquefasciatus* larvae. A total of more than 50 generations have been completed to date under selection pressure. A slightly increased tolerance was noted following the 16th generation but larvae quickly recovered normal susceptibility after selection pressure was stopped (11). Though such observations obtained in the laboratory have a relatively limited predictive value, the conclusions are optimistic regarding the continued use of *B. thuringiensis* H14.

- mass production : a very rapid advance was noted in the development of mass production of *B. thuringiensis* H14 adapted from technics used in the production of other serotypes. Great quantities of *B. thuringiensis* H14 can be industrially produced with a very satisfactory and constant level of efficacy. The viscosity of the formulation, which is an important parameter regarding application, is more difficult to adjust ; significant progress is actually being made.

Preliminary research has been carried out to determine the most suitable type of formulation to develop for onchocerciasis control according to the feeding behaviour of the blackfly larvae, hydrological conditions and operational requirements for spraying in the rivers. The best type turned out to be water suspensions of dispersed crystals (12, 13).

The formulation presently used in the OCP is a water dispersible concentrate, Teknar[®] (Sandoz). It is used at a uniform dosage of 1.6 mg/l during 10 mn, in dry as well as in rainy season treatment conditions. For spontaneous dispersal in the rivers, Teknar, prior to application, must be diluted with 20% water, which increases the quantity to carry and to apply. In practice, its application necessitates the use of a large helicopter and is limited to the treatment of rivers in which current flow does not exceed 50 m³/s.

The relative performances of Abate[®] (a 20% temephos emulsifiable concentrate used in the OCP) and Teknar are compared in the following tables :

I - Dry season conditions (low current flow)

Formulation	Dosage (mg/l/10mn)	Amount for 1 m ³ /s	Carry	Approximative cost for 1 m ³ /s treated*
Abate	0.1	300 cc	no	3.6 US \$
Teknar	1.6	960 cc + 20% water	no	4.3 US \$

II - Rainy season conditions (high current flow)

Formulation	Dosage (mg/l/10mn)	Amount for 1 m ³ /s	Carry	Approximative cost per km treated per m ³ /s *
Abate	0.05	150 cc	30 - 40 km	0.045 - 0.06 US \$
Teknar	1.6	960 cc + 20% water	≤ 5 km	≥ 0.9 US \$

* application cost not included.

The respective costs of treatments with Teknar and Abate during the dry season are relatively comparable. However, due to the variable and excessive viscosity of the formulation, Teknar is much more difficult to apply than Abate and results are not systematically guaranteed. Moreover, application cost is higher, due to a 3.8 times increase in the volume required. In rainy season conditions, the cost difference is at least 15 to 20 times greater and the application of Teknar, when feasible, is also very prohibitive. In these conditions, *B. thuringiensis* H14 is not at all competitive, and consequently formulations must be improved.

The improvement of formulations relates to their physical characteristics, as well as their potency. The present objective is to develop a self-dispersive formulation 2 to 4 times more effective than Teknar. This objective is technically possible and industry is actively working in this direction to make it economically feasible.

A screening programme has been developed for the evaluation of new experimental formulations. To date, more than 200 formulations produced by 4 industrial companies have been tested under simulated field conditions. Six of them have reached the stage of field evaluation, and two among these the stage of operational application : Teknar and Bactimos[®] (Solvay). The second one is used at the same dosage but does not need previous dilution prior to application. Mass production of this formulation is still subject to difficulties.

From recent bioassays and field evaluations, it appears that in the near future, with normal, as well as with asporogenic strains, new formulations will be available with suitable physical characteristics to give 100% mortality at 0.8 mg/l/10mn.

However, one must stress that during rainy season, the probability is low to achieve a satisfactory carry (e.g. 20 km or more), even with improved formulations and spraying conditions. On that point, *B. thuringiensis* H14 will probably never be competitive with good formulations of chemical insecticides like Abate. On the contrary, it will be competitive for dry season treatments where carry is always very limited whatever insecticides and formulations are used. Furthermore, according to competition between companies and an increase in the market volume, the future relative price of *B. thuringiensis* H14 will probably decrease.

The use of *B. thuringiensis* H14 in the OCP in West Africa proves that this agent can be routinely used in a very large scale vector control operation in tropical area. Until now, its use in an emergency situation induced by resistance to organophosphate insecticides raised some difficulties. This situation will change when new improved formulations will be completed and commercially available.

Integrated control of onchocerciasis vectors cannot yet be considered through the simultaneous use of different control agents and methods, but rather with alternance of compounds showing drastically different modes of action. The alternative use of properly formulated *B. thuringiensis* H14 during the 8 months of dry season and a chemical larvicide during the 4 months of rainy season would be an optimal control solution ; the initiation of which is highly desirable throughout the whole OCP area. This treatment scheme could bring about a significant decrease in the selection pressure process of chemical insecticides on onchocerciasis vectors, as well as environment in very sensitive ecological situations.

BIBLIOGRAPHY

- 1 - GUILLET, P., MOUCHET, J. and GREBAUT, S. - 1977 -
WHO mimeographed document, WHO/VBC/77.678.
- 2 - GUILLET, P., ESCAFFRE, H., OUEDRAOGO, M. and QUILLEVERE, D. - 1980 -
Cah. ORSTOM, Sér. Entomol. Méd. Parasitol., 18, 291-299.
- 3 - KURTAK, D., CUEDRAOGO, M., OCRAN, M., BARRO TELE and GUILLET, P. - 1982-
WHO mimeographed document, WHO/VBC/82.850.
- 4 - GUILLET, P., ESCAFFRE, H. and PRUD'HOM, J.M. - 1982 -
Cah. ORSTOM, Sér. Entomol. Méd. Parasitol., 20, 175-180.
- 5 - LACEY, L.A., ESCAFFRE, H., PHILIPPON, B., SEKETELI, A. and GUILLET, P.-1982 -
Tropenmed. Parasit., 33, 97-101.
- 6 - SINEGRE, G. - 1980 -
WHO mimeographed document, WHO/VBC/80.769.
- 7 - GUILLET, P., ESCAFFRE, H. and PRUD'HOM, J.M. - 1982 -
Cah. ORSTOM, Sér. Entomol. Méd. Parasitol., 20, 181-185.
- 8 - THOMAS, W.E. and ELLAR, D.J. - 1983 -
J. Cell. Science, 60, 181-197.
- 9 - SUN, C., GEORGHIOU, G. and WEISS, K. - 1980 -
Mosq. News, 40, 614-618.
- 10 - GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H., DUVAL, J. - 1985 -
Cah. ORSTOM, Sér. Entomol. Méd. Parasitol., submitted for publication.
- 11 - GEORGHIOU, G. - 1983 -
Unpublished WHO document.
- 12 - GUILLET, P., ESCAFFRE, H., PRUD'HOM, J.M. and BAKAYOKO, S. - 1985 a and b -
13 - Cah. ORSTOM, Sér. Entomol. Méd. Parasitol., submitted for publication.

24

Bacillus thuringiensis H14,

A BIOCONTROL AGENT FOR ONCHOCERCIASIS CONTROL

IN WEST AFRICA.

INVERTEBRATE PATHOLOGY AND MICROBIAL CONTROL

IIIrd INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON INVERTEBRATE PATHOLOGY

6 - 10 September 1982

BRIGHTON, United Kingdom.

Proceeding :

BACILLUS THURINGIENSIS H14, A BIOCONTROL AGENT FOR ONCHOCERCIASIS
CONTROL IN WEST AFRICA.

(p. 460-465)

GUILLET, P., ESCAFFRE, H. and PRUD'HOM, J.M.

OCCGE - Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et l'Onchocercose
B.P. 1500 - BOUAKE (Côte d'Ivoire)

BACILLUS THURINGIENSIS H14, A BIOCONTROL AGENT FOR ONCHOCERCIASIS
CONTROL IN WEST AFRICA

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

INTRODUCTION

Human onchocerciasis or river blindness control in Africa is actually based on the use of insecticides which kill the larval stage of the vector of the *Simulium damnosum* complex. The World Health Organization in 1974 started a vast control programme (O.C.P.) in seven West African countries. The programme covers an area of 764.000 km² and 18.000 km of river system have to be treated each week for a period of twenty years. These treatments consist of aerial spraying of insecticides in the breeding sites. During dry season (low water) each breeding site must be treated individually whereas at high water (rainy season) treatment points are much more spaced. From 1974 to 1980, the use of an organophosphate compound, temephos, gave very good results in the control of *S. damnosum* complex populations with a tolerable effect on the equilibrium of non-target organisms in treated rivers. In 1980 resistance to temephos occurred in the *Simulium soubrense* *Simulium sanctipauli* pair, vector of onchocerciasis in forest area (Guillet *et al.*, 1980). Another organophosphate compound, chlorphoxim, was used as an alternative but resistance developed: to this compound also and spread out rapidly (Kurtak *et al.*, 1982). Recently cross resistance to several organophosphate compounds suitable in the context of this programme has been demonstrated (Guillet, Kurtak, unpublished data). The prospects of using other chemical insecticides are actually very limited because of their relative toxicity to riverine populations, non-target organisms or their low level of efficacy for the larvae of *S. damnosum* complex. In this context, *Bacillus thuringiensis* H14 appears to be not as an elegant solution for the future but as the only alternative available at present for the continuation of larviciding in the zones where resistance has occurred.

I. THE OPERATIONNAL USE OF *B. THURINGIENSIS* H14 IN WEST AFRICA

The formulation presently used is Teknar^R SAN 402 I (Sandoz). Among the different *B.t.* H14 formulations tested in rivers, Teknar represents the best compromise between the level of efficacy for *S. damnosum* complex larvae and the physical characteristics which enable its use in aerial operational treatments. The modalities of its use have already been described (dosage : 1.6 mg/l/10 mn, prior dilution of the formulation with 20 % water, application by helicopter equipped with nozzles or rapid release system, Guillet *et al.*, 1982 A, Cheke 1981 unpublished data). The stability of the pure or diluted formulation is remarkable since no loss of activity is noticeable after 16 months storage of the drums in the open sun in West Africa (Guillet *et al.*, 1982 B). The use of Teknar has however a serious logistic drawback because the quantities to be applied are 4 to 8 times more important than that of temephos and its effective "carry" is much less inferior. In a preliminary trial by O.C.P. in the Ivory Coast on a river with a very large discharge (457 m³/s) a carry of about 20 km was recorded (Lacey *et al.*, 1981) as compared to 50 to 60 km with temephos. However trials carried out subsequently in the O.C.P. have shown that this "carry" of 20 km is the maximum that can be expected with this formulation. Teknar is thus suitable for treat-

* O.C.C.G.E. - Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et l'Onchocercose -
B.P. 1500 - BOUAKE (Côte d'Ivoire)

ments during dry season when the discharges are low and the carry is consequently very limited whatever the formulation of insecticide used. On the contrary, its use in the rainy season because of the larger quantities which have to be applied and the number of treatment points is not realistic at present from practical and economical point of view. New batches of Teknar having an increased delta endotoxin content have been recently tested and found to be 2 to 4 times more effective (Guillet *et al.*, 1982 C, Ocran and Agoua, pers. comm.). When these formulations become commercially available, it should be possible to use *B.t.* H14 in the rainy season and eventually to extend its use in the savannah zones as an alternative to temephos to limit the possible spread of resistance to organophosphates into savannah populations of *S. damnosum* complex.

II. PROBLEMS ASSOCIATED WITH IMPROVEMENT OF *B. THURINGIENSIS* H14 BLACKFLY LARVICIDES

Generally the efficacy of blackfly larvicides is closely related to the formulation (Jamnback and Means, 1968 ; Guillet and Escaffre, 1979). It is the same for *B.t.* H14 formulations of which the efficacy vis-à-vis *S. damnosum* complex larvae does not necessarily depend on the delta endotoxin content expressed in terms of I.T.U. *A. aegypti*/mg. For a given formulation efficacy varies proportionally with the delta endotoxin content (Table I). On the other hand from one formulation to another, the ratio *A. aegypti* biological titre/LC 50 *S. damnosum* can vary considerably (up to 200 times) indicating that for certain formulations there is no relation at all between *A. aegypti* titre and toxicity to blackfly larvae (table II). This disparity can be explained generally by three main factors : the active ingredient itself (parasporal crystals), blackfly larvae and their feeding behaviour and lastly the formulations.

II. I. Toxicity of *B.t.* H14 crystals to blackfly larvae :

When *B.t.* H14 is tested on mosquito and blackfly larvae under comparable conditions (contact 24 h in the lab with distilled water) one can note a very satisfactory concordance between the *A. aegypti* and *S. damnosum* titres (table III). However when the same products are tested in troughs under more natural conditions this concordance no longer exists (table III). In these conditions, with an exposure period of 10 mn and an intestinal transit of 2 to 15 mn the larval mortality of blackfly larvae no longer varies proportionally with the endotoxin content. It is probable that a proportion of toxin is not digested. If the retention time of the *B.t.* H 14 in the gut is artificially increased by inhibiting feeding immediately after treatment (Gaugler and Molloy, 1980) or by paralyzing the larvae with sublethal doses of pyrethroids its toxicity is considerably increased. The retention time of *B.t.* H14 crystals in the gut of *A. aegypti* larvae during bioassays where no food is provided is considerably longer than in blackfly larvae under natural conditions. It is not excluded that at different stages of the growth of crystals or the preparation of the products the toxin can be more or less digestible (membrane formation, presence

of proteases ...). This could be manifested by a variation in toxicity to blackfly larvae which may not be detected in the bioassay with *A. aegypti*. The growth medium of the *Bacillus* can equally condition its toxicity. With *S. damnosum* larvae the LC 50 of preparations can vary from 0.35 to 5 mg/l/10 mn (about 15 times) due only to the changes in the growth medium. The toxicity varies finally on the type of primary products used, the freeze dried powders being always more toxic than the air dried ones for example.

II. II. Blackfly larvae and their feeding behaviour :

The feeding modalities of blackfly larvae have been extensively studied. Concerning the ingestion of *B.t.* H14, it is important to remember that the larvae can ingest large particles (in the order of 100 μ) as well as fine colloidal particles less than 1 μ . The fine particles ($\leq 2 \mu$) which constitute an important part of the material ingested by the larvae (Wotton 1977) are trapped by an adhesive mucus which coats their filtering organs (Ross and Craig, 1980) ; it consists essentially of passive filtration. The big particles are filtered by sieving action of the fan rays and ingested more or less rapidly according to their size and consistence. The intestinal transit time in *S. damnosum* is usually very short. In natural conditions a time of 2 to 15 mn is largely sufficient for most of the larvae.

II. III. Formulations :

There are generally two types of formulations, either the particles are big clumps or they are isolated spores and crystals. The efficacy of the former which are usually wetttable powders, increases with increasing size of clumps up to an optimum (40 to 70 μ) varying from one formulation to another and according to the larval instar. The addition of a cement to aggregate spores and crystals decreases the efficacy considerably. The efficacy, in most cases, varies proportionally with the exposure period, long exposures at low concentrations giving better results. By adding certain surfactants to primary powder aqueous suspensions one can noticeably increase or decrease their efficacy. The fine particle formulations which are generally water dispersible concentrates are better adapted to operational requirements. Their efficacy is usually not dependent on exposure time. The ingested mass of such fine particle formulations taken in by blackfly larvae is smaller compared with the big particle suspensions but their effectiveness can be as good because of a better contact crystals-digestive enzymes and a considerable increase in the number of active particles. This higher number of active particles moreover confers a better "carry" to this type of formulations than with the wetttable powders where the number of particles is much more limited. Under natural conditions the turbidity of the water does not affect their efficacy contrary to formulations with big particles of which the efficacy decreases considerably with turbidity. It is very likely that in this case higher turbidity acts not by feeding inhibition but rather by increasing the speed of intestinal transit or by a competitive selection between *B.t.* H14 particles and natural particles uptake.

III. CONCLUSION

Considering the mode of nutrition of *S. damnosum* larvae, the hydrological conditions in West Africa and operational requirements, the most convenient *B.t.* H14 formulations for Onchocerciasis control are the water dispersible concentrates. The experience acquired with Teknar shows that the evaluation of this type of formulation is very similar to that of conventional insecticide formulations. The practical use of Teknar actually limits the use of *B.t.* H14 to dry season treatments in zones where the larvae are resistant to insecticides. However, the remarkable stability of the toxin in general and of Teknar in particular as well as the level of efficacy recorded with new experimental formulations offer very promising prospects.

Serious difficulties are usually encountered in the improvement of the formulations due to the generally poor relation between toxicity vis-à-vis mosquitoes and *Simulium* larvae. As long as *A. aegypti* biological titre is not a relevant criterion to estimate blackfly formulations efficacy, the chemical companies do not possess a bioassay procedure which can guide them in improving their formulations. They must send material to specialized laboratories with all the risks involved, which slows down the process of improving blackfly larvicide formulations.

We have noticed that a certain number of factors act separately or conjointly to determine the efficacy of *B.t.* H14 formulations. It is not less true that the toxicity of this entomopathogen to blackfly larvae is still a largely unexplored field where much more work needs to be done. It is to be recalled that *B. thuringiensis* H14 remains at present the only available alternative to the World Health Organization since the appearance of insecticide resistance in certain areas of the Onchocerciasis Control Programme which has been going on for six years with considerable success.

AKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to thank Dr. M. Ocran (Onchocerciasis Control Programme Bouaké) who helped us in the translation of the text.

SUMMARY

Since the appearance of resistance to insecticides in human onchocerciasis vectors in West Africa *Bacillus thuringiensis* H14 is actually the only alternative available to the Onchocerciasis Control Programme to continue its treatment operations in the zones where resistance has been detected. The best formulations adapted to prevailing conditions in the Programme are the water dispersible concentrates. Among these, Teknar^R which has given the best results is commercially available and used operationally. Its stability is such that drums can be stored in the field in the open sun for more than 16 months without any loss of activity. However, the dosages to be applied (1.6 mg/l/10 mn) and the relatively poor "carry" of this formulation limit its use to dry season treatments. Its use in rainy season (high water) is unrealistic from practical and economical points of view. New formulations 2 to 4 times more effective have already been tested and should, when available, be possible to use practically in the same conditions as the best chemical larvicides.

The effectiveness of blackfly larvicides is usually closely related to the formulation. With regard to *B.t.* H14 there is generally no relation from one formulation to another between the *A. aegypti* titre expressed in international units and the toxicity to blackfly larvae. The same applies with primary products when tested under natural conditions. In such conditions the time of intestinal transit in the larvae of *S. damnosum* complex is very short and a portion of the ingested crystals do not liberate their toxin in the gut. The more or less good digestibility of the crystal is a factor which limits the toxicity of *B.t.* H14 to blackfly larvae contrary to the larvae of mosquito which under bioassay conditions have a much longer intestinal transit time. Other factors condition, to varying degrees, the effectiveness of *B.t.* H14 formulations on blackfly larvae among which are : the growth medium, the size of clumps in the formulation, the presence or absence of surfactants, the exposure period and the turbidity of the river water. It is practically actually impossible using bioassay on *A. aegypti* larvae to forecast the effectiveness of these formulations and even of the primary products on blackfly larvae. The chemical companies have to send their material to specialised laboratories which significantly slows down the process of improving their formulations.

The use of *B.t.* H14 in the O.C.P. has already reached an operational level. The rapid progress in the knowledge of this entomopathogen and the effort devoted by the firms into its further development will make it possible to fully integrate *B. thuringiensis* H14 in large scale vector control operations in developing countries as well as in developed countries.

Formulations	<i>A. aegypti</i> titre (I.T.U./mg)	CL 50 <i>S. damnosum</i> (mg/1/10 mn) (trough test)
TEKNAR ^(R) 402 I	540	0,24
TEKNAR 3 X	2150	0,05
TEKNAR H 28	≈ 1900	0,08
TEKNAR H 31	≈ 1900	0,078

Table I : Comparison between *A. aegypti* titre of Teknar formulations and their toxicity to *S. damnosum* complex larvae.

Formulations	<i>A. aegypti</i> titre (I.T.U./mg)	CL 50 <i>S. damnosum</i> (mg/1/10 mn) (trough test)
Wettable dispersible powder	W.D.P. 50 % (ROGER BELLON)	≈ 1500
	BACTIMOS ^(R) (SOLVAY)	6000
	VECTOBAC ^(R) 6108 II (ABBOTT)	2000
Water dispersible concentrate	TEKNAR 402 I	600
	TEKNAR H 28	≈ 1900
	R 1471 C.R. (SOLVAY)	1270
		0,18
		0,62
		0,17
		0,24
		0,08
		18

Table II : Comparison of various *B.t.* H14 formulations between *A. aegypti* titre and their toxicity to *S. damnosum* complex larvae.

