

ACADEMIE DE PARIS

FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES
D'ENTOMOLOGIE MEDICALE

LES CULICIDES DE LA FORET DE SENART :

- INVENTAIRE FAUNISTIQUE
- RECHERCHE DES PREDATEURS DES STADES LARVAIRES
PAR LE TEST ELISA.

RAPPORT DE STAGE

soutenu en Octobre 1978 devant la commission d'examen

par

Michel TIBAYRENC

JURY : MM. BERGERARD

COZ

MOUCHET

GILLOU

LIBRE

ORSTOM Documentation



010052991

F

ERRATA.

Dans la bibliographie, ajouter:

DUSSART (E.) 1966.

Limnologie; l'étude des eaux continentales.

Gauthiers-Villars Ed. Paris.

ACADEMIE DE PARIS

FACULTE DES SCIENCES D'ORSAY

DIPLOME D'ETUDES APPROFONDIES
D'ENTOMOLOGIE MEDICALE

LES CULICIDES DE LA FORET DE SENART :

- INVENTAIRE FAUNISTIQUE
- RECHERCHE DES PREDATEURS DES STADES LARVAIRES
PAR LE TEST ELISA.

RAPPORT DE STAGE

soutenu en Octobre