Sample Strain	RB 1 W1.00	RB 2 W1.00	RB 5 1884	RB 6 1884	BTF 1136 WI 36-5	BTF 1137 W1 36-5
<i>A. aegypti</i> titre (I.T.U./mg)	6870	5470	8645	10720	7500	30000
<i>S. damnosum</i> titre (I.T.U./mg) (LAB. Test)	10142	10142	12814	17151	-	-
% mortality at 0.05 mg/1/10 mn (trough test)	94.9	69.4	84	40.3	85	91

Table III : Comparison of various freeze dried *B.t.* H14 powders between the *A. aegypti* titre and their toxicity to *S. damnosum* complex larvae both in the laboratory (24 h contact in distilled water) and in field

BIBLIOGRAPHY

- GAUGLER, R. and MOLLOY, D. (1980). Feeding inhibition in blackfly larvae (Diptera : Simuliidae) and its effects on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Environ. Entomol. 9 : 704-8.
- GUILLET, P. and ESCAFFRE, H. (1979). La recherche de nouvelles formulations d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs d'onchocercose en Afrique de l'Ouest. Congrès sur la lutte contre les insectes en milieu tropical. Marseilles : 1169-78.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., OUEDRAOGO, M. and QUILLEVERE, D. (1980). Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans la complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire (zone du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta). Cah. ORSTOM, Ent. méd. Parasit. 18 : 291-99.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H. and PRUD'HOM, J.M. (1982 A). L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. I. Efficacité et modalités d'application. Cah. ORSTOM, Ent. méd. Parasit. (in press).
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H. and PRUD'HOM, J.M. (1982 B). L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. II. Stabilité dans les conditions de stockage en milieu tropical. Cah. ORSTOM, Ent. méd. Parasit. (in press).
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H. and PRUD'HOM, J.M. (1982 C). L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. III. Amélioration du niveau d'efficacité. Cah. ORSTOM, Ent. méd. Parasit. (in press).
- JAMNBACK, H. and MEANS, R.G. (1968). Formulation as a factor influencing the effectiveness of Abate^(R) in control of blackflies (Diptera : Simuliidae) Proc. NJ.Mosquito. Extern. Assoc. 55 : 89-94.
- KURTAK, D., OCRAN, M., OUEDRAOGO, M., BARRO TELE and GUILLET, P. (1982). Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* already resistant to temephos (Abate^(R)). to be issued as WHO/VBC/Mimeographed document.
- LACEY, L.A., ESCAFFRE, H., PHILIPPON, B., SEKETELI, A. and GUILLET, P. (1981). Large river treatment with *Bacillus thuringiensis* H14 for the control of *Simulium damnosum* s.l. in the onchocerciasis control programme. Preliminary trials with the Sandoz 402 formulation. MISC. PUBL. Entomol. Soc. Am. (in press).
- ROSS, D.H., and CRAIG, D.A. (1980). Mechanisms of fine particle capture by larval black flies (Diptera : Simuliidae). Can. J. Zool. 58 : 1186-92.
- WOTTON, R.S. (1977). The size of particles ingested by Moorland stream blackly larvae. (Simuliidae). Oikos 30 : 121-5.

25

TOXICITE COMPAREE DU *Bacillus thuringiensis* H14

POUR LES LARVES DE MOUSTIQUES ET DE SIMULIES.

TOXICITE COMPAREE DU *Bacillus thuringiensis* H14

POUR LES LARVES DE MOUSTIQUES ET DE SIMULIES.*

Pierre GUILLET **
Jean Marc HOUGARD ***
Julien DOANNIO ***
Henri ESCAFFRE ***
Jacques DUVAL ***

INTRODUCTION

Pour être utilisable, un insecticide, qu'il soit chimique ou d'origine biologique, doit être formulé. En matière d'insecticides utilisables contre les larves de simulies, la formulation revêt une importance primordiale. Dans la lutte antilarvaire contre les moustiques, l'insecticide est appliqué dans l'eau stagnante où se déplacent les larves. Plusieurs types de formulations peuvent être employés, leurs performances dépendant plus de la matière active elle-même que de la formulation.

Dans le cas des simulies, les larves vivent fixées dans l'eau courante. C'est donc la formulation qui, après s'être dispersée dans le courant, est entraînée et va conduire la matière active jusqu'à la cible ; le temps de contact est toujours relativement bref. Mal formulé, le meilleur insecticide n'atteindra pas la cible, ou ne sera pas ingéré. C'est le cas par exemple du téméphos qui peut avoir une efficacité remarquable ou au contraire médiocre selon la formulation utilisée.

* Ce travail a bénéficié, dans le cadre des accords entre l'ORSTOM et l'OCCGE, d'une subvention de l'Organisation mondiale de la Santé.

** ORSTOM - SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE.

*** Institut Pierre Richet (IRTO) - BP 1500 - BOUAKE - COTE D'IVOIRE.

Il en va de même pour le *Bacillus thuringiensis* H14. Dès les premiers essais, il est apparu que la formulation jouait également un rôle important (GUILLET et ESCAFFRE, 1979, MOLLOY *et al.*, 1981). L'influence d'un certain nombre de facteurs a été étudiée systématiquement (nature et taille des particules, temps de contact, âge des larves, turbidité de l'eau, GUILLET *et al.*, 1985 a et b). Toutefois, il est apparu très tôt que les produits primaires utilisés dans les formulations ne présentaient pas nécessairement la même toxicité pour les larves de simuliés que pour les larves de moustiques et avaient une influence importante sur l'efficacité des formulations (GUILLET *et al.*, 1982).

La teneur des préparations de *B. thuringiensis* H14 en endotoxine est mesurée par titrage biologique avec des larves d'*Aedes aegypti*. Si l'on n'observe généralement pas de relation entre le titre *A. aegypti* des formulations et leur efficacité contre les larves de simuliés (GUILLET et ESCAFFRE, *loc. cit.*, MOLLOY *et al.*, 1984), il peut en être de même dans le cas des produits primaires (non formulés) (GUILLET *et al.*, 1982, *loc. cit.*).

Une évaluation comparative de plusieurs produits primaires de *B. thuringiensis* H14 a été réalisée parallèlement avec des larves de simuliés appartenant au complexe *Simulium damnosum* et des larves d'*A. aegypti* pour étudier, en fonction des conditions d'utilisation, le degré de corrélation des résultats obtenus.

MATERIEL ET METHODES

Les tests avec les larves d'*A. aegypti* ont été réalisés conformément à la méthode préconisée par l'Organisation mondiale de la Santé (Anon, 1981). Pour chaque série, un triple essai a été pratiqué. Dans certains cas, une dose unique a été appliquée avec deux répétitions et quatre lots de 25 larves par répétition. Dans tous les cas, le temps de contact est de 24 h en eau distillée, sans adjonction de nourriture.

Les tests avec les larves de simulies ont été réalisés avec trois dispositifs différents :

- Mini-gouttières : il s'agit d'un dispositif de plusieurs gouttières en parallèle (jusqu'à 50) alimentées avec de l'eau de rivière en circuit ouvert et qui sont utilisées en routine pour l'évaluation de l'efficacité des formulations de *B. thuringiensis* H14 (GUILLET *et al.*, 1985 c) ; le contact est de 10 mn et la lecture s'effectue 24 h après. Ce dispositif donne des résultats identiques à ceux obtenus en rivière.

- Dispositif de Colbo et Thompson (1978) : dans ce dispositif, le brassage de l'eau est assuré par des barreaux magnétiques. Le temps de contact est de 24 h à 25° C en eau distillée, sans adjonction de nourriture. Dans ces conditions, le transit intestinal des larves est pratiquement stoppé (ELOUARD et ELSEN, 1977), alors qu'il est de 15 à 20 mn avec le dispositif précédent ainsi que dans les conditions naturelles.

- Dispositif d'agitateurs à bouteilles : ce dispositif dérivé de celui décrit par Hembree *et al.*, 1980, a été mis au point pour tester la sensibilité des larves du complexe *S. damnosum* à la toxine du *B. thuringiensis* H14 (GUILLET *et al.*, 1985 d). Le contact est de 3 h en eau distillée à 25° C, sans adjonction de nourriture ; le décompte de la mortalité s'effectue immédiatement après.

Tous les tests avec les larves de simulies ont été réalisés avec des larves âgées (stades 6 et 7), pour la plupart de *S. yahense* Vajime et Dunbar. Quatre à six concentrations ont été utilisées par test avec généralement quatre lots de 25 à 30 larves par concentration. Chaque test a été répété au minimum deux fois. Les résultats, basés sur les pourcentages de mortalité larvaire, ont été interprétés à l'aide d'un programme analyse-probit (FINNEY, 1971) sur micro ordinateur ; les CL 50 sont exprimées en mg/l avec un intervalle de confiance au seuil de 95 %.

Plusieurs types de préparations de *B. thuringiensis* H14 ont été utilisés :

- des poudres lyophilisées (RB 1, 2, 5 et 6) ou atomisées (R153-78 et Bt.Bl.45) fournies par Solvay Biochem,
- des suspensions aqueuses stabilisées non formulées (153 A et 153 B, 155 et 157 B, 158 A, F11 A et B, F12 A) fournies également par Solvay Biochem,
- des poudres primaires (HD 522 à 910) obtenues le plus souvent par précipitation à l'acétone, et fournies par l'USDA* (Dr H.T. Dulmage) dans le cadre d'un programme de criblage de différents isolats de *B. thuringiensis* H14 en collaboration avec l'OMS,
- pour illustrer le rôle joué par la formulation elle-même, huit formulations liquides ont été testées (Bactimos A et 7126 A) fournies par Solvay Biochem.

Compte-tenu de l'existence de plusieurs standards successifs du *B. thuringiensis* H14, les résultats ont été exprimés sur la base des CL 50 et non sur celle de titres biologiques en référence à l'un des standards.

RESULTATS

Rappel du rôle joué par la formulation

L'adjonction d'agents de formulation dans un produit primaire peut augmenter considérablement son efficacité contre les larves de simulies. Cette efficacité, pour la même dose, passe de moins de 30 % à plus de 99 % de mortalité, sans que l'on n'observe aucune modification de la toxicité contre les larves d'*A. aegypti* (tableau 1).

* United States Department of Agriculture, Brownsville, Texas.

Toxicité comparée des produits non formulés

Lorsque ces produits sont testés dans des conditions comparables (contact de 24 h en eau distillée avec le dispositif de Colbo et Thompson pour les larves de simulies), on observe une concordance hautement significative entre les résultats obtenus sur moustiques et sur simulies, avec un coefficient de corrélation $r^2 = 0,92$ ($y = 1,34x - 0,99$ après transformation logarithmique des CL 50) (tableau 2).

Lorsque le temps de contact n'est plus que de trois heures pour les larves de simulies, mais toujours en eau distillée, (agitateurs à bouteilles), on observe une corrélation significativement moins bonne : $r^2 = 0,72$ ($y = 0,77x + 0,81$).

Enfin, lorsque le temps de contact avec les larves de simulies n'est plus que de 10 mn, dans de l'eau de rivière (mini-gouttières), on n'observe plus aucune corrélation entre les résultats obtenus sur moustiques et sur simulies : $r^2 = 0,20$ ($y = 1,85x - 0,53$) (tableau 4).

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'importance de la formulation dans l'efficacité des produits à base de *B. thuringiensis* H14 est aussi significative que dans le cas des larvicides chimiques. L'exemple mentionné ici avec le Bactimos[®] ne fait que confirmer un phénomène déjà bien connu. Toutefois, les produits primaires eux-mêmes jouent un rôle important et qui, jusqu'à présent, a été probablement trop souvent attribué à la formulation.

Les différences d'efficacité observées entre les larves de moustiques et celles de simulies dépendent en fait beaucoup plus des conditions d'utilisation de la toxine que de l'insecte utilisé. En effet, si l'on modifie les tests avec les larves d'*A. aegypti* en limitant le temps de contact à 10 mn seulement, on obtient des résultats qui se rapprochent sensiblement de ceux obtenus avec les larves de simulies dans le dispositif des mini-gouttières (GUILLET, non publié).

Dans ce dernier dispositif, les larves sont exposées pendant un intervalle de temps bref à une forte dose de toxine, comme dans les traitements en rivière. En revanche, dans le dispositif de Colbo et Thompson et lors du titrage avec *A. aegypti*, les larves, au cours d'une période de 24 h, sont exposées à une succession de faibles doses en fonction de leurs périodes de prise de nourriture. L'utilisation d'eau distillée réduit pratiquement à néant le transit intestinal et la toxine ingérée demeure dans l'intestin. Dans les mini-gouttières, le transit intestinal est au contraire très rapide, notamment dans l'intestin moyen où a lieu l'activation de la toxine (CHARLES et de BARJAC, 1983). Cette activation doit intervenir rapidement pour que la ou les toxines puissent être intégralement libérées.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer les degrés de corrélation divers observés :

- la première concerne la nature de la ou des toxines. Les cristaux du sérotype H14 sont constitués de sous-unités toxiques qui sont des polypeptides d'un poids moléculaire allant de 28 000 à 140 000 daltons selon les auteurs. Si la présence de plusieurs polypeptides est unanimement reconnue, leur pouvoir insecticide respectif est très controversé, notamment celui des sous-unités de 25-28 000 et 65 000 daltons (HUBERT *et al.*, 1981, TYRELL *et al.*, 1981, KONIKARA, 1984, LEE *et al.*, 1985, ARMSTRONG *et al.*, 1985). Il serait possible que, selon les conditions d'exposition des larves, ce soient des toxines différentes qui agissent. Il a été montré par exemple, que certaines toxines avaient une action essentiellement haemolytique et d'autres une action neurotoxique (CHILCOTT *et al.*, 1984). Toutefois, les résultats présentés ici ne permettent pas d'étayer cette hypothèse.

- La deuxième hypothèse concerne l'activation de la protoxine en toxine(s) au cours du transit intestinal. On a observé que si l'on augmente le temps de transit intestinal chez les larves de simules, on augmente significativement l'efficacité du *B. thuringiensis* H14 (GAUGLER et MOLLOY; 1980, GUILLET, non publié). Dans les conditions normales

d'utilisation du *B. thuringiensis* H14 avec les larves de simulies, la ou les toxines ne sont probablement pas intégralement libérées. L'activation de la protoxine s'effectue sous l'action de protéases en milieu alcalin. Ces protéases, selon les auteurs, peuvent être endogènes, l'activation de la toxine étant alors un processus autolytique (BULLA *et al.*, 1977, CHILCOTT *et al.*, 1981), ou au contraire, être contenues dans l'intestin des larves de moustiques et de simulies (TYRELL *et al.*, *loc. cit.*, NICKERSON, 1982, PFANNENSTIEL *et al.*, 1984, ARMSTRONG *et al.*, *loc. cit.*).

Il existe dans le sérotype H14 des métallo-protéases endogènes qui peuvent être totalement inhibées par l'adjonction d'EDTA*. Cette adjonction ne modifiant pas la toxicité vis-à-vis des larves d'*A. aegypti*, il en a été déduit que ces protéases n'étaient pas impliquées dans l'activation de la protoxine (PFANNENSTIEL *et al.*, *loc. cit.*).

Récemment, on a observé que l'agitation de suspensions de *B. thuringiensis* H14 (IPS 80) en présence d'EDTA n'entraînait effectivement aucune modification de la toxicité vis-à-vis des larves d'*A. aegypti*. En revanche, il n'en n'est pas de même pour les larves de simulies. Avec le dispositif des agitateurs à bouteilles, l'EDTA entraîne une augmentation de la CL 50 de deux fois, tandis que dans les mini-gouttières, il semble inhiber totalement l'activation de la toxine et entraîne une diminution pratiquement totale de la mortalité qui passe de 95 % à 1,7 % seulement (GUILLET et BOURGOIN, non publié).

Ces observations préliminaires qui font l'objet d'une autre étude, semblent démontrer le rôle éventuel des protéases, et particulièrement celui des métallo-protéases, dans l'activation de la protoxine chez les larves de simulies. Le rôle éventuel des protéases a également été discuté dans le cadre d'une étude relative à l'influence du mixage sur la toxicité du *B. thuringiensis* H14 (GUILLET et DUVAL, 1985).

* EDTA : acide éthylène-diamine-tetraacétique.

Il semblerait que ce soit plutôt au niveau de l'activation de la protoxine et de la libération des toxines dans l'intestin que les différences observées entre les larves de moustiques et de simulies trouvent leur explication que dans la présence de plusieurs toxines ayant des modes d'action différents.

Les différences de toxicité des produits primaires de *B. thuringiensis* H14 vis-à-vis des larves de moustiques et de simulies représentent un phénomène probablement sous-estimé jusqu'à présent et qui a, sans aucun doute, retardé le processus de la mise au point de formulations commerciales utilisables à grande échelle dans la lutte contre les vecteurs de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest.

SUMMARY : RELATIVE TOXICITY OF *Bacillus thuringiensis* H14
FOR MOSQUITO AND BLACKFLY LARVAE.

Formulation by itself is well known to be a key factor regarding the efficacy of blackfly larvicides. This is true also for *B. thuringiensis* H14. When a primary product was properly formulated, its efficacy increased from 30 % up to 99 % without any significative change in the toxicity for mosquito larvae (table 1).

When primary products were tested against mosquito and blackfly larvae under similar conditions (24 h exposure time in distilled water, without food), the observed correlation in LC 50s was highly significative ($r^2 = 0.92$, table 2).

When the exposure time for blackfly larvae was reduced to 3 h, this correlation decreased significantly ($r^2 = 0.72$, table 3).

Finally, when blackfly larvae were exposed during 10 mn only in river water, no correlation at all was observed ($r^2 = 0.2$, table 4).

This discrepancy seems to depend more on the toxin activation in the gut than on the possible existence of several toxins with preferential activity against mosquito or blackfly larvae. The role of proteases and the influence of a protease inhibitor (EDTA) are briefly discussed.

These differences observed in the relative toxicity of *B. thuringiensis* H14 unformulated products was not sufficiently stressed in the past and was probably involved in slowing down the production of suitable formulations for onchocerciasis control in West Africa.

KEY WORDS : *B. thuringiensis* H14, mosquito, blackfly, relative toxicity.

RESUME :

On observe des différences importantes dans la toxicité des produits primaires de *B. thuringiensis* H14 vis-à-vis des larves de moustiques et de simulies. Ces différences dépendent étroitement de leurs conditions d'utilisation et semblent liées à l'activation de la toxine dans l'intestin, plutôt qu'à la présence de plusieurs sous-unités toxiques préférentiellement actives sur l'un ou l'autre de ces insectes cibles.

MOTS CLES : *B. thuringiensis* H14, moustique, simulie, toxicité comparée.

Pourcentages de mortalité et (nombre de larves testées)					
Produit		non formulé	formulé 1	formulé 2	formulé 3
Bactimos A	S	23,3 (390)	43,2 (185)	92,3 (174)	97,2 (144)
	M	39,7 (200)	39,5 (200)	38 (200)	51,5 (200)
7126 A	S	29,4 (367)	54,3 (291)	65,9 (213)	99,5 (433)
	M	12 (200)	11,7 (200)	13,7 (200)	7,3 (200)

Tableau 1 - Evaluation comparative de huit formulations de *Bacillus thuringiensis* H14 sur les larves de simulies et de moustiques.

(la première colonne correspond au produit primaire non formulé, les trois autres à trois formulations différentes de ce produit).

S = *Simulium damnosum* s.l. :
larves de stades 6 et 7, tests en mini-gouttières, concentration 0,8 mg/l, temps de contact 10 mn, lecture après 24 h.

M = *Aedes aegypti* :
concentration 0,25 mg/l pendant 24 h à 25° C.

Produit	<i>Simulium damnosum s.l.</i>		<i>Aedes aegypti</i>	
	CL 50 mg/l	IC 95 %	CL 50 mg/l	IC 95 %
RB 6	0,006	0,005 - 0,007	0,025	0,023 - 0,026
RB 1	0,011	0,010 - 0,013	0,039	0,037 - 0,042
RB 5	0,011	0,009 - 0,011	0,031	0,029 - 0,033
RB 2	0,012	0,011 - 0,013	0,050	0,045 - 0,051
Bt. Bl. 45	0,014	0,012 - 0,015	0,027	0,025 - 0,029
R153-78	0,055	0,047 - 0,064	0,091	0,086 - 0,096
IPS 78	0,180	0,160 - 0,210	0,270	0,260 - 0,280
$y = 1,34x - 0,99$			$r^2 = 0,92$	

Tableau 2 - Evaluation comparative de sept produits primaires de *Bacillus thuringiensis* H14 sur les larves de simules et de moustiques.

Simulium damnosum s.l. :
test avec le dispositif de Colbo et Thompson 1978,
contact 24 h à 25° C en eau distillée.

Aedes aegypti :
contact 24 h à 25° C en eau distillée.

Produit	<i>Simulium damnosum s.l.</i>		<i>Aedes aegypti</i>	
	CL 50 mg/l	IC 95 %	CL 50 mg/l	IC 95 %
HD 919	0,068	0,061 - 0,076	0,045	0,044 - 0,047
HD 563	0,102	0,092 - 0,112	0,052	0,050 - 0,054
HD 522	0,109	0,100 - 0,119	0,035	0,034 - 0,037
HD 786	0,139	0,128 - 0,151	0,040	0,038 - 0,042
HD 648	0,151	0,136 - 0,167	0,081	0,078 - 0,083
HD 790	0,182	0,166 - 0,199	0,073	0,071 - 0,075
HD 659	0,219	0,200 - 0,241	0,049	0,047 - 0,050
HD 655	0,232	0,212 - 0,255	0,100	0,096 - 0,104
HD 794	0,248	0,225 - 0,274	0,247	0,241 - 0,253
HD 649	0,280	0,250 - 0,310	0,189	0,183 - 0,196
HD 653	0,380	0,340 - 0,410	0,142	0,138 - 0,146
HD 656	0,595	0,549 - 0,645	0,243	0,236 - 0,249
HD 654	0,682	0,639 - 0,730	0,268	0,259 - 0,277
$y = 0,77x + 0,81$			$r^2 = 0,72$	

Tableau 3 - Evaluation comparative de 13 produits primaires de *Bacillus thuringiensis* H14 sur les larves de simulies et de moustiques.

Simulium damnosum s.l. :
tests avec agitateurs à bouteilles (GUILLET et al., 1985)
contact 3 h à 25° C en eau distillée.

Aedes aegypti :
contact 24 h à 25° C en eau distillée.

Produit	<i>Simulium damnosum s.l.</i>		<i>Aedes aegypti</i>	
	CL 50 mg/l/10mn	IC 95 %	CL 50 mg/l/24h	IC 95 %
F11 1B	0,076	0,058 - 0,098	0,067	0,061 - 0,073
F11 1A	0,083	0,062 - 0,112	0,082	0,070 - 0,092
F12 1A	0,099	0,086 - 0,113	0,100	0,090 - 0,110
153 2A	0,139	0,120 - 0,160	0,100	0,080 - 0,120
F11 2A	0,154	0,130 - 0,180	0,097	0,091 - 0,104
153 1B	0,168	0,140 - 0,190	0,159	0,150 - 0,170
155 1B	0,189	0,170 - 0,210	0,222	0,210 - 0,230
155 3B	0,390	0,330 - 0,460	0,190	0,170 - 0,210
F11 3B	0,670	0,610 - 0,740	0,220	0,200 - 0,250
158 3A	1,910	1,200 - 2,800	0,190	0,180 - 0,200
157 3B	3,200	2,100 - 4,600	0,103	0,092 - 0,180
$y = 1,85x - 0,53$			$r^2 = 0,20$	

Tableau 4 - Evaluation comparative de 11 produits primaires de *Bacillus thuringiensis* H14 sur les larves de simulies et de moustiques.

Simulium damnosum s.l. :
tests en mini-gouttières, contact 10 mn en eau de rivière, lecture après 24 h.

Aedes aegypti :
contact 24 h à 25° C en eau distillée.

26

THE EFFECT OF BLENDING ON THE TOXICITY
OF *Bacillus thuringiensis* SEROTYPE H14 PREPARATIONS
AGAINST MOSQUITO AND BLACKFLY LARVAE.

THE EFFECT OF BLENDING ON THE TOXICITY OF *Bacillus thuringiensis* SEROTYPE H14

PREPARATIONS AGAINST MOSQUITO AND BLAKFLY LARVAE.*

Pierre GUILLET**

Jacques DUVAL***

INTRODUCTION

The determination of the potency of various *Bacillus thuringiensis* serotype products is based on different bioassay procedures, each of them consisting of an acceptable compromise rather than a fully satisfactory testing method. The technics used so far vary according to the serotype and the test insects involved, but the reliability of results is likely to be affected by the same factors. Among these factors is the homogeneity of the tested bacterial suspensions in relation to the feeding behaviour of the target insect and the insolubility of the toxin.

The bioassay results are usually calculated using a log-probit model which supposes that all individuals within a given concentration are exposed to the same dose of toxic material (FINNEY, 1971). This is very difficult to achieve with the particulate insoluble endotoxin of *B. thuringiensis* H14 which is activated only upon ingestion. It is therefore essential to try to provide each individual for each dosage, with the same amount of crystals under the same presentation (particle size and distribution within the larval feeding zone).

When dry preparations of *B. thuringiensis* H14 (freeze dried or spray dried) are diluted into liquid suspensions, they usually form aggregates of spores, crystals, vegetative cells and fermentation residues of variable size (from 1 to more than 100 μm). The mean size of these aggregates is an important factor regarding the distribution of the toxin and its ingestion by the larvae. It depends a great deal on the mode of preparation of the

* This study was funded by UNDP, World Bank, WHO Special Programme for research and training in Tropical Diseases.

** ORSTOM - SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE

*** Pierre Richet Institute (IRTO) - BP 1500 - BOUAKE - IVORY COAST

initial suspension. Various devices are commonly used for the homogenization of suspensions such as magnetic stirrers, vortexes, blenders or Dangoumau type shakers.

From informal discussions with people performing *B. thuringiensis* H14 bioassays, it appears that blenders, though producing fairly homogeneous suspensions of small size particles, can affect the toxicity of the preparations. Laboratory trials were carried out in order to elucidate this phenomenon and to verify if it occurs with blackfly as well as with mosquito larvae.

MATERIAL AND METHODS

Trials were carried out using the new proposed international standart IPS 82 produced by Pasteur Institute (de BARJAC and LARGET-THIERRY, 1984) and 3 formulations produced by industry : an experimental liquid suspension for blackfly control Bactimos[®], batch R-155/1B, 1059 I.U. *Aedes aegypti*/mg (Solvay) ; a water dispersible concentrate Teknar[®], batch 21.521, 514 I.U. *A. aegypti*/mg (Sandoz) ; and inactivated Teknar, an experimental sample produced by Sandoz as a result of blending of the commercial batch, 429 I.U. *A. aegypti*/mg. The potency of these formulations was determined according to the WHO recommended method (Anon., 1981) using an *A. aegypti* potency of 15,000 I.U. for IPS 82.

When dispersed in the water, Teknar produces homogeneous suspensions of individualized spores and crystals. Bactimos produces mostly individualized spores and crystals with a few big aggregates irregular in shape and size (10 to 50 μ m). The mean size of aggregates was not determined as it remains difficult to evaluate the relative proportions of the toxin contained in big aggregates compared with individualized crystals. IPS 82 also produces big aggregates, some of which remain after homogenization.

Blending was carried out 24 h before bioassay with an usual domestic blender using either undiluted formulation or 250 ml of 5 g/l distilled water suspensions (0.5 g/l with IPS 82).

Bioassays with blackfly larvae were carried out with *Simulium yahense* Vajime et Dunbar 1975, late instar larvae (mean post-genal length 460 μm), a forest species belonging to the *Simulium damnosum* complex, vector of onchocerciasis in West Africa. The test apparatus was a minigutter system routinely used for the screening of *B. thuringiensis* H14 formulations (larvae collected in the field, contact 10 mn, post-exposure period 24 h). Four to five concentrations were tested with 3 to 4 replicates. With mosquito larvae, a triple bioassay was systematically carried out with 5 to 6 concentrations.

RESULTS

The use of a blender for the homogenization of *B. thuringiensis* H14 preparations strongly affected its toxicity against blackfly larvae. The inactivated Teknar was 3 times less effective than the commercial one (table 1). In our blending procedure, the loss of efficacy was only 1.8 times after 45 s blending, contrary to Bactimos whose LC 50 increased respectively 1.5, 3.5 and 19.5 times after 5, 15 and 45 s blending (table 1). On the other hand, the toxicity against mosquito larvae was much less affected. The efficacy of Teknar (either inactivated or blended commercial formulation) was not significantly changed (table 2). The LC 50 of Bactimos and IPS 82 increased respectively 2.9 and 2.7 times after 5 s blending without additional effect after more than 5 s (table 2). When pure (undiluted) formulation was blended, the loss of efficacy was more limited ; LC 50 increased 2 times compared with the 2.9 times with a 5 g/l suspension.

Blending had a significative effect on the particle size of Bactimos and IPS 82 suspensions. Big aggregates was partly broken up and only few remained after 45 s blending.

DISCUSSION - CONCLUSION

The influence of blending on the particle size of Bactimos and IPS 82 is likely to play a role in the inactivation process reported in this paper. Reduced efficacy is much more marked with blackfly larvae than with mosquito larvae. The former are exposed only 10 mn to *B. thuringiensis* H14 and consequently, their filter feeding efficiency according to the par-

ticle size is a critical factor. On the contrary, mosquito larvae are exposed during 24 h (144 times longer) and can ingest most of the *B. thuringiensis* H14 particles in the bioassay cups, whatever their size within a certain range (e.g. 1 to more than 100 μm). The relationship between the particle size of *B. thuringiensis* H14 formulations and their efficacy against blackfly larvae has already been mentioned (GUILLET and ESCAFFRE, 1979, MOLLOY *et al.*, 1981, MOLLOY *et al.*, 1984, GUILLET *et al.*, 1985).

Decreasing particle size is probably not the only factor involved in this activation process. Inactivated Teknar has the same particle size as the commercial one and is 3 times less effective against blackfly larvae. It is difficult to conceive that the decreasing particle size of Bac-timos by itself, can be responsible for the 20 times decrease in efficacy.

One of the particularities of the H14 serotype is founded in its crystals which are irregular in shape and size (TYRELL *et al.*, 1981, CHARLES and de BARJAC, 1982, BOISVERT *et al.*, 1982). They consist of an assembly of several subunits differing in size and electron density, and are usually surrounded by an envelope (TYRELL *et al.*, *loc. cit.*, CHARLES and de BARJAC, *loc. cit.*). The blending may lead to the destruction of envelopes and eventually splitting up crystals in smaller subunits. Such mechanical action could explain the obtained results in that the individualized subunits are less easily ingested or, the proteases included in the preparations are activated and degrade the toxin. This last hypothesis must be considered.

As mentioned by NICKERSON (1982), the H14 serotype bacterial sporulation " is a process characterized by extensive protein turnover and consequently, crystals are released into a highly proteolytic environment ".

It is assumed in the literature that *B. thuringiensis* H14 crystals may contain endogenous protease(s) which may be responsible for activation of the protoxin under alkaline conditions in the gut of susceptible insects (BULLA *et al.*, 1977, CHILCOTT *et al.*, 1981). When heat treated under alkaline conditions, crystals lose most of their toxicity (increases in LC 50 up to 1000 times due to protease inactivation : CHILCOTT *et al.*, *loc. cit.*). On the other hand, such a phenomenon could also be due to heat denaturation of the active polypeptide (LECADET, pers. comm.). Moreover, the possible role of proteases in protoxin activation is not unanimously accepted. It is generally

stated that insect gut enzymes are much more effective than endogenous protease(s) in activating the protoxin and that the latter are not involved in the activation process (TYRELL *et al.*, *loc. cit.*, NICKERSON, *loc. cit.*, PFANNENSTIEL *et al.*, 1984, ARMSTRONG *et al.*, 1985).

The blending of pure or diluted *B. thuringiensis* H14 preparations probably leads to an activation of proteases which could further degrade the toxin (BOURGOIN, pers. comm.). The reason why the toxicity of Teknar is much less affected than that of Bactimos could be explained by 3 different factors :

1 - The proteases content of Teknar may be lower, possibly due to the stabilisation of the culture at an early stage, when proteases content still increases.

2 - The newly formed *B. thuringiensis* H14 crystals are surrounded by an envelope as previously mentioned and such an envelope can be removed with additional incubation time (NICKERSON, *loc. cit.*). If Bactimos is produced with older cultures or is improperly stabilized compared with Teknar, crystals may be less protected by their envelopes and consequently more susceptible to the action of proteases.

3 - The pH of Teknar could be lower than the one of Bactimos, and a lower pH is known to be responsible for lower protease activity (LUTHY, pers. comm.). The pH of preparations was not checked during our assays.

The reason why this inactivation process is much more effective with blackfly larvae than with *Aedes* larvae may be due either to the fact that more than a single polypeptide may be involved in the intoxication process of mosquito and blackfly larvae or to different protoxin activation conditions in their gut. It was already shown that in the conditions of activity against blackflies (very brief exposure period and intestinal transit time), the toxicity of *B. thuringiensis* H14 dose not correlate with the toxicity against mosquito larvae (Guillet *et al.* 1982). This aspect will be discussed in an other paper which is presently in preparation.

The results of this study underline the necessity to avoid the use of certain homogenization technics in bioassays. Any method with a strong mechanical impact on crystals such as blending or sonication has to be avoided. Furthermore, in routine bioassay procedures, mother suspensions should be prepared as gently as possible, preferably with a high dilution rate (e.g. ≤ 50 mg/l) in order to minimize the possible action of proteases.

Whether proteases activate or degradate the toxin, their influence on *B. thuringiensis* H14 toxicity must be stressed. Companies involved in the production of formulations for blackfly control are aware that the *A. aegypti* potency is not a reliable criterion and that preparations may be more or less effective against *S. damnosum* complex larvae than expected. The proteases and their activity, which can depend on growth conditions, sporulation stage, the use of stabilizing or formulation agents (carbonates for example can strongly affect the toxicity of *B. thuringiensis* H14, SCHNELL and NICKERSON, 1983) must be taken into account in the production of *B. thuringiensis* H14, especially when it is used for blackfly control.

SUMMARY

The use of a blender to homogenize *B. thuringiensis* H14 suspensions leads to a significant loss of toxicity against mosquito and almost all blackfly larvae. This loss depends on preparations used. The main factor involved seems to be the action of proteases which are probably activated by blending and then degrade the toxin. The use of blender or sonication has to be avoided. Proteases must be taken into account in the preparation of *B. thuringiensis* H14 formulations, especially for the control of blackfly larvae.

KEY WORDS : *B. thuringiensis* H14 toxin, blending, proteases, inactivation, mosquito, blackfly.

RESUME

L'agitation de suspensions de *B. thuringiensis* H14 à l'aide d'un "blender" entraîne une perte importante de toxicité vis-à-vis des larves de moustiques et surtout de simulies. Cette perte dépend également de la préparation utilisée. Le "blender", en agissant sur la taille des particules, peut entraîner une légère perte d'efficacité. Mais le phénomène observé pourrait s'expliquer surtout par l'action des proteases qui, activées par l'agitation vigoureuse, peuvent dégrader la toxine. L'utilisation de procédés d'agitation tels que "blender" ou ultra-sons doit être évitée. Le rôle des proteases est important et doit être pris en compte dans la préparation des formulations de *B. thuringiensis* H14, surtout lorsqu'elles sont destinées à la lutte antismulidienne.

MOTS CLES: *B. thuringiensis* H14, toxine, inactivation, protéases, moustiques, simulies.

Preparation	LC 50 (mg/l)			
	unblended	5 s	blended 15 s	45 s
Bactimos R batch 155-1B (1059 I.U.)	0.19 (0.17 - 0.20)*	0.28 (0.25 - 0.31)	0.69 (0.55 - 0.87)	3.73 (3.5 - 4.0)
Teknar R batch 21.521 (514 I.U.)	0.37 (0.35 - 0.40)			0.67 (0.60 - 0.77)
Inactivated Teknar (429 I.U.)	1.14 (1.1 - 1.2)			

* 95 % confidence limits.

Table 1 - Changes in *Simulium damnosum* complex larvae LC 50s according to blending of suspensions.

(minigutter test, *S. yahense*, mature larvae, 10mn exposure period, 24h post exposure period)

Preparation	LC 50 (mg/l)			
	unblended	blended		
		5 s	15 s	45 s
Bactimos 155-1B (5g/l suspension)	0.17 (0.14 - 0.20)* 1059 I.U.	0.49 (0.44 - 0.54) 367 I.U.	0.57 (0.52 - 0.63) 316 I.U.	0.56 (0.50 - 0.63) 321 I.U.
Bactimos (undiluted)				0.34 (0.28 - 0.41) 529 I.U.
Teknar 21.521 (5g/l suspension)	0.35 (0.29 - 0.42) 514 I.U.	0.40 (0.36 - 0.45) 450 I.U.	0.46 (0.43 - 0.49) 391 I.U.	0.44 (0.39 - 0.49) 409 I.U.
Teknar (undiluted)				0.34 (0.28 - 0.41) 529 I.U.
Inactivated Teknar	0.42 (0.33 - 0.51) 429 I.U.			
IPS 82 standart (0.5g/l suspen.)	0.012 (0.010 - 0.015)	0.032 (0.027 - 0.037)	0.037 (0.030 - 0.044)	0.035 (0.029 - 0.044)

* 95 % confidence limits.

Table 2 - Changes in *Aedes aegypti* LC 50s according to the blending of suspensions.

(Bora-Bora strain, young 4th instar larvae, WHO bioassay procedure)

BIBLIOGRAPHY

- ARMSTRONG, J.L., ROHRMANN, G.F. and BEAUDREAU, G.S. - 1985. Delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. - J. Bacteriol., Jan. 1985, 39-46.
- ANONYMOUS. - 1981. Informal consultation on standardization of *Bacillus thuringiensis* H14. - WHO. Mim. Doc., WHO/VBC/81.828.
- de BARJAC, H. and LARGET-THIERRY, I. - 1984. Characterization of IPS 82 as a standard for bioassays of *Bacillus thuringiensis* H14 preparations. - WHO. Mim. Doc., WHO/VBC/84.892.
- BOISVERT, J., BOILY, M., CHARPENTIER, G. and GARZON, S. - 1982. Analysis of the delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* by electron microscopy and polyacrilamide gel electrophoresis. - Abstr. IIIrd Int. coll. Invertebr. Pathol., Brighton, U.K., 204.
- BULLA, L.A. Jr, KRAMER, K.J. and DAVIDSON, L.I. - 1977. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. - J. Bacteriol., 130, 375-383.
- CHARLES, J. and de BARJAC, H. - 1982. Sporulation et cristallogénèse de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en microscopie électronique. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 133A, 425-442.
- CHILCOTT, C.N., KALMAKOFF, J. and PILLAI, J.S. - 1981. Biological significance of proetolytic activity associated with *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals. WHO. Mim. Doc., WHO/VBC/81.835.
- FINNEY, D.J. - 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 333p.
- GUILLET, P. and ESCAFFRE, H. - 1979. Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l. - II - Efficacité comparée de trois formulations expérimentales. WHO. Mim. Doc., WHO/VBC/79.735.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H. and PRUD'HOM, J.M. - 1982. *Bacillus thuringiensis* H14, a biocontrol agent for onchocerciasis control in West Africa. - Proc. IIIrd Int. coll. Invertebr. Pathol., Brighton, U.K., 460-465.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., PRUD'HOM, J.M. and BAKAYOKO, S. - 1985. Etude des facteurs conditionnant l'efficacité des préparations à base de *Bacillus thuringiensis* H14 vis-à-vis des larves du complexe *Simulium damnosum* (Diptera : simuliidae). - I - Influence de la nature et de la taille des particules. - Entomophaga (submitted for publication).
- MOLLOY, D., GAUGLER, R. and JAMNBACK, H. - 1981. Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of blackfly larvae. J. Econ. Entomol., 74, 61-64.
- MOLLOY, D., WRAIGHT, S.P., KAPLAN, B., GERARDI, J. and PETERSON, P. - 1984. Laboratory evaluation of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against mosquito and blackfly larvae. - J. Agric. Entomol., 1(2), 161-168.
- NICKERSON, K.W. - 1982. Chemistry and toxicity of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal. - Proc. IIIrd Int. coll. Invertebr. Pathol., Brighton, U.K., 444-446.

- PFANNENSTIEL, M.A., ROSS, E.J., KRAMER, V.C. and NICKERSON, K.W. - 1984. Toxicity and composition of protease-inhibited *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals. - FEMS Microbiol. Lett., 21, 39-42.
- SCHNELL, D.J. and NICKERSON, K.W. - 1983. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystals to *Aedes aegypti* larvae : Carbonate reversal. Appl. Environ. Microbiol., 45, 1691-1693.
- TYRELL, D.J., BULLA, L.A. Jr., ANDREWS, R.E., KRAMER, K.J., DAVIDSON, L.I. and NORDIN, P. - 1981. Comparative biochemistry of entomocidal parasporal crystals of selected *Bacillus thuringiensis* strains. - J. Bacteriol., 145, 1052-1062.
- VAJIME, C.G. and DUNBAR, R.W. - 1975. Chromosomal identification of eight species of the subgenus *Edwardsellum* near and including *Simulium* (*Edwardsellum*) *damnosum* Theobald (Diptera : Simuliidae). Tropenmed. Parasit., 26, 1, 111-138.
-

27

EVALUATION DE LA SENSIBILITE DES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*

A LA TOXINE DU *Bacillus thuringiensis* H14

I - METHODOLOGIE.

EVALUATION DE LA SENSIBILITE DES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*

A LA TOXINE DU *Bacillus thuringiensis* H14 - I - METHODOLOGIE*

Pierre GUILLET**

Jean Marc HOUGARD***

Julien DOANNIO***

Henri ESCAFFRE***

Jacques DUVAL***

INTRODUCTION

L'utilisation massive d'insecticides organo-phosphorés dans le cadre du programme OMS de lutte contre l'onchocercose (OCP) en Afrique de l'Ouest a engendré rapidement la sélection de populations résistantes chez deux espèces forestières *Simulium soubrense* et *Simulium sanctipauli* Vajime et Dunbar 1975, du complexe *Simulium damnosum* (GUILLET *et al.*, 1980, KURTAK *et al.*, 1982, GUILLET et KURTAK, 1985). L'ampleur de ce phénomène a pratiquement réduit à néant l'arsenal des insecticides utilisables contre les larves des vecteurs forestiers de l'onchocercose. L'utilisation du *Bacillus thuringiensis* H14 est apparue comme la seule alternative envisageable pour la poursuite des traitements dès qu'une formulation raisonnablement efficace fut sélectionnée (GUILLET *et al.*, 1982, LACEY *et al.*, 1982 a).

La sensibilité des larves de simulies à la toxine du *B. thuringiensis* H14 qui agit exclusivement par ingestion, n'a pu être mise en évidence en utilisant la méthode mise au point par MOUCHET *et al.* (1977) pour les insecticides à action de contact rapide. Cette méthode consiste à exposer les larves pendant 3 h en eau stagnante et dans ces conditions, les larves ne peuvent ingérer les particules en suspension dans l'eau. Une méthodologie nouvelle a donc du être mise au point afin de pouvoir détecter une éventuelle baisse de sensibilité engendrée par l'utilisation massive de cet entomopathogène dans

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

** ORSTOM - SSC - 70 à 74 route d'Aulnay - 93140 BONDY - FRANCE

*** Institut Pierre Richet (IRTO) - BP 1500 - BOUAKE - COTE D'IVOIRE

certaines rivières de l'aire du programme OCP.

Diverses contraintes ont du être prises en compte dans la mise au point de cette méthode :

- pour qu'elles puissent se nourrir, les larves doivent être placées en eau courante ; de plus, les mouvements de l'eau doivent être aussi homogènes que possible à l'intérieur de chaque récipient et d'un récipient à l'autre, pour que les larves se nourrissent de façon uniforme ;

- en tenant compte de l'expérience acquise avec le titrage biologique des préparations à base de *B. thuringiensis* H14, tous les paramètres expérimentaux doivent être rigoureusement standardisés ;

- enfin, cette méthode doit être simple, utilisable sur le terrain et donner des résultats fiables.

Plusieurs méthodes ont déjà été décrites et utilisées en Amérique du Nord pour l'évaluation des préparations de *B. thuringiensis* H14 avec des larves de simulies (COLBO et THOMPSON, 1978, LACEY et MULLA, 1977 a, GAUGLER *et al.*, 1980, HEMBREE *et al.*, 1980). Par la suite, une procédure standard a été proposée afin de pouvoir comparer directement les résultats obtenus par différents auteurs (LACEY *et al.*, 1982 b). La méthode décrite dans le présent travail est une adaptation de cette procédure aux conditions particulières d'utilisation sur le terrain avec des larves du complexe *S. damnosum*.

MATERIELS ET METHODES

Dispositif de mesure de la sensibilité

L'appareil mis au point se compose de deux parties : un caisson isotherme et un couvercle adaptable amovible (photo 1). Le couvercle comporte 12 axes rotatifs munis chacun d'une poulie et entraînés par une courroie solidaire d'un moteur électrique. A chacun des axes est fixé une bouteille plastique (diamètre 7,5 cm, hauteur 15 cm). Le caisson isotherme comporte 12 bechers en Manolène[®] d'une capacité de 1 l (diamètre intérieur 10 cm, hauteur 15 cm). Au moment du test, le couvercle est placé sur le caisson et chaque bouteille plonge au centre d'un becher. L'agitation de l'eau est produite par la rotation des bouteilles. Le couvercle est traversé par 12 tubes rigides par où

est introduite la suspension bactérienne au moment du traitement. Ces tubes débouchent chacun au niveau d'un becher. Le caisson fermé est isotherme et les variations de température à l'intérieur n'excèdent pas 1° C au bout de 3 h pour des variations à l'extérieur de 5° à 10° C. (photo 2)

Préparation des suspensions bactériennes

La plupart des tests ont été réalisés avec l'IPS 80, un standard intérimaire fourni par l'Institut Pasteur de Paris et titrant 15 000 U.I. *Aedes aegypti*/mg par rapport à l'ancien standard IPS 78 (de BARJAC et LARGET, 1981). La pastille de produit lyophilisé (50 mg environ) est pesée puis disposée dans une fiole jaugée complétée à 1 l d'eau distillée. Un barreau magnétique de 7 cm et 40 g environ de billes de verre de 4 mm sont ensuite ajoutés pour obtenir un brassage vigoureux pendant 2 h à l'aide d'un agitateur magnétique à la vitesse maximum de rotation. Cette suspension, ajustée à 50 mg/l, est conservée au réfrigérateur et transportée sur le terrain en glacière. Les dilutions préparées extemporanément ne sont jamais conservées. Quelques tests ont été également réalisés avec une formulation, le Teknar[®] (Sandoz) titrant 1100 U.I./mg (lot 21.731).

Réalisation du test

Les larves prélevées dans les gîtes sur leurs supports naturels sont rapidement triées et introduites dans les bechers contenant 480 ml d'eau distillée ou à défaut d'eau filtrée déchlorée. Lorsque les larves ne sont pas utilisées immédiatement, elles sont conservées dans un linge humide au frais. Le couvercle est ensuite fermé, le moteur mis en marche et l'on introduit immédiatement 10 ml de suspension bactérienne. Le tube d'introduction est ensuite rincé avec 10 ml d'eau distillée, ce qui ramène le volume final d'eau dans les bechers à 500 ml.

Les larves sont maintenues en contact avec la suspension pendant toute la durée du test. Aucune nourriture n'est ajoutée. Pour la lecture, on dénombre les larves vivantes, moribondes et mortes ainsi que les nymphes en commençant d'abord par celles fixées sur les bouteilles puis celles des bechers préalablement vidés de leur eau. Les larves vivantes sont repliées sur elles-mêmes ou se replient au contact de la pince tandis que les larves moribondes ne réagissent que peu ou pas à ce contact. La lecture doit être effectuée rapidement pour éviter le dessèchement des larves. Chaque test (5 concentrations et 2 répliques par con-

centration) est répété au minimum 3 fois. Les mortalités corrigées (formule de Abbott) varient généralement entre 15 et 100 %. Les valeurs caractéristiques sont calculées sur ordinateur (programme analyse-probit, FINNEY, 1971) et l'intervalle de confiance, calculé sur la CL 50, correspond à une probabilité de 95 %. Quand les intervalles de confiance d'une série de tests se chevauchent, les données sont regroupées pour le calcul des valeurs caractéristiques moyennes. Tous les tests ont été réalisés sur le bas Bandama en Côte d'Ivoire, avec des larves de *S. soubrense/sanctipauli*.

Paramètres étudiés

- le temps de contact : 2, 3, 6, 12 et 24 h respectivement à 25° C avec des larves de stade 7 (histoblastes bien développés et longueur moyenne de la postgena 470 μ) ;
- la température : 20°, 25° et 30° C, temps de contact 3 h, larves de stade 7 ;
- le stade larvaire : les larves ont été regroupées par catégories d'âge à partir de critères morphologiques simples (écailles sur la partie dorsale des segments abdominaux et plaques thoraciques, KURTAK, 1980) : stades 3 et 4 (postgena 210 μ), stades 5 et 6 (340 μ) et enfin stade 7, temps de contact 3 h à 25°C ;
- le nombre de larves par becher : respectivement 15, 30, 60 et 120 larves de stade 7, temps de contact 3 h à 25° C ;
- la vitesse de rotation des bouteilles : 120, 130 et 150 tours/mn correspondant au niveau des bouteilles respectivement à 47, 51 et 59 cm/s temps de contact 3 h, 25° C, larves de stade 7 ;
- le temps d'adaptation avant le traitement : la suspension bactérienne est introduite dès la mise en marche du moteur ou 10, 20 et 40 mn plus tard, temps de contact 3 h, 25° C, larves de stade 7.

RESULTATS

Les lignes de régression correspondant aux mortalités obtenues après 3, 6 et 12 h de contact sont parallèles. La pente correspondant à 24 h de contact est plus accentuée, tandis qu'après seulement 2 h de contact elle est beaucoup plus faible (graphique 1). Après 2 h de contact les résultats obtenus sont hétérogènes (plus de 100 % d'imprécision sur la CL 50, χ^2 significatif). La précision du résultat est satisfaisante entre 3 h et 24 h de contact

(10 à 14 % d'imprécision sur CL 50, χ^2 non significatif) et la relation dosage x temps de contact reste constante (tableau 1).

On n'observe aucune différence significative dans les résultats obtenus à 25° et à 30° C (tableau 2). Les CL 50 observées présentent des variations aléatoires de l'ordre de 3 fois (au maximum) qui sont indépendantes de la température. En revanche, à 20° C la CL 50 est 10 fois plus élevée, le χ^2 hautement significatif et la pente de la ligne de régression très faible (graphique 2).

Les larves de stades 3-4 et 5-6 sont respectivement 4 et 2 fois plus sensibles que les larves de stade 7 (tableau 3). C'est avec le dernier stade que l'on obtient la meilleure corrélation dose-mortalité et donc la plus faible marge d'erreur (graphique 3).

Les résultats obtenus avec 15 et 30 larves par becher sont pratiquement identiques (tableau 4). En revanche, avec 60 et 120 larves on note une forte augmentation des CL 50 ainsi qu'une diminution très nette de la pente, la ligne de régression correspondant à 120 larves par becher étant pratiquement plate (graphique 4).

La vitesse de rotation entre 120 et 150 tours/mn n'influe pas sur le résultat (tableau 5). La vitesse de 150 tours/mn a été adoptée.

Seule l'introduction immédiate de la suspension bactérienne dès la mise en marche du moteur permet d'obtenir des résultats satisfaisants. Au-delà de 10 mn, on observe une grande hétérogénéité des résultats ainsi qu'une augmentation des valeurs caractéristiques (de 3 à 5 fois au niveau de la CL 95) (tableau 6). Ce phénomène s'observe également avec d'autres espèces comme *S. har- greavesi* ainsi qu'avec une suspension bactérienne différente (Teknar au lieu de IPS 80).

DISCUSSION - CONCLUSION

Cette série d'expérimentations a été faite afin de mettre au point une méthode simple et fiable pour réaliser sur le terrain des tests de

sensibilité des larves du complexe *S. damnosum* à la toxine du *B. thuringiensis* H14. L'influence d'un certain nombre de paramètres expérimentaux a du être étudiée systématiquement en vue de proposer un protocole d'évaluation standardisé.

Le temps de contact minimal pour obtenir des résultats satisfaisants est de 3 h. C'est également la durée retenue par MOUCHET *et al.* (*loc. cit.*) pour les insecticides de contact. Un contact de 24 h serait théoriquement préférable, mais il présente deux inconvénients : d'une part il est difficile d'obtenir sur le terrain une alimentation électrique continue, et d'autre part, la proportion de nymphoses (lorsqu'on utilise des larves de stade 7) qui ne dépasse pas généralement 5 % après 3 h, atteint 20 à 30 % après 24 h. Comme cela est démontré ultérieurement, la solution ne réside pas dans l'utilisation de larves plus jeunes. Entre 3, 6 et 12 h de temps de contact, il s'est avéré préférable pour des raisons pratiques, d'opter pour un temps de 3 h. La proportionnalité entre le temps de contact et la mortalité est comparable à ce qui est observé avec les insecticides chimiques conventionnels (MOUCHET *et al.*, *loc. cit.*) pour lesquels un temps de contact de 3 h donne également entière satisfaction. FROMMER *et al.* (1980) démontre au contraire, qu'au-delà de 60 mn de contact, la mortalité des larves de *S. vittatum* (lue après 24 h de mise en observation) n'augmente plus significativement.

Le nombre de larves utilisées doit être constant. Toutefois, ce qu'il importe de respecter, c'est le rapport entre le nombre de larves et le volume de la suspension. Avec 8 ou 4 ml d'eau par larve correspondant respectivement à 60 et 120 larves par becher, il est probable que toute la fraction accessible de la toxine soit ingérée par les larves, de ce fait, la mortalité n'augmente plus proportionnellement à la concentration (pente très faible des lignes de régression obtenues). Ce phénomène ne se produit plus avec 30 larves par becher et c'est ce nombre qui a été retenu.

La température entre 25° et 30° C, qui correspond à celle généralement observée dans les gîtes larvaires (OCRAN *et al.*, 1982) n'influe pas significativement sur la sensibilité des larves au *B. thuringiensis* H14. Les variations observées dans les CL 50 dépendent plutôt de la variabilité naturelle de la réponse à la toxine du *B. thuringiensis* H14 des larves collectées sur le terrain. Il en est de même chez les larves d'*A. aegypti* pour une gamme de températures comprises entre 19° et 33° C (SINEGRE *et al.*, 1980).

En revanche, lorsque les larves sont placées dans des conditions de température inférieures à celles dans lesquelles elles se développent normalement, leur activité trophique est ralentie, ce qui entraîne une moindre ingestion de la toxine et donc une mortalité plus faible. Dans le cas des larves du complexe *S. damnosum* testées à 20° C, la brusque variation de température explique également en partie les résultats observés. Les auteurs travaillant avec des larves se développant en eaux plus froides notent généralement une nette corrélation entre la température et la mortalité (MOLLOY *et al.*, 1981, LACEY et MULLA, 1977 b, LACOURSIERE *et al.*, 1982). Il en est de même avec les larves de moustiques (WRAIGHT *et al.*, 1981). Toutefois, il n'a pas encore été démontré si la température agissait sur le rythme d'ingestion des particules par les larves et/ou sur leur sensibilité intrinsèque à la toxine.

Les larves jeunes sont plus sensibles que les larves âgées. Ce phénomène a déjà été observé chez les larves de simulies (GUILLET et de BARJAC, 1979, MOLLOY *et al.*, *loc. cit.*) ou de moustiques (WRAIGHT *et al.*, *loc. cit.*). Il en est de même pour la plupart des insecticides chimiques, même si dans le cas des larves du complexe *S. damnosum*, les différences observées avec le téméphos sont plus fortes qu'avec le *B. thuringiensis* H14. Aucun critère morphologique acceptable ne permet de différencier les stades larvaires 3, 4, 5 et 6. Seul le stade 7 peut être identifié avec certitude, ce qui explique que son utilisation entraîne un gain de précision dans les résultats obtenus. Le stade pharate qui précède la nymphose et au cours duquel les larves de moustiques cessent de s'alimenter, semble à peu près inexistant chez les larves du complexe *S. damnosum**. Les larves de stade 7 ont donc été retenues.

Le temps d'adaptation joue incontestablement un rôle important. Ce phénomène, qui avant d'être mis en évidence, avait conduit au rejet de nombreuses séries de tests, pourrait éventuellement être évité en ajoutant de la nourriture dans l'eau. Toutefois, l'apport de nourriture est difficile à standardiser et, en interférant avec le comportement trophique des larves (GAUGLER et MOLLOY, 1980), il peut modifier le résultat des tests. Les bons résultats obtenus sans temps d'adaptation ont permis de résoudre ce problème.

* L'utilisation d'une poudre fluorescente a permis de démontrer que la proportion de larves de stade 7 à ébauches branchiales noires qui ne se nourrissent pas est toujours très faible et comparable à celle observée chez les autres stades larvaires (GUILLET, non publié).

La stabilité des standards conservés en réfrigérateur est suffisante pour qu'ils puissent servir de nombreuses années comme produit de référence pour les tests de sensibilité au *B. thuringiensis* H14 (de BARJAC et LARGET-THIERRY, 1984).

Les conditions expérimentales peuvent se résumer ainsi :

Temps d'acclimatation :	néant.
Temps de contact :	3 h.
Stade larvaire :	7.
Température :	25° C.
Vitesse de rotation :	150 trs/mn.
Eau :	distillée, permutée ou filtrée.
Nourriture :	néant.
Suspension bactérienne :	IPS 80.

Cette méthode, en tant que test de sensibilité, doit permettre de définir aussi précisément que possible, le ou les critères qui aideront à mettre en évidence le développement éventuel d'un mécanisme de résistance. Ces critères peuvent être : la CL 50, la CL 95, la pente de la droite (ou le rapport CL 95/CL 50) et enfin, la limite supérieure de la CL 100. La valeur relative de chacune de ces valeurs caractéristiques dépend de la nature du ou des mécanismes de résistance. Il n'est actuellement pas possible de prédire lequel serait le plus significatif dans le cas du *B. thuringiensis* H14. La CL 100 représente une valeur importante dans le cas des insecticides chimiques conventionnels. La matière active, une fois dissoute, affecte également toutes les larves d'un lot traité par une action de contact. Au contraire, la toxine du *B. thuringiensis* H14 est insoluble (donc particulaire) et n'agit que par ingestion. Sa répartition dans les différents lots traités ne peut pas être parfaitement homogène, surtout si les cristaux sont agglomérés ou s'ils ont tendance, une fois individualisés, à adhérer aux parois des récipients. De plus, seules les larves qui se nourrissent activement au cours du test peuvent être affectées par la toxine. Il est fréquent d'obtenir 2 à 3 % de larves qui ne se nourrissent pas et survivent après 24 h de contact (*A. aegypti*) tout aussi bien que 3 h (*S. damnosum s.l.*) à des concentrations 2 à 8 fois supérieures à la CL 100 généralement enregistrée. La limite supérieure de la CL 100 du *B. thuringiensis* H14 est donc une valeur variable et peu précise. Elle ne devra

par conséquent pas être retenue comme un critère fiable pour la mise en évidence d'une éventuelle baisse de sensibilité à la toxine. En revanche, la CL 50 et surtout la CL 95, ainsi que la pente de la ligne de régression sont définies avec une relative précision. Leur suivi et la comparaison avec les données obtenues avant le traitement devraient permettre de mettre en évidence cette éventuelle baisse de sensibilité qui se traduira vraisemblablement par un déplacement de la ligne de régression vers les forts dosages et/ou une augmentation significative de la pente.

La possibilité de définir une dose diagnostique, ainsi que l'étude de la sensibilité relative des différents groupes d'espèces du complexe *S. damnosum* feront l'objet de la deuxième partie de ce travail.

RESUME

Une méthode est proposée pour évaluer la sensibilité des larves du complexe *S. damnosum* à la toxine du *B. thuringiensis* H14. Cette méthode, basée sur un temps de contact de 3 h, est simple, applicable sur le terrain et donne des résultats fiables. Son utilisation permettra la mise en évidence d'un phénomène de résistance à la toxine, dans l'hypothèse où une telle résistance pourrait se développer par suite de l'utilisation massive du *B. thuringiensis* H14 dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose.

Mots clés: *B. thuringiensis* H14, complexe *S. damnosum*, résistance, méthodologie.

SUMMARY

A method for testing susceptibility of the *Simulium damnosum* complex larvae to the *B. thuringiensis* serotype H14 toxin. I - Methodology

The basic requirement for this study was to propose to the Onchocerciasis Control Programme, which is massively using *B. thuringiensis* H14, a simple method than can be applied in the field and which produces reliable results for the detection of an eventual resistance of the *S. damnosum* complex larvae to the *B. thuringiensis* H14 toxin. A method which fullfills these requirements was adapted from the standard procedure proposed by LACEY *et al.*, 1982.

The influence of several experimental parameters was systematically investigated in order to define a standard protocole :

- Exposure period : the mortality was assessed after 3, 6, 12 and 24 h. The corresponding dose/mortality lines were almost parallel and the ratios exposure period/LC 50 constant just as LC 50 95 % confidence limits. For practical reasons, a 3 h exposure period was selected. No food was added.
- Water temperature : the LC 50 observed at 25° C and 30° C, which correspond to the water temperature in the larval breeding sites, were obviously the same. At 20° C, results were erratic and LC 50 much higher. 25° C was selected as a temperature easy to maintain in the field.
- Larval instar : the 3-4th and 5-6th instars were respectively 4 to 2 times more susceptible than the 7th instar. The ultimate larval instar, which is the only one that can be precisely identified, produces the most accurate data and was consequently selected.
- Number of larvae per beaker : with 15 and 30 larvae per beaker (500 ml) results were almost identical and satisfactory. With 60 and 120 larvae, the LC 50 values increased respectively 20 and 150 times and the slope of the regression lines decreased sharply. 30 was the selected number.
- Pre-exposure acclimatation period : the best results were obtained without any acclimatation period. With 10 mn only or more, heterogeneous results were systematically obtained with significant increase in the LC 50 and LC 95 values. No explanation was provided for such a phenomenon.
- Bacterial suspension : IPS 80, an interim standard was used. Dosages are expressed in mg/l only.

Key words : *B. thuringiensis* H14, *S. damnosum* complex larvae, susceptibility testing, methodology.

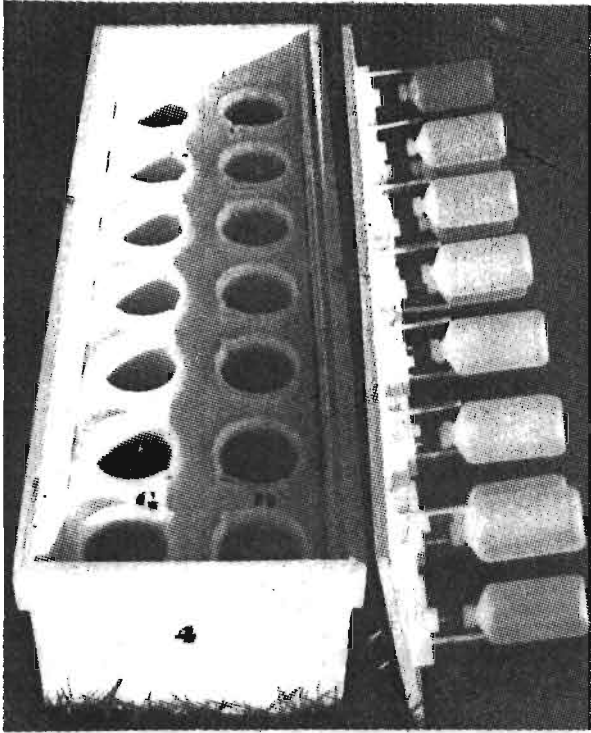


Photo 1 -
Dispositif d'agitateurs ouvert.

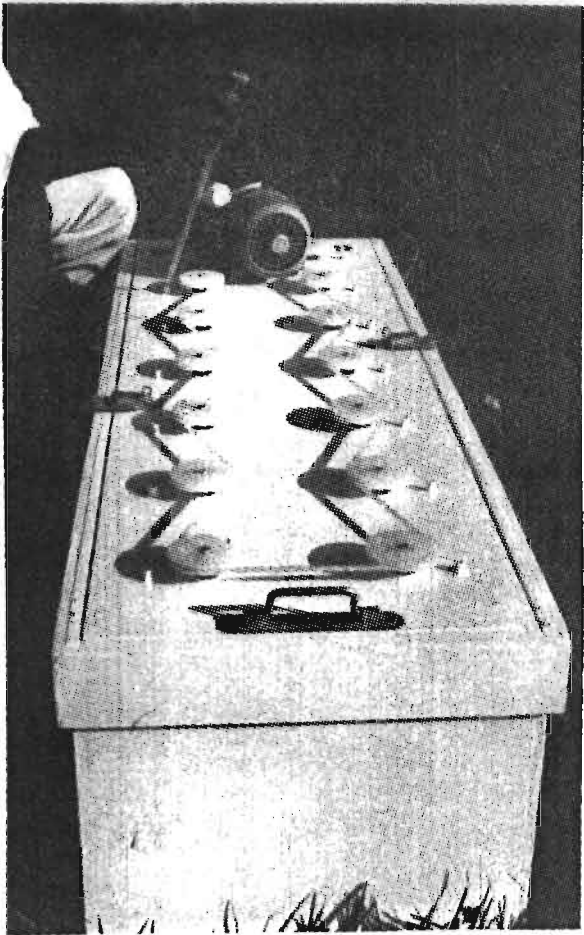


Photo 2 -
Dispositif d'agitateurs fermé.

Temps de contact	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	X ²
2 h	81	40 - 162	102,0	--	0,94	S
3 h	33	29 - 37	13,8	230	1,9	NS
6 h	19	17 - 21	11,7	160	1,8	NS
12 h	11	10 - 13	10,0	78	1,9	NS
24 h	8	7 - 9	14,3	22	3,7	NS

Tableau 1 - Influence du temps de contact.
(température 25° C, stade larvaire 7, IPS 80)

Température	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	X ²
20° C	180	41 - 780	336,0	6300	1,1	S
25° C	21	18 - 23	16,7	180	1,7	NS
30° C	21	17 - 23	17,7	170	1,8	NS

Tableau 2 - Influence de la température.
(temps de contact 3 h, stade larvaire 7, IPS 80)

Stade larvaire	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	X ²
3 et 4	12	10 - 14	20,0	250	1,2	NS
5 et 6	28	22 - 36	27,7	400	1,4	S
7	40	35 - 46	14,3	450	1,6	NS

Tableau 3 - Influence du stade larvaire utilisé.
(temps de contact 3 h, température 25° C, IPS 80)

Nombre de larves par becher	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	X ²
15	23	19 - 28	21	320	1,4	NS
30	28	25 - 32	12	250	1,7	NS
60	150	100 - 220	44,2	16 920	0,8	NS
120	4 120	710 - 23900	480,0	42 500	0,4	NS

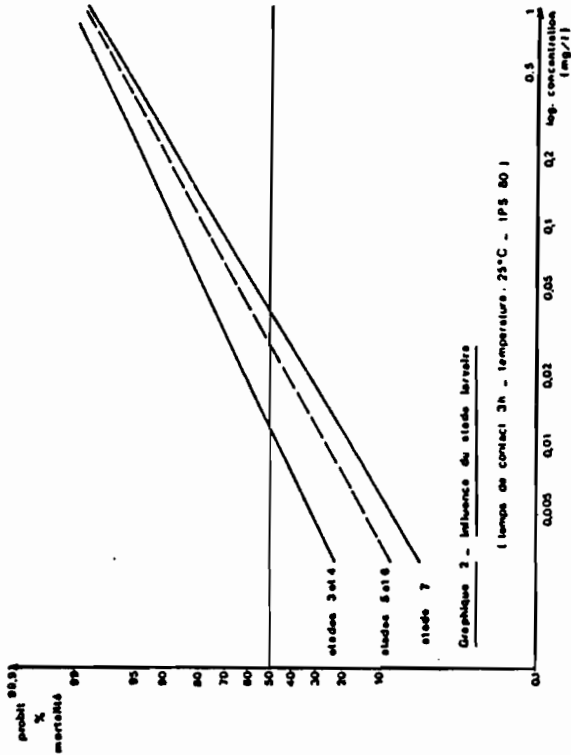
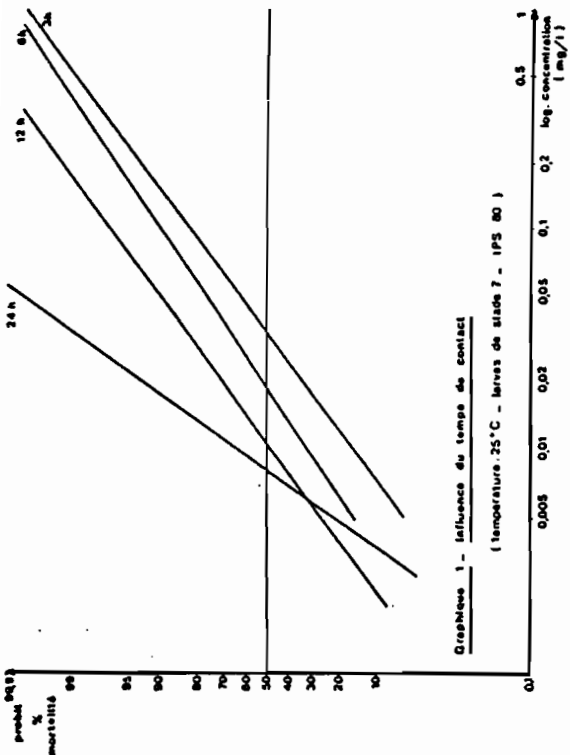
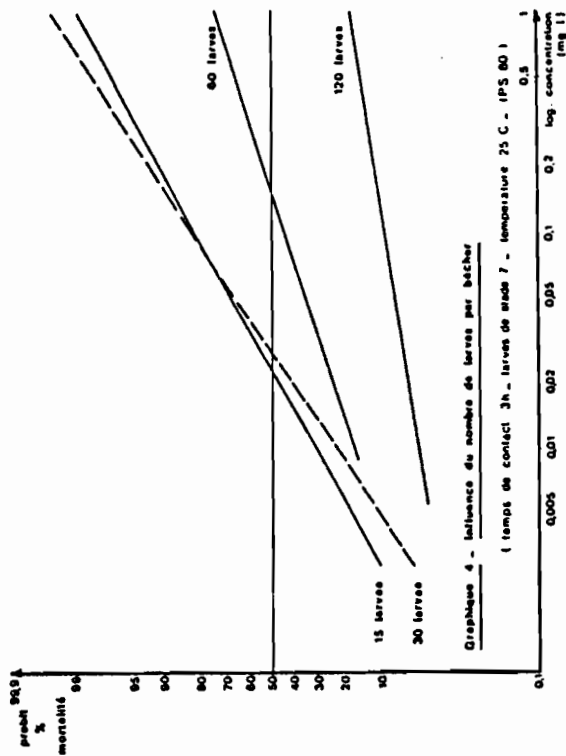
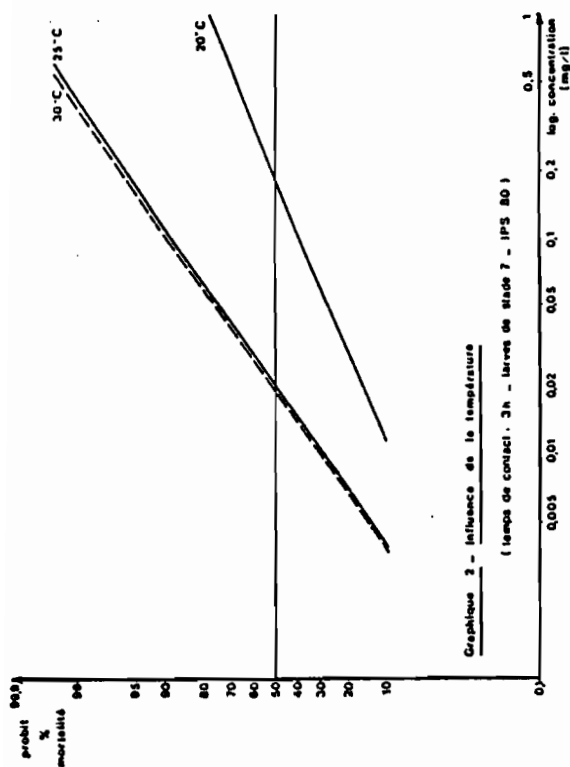
Tableau 4 - Influence du nombre de larves par becher.
(temps de contact 3 h, température 25° C, stade larvaire 7, IPS 80)

Vitesse de rotation	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	X ²
120 trs/mn	32	24 - 42	33,3	258	1,7	S
130 trs/mn	28	25 - 31	12,0	250	1,7	NS
150 trs/mn	28	24 - 32	14,2	210	1,7	NS

Tableau 5 - Influence de la vitesse de rotation des bouteilles.
(temps de contact 3 h, température 25° C, stade larvaire 7, IPS 80)

Temps d'adaptation	CL50x10 ⁻³ mg/l	Intervalle de confiance*	Imprécision %	CL95x10 ⁻³ mg/l	Pente	X ²
0 mn	36	31 - 41	13,7	337	1,7	NS
10 mn	63	48 - 82	31,2	879	1,4	S
20 mn	49	30 - 81	63,3	1 763	1,1	S
40 mn	85	73 - 98	15,4	932	1,6	NS

Tableau 6 - Influence du temps d'adaptation avant traitement.
(temps de contact 3 h, température 25° C, stade larvaire 7, Tekmar lot 21.731)



Influence de quatre paramètres (température, temps de contact, nombre de larves par becher et stade larvaire) sur le résultat des tests de sensibilité de larves du complexe *S. damnosum* à la toxine du *B. thuringiensis* H14 (IPS 80, Institut Pasteur, Paris).

BIBLIOGRAPHIE

- de BARJAC, H. et LARGET, I. - 1981. Properties of the interim standard IPS 78 and proposal of a new reference preparation IPS 80 for the establishment of an international standard. Doc. Mim. OMS, TDR/BCV/IC.81.1/WP.5, (non publié).
- de BARJAC, H. et LARGET-THIERRY, I. - 1984. Characterization of IPS 82 as a standard for bioassays of *Bacillus thuringiensis* H14 preparations. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/84.892.
- COLBO, M.H. et THOMPSON, B.H. - 1978. An efficient technique for laboratory rearing of *Simulium verecundum* S & J (Diptera : Simuliidae). Can. J. Zool., 56, 507-510.
- FINNEY, D.J. - 1971. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 333p.
- FROMMER, R.L., HEMBREE, S.C., NELSON, J.H., REMINGTON, M. et GIBBS, P.H. - 1980. The susceptibility of *Simulium vittatum* larvae (Diptera : Simuliidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in the laboratory. Mosq. News, 41, 339-347.
- GAUGLER, R. et MOLLOY, D. - 1980. Feeding inhibition in black fly larvae (Diptera : Simuliidae) and its effects on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. Environ. Entomol., 9, 704-708.
- GAUGLER, R., MOLLOY, D., HASKINS, T. et RIDER, G. - 1980. A bioassay system for the evaluation of black fly (Diptera : Simuliidae) control agent under simulated stream conditions. Can. Entomol., 112, 1271-1276.
- GUILLET, P. et de BARJAC, H. - 1979. Toxicité de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* pour les larves de simulies vectrices de l'onchocercose. C.R. Acad. Sc. Paris, 289, D., 549-552.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., OUEDRAOGO, M. et QUILLEVERE, D. - 1980. Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire. (Zone du programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta). Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XVIII (3), 291-299.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H. et PRUD'HOM, J.M. - 1982. L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. - I - Efficacité et modalités d'application. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XX (3), 175-180.
- GUILLET, P. et KURTAK, D.C. - 1985. Cross-resistance to chlorpyrifos-methyl and pirimiphos-methyl in the larval populations of the *Simulium damnosum* complex already resistant to temephos in West Africa and its operational significance. Soumis pour publication à Tropenmed. Parasitol.
- HEMBREE, S.C., FROMMER, R.L. et REMINGTON, M.P. - 1980. A bioassay apparatus for evaluating larvicides against black flies. Mosq. News, 40, 647-650.

- KURTAK, D.C. - 1980. Notes on the selection of larvae of *Simulium damnosum* s.l. for insecticide susceptibility tests with particular reference to the cytospecies *Simulium soubrense* and *Simulium squamosum*. WHO unpublished document.
- KURTAK, D.C., OUEDRAOGO, M., OCRAN, M., BARRO TELE et GUILLET, P. - 1982. Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae already resistant to temephos (Abate). Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/82.850.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1977 a. A new bioassay unit for evaluating larvicides against blackflies. J. Econ. Entomol., 70, 453-456.
- LACEY, L.A. et MULLA, M.S. - 1977 b. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* as a biocide of blackfly larvae (Diptera : Simuliidae) J. Invertebr. Pathol., 30, 46-49.
- LACEY, L.A., ESCAFFRE, H., PHILIPPON, B., SEKETELI, A. et GUILLET, P. - 1982 a. Large river treatment with *Bacillus thuringiensis* H14 for the control of *Simulium damnosum* s.l. in the onchocerciasis control programme. Tropenmed. Parasitol., 33, 97-101.
- LACEY, L.A., UNDEEN, A.H. et CHANCE, M.M. - 1982 b. Laboratory procedures for the bioassay and comparative efficacy evaluation of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (serotype 14) against black flies (Simuliidae). Miscell. Publ. Ent. Soc. Amer., 12 (4), 19-23.
- LACOURSIERE, J., BOISVERT, J. et CHARPENTIER, G. - 1982. Pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* serovar. *israelensis* against black fly larvae (Diptera : Simuliidae). Abst. IIIrd Int. coll. Invertebr. Pathol., Brighton, U.K., 58.
- MOLLOY, D., GAUGLER, R. et JAMNBACK; H. - 1981. Factors influencing efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* as a biological control agent of black fly larvae. J. Econ. Entomol., 74, 61-64.
- MOUCHET, J., QUELENNEC, G., BERL, D., SECHAN, Y. et GREBAUT, S. - 1976. Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de *Simulium damnosum* s.l. Cah. ORSTOM, sér. Ent. méd. et Parasitol., XV (1), 55-66.
- OCRAN, M., et al. - 1982. Water temperatures in *Simulium damnosum* breeding rivers of the onchocerciasis control programme area. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/82.848.
- SINEGRE, G., GAVEN, B. et VIGO, G. - 1980. Contribution à la normalisation des épreuves de laboratoire concernant des formulations expérimentales et commerciales du sérotype H14 de *Bacillus thuringiensis*. - II - Influence de la température, du chlore résiduel, du pH et de la profondeur de l'eau sur l'activité biologique d'une poudre primaire. Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/80.770.
- WRAIGHT, S.P., MOLLOY, D., JAMNBACK, H. et Mc COY, P. - 1981. Effect of temperature and instar on the efficacy of *Bacillus thuringiensis israelensis* and *Bacillus sphaericus* strain 1593 against *Aedes stimulans* larvae. J. Invertebr. Pathol., 38, 78-87.
-

EVALUATION DE LA SENSIBILITE DES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*

A LA TOXINE DU *Bacillus thuringiensis* H14

II - SENSIBILITE RELATIVE DE QUELQUES GROUPES D'ESPECES

ET POSSIBILITES D'UTILISATION DE DOSES DIAGNOSTIQUES.

EVALUATION DE LA SENSIBILITE DES LARVES DU COMPLEXE *Simulium damnosum*
A LA TOXINE DU *Bacillus thuringiensis* H14.

II - SENSIBILITE RELATIVE DE QUELQUES GROUPES D'ESPECES ET
POSSIBILITES D'UTILISATION DE DOSES DIAGNOSTIQUES.*

Pierre GUILLET **

Jean Marc HOUGARD **

Julien DOANNIO **

Henri ESCAFFRE **

Jacques DUVAL **

INTRODUCTION

Une méthodologie a été proposée pour tester la sensibilité des larves de simulies à la δ -endotoxine du *Bacillus thuringiensis* H14 (GUILLET *et al.*, 1985). Elle a été conçue pour être utilisée sur le terrain avec des larves des simulies vectrices de l'onchocercose en Afrique de l'Ouest appartenant au complexe *Simulium damnosum*. En tenant compte de la nature complexe des polypeptides qui constituent la toxine du *B. thuringiensis* H14 et de leur mode d'action, les chances de voir se développer une résistance devraient être plus limitées que dans le cas des insecticides conventionnels tels que les organophosphorés. Toutefois, ce risque ne peut pas être négligé. En effet, le *B. thuringiensis* H14 a été utilisé à grande échelle depuis 1982 dans le cadre du vaste Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la Région du Bassin de la Volta pour détruire les populations larvaires des espèces du complexe *S. damnosum* résistantes aux insecticides organophosphorés.

Cette méthodologie a été standardisée pour que les résultats obtenus soient reproductibles. Par la suite, une enquête a été réalisée pour mesurer la sensibilité à la toxine de quelques populations de *S. damnosum s.l.*

* Ce travail a bénéficié d'une subvention de l'Organisation mondiale de la Santé.

** Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et l'Onchocercose
BP 1500 - BOUAKE - Côte d'Ivoire.

Les données obtenues avant l'emploi systématique du produit servent à définir la sensibilité de base de populations composées de différentes espèces du complexe *S. damnosum*, et ultérieurement, à déterminer leur éventuelle diminution de sensibilité.

L'exécution de tests de sensibilité dans les zones traitées est souvent impossible car le nombre de larves disponibles est généralement insuffisant. L'interruption momentanée des traitements, qui permettrait aux populations larvaires de se reconstituer, doit être évitée dans toute la mesure du possible car elle risque d'engendrer une reprise de la transmission dans les zones normalement protégées. Dans ce cas, on se limite à tester les populations vis-à-vis d'une seule dose diagnostique qui permet de déterminer si une fraction appréciable de la population n'a plus une sensibilité normale.

Des doses diagnostiques (ou doses discriminatives) ont été proposées pour détecter la résistance aux insecticides organophosphorés chez les larves d'*Aedes aegypti* (MOUCHET *et al.*, 1972, COOSEMANS *et al.*, 1977). Ces doses sont d'environ 10 fois la valeur de la CL 50 moyenne avec les pentes des lignes de régression dose-mortalité (rapports CL 95/CL 50) allant de 1,7 à 2. Ces doses ont été établies à partir des valeurs obtenues sur 170 à 200 souches.

Des doses diagnostiques pour le téméphos ont également été proposées dans le cas des larves du complexe *S. damnosum* (MOUCHET *et al.*, 1977). Les données disponibles étaient alors beaucoup plus limitées, mais compte tenu de l'expérience acquise avec les larves d'*A. aegypti*, ces auteurs ont également fixé la dose diagnostique à 10 fois la valeur de la CL 50 moyenne. Les travaux exécutés ultérieurement, lors de l'apparition de populations résistantes, ont confirmé la validité de ces doses discriminatives (GUILLET *et al.*, 1980).

Les données obtenues avec la toxine du *B. thuringiensis* H14 sur quatre populations de différentes espèces du complexe *S. damnosum* ont

été comparées à celles obtenues avec le ténéphos (Abate[®]) (GREBAUT et GUILLET, 1977). Cette comparaison a été établie pour voir s'il était possible de recommander, comme pour le ténéphos, l'emploi de doses diagnostiques dans le suivi de la sensibilité des larves du complexe *S. damnosum* à la toxine du *B. thuringiensis* H14.

MATERIEL ET METHODES

Les tests ont été réalisés conformément à la méthodologie proposée dans la première partie de ce travail (GUILLET *et al.*, 1985 *loc. cit.*). La préparation bactérienne utilisée a été l'IPS 80, un standard international intérimaire du *B. thuringiensis* H14 (de BARJAC et LARGET, 1981).

Les tests ont été réalisés dans quatre localités d'Afrique de l'Ouest sur différentes espèces du complexe *S. damnosum* Vajime et Dunbar 1975 :

- Manantali (Mali) sur le Baffing, en zone de savane soudanienne avec des larves de *S. dieguerense* et *S. squamosum*,
- N'Golodougou (Côte d'Ivoire) sur la Bagbé, en zone de savane guinéenne, sur une population larvaire composée en majorité de *S. soubrense* et *S. damnosum s.s.*,
- Chutes Gauthier (Côte d'Ivoire) sur le Bandama, en zone de forêt dégradée, avec des larves de *S. soubrense* et *S. sanctipauli*,
- Akakro (Côte d'Ivoire) sur le M'Pedo, en zone de forêt dense, avec des larves de *S. yahense*.

Aux chutes Gauthier, 17 tests successifs ont été réalisés (un test comporte 5 concentrations et 2 répétitions), répartis en 4 séries d'expérimentations. Ailleurs, 3 à 5 tests ont été réalisés. Pour chaque série d'essais, les résultats ont été regroupés par concentration afin de pouvoir calculer les valeurs caractéristiques moyennes à l'aide d'un programme d'analyse probit (FINNEY, 1971). L'intervalle de confiance est donné au seuil de 95 %.

Les résultats de l'ensemble des tests (29 au total) ont été regroupés et comparés aux résultats obtenus par la méthode Mouchet (MOUCHET *et al.*, 1977 *loc. cit.*) avec le téméphos dans plusieurs localités de savane de l'Afrique de l'Ouest (20 au total) (GREBAUT et GUILLET, *loc. cit.*). Un coefficient de variation des valeurs caractéristiques a été calculé :

$$\text{Coeff. variation} = 100 \times \text{Ecart-type} / \text{Moyenne}$$

RESULTATS

On a observé d'une localité à l'autre des différences significatives de sensibilité. Toutefois, les écarts observés n'ont pas excédé 3 fois (tableau 1). L'écart entre les valeurs extrêmes des CL 50 prises dans leur ensemble a été de 4,2 fois (0,014 à 0,059 mg/l) de même que pour les CL 95 (0,14 à 0,59 mg/l) (tableau 1). La population larvaire aux Chutes Gauthier était légèrement plus sensible à la toxine du *B. thuringiensis* H14 que les trois autres populations testées. Toutefois, si l'on tient compte de la variabilité des résultats des différents tests pour chaque population, la différence entre les populations est minime et à peine significative au seuil de 5 %.

Les résultats ont présenté de nombreuses similitudes avec ceux obtenus pour le téméphos : mêmes CL 50 moyennes, coefficients de variation voisins (légèrement plus forts pour le téméphos) et des écarts entre les CL 50 et CL 95 maxima et minima identiques. La seule différence a résidé dans la pente des lignes de régression dose/mortalité qui est presque deux fois plus faible dans le cas du *B. thuringiensis* H14 (tableau 2).

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les populations larvaires de *S. soubrense* et *S. sanctipauli* en zone de forêt sont 1,5 à 2 fois plus sensibles à la toxine du *B. thuringiensis* H14 que les autres populations testées.

On a pu noter un degré de similitude élevé entre les résultats obtenus sur les larves du complexe *S. damnosum* par deux méthodes différentes avec un insecticide chimique d'une part et un insecticide biologique d'autre part. Cette similitude n'est toutefois pas surprenante, dans la mesure où il s'agit dans les deux cas d'insecticides, même s'ils n'ont pas la même origine. La concordance observée dans les valeurs des CL 50 est une coïncidence. Ce parallèle permet de recommander pour le *B. thuringiensis* H14 comme pour le téméphos l'emploi de doses diagnostiques. Pour le téméphos, leur utilisation a donné entière satisfaction et a permis de détecter rapidement la résistance lorsque celle-ci est apparue (GUILLET *et al.*, 1980 *loc. cit.*). Pour la toxine du *B. thuringiensis* H14, du fait que la pente des lignes de régression est plus faible (2 fois), cette dose doit être fixée à 20 fois la valeur de la CL 50 moyenne. Dans le cas de l'IPS 80, elle serait de 0,6 mg/l mais peut être ramenée à 0,5 mg/l, ce qui représente encore 2 fois la valeur de la CL 95 moyenne. Si plus de 5 % des larves survivent à 0,5 mg/l, des tests complets doivent être pratiqués.

L'interprétation des tests de sensibilité à la toxine du *B. thuringiensis* H14 doit être conduite avec prudence. En effet, contrairement au téméphos qui dans le cas des tests de sensibilité agit par contact, la toxine n'agit que par ingestion. Ceci suppose que toutes les larves au moment du test aient un comportement trophique normal et ce n'est pas toujours facile à obtenir. Ainsi la CL 100 est-elle relativement variable, et l'interprétation des tests devra se faire surtout sur les CL 50 et CL 95, ainsi que sur la pente des lignes de régression. L'emploi d'une dose diagnostique de 20 fois environ la CL 50 laisse une marge de sécurité acceptable.

Dans le cas du téméphos, un coefficient de résistance (R/S) de 2 fois au niveau de la CL 50 et 5 fois pour la CL 95 a été observé très rapidement après l'apparition de survivants aux doses diagnostiques et a entraîné un échec complet des traitements opérationnels (GUILLET *et al.*, 1980 *loc. cit.*). Pour la plupart des traitements insecticides, c'est en présence d'un coefficient de résistance nettement plus élevé qu'on constate un tel phénomène. Dans les traitements antisimuldiens, la concentration est ajustée de façon très précise pour éviter les surdosages onéreux et dangereux pour l'environnement. Concernant le *B. thuringiensis* H14, l'efficacité limitée des formulations actuellement disponibles conduit à utiliser

ce produit à la limite de la CL 100, sans aucune marge de sécurité. Un sous-dosage accidentel ou une légère baisse de sensibilité se traduiraient immédiatement par un échec partiel des traitements. Cette particularité propre aux traitements antisimulidiens souligne la nécessité de surveiller constamment et très précisément la sensibilité des populations régulièrement traitées, notamment avec le *B. thuringiensis* H14, et de ne pas conclure à la résistance sans avoir réalisé plusieurs tests complets.

En tenant compte de l'expérience acquise dans la détection et le suivi de la résistance aux insecticides organophosphorés, et du fait que le résultat des tests de sensibilité à la toxine du *B. thuringiensis* H14 ne sont pas plus variables que ceux obtenus avec le téméphos, il devrait être possible de mettre rapidement en évidence une baisse de sensibilité à la toxine chez les larves du complexe *S. damnosum* si celle-ci survenait.

SUMMARY

The susceptibility of four larval populations belonging to the *Simulium damnosum* complex was tested, both in savannah and forest areas. The differences observed between mean LC 50 values of different populations did not exceed 3 times and 4 times between extreme LC 50's within populations.

These results were compared with those obtained with temephos in 3 hours susceptibility tests and turned out to be comparable except the mean slope of regression lines which was 2 times lower with *Bacillus thuringiensis* H14 than with temephos. The use of diagnostic doses was recommended. It was fixed at 0.5 mg/l during 3 hours that is to say 20 times the mean value of the overall LC 50's.

KEY WORDS : *B. thuringiensis* H14, blackflies, susceptibility, diagnostic dose.

RESUME

La sensibilité à la toxine du *Bacillus thuringiensis* H14 de quatre populations larvaires du complexe *Simulium damnosum* a été testée. L'écart observé entre les populations ne dépasse pas 3 fois au niveau de la CL 50 ; il atteint 4 fois pour les valeurs extrêmes au sein d'une même population. L'emploi d'une dose diagnostique a été préconisé. La valeur de cette dose a été fixée à 20 fois la valeur moyenne des CL 50 obtenues sur l'ensemble des populations, soit 0,5 mg/l pendant 3 heures.

MOTS CLES : *B. thuringiensis* H14, simuliés, sensibilité, dose diagnostique.

Localité	Date	Espèces dominantes	Valeurs moyennes (mg/l)		Valeurs extrêmes (mg/l)	
			CL 50 x 10 ⁻²	CL 95 x 10 ⁻²	CL 50 x 10 ⁻²	CL 95 x 10 ⁻²
Manantali (Mali)	01/83	<i>S. dieguerense</i> <i>S. squamosum</i> (savane)	4,9 (4,4 - 5,4)	25	4,1 - 5,0 (min. max.)	19 - 34
N'Golodougou (Côte d'Ivoire)	04/83	<i>S. soubrense</i> <i>S. damnosum</i> s.s. (savane)	5,8 (5,1 - 6,5)	31	5,6 - 5,9	25 - 39
Akakro (Côte d'Ivoire)	11/82	<i>S. yahense</i> (forêt)	4,7 (4,1 - 5,2)	34	3,6 - 5,9	31 - 39
Chutes Gauthier (Côte d'Ivoire)	08/82	<i>S. soubrense</i> <i>S. sanctipauli</i> (forêt)	3,6 (3,1 - 4,1)	21	3,2 - 4,5	17 - 36
	12/82		2,0 (1,8 - 2,3)	17	1,4 - 2,7	14 - 21
	02/83		2,8 (2,5 - 3,2)	24	2,7 - 3,1	19 - 39
	03/83		3,9 (3,3 - 4,6)	36	3,1 - 5,1	26 - 59

Tableau 1 - Résultats des tests de sensibilité à la toxine du *Bacillus thuringiensis* H14 de différentes populations larvaires du complexe *Simulium damnosum*. (larves de stades 6 et 7, contact 3 h, Température 25° C, IPS 80)

	témépos				<i>B. thuringiensis</i> H14			
	Moy.	Maxi.	Mini.	Ecart	Moy.	Maxi.	Mini.	Ecart
CL 50 (mg/l)	0,031	0,072	0,017	4,2	0,031	0,059	0,014	4,2
Coeff. variation	13,4%				11,6%			
CL 95 (mg/l)	0,13	0,23	0,068	3,4	0,25	0,59	0,17	3,5
Coeff. variation	19,2%				13,5%			
CL 95/CL 50	4,2				8,1			
Dose diagnostique proposée (mg/l)	0,25				0,5			

Tableau 2 - Comparaison des résultats des tests de sensibilité à la toxine du *Bacillus thuringiensis* H14 et au témépos.

B. thuringiensis H14 : 29 données, larves de stades 6 et 7, contact 3h, température 25° C.

Témépos : 20 données, larves de stades 4 et 5, contact 3 h, température 20° à 25° C. (méthode Mouchet)

BIBLIOGRAPHIE

- de BARJAC, H. et LARGET, I. -1981. Properties of the interim standard IPS 78 and proposal of a new reference preparation IPS 80 for the establishment of an International standard. Doc. Mim. OMS, TDR/BCV/IC. 81.1/WP.5, (non publié).
- COOSEMANS, M., MOUCHET, J., DEJARDIN, J., BARATHE, J. et SANNIER, C., 1978. Doses diagnostiques de la résistance d'Aedes aegypti aux insecticides organophosphorés. Ann.Soc.belge Méd.trop., 58, 219-230.
- FINNEY, D.J. -1971. Probit analysis. Cambridge University Press, U.K., 333pp.
- GUILLET, P., ESCAFFRE, H., OUEDRAOGO, M. et QUILLEVERE, D. -1980. Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe Simulium damnosum (S.soubrense et S.sanctipauli) en Côte d'Ivoire (zone du Programme de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta). Cah. ORSTOM, sér.Ent.méd.Parasitol, 18(3), 291-299.
- GUILLET, P., HOUGARD, J.M., DOANNIO, J., ESCAFFRE, H. et DUVAL, J.-1985. Evaluation de la sensibilité des larves du complexe Simulium damnosum à la toxine du Bacillus thuringiensis H14. I-Méthodologie. Cah.ORSTOM, sér.Ent.méd. Parasitol, soumis pour publication.
- MOUCHET, J., DEJARDIN, J., BARATHE, J., SANNIER, C et SALES, S.- 1972. Doses discriminatives pour la résistance d'Aedes aegypti aux insecticides organophosphorés et étude de quelques éléments susceptibles de modifier les résultats des tests. Cah. ORSTOM, sér. Ent.méd.Parasitol, 10(1), 77-83.
- MOUCHET, J., QUELENNEC, G., BERL, D., SECHAN? Y. et GREBAUT, S.-1976. Méthodologie pour tester la sensibilité aux insecticides des larves de Simulium damnosum s.l. . Cah. ORSTOM, sér. Ent.méd.Parasitol, 15(1), 55-66.
-

29

LA LUTTE CONTRE L'ONCHOCERCOSE HUMAINE

ET LES PERSPECTIVES D'INTEGRATION DE LA LUTTE BIOLOGIQUE.

LA LUTTE CONTRE L'ONCHOCERCOSE HUMAINE ET LES PERSPECTIVES D'INTÉGRATION DE LA LUTTE BIOLOGIQUE

P. GUILLET

Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et l'Onchocercose.
OCCGE/ORSTOM - B.P. 1500, Bouaké, Côte d'Ivoire

Pour être utilisable dans la lutte contre l'onchocercose, un insecticide ou un agent de lutte biologique doit présenter impérativement certaines caractéristiques parmi lesquelles :

- pouvoir être produit en masse à un coût réaliste,
- être correctement formulé afin de pouvoir être appliqué et avoir une efficacité totale contre les vecteurs,
- être suffisamment stable pour subir un stockage prolongé sur le terrain en zone tropicale,
- avoir une toxicité modérée vis-à-vis des organismes non cibles.

L'emploi généralisé d'un insecticide chimique en Afrique de l'Ouest a engendré des résistances chez certaines espèces vectrices. Ultérieurement des phénomènes de résistance croisée ont considérablement restreint l'arsenal des insecticides utilisables. Le recours à la lutte biologique s'est avéré indispensable. Le *Bacillus thuringiensis* H14 de Barjac répond parfaitement aux exigences mentionnées. Il est utilisé opérationnellement pour le contrôle des populations résistantes. Son emploi généralisé serait possible en améliorant les performances des formulations actuelles et en diminuant leur coût d'utilisation. Les perspectives d'utilisation d'autres agents que les bactéries sporogènes (mermithides, champignons, microsporidies) ne peuvent actuellement être évaluées tant que n'aura pas été résolu un certain nombre de questions parmi lesquelles : la spécificité parasitaire, le degré d'efficacité, les possibilités de productions de masse et la stabilité au stockage.

La lutte biologique contre les insectes vecteurs de maladies tropicales connaît actuellement un regain d'intérêt. Cela est dû aux phénomènes de plus en plus courants de résistance aux insecticides, au souci sans cesse croissant de protéger l'environnement ainsi qu'à la découverte récente du *Bacillus thuringiensis* H14. Cette bactérie entomopathogène a connu un développement très rapide et, moins de 4 années après sa découverte, a atteint le stade de l'utilisation opérationnelle à grande échelle dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. A travers cette opération, nous analyserons les perspectives offertes par l'utilisation d'agents de lutte biologique contre les vecteurs de cette maladie.

L'ONCHOCERCOSE HUMAINE DANS LE MONDE

L'onchocercose est une filariose dermique transmise par des simulies du genre *Simulium*. Cette maladie, qui dans sa phase avancée provoque la cécité, touche environ 30 millions

d'individus dont près de 99 % se trouvent en Afrique intertropicale et le reste au Yémen, en Arabie Saoudite et en Amérique Centrale et du Sud.

La stratégie de lutte contre cette maladie est conditionnée par les contraintes imposées par le parasite d'une part, ses vecteurs d'autre part, ainsi que par les moyens de lutte disponibles.

Le parasite, *Onchocerca volvulus* Leuckart, vit chez l'homme plus de 10 ans et il n'est actuellement pas possible de le détruire par l'emploi de médicaments filaricides en campagnes de masse. La seule arme disponible reste la lutte antivectorielle. Cette lutte doit être continue et durer une quinzaine d'années jusqu'à disparition totale du parasite chez l'homme.

Les contraintes dues aux vecteurs et à leur milieu naturel sont très différentes selon qu'il s'agisse d'onchocercose africaine ou sud-américaine et conditionnent les armes que l'on peut leur opposer.

LES VECTEURS AFRICAINS

Ils appartiennent en majorité au complexe *Simulium damnosum* Theobald. Ils ont un cycle de développement très court (durée de vie larvaire de 8 j à 25 j, 25 à 30 générations/an). Les larves colonisent des cours d'eau d'une certaine importance dont le débit moyen peut varier de quelques m³/s (petites rivières de savane) à plus de 1000 m³/s (grandes rivières de forêt) (1).

Les adultes se déplacent beaucoup et peuvent migrer sur des centaines de kilomètres. Pour être efficace, une campagne de lutte devra donc porter sur de grandes étendues afin de minimiser les phénomènes de migration et de réinvasion des zones traitées (Philippon & Le Berre, 1978 ; Le Berre & Philippon, 1982). En Afrique de l'Ouest et Centrale, entre 13° de latitude N et 12° de latitude S, les foyers sont généralement contigus. Le faciès de la maladie diffère sensiblement en zone de forêt et de savane ; dans ce dernier milieu, elle est beaucoup plus grave et entraîne un taux de cécité élevé. Les vecteurs de savane sont généralement différents de ceux de forêt.

Il existe en Afrique de l'Est, au Kenya et en Tanzanie notamment, des petits foyers isolés où les larves des vecteurs (*S. neavei* Roubaud, *S. damnosum* s.l.) se développent dans les torrents des régions montagneuses dont le débit est rarement élevé et les eaux moins chaudes. Les adultes semblent s'y déplacer sur de plus faibles distances. *S. neavei* dont les larves vivent fixées sur des crabes se rencontre généralement à une altitude plus élevée que *S. damnosum* s.l. et ne transmet pas toujours l'onchocercose, notamment dans les bassins où ces 2 espèces sont présentes.

LES VECTEURS D'AMÉRIQUE CENTRALE

Le vecteur majeur est *S. ochraceum* Walker. Les larves se développent dans des cours d'eau insignifiants (0,1 à 10 l/s) abondants le long des montagnes volcaniques aux flancs abruptes et densément boisés (Anon., 1976). Le nombre de gîtes est généralement très élevé. Le cycle de développement larvaire est relativement plus long (supérieur à 15 j). Les foyers sont localisés et, comparés à ceux de l'Afrique de l'Ouest, de taille restreinte (de quelques km² à quelques milliers de km²). En Amérique du Sud (Vénézuéla, Brésil) le degré de gravité de l'onchocercose est mal connu. Les vecteurs sont *S. metallicum* Bellardi, dont les larves colonisent des cours d'eau de taille moyenne et, *S. exiguum* Roubaud et les espèces du groupe *S. amazonicum* Goeloi dans les rivières et les fleuves importants.

(1) Des traitements ont été réalisés sur la Sanaga (Cameroun) et le fleuve Zaïre à des débits respectifs de 6000 et 80.000 m³/s soit dans le 2ème cas 6000 l d'insecticide par point d'épandage.

LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE L'ONCHOCERCOSE

STRATÉGIE DE LA LUTTE CONTRE L'ONCHOCERCOSE

La diversité évoquée ci-dessus à propos des différents foyers d'onchocercose conditionne la stratégie à adopter pour la lutte.

LA LUTTE EN AFRIQUE INTER-TROPICALE

La principale opération est le programme OMS de lutte contre l'onchocercose dans la région du bassin de la Volta (OCP) en Afrique de l'Ouest (Philippon & Le Berre, 1978 ; Le Berre & Philippon, 1982 ; Walsh *et al.*, 1981). Ce programme en cours depuis 1973 couvre une superficie de 700.000 km² et concerne 7 Etats (Bénin, Côte d'Ivoire, Haute-Volta, Ghana, Mali, Niger et Togo).

La localisation des gîtes larvaires et la dispersion des femelles concourent à l'utilisation des traitements larvicides plutôt qu'adulticides. Selon la saison, 4000 à 18.000 km de rivières doivent être surveillés et, si besoin est, traités chaque semaine pendant 20 années. Les traitements doivent être systématiquement efficaces à 100 % afin de pouvoir ramener le taux annuel de piqûres (TAP : nombre de piqûres par homme et par an) de 300.000 et parfois plus dans les conditions naturelles, à moins de 1000, seuil au-dessous duquel l'endémie onchocerquienne reste très basse et ne constitue plus un problème de santé publique. Du fait de l'étendue des zones traitées et de leur inaccessibilité en saison des pluies, les traitements sont réalisés par avion et hélicoptère.

La pratique de ces traitements impose l'utilisation de formulations d'insecticides parfaitement auto-dispersibles et efficaces sous un faible volume du fait de la capacité de chargement limitée des aéronefs. La portée, c'est-à-dire la distance sur laquelle le traitement reste totalement efficace en aval du point d'épandage, doit être aussi grande que possible de manière à limiter le nombre de points de traitement et la quantité d'insecticide consommée. L'Abate[®], un concentré émulsifiable à 20 % de téméphos (organophosphoré), répond à ces exigences. En saison sèche, il est utilisé à la dose de 0,1 mg/l pendant 10 mn et chaque gîte doit être traité individuellement du fait de l'absence de portée due au faible débit des rivières. En hautes eaux (saison des pluies), la dose est de 0,05 mg/l/10 mn et la portée efficace dans les mêmes rivières atteint 30 à 50 km. Le ravitaillement des aéronefs impose le stockage des fûts en brousse où ils restent en plein soleil pendant parfois plus d'un an. Pour le Programme OCP, la quantité d'insecticide consommée annuellement est de l'ordre de 160.000 à 180.000 l et représente environ 10 % du coût total du Programme. Après 10 années d'utilisation continue son impact sur le milieu naturel, régulièrement évalué, est jugé comme très acceptable.

Il existe d'autres exemples de lutte, en Afrique de l'Est notamment. La focalisation de la maladie a permis dans certains cas comme au Kenya avec *S. neavei* d'aboutir à l'éradication du vecteur (Mac Mahon *et al.*, 1958). Toutefois l'ampleur des opérations de traitement dans ce type de foyers est sans commune mesure avec l'exemple précédemment cité.

EN AMÉRIQUE CENTRALE ET DU SUD

Des essais de lutte à l'aide du DDT ont été entrepris au Guatemala dès 1945 (Fairchild & Barreda, 1945). Un projet de lutte pilote, également au Guatemala, est en cours (Ogata, 1981). Les traitements sont réalisés à l'aide de blocs de plâtre imprégnés de téméphos qui, en se dissolvant, libèrent une concentration de 0,1 mg/l pendant 1 h environ. La portée des traitements est très faible, même lorsque la dose appliquée est double (Takoaka *et al.*, 1981).

Le problème majeur de ce type de campagne réside dans la multiplicité des gîtes à traiter ainsi que leur accessibilité toujours problématique. Le coût de l'insecticide en lui-même ne représentant qu'une faible part du prix de revient, il devrait être possible d'utiliser des larvicides

plus onéreux, même si l'onchocercose ne constitue pas en Amérique du Sud un problème socio-économique aussi grave qu'en Afrique. Au Guatemala par exemple, sur 2 bassins couvrant au total une superficie de 9,6 km², il faut réaliser 370 points de traitement et la consommation annuelle de téméphos est de 2,3 kg.

PROBLÈMES RENCONTRÉS DANS LE DÉROULEMENT D'UNE CAMPAGNE DE LUTTE CONTRE L'ONCHOCERCOSE

Le programme OCP peut inscrire à son passif 2 écueils : les phénomènes de réinvasion, déjà mentionnés et la résistance aux insecticides. Ce dernier point est particulièrement important.

Des populations d'espèces forestières du complexe *S. damnosum* ont très rapidement développé une résistance au téméphos (Guillet *et al.*, 1981). Le chlorphoxim, un autre composé organophosphoré, a été utilisé en remplacement mais les larves ont également développé une résistance à ce composé (Kurtak *et al.*, 1982). Simultanément a été mise en évidence une résistance croisée à la plupart des composés organophosphorés utilisables en santé publique (Kurtak, comm. pers.).

Les autres familles de larvicides présentent des caractéristiques nettement moins avantageuses que les organophosphorés. Les organochlorés tels que le métoxychloré sont beaucoup plus efficaces dans les eaux froides que chaudes. Le DDT longtemps utilisé avec succès est considéré comme indésirable par les écologistes du fait de son accumulation dans les chaînes alimentaires. De plus les larves du complexe *S. damnosum* peuvent développer une résistance à ce composé (Guillet *et al.*, 1977). Les carbamates, outre leur toxicité généralement élevée vis-à-vis des mammifères, ont un effet larvicide très limité (Jamnback & Frempong Boadu, 1966; Quelennec *et al.*, 1970). Les pyréthrinoides présentent dans l'ensemble un pouvoir larvicide très élevé ; la deltaméthrine[®] (K-Othrine), par exemple peut être utilisée à des doses 15 à 20 fois moindres que celles de l'Abate (Dejoux & Guillet, 1980). Mais, comme tous les composés de cette famille sa toxicité vis-à-vis de la faune non cible, en particulier des poissons, limite les perspectives d'utilisation.

Les régulateurs de croissance représentent une famille d'insecticides en pleine expansion. Les mimétiques d'hormones juvéniles comme le méthoprène n'agissent à des doses raisonnables que sur les larves âgées (Dove & Mac Kague, 1975 ; Thompson & Adams, 1979). Les inhibiteurs de mue comme le diflubenzuron sont normalement actifs lors de chaque mue à la condition que le temps de contact soit relativement long (Lacey & Mulla, 1978a, b). Des essais préliminaires réalisés sur les larves du complexe *S. damnosum* ont montré qu'avec des temps de contact brefs, que l'on observe dans la pratique des traitements opérationnels (10 mn et moins), ce type de produit n'est pas efficace même à des dosages élevés.

L'apparition de la résistance croisée aux composés organophosphorés a conduit à intensifier la recherche de larvicides de remplacement mais, depuis 2 années maintenant, aucun nouveau larvicide chimique n'a atteint le stade opérationnel. La résistance apparue dans la zone forestière n'a qu'un impact très modéré sur l'ensemble puisqu'elle intéresse des espèces associées à une onchocercose peu grave ; mais le développement d'une résistance chez les espèces savaniques du complexe *S. damnosum* associées aux foyers les plus graves de la maladie risquerait d'hypothéquer l'acquit de 10 années de traitement d'une efficacité remarquable. Dans l'état actuel des recherches sur le développement des insecticides au sens large du mot, l'utilisation d'agents de lutte biologique constitue la seule alternative. Le *B. thuringiensis* H14 n'est pas seulement une des solutions élégantes proposées pour des traitements expérimentaux, mais un produit opérationnellement employé, même si la formulation actuelle présente de nombreuses insuffisances.

LES AGENTS PATHOGÈNES DE SIMULIES
ET LEURS PERSPECTIVES D'UTILISATION DANS LA LUTTE BIOLOGIQUE

LES BACTÉRIES

Bacillus sphaericus Meyer & Neide : 4 produits primaires (souches 1593 et MR4) ont été testés sur des larves du complexe *S. damnosum*. Ils ne présentent aucune toxicité même à des dosages très élevés et des temps de contact longs. Il en est de même vis-à-vis des espèces néarctiques comme *S. vittatum* Zetterstedt (Molloy, comm. pers.). Dans le cadre du programme OMS de screening des bactéries entomopathogènes, de nouvelles souches et préparations à base de *B. sphaericus* vont de nouveau être testées sur les larves du complexe *S. damnosum*.

Bacillus thuringiensis H14 : les premiers essais sur larves des vecteurs d'onchocercose ont été réalisés au laboratoire (Undeen & Berl, 1979) et sur le terrain (Guillet & de Barjac, 1979), en Afrique de l'Ouest en 1979. Pour être utilisables, les produits primaires qui se sont avérés remarquablement efficaces et d'une parfaite sécurité d'emploi (Dejoux, 1979) doivent être correctement formulés. Les premières formulations ont été testées en 1979 (Guillet & Escaffre, 1979) et le programme d'évaluation a été rapidement intensifié grâce à une coopération étroite entre l'OMS et l'industrie.

Les recherches entreprises en Afrique de l'Ouest ont permis de démontrer que le type de formulation le mieux adapté à la lutte contre l'onchocercose est le concentré de suspension dispersible (suspension de spores et cristaux individualisés).

Leurs taux de sédimentation sont très faibles (Guillet *et al.*, 1979). Leur efficacité ne dépend ni du temps d'exposition des larves (Guillet *et al.*, 1982a) ni de la turbidité de l'eau. Du fait des modalités de nutrition des larves de simulies, on n'observe pas de compétition trophique entre les fines particules actives de *B. thuringiensis* H14 (1 à 2 μ) et les particules naturelles dont se nourrissent les larves. Cette compétition existe nettement pour les formulations à grosses particules (20 à 50 μ de diamètre), qui sont moins retenues par les larves lorsque la concentration en particules naturelles augmente. Ces formulations sont donc nettement moins efficaces dans les eaux chargées de matières en suspension que l'on rencontre très fréquemment en zone tropicale, notamment en saison des pluies. Pour une formulation donnée, une augmentation du titre exprimée en UTI *Aedes aegypti* se traduit généralement par une augmentation d'efficacité vis-à-vis des larves de simulies. En revanche, d'un type de formulation à l'autre, cette relation n'est pas systématique (Guillet *et al.*, 1982b).

Une formulation à base de *B. thuringiensis* H14, le Teknar[®], un concentré de suspension titrant au minimum 600 UTI *A. aegypti*/mg, sélectionné en 1981 (Guillet *et al.*, 1982a ; Lacey *et al.*, 1982) est maintenant utilisée opérationnellement par OCP pour le traitement des populations larvaires résistantes aux insecticides organophosphorés. Le dosage employé en toute saison est de 1,6 mg/l de formulation pendant 10 mn (soit 960 cm³ pour un débit de 60.000 l/mn).

La portée, comme tous les larvicides antisimulidiens, est fonction du débit. Faible aux basses eaux, elle peut atteindre 20 km aux débits élevés (2,7.10⁷ l/mn) (Lacey *et al.*, 1982) mais s'est avérée dans la pratique limitée à 8-10 km. Pour se disperser spontanément, le Teknar doit préalablement être dilué avec 20 % d'eau, ce qui augmente les quantités à appliquer. Pur ou dilué, sa stabilité est remarquable et il peut être stocké plus de 16 mois en plein soleil sans perte d'efficacité (Guillet *et al.*, 1982c).

Il est toutefois apparu indispensable de rechercher des formulations ayant des caractéristiques opérationnelles plus avantageuses. Plus de 200 nouvelles formulations fournies par l'industrie ont été testées sur les larves du complexe *S. damnosum* (Guillet, non publié) en vue d'identifier point par point les facteurs qui depuis la fermentation du bacille jusqu'à sa formulation peuvent conditionner son efficacité. Les meilleures formulations actuelles sont

4 fois plus efficaces que le Teknar avec des propriétés physiques améliorées, mais n'ont pas encore atteint le stade opérationnel du fait de leur coût de production.

Le Teknar a été également utilisé avec succès au Guatemala (Undeen *et al.*, 1981 ; Gaugler *et al.*, 1982), mais du fait des très faibles débits observés les dosages utilisés sont nettement plus élevés et la portée très faible.

LES PROTOZOAIRES

Les ciliés. Des ciliés du genre *Tetrahymena* (ou d'un genre proche) ont été décrits sur adultes du complexe *S. damnosum* (Corliss *et al.*, 1979 ; Lewis, 1960, 1965) et sur *S. ochraceum* au Guatemala (Garms, 1975). La prévalence naturelle des ciliés chez les femelles du complexe *S. damnosum* en Afrique de l'Ouest est généralement très faible (rarement plus de 1 à 2 %). Si l'on observe habituellement un grand nombre de ciliés par femelle infectée, leur pathogénicité n'a pas encore été prouvée et encore moins leurs potentialités comme éventuels agents de lutte biologique.

Les microsporidies. Ce sont après les mermithides, les parasites les plus fréquemment rencontrés chez les simulies. Deux espèces ont été trouvées chez *S. damnosum* s.l. : *Thelohannia fibrata* Strickland 1913 (Undeen, comm. pers.) et *Pleistophora simulii* (Ezenwa *et al.*, 1974). Dans la nature la prévalence est parfois élevée (jusqu'à 15 % chez *S. squamosum*, une des espèces du complexe *S. damnosum* en zone de forêt).

Des tentatives d'infestation à partir de spores prélevées sur des larves contaminées de dernier stade larvaire se sont soldées par un échec (Guillet, non publié), comme cela a été le cas avec d'autres espèces de simulies (Weiser & Undeen, 1981). Les espèces mentionnées sont cosmopolites et naturellement présentes dans le milieu. Il est probable que leur introduction artificielle n'augmente la prévalence que très temporairement. Des microsporidies de larves de moustiques du genre *Nosema* ou *Vavraia* peuvent être produites en laboratoire et se transmettent expérimentalement sans difficulté. Lors d'essais sur le terrain, il n'a jamais été possible d'obtenir des taux d'infestation dépassant 50 à 80 % (Anthony *et al.*, 1978). Avant de pouvoir envisager l'utilisation de microsporidies pour lutter contre les larves de simulies, il est indispensable de résoudre le problème posé par la transmission du pathogène, sa spécificité parasitaire, son pouvoir larvicide réel et son effet sur les adultes (fécondité, transmission).

Les champignons. Une des espèces cosmopolites les plus courantes *Coelomycidium simulii* Debaisieux 1919 a été trouvée chez *S. neavei* et *S. adersi* Pomeroy, une espèce couramment associée à *S. damnosum* s.l. Un *Coelomomyces* a été identifié chez *S. metallicum* au Honduras (Garnham & Lewis, 1959). Les cas d'atteinte par mycose chez les larves de vecteurs d'onchocercose semblent rares. En revanche l'on trouve parfois des filaments mycéliens sur les femelles vivantes de *S. damnosum* (un cas de prévalence de plus de 60 % a été signalé en Côte d'Ivoire) qui pourraient être des phycomycètes pathogènes. Des *Entomophthora* ont été trouvés chez *S. damnosum* s.l. au Cameroun (Lewis, 1965). Deux missions ont été consacrées à ce groupe d'entomopathogènes en Côte d'Ivoire mais n'ont pas abouti (Remaudière & Papierock, comm. pers.).

Les virus. Bien que les infections par virus cytoplasmiques polyédriques puissent être décelées à l'œil nu, il n'en a, semble-t-il, pas été mis en évidence chez les vecteurs d'onchocercose. La prévalence de ce type de parasitisme dans la nature semble très limitée et encore mal connue.

Les nématodes. Le parasitisme par mermithides est très fréquent chez les simulies notamment en zone tropicale. Trois espèces ont été décrites en Afrique de l'Ouest sur *S. damnosum* s.l. : *Isomermis lairdi*, *Gastromermis leberrei* et *Gastromermis philipponi* (Mondet *et al.*, 1977a,b).

Trois espèces ont également été décrites chez *S. metallicum* en Amérique Centrale *Neomesomermis travisi* (Vargas *et al.*, 1980) *Mesomermis guatemalae* (Poinar & Takaoka, 1981) et *Isomermis benevolus* (Poinar & Takaoka, 1979). De nombreuses espèces de mermithides ont été décrites chez d'autres espèces de simulies.

Le parasitisme de *S. damnosum* s.l. par *I. lairdi* en Afrique de l'Ouest a été bien étudié (Mondet, 1981). La prévalence chez les femelles piqueuses peut être de 20 à 25 % et même dans certains cas atteindre 50 %. Le parasite, dans la plupart des cas, stérilise la femelle en bloquant le développement ovarien. Lorsque la prévalence est élevée, on observe un pluriparasitisme, qui entraîne un déséquilibre très net de la sex-ratio avec production d'une majorité de mâles. Le parasitisme chez les larves est fréquent mais sa prévalence est généralement plus élevée dans les petits cours d'eau temporaires que dans les grandes rivières.

Quatre espèces de mermithides ont été décrites comme agents potentiels de lutte biologique contre les simulies (Poinar, 1981) : *Mesomermis fluminalis* Welch 1967, *Gastromermis viridis* Welch 1962, *Isomermis wisconsinensis* Welch 1962 et *Isomermis lairdi*. Il s'agit là de parasites spécifiques, difficiles à produire dans la mesure où il n'existe pas encore d'élevages de masse de larves de simulies. Un essai de lutte limité a été entrepris avec *M. fluminalis* sur *S. venustum* Say dans une toute petite rivière de l'Etat de New-York (Molloy & Jamnback, 1977). Il s'est avéré très difficile de dépasser 80 % de parasitisme et la portée du traitement a été faible. Il faudrait diminuer le coût de production des parasites respectivement de 10.000 et 100.000 fois pour être « compétitif » avec l'Abate et le Métoxychlore.

Il existe des espèces de mermithides non spécifiques telles que *Romanomermis culicivorax* Ross & Smith produites en masse *in vivo* pouvant parasiter des larves de simulies (Finney, 1975). Lors d'essais réalisés sur *S. damnosum* s.l. en Afrique de l'Ouest (Colbo *et al.*, 1978), il a été démontré que même à des doses massives, ce parasite ne pouvait infester plus de 0,5 % des larves de premier stade seulement. Son emploi ne peut donc pas être envisagé.

Neoaplectana carpopapsae Weiser (*Steinernema feltiae* Filipjev 1934, *Steinernematidae*) est un nématode qui peut parasiter près de 250 espèces d'insectes dont les larves de simulies. Sa production *in vivo* est relativement aisée. Des essais réalisés sur des larves de *S. vittatum* et *S. verecundum* Stone & Jamnback ont permis de constater que du fait de la taille élevée des parasites, ce nématode n'infeste que les larves âgées (Molloy *et al.*, 1980). Ses perspectives d'utilisation sont donc très limitées pour les vecteurs d'onchocercose dont les populations larvaires présentent simultanément tous les stades. Il a également été testé sur des vecteurs d'onchocercose au Mexique (Gaugler *et al.*, 1982).

DISCUSSION - CONCLUSION

Pour remplir son objectif, un programme de lutte contre l'onchocercose, du moins en Afrique, s'il est basé sur l'utilisation de larvicides, doit détruire systématiquement de l'ordre de 99,9 % des larves. Des traitements efficaces à 90-95 % seulement auraient pour conséquence le maintien d'une population résiduelle de femelles assurant un taux de piqûres supérieur au seuil acceptable de 1000 piqûres par homme et par an.

La régulation naturelle des vecteurs par les agents pathogènes mentionnés dans cet exposé n'a aucune incidence significative sur la transmission de la maladie et sur son degré de gravité. Il n'est donc pas surprenant de constater que des zones en Afrique de l'Ouest, dans lesquelles le parasitisme par mermithides atteint 50 % des femelles de *S. damnosum*, présentent quand même une onchocercose hyperendémique due à un taux de transmission élevé.

Le fait que les larves de simulies vivent en eaux courantes et donc que les traitements larvicides n'ont jamais de rémanence conditionne les modalités d'utilisation des agents de lutte biologique. Dans l'état actuel des choses, cette utilisation ne peut consister qu'en applications séquentielles comme n'importe quel larvicide conventionnel afin de détruire systématiquement les simulies ou altérer leur capacité vectrice.

Nous avons pu constater que le nombre de parasites et agents pathogènes décrits chez les simulies vectrices de l'onchocercose est très limité comparativement aux autres espèces de simulies. Les recherches sur les agents pathogènes de simulies en zones tropicales ont jusqu'à ce jour été singulièrement négligées. La plupart des spécialistes résident en zones tempérées et n'interviennent que rarement lors de mission « safari » généralement de courte durée, ou pour examiner du matériel fixé par des entomologistes de terrain qui n'ont souvent qu'une compétence limitée en pathologie des insectes.

De la description d'un pathogène d'insecte à son utilisation comme agent de lutte biologique, il existe un « fossé » considérable, le plus souvent infranchissable. Qu'il s'agisse de microsporidies ou de champignons, les données concernant les modalités de transmission du parasite, sa pathogénicité réelle et les possibilités de production en masse *in vitro* sont actuellement trop fragmentaires pour pouvoir évaluer raisonnablement leurs potentialités dans la lutte biologique contre les vecteurs d'onchocercose.

Le parasitisme par *Mermithidae* est un phénomène mieux connu. Les quelques essais de lutte entrepris contre les simulies ont permis de démontrer qu'il était difficile d'obtenir des taux de parasitisme supérieurs à 70-80 % et la production de masse *in vitro* n'est pas encore réalisable. Malgré de nombreux travaux consacrés à ce sujet, l'emploi d'helminthes dans la lutte biologique contre les vecteurs d'onchocercose n'offre, dans l'état actuel des choses, pratiquement aucune perspective d'utilisation.

Il est peu probable que des parasites appartenant à ces 3 groupes soient, à moyen terme, utilisables massivement dans une campagne de lutte contre *S. damnosum* s.l. En revanche, la lutte contre les vecteurs d'onchocercose en Amérique Centrale pourrait offrir des perspectives intéressantes. Les débits très faibles des rivières et la nécessité des traitements manuels laissent une plus grande latitude dans le choix des moyens de lutte à utiliser. Ces foyers d'onchocercose représentent donc un milieu favorable pour tester de tels agents de lutte biologique.

Il existe dans le domaine de la lutte biologique contre les simulies une différence importante entre le *B. thuringiensis* H14 et tous les autres agents potentiels de lutte biologique. Le premier est infiniment plus performant à tous les niveaux (efficacité, stabilité, commodité d'utilisation et coût de production). Représente-t-il pour autant l'arme absolue ? Nous allons à l'aide de quelques chiffres le situer dans son contexte actuel d'utilisation.

Pour protéger les zones de résistance aux insecticides dans le Programme OCP, il faudrait utiliser par an l'équivalent de 80.000 litres d'Abate soit 1.600.000 litres de *B. thuringiensis* H14 (Teknar) c'est-à-dire 20 fois plus.

Actuellement pour protéger pendant 6 à 8 mois la moitié environ des zones où la résistance est effective, il a fallu doubler le budget insecticide de tout le Programme. Pour des raisons de logistique (capacité des appareils), il est très difficile de traiter en routine les rivières dont le débit dépasse 20 m³/s. La protection des zones de résistance n'est possible que grâce à une alternance judicieuse entre le Teknar et le Chlorphoxim, pour lequel les larves développent une résistance instable.

Il est indispensable d'améliorer les performances de la formulation présentement utilisée. L'objectif serait une formulation à dispersion spontanée aussi efficace que possible (une amélioration de l'ordre de 4 fois de la CL 100 est souhaitable), ayant en hautes eaux une portée opérationnelle de l'ordre de 20 km et d'un prix de revient équivalent à celui de l'Abate. Cet objectif

LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE L'ONCHOCERCOSE

est techniquement réalisable et l'industrie travaille activement dans ce sens. La première approche consiste à augmenter la teneur en endotoxine (par culture sur milieu enrichi ou concentration en fin de culture) et à utiliser des agents de formulation qui optimisent l'efficacité de la toxine.

L'exemple de la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest démontre que le *B. thuringiensis* H14, en dépit de ses imperfections actuelles, est déjà un instrument de lutte intégrée. Son utilisation même limitée à la saison sèche (basses eaux) permet de relâcher significativement la pression de sélection par les insecticides chimiques ainsi que la pression sur l'environnement. La lutte intégrée contre les vecteurs d'onchocercose ne se conçoit pas comme l'utilisation simultanée de plusieurs agents de lutte mais comme une alternance de produits présentant des modes d'action radicalement différents. Pour des raisons de logistique, il est difficile d'envisager l'emploi de plus de 2 ou 3 produits. L'alternance *B. thuringiensis* H14 (8 mois, saison sèche) — Abate (4 mois, saison des pluies) en zones de savane, où la résistance ne s'est pas encore manifestée, serait très souhaitable.

S'il est apparu nécessaire de situer le *B. thuringiensis* H14 dans son contexte actuel d'utilisation contre les vecteurs d'onchocercose, il représente toutefois un réel progrès qui a permis de résoudre le problème posé par la résistance aux insecticides. Ce n'est point là son seul mérite, car il a renforcé la crédibilité de la lutte biologique et fait prendre conscience de la nécessité d'intensifier les recherches dans ce domaine.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement les Docteurs Hamon et Le Berre, de l'Organisation Mondiale de la Santé (Genève) et le Docteur Mouchet de l'ORSTOM (Paris) pour la revue critique de ce manuscrit.

SUMMARY

The control of human Onchocerciasis and the prospects for biological agents

An insecticide or biological agent for use in Onchocerciasis control must have certain characteristics including mass production at a realistic cost, a formulation which can be easily applied and is fully effective against vectors, stability during several months storage in the tropics and moderate toxicity to man and non-target organisms. The widespread use of one chemical insecticide in West Africa has caused resistance in 2 vector species of the *Simulium damnosum* complex. Cross-resistance subsequently appeared which limited the number of usable insecticides. Recourse to biological control was therefore necessary. *Bacillus thuringiensis* H14 de Barjac fulfilled the above mentioned requirements for a control agent. It is being used operationally for the control of insecticide-resistant populations. Its use should be extended by improving performances of available formulations and increasing cost-effectiveness. The prospects for biological control agents other than spore-forming bacteria (mermithids, fungi, microsporidia) cannot be evaluated presently as long as a number of questions remain unanswered viz. host-parasite specificity, degree of efficacy, mass production and storage stability.

BIBLIOGRAPHIE

- Anonyme. — 1976. Epidémiologie de l'onchocercose. — Rapport d'un Comité d'Experts de l'Org. mond. Santé, Rapp. techn. n° 597, 105 pp.
- Anthony, D.W., Savage, K.E., Hazard, E.I., Avery, S.W., Boston, M.D. & Oldacre, S.W. — 1978. Field test with *Nosema algerae* Vavra & Undeen [*Microsporida* : *Nosematidae*] against *Anopheles albimanus* Wiedemann in Panama. — *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.*, 2, 17-27.
- Colbo, M.H., Laird, M. & Peterson, J. — 1978. Annu. Rept. Res. Unit. Vec. Pathol., Memorial Univ. Newfoundland.
- Corliss, J.D., Berl, D. & Laird, M. — 1979. A note on the occurrence of the ciliate *Tetrahymena* potential biocontrol agent in the blackfly vectors of onchocerciasis from Ivory Coast. — *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 98, 587-591.
- Dejoux, C. — 1979. Recherches préliminaires concernant l'action de *Bacillus thuringiensis* de Barjac sur la faune d'invertébrés d'un cours d'eau tropical. — *Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/79.721.*, 11 pp.
- Dejoux, C. & Guillet, P. — 1980. Evaluation of new blackfly larvicides for use in onchocerciasis control in West Africa. — *Doc. Mim. OMS WHO/VBC/80.783.*
- Dove, R.F. & Mac Kague, A.B. — 1975. Effect of insect development inhibitors on adult emergence of blackflies [*Diptera* : *Simuliidae*]. — *Can. Entomol.*, 107, 1211-1213.
- Ezenwa, A.O., Howlett, T. & Hedge, K. — 1974. Microsporidan infection of *Simulium damnosum* in West Africa. — *J. Parasitol.*, 60, 975.
- Fairchild, G.M. & Barreda, E. — 1945. DDT as a larvicide against *Simulium*. — *J. Econ. Entomol.*, 38, 694-699.
- Finney, J.R. — 1975. The penetration of three simuliid species by the nematode *Reesimermis nielsenii*. — *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 52, 235.
- Garms, R. — 1975. Observations on filarial infections and parous rates of anthropophilic blackflies in Guatemala with reference to the transmission of *Onchocerca volvulus*. — *Tropenmed. Parasitol.*, 26, 169-182.
- Garnham, P.C.C. & Lewis, D.J. — 1959. Parasites of British Honduras with special reference to leishmaniasis. — *Trans. R. Soc. Med. Hyg.*, 53, 12-40.
- Gaugler, R., Kaplan, E., Alvaredo, D., Montoy, C. & Ortega, M. — 1982. Assesment of *Bacillus thuringiensis* serotype H14 and *Steinernema feltiae* [*Nematoda* : *Steinernematidae*] for control of the *Simulium* vectors of onchocerciasis in Mexico. — *Entomophaga*, 28,4,309.
- Guillet, P., Mouchet, J. & Grebaut, S. — 1977. La résistance au DDT chez *Simulium damnosum* s.l. [*Diptera* : *Simuliidae*] en Afrique de l'Ouest. — *Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/77.678.*
- Guillet, P. & de Barjac, H. — 1979. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for blackfly larvae, vectors of onchocerciasis. — *C.R. Acad. Sci., D.*, 289, 549-552.
- Guillet, P., Dempah, J. & Coz, J. — 1979. Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l. : III. Données préliminaires sur la sédimentation de l'endotoxine dans l'eau et sur sa stabilité en zone tropicale. — *Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/79.783.*
- Guillet, P. & Escaffre, H. — 1979. Evaluation de *Bacillus thuringiensis israelensis* de Barjac pour la lutte contre les larves de *Simulium damnosum* s.l.. Efficacité comparée de trois formulations expérimentales. — *Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/79.735.*
- Guillet, P., Escaffre, H., Ouedraogo, M. & Quillevere, D. — 1981. Mise en évidence d'une résistance au téméphos dans le complexe *Simulium damnosum* (*S. sanctipauli* et *S. soubrense*) en Côte d'Ivoire (Zone du Programme de Lutte contre l'Onchocercose dans la région du bassin de la Volta). — *Cah. ORSTOM, sér. Entomol. Méd. Parasitol.*, 18, 291-299.

LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE L'ONCHOCERCOSE

- Guillet, P., Escaffre, H. & Prud'hom, J.M. - 1982a. L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose. I. Efficacité et modalités d'application. - *Cah. ORSTOM, sér. Entomol. Méd. Parasitol.*, 20, 3, 175-180.
- Guillet, P., Escaffre, H. & Prud'hom, J.M. - 1982b. *Bacillus thuringiensis* H14, a biocontrol agent for onchocerciasis control in West Africa. - *Proc. 3rd Int. Colloq. Invertebr. Pathol.*, Brighton 1982. 460-465.
- Guillet, P., Escaffre, H. & Prud'hom, J.M. - 1982c. L'utilisation d'une formulation à base de *Bacillus thuringiensis* H14 dans la lutte contre l'onchocercose. II. Stabilité dans les conditions de stockage en milieu tropical. - *Cah. ORSTOM, sér. Entomol. Méd. Parasitol.*, 20, 181-185.
- Jamback, H. & Frempong Boadu, J. - 1966. Testing blackfly larvicides in the laboratory and in streams. - *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 34, 405-421.
- Kurtak, D., Ouedraogo, M., Ocran, M., Barro, T. & Guillet, P. - 1982. Preliminary note on the appearance in Ivory Coast of resistance to Chlorphoxim in *Simulium soubrense/sanctipauli* larvae already resistant to temephos (Abate®). - *Doc. Mim. OMS, WHO/VBC/82.850*.
- Lacey, L.A., Escaffre, H., Philippon, B., Seketeli, A. & Guillet, P. - 1982. Large river treatment with *Bacillus thuringiensis* H14 for the control of *Simulium damnosum* s.l. in the onchocerciasis control programme. - *Tropenmed. Parasitol.*, 33, 97-101.
- Lacey, L.A. & Mulla, M.S. - 1978a. Biological activity of Diflubenzuron and three new IGR's against *Simulium vittatum* [Diptera : Simuliidae]. - *Mosq. News*, 38, 377-381.
- Lacey, L.A. & Mulla, M.S. - 1978b. Factors affecting the activity of Diflubenzuron against *Simulium* larvae [Diptera : Simuliidae]. - *Mosq. News*, 38, 264-267.
- Le Berre, R. & Philippon, B. - 1982. Lutte contre l'onchocercose : stratégie, réalisation, futur. - *Comm. Journées Hôpital C. Bernard*, Paris 22-23/10/82, 7 pp.
- Lewis, D.J. - 1960. Observations on *Simulium damnosum* in the southern Cameroun and Liberia. - *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 54, 208-223.
- Lewis, D.J. - 1965. Features in *Simulium damnosum* populations of the Kumba area in West Cameroun. - *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 59, 365-374.
- Mac Mahon, J.P., Highton, R.B. & Goiny, H. - 1958. The eradication of *Simulium neavei* from Kenya. - *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 19, 75-107.
- Molloy, D. & Jamnback, H. - 1977. A larval blackfly control field trial using mermithid parasites and its cost implications. - *Mosq. News.*, 37, 104-108.
- Molloy, D., Gaugler, R. & Jamnback, H. - 1980. The pathogenicity of *Neoaplectana carpocapsae* to blackfly larvae. - *J. Invertebr. Pathol.*, 36, 302-306.
- Mondet, B. - 1981. Etudes sur *Isomermis lairdi* [Nematoda : Mermithidae] parasite de *Simulium damnosum* s.l. [Diptera : Simuliidae] en Afrique de l'Ouest. - *Travaux et Documents ORSTOM*, 141, 161 pp.
- Mondet, B., Poinar, J.R. & Bernadou, J. - 1977a. Etude du parasitisme des simulies [Diptera : Simuliidae] par des Mermithidae [Nematoda] en Afrique de l'Ouest. Description de deux nouvelles espèces de *Gastromermis*. - *Can. J. Zool.*, 55, 1275-1283.
- Mondet, B., Poinar, J.R. & Bernadou, J. - 1977b. Etude du parasitisme des simulies [Diptera : Simuliidae] par Mermithidae [Nematoda] en Afrique de l'Ouest. IV. Description de *Isomermis lairdi* n.sp. parasite de *Simulium damnosum*. - *Can. J. Zool.*, 55, 2011-2017.
- Ogata, K. - 1981. Preliminary report of Japan-Guatemala onchocerciasis control pilot project. In : *Blackflies : the Future for Biological Methods in Integrated Control*. (M. Laird, ed.). - *Academic Press*, 105-115.
- Philippon, B. & Le Berre, R. - 1978. La lutte contre les vecteurs d'onchocercose humaine en Afrique intertropicale. - *Méd. Trop.*, 36, 667-675.
- Poinar, J.R. - 1981. Mermithid nematodes of blackflies. In : *Blackflies : the Future for Biological Methods in Integrated Control*. (M. Laird, ed.). - *Academic Press*, 159-170.

- Poinar, J.R. & Takoaka, H. - 1979. *Isomermis benevolus* sp. n. [Nematoda : Mermithidae] a parasite of *Simulium metallicum* [Diptera : Simuliidae] in Guatemala. - *Jap. J. Sanit. Zool.*, 30, 305-307.
- Poinar, J.R. & Takoaka, H. - 1981. Three new mermithids [Nematoda] from Guatemalan blackflies [Diptera : Simuliidae]. - *Int. J. Systematics*.
- Queleennec, C., Philippon, B. & Cordelier, R. - 1970. Essais d'activité d'une poudre insecticide à base de Sevin contre les larves de simulies. - *Méd. Trop.*, 34, 3-6.
- Takoaka, H., Ochoa, J.O., Takashi, M. & Takashi, H. - 1981. Evaluation of temephos as a larvicide against *Simulium ochraceum* [Diptera : Simuliidae] in Guatemala. - *J. Med. Entomol.*, 18, 145-152.
- Thompson, B.H. & Adams, B.G. - 1979. Laboratory and field trials using Altosid® insect growth regulator against blackflies [Diptera : Simuliidae] of Newfoundland. - *Can. J. Med. Entomol.*, 16, 536-546.
- Undeen, A.H. & Berl, D. - 1979. Laboratory studies on the effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac against *Simulium damnosum* [Diptera : Simuliidae] larvae. - *Mosq. News*, 39, 742-745.
- Undeen, A.H., Hiroyuki, T. & Hansen, K. - 1981. A test of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* de Barjac as a larvicide for *Simulium ochraceum* the Central American vector of onchocerciasis. - *Mosq. News*, 41, 37-40.
- Vargas, M., Rubstov, I.A. & Fallas, B. - 1980. Bionomics of blackflies [Diptera : Simuliidae] in Costa-Rica. V. Description of *Neomesomermis travisi* sp.n. [Nematoda : Mermithidae]. - *Rev. Biol. Trop.*, 28, 73-89.
- Walsh, J.F., Davies, J.B. & Cliff, B. - 1981. World Health Organization Onchocerciasis control programme in the Volta river basin. In *Blackflies : the Future for Biological Methods in Integrated Control*. (M. Laird, ed.). - *Academic Press.*, 85-103.
- Weiser, J. & Undeen, A.H. - 1981. Diseases of blackflies. In : *Blackflies : the Future for Biological Methods in Integrated Control*. (M. Laird, ed.). - *Academic Press*, 181-196.

NOM GUILLET

PRENOM Pierre

TITRE LA LUTTE CONTRE LES VECTEURS DE L'ONCHOCERCOSE
EN AFRIQUE DE L'OUEST

ETUDE DE LA RESISTANCE ET RECHERCHE DE NOUVEAUX LARVICIDES.

RESUME

Des méthodes ont été mises au point pour évaluer l'efficacité de différentes classes d'insecticides utilisables contre les larves des vecteurs de l'onchocercose dans le cadre d'un vaste Programme de lutte en Afrique de l'Ouest.

Une résistance au téméphos a été mise en évidence, suivie d'une résistance aux autres composés organophosphorés. Compte-tenu des perspectives limitées offertes par les insecticides conventionnels, on a évalué l'efficacité de nouvelles classes d'insecticides, en particulier les régulateurs de croissance et les agents de lutte biologique.

Les résultats limités obtenus avec les premiers n'ont pas encore permis d'envisager leur utilisation. Les facteurs qui conditionnent l'efficacité du *Bacillus thuringiensis* H14 ont été étudiés ; un type de formulation adapté à l'utilisation sur le terrain a été sélectionné.

Cet entomopathogène peut être produit industriellement en très grandes quantités ; son utilisation a rapidement atteint le stade opérationnel pour le traitement des larves résistantes aux insecticides. Les risques de développement d'une résistance à la toxine bactérienne sont très faibles mais ont toutefois été pris en compte. L'amélioration des formulations va permettre d'étendre sensiblement leurs possibilités d'utilisation.

MOTS CLES : Onchocercose, lutte antivectorielle, larvicides, résistance, *Bacillus thuringiensis* H14 (formulations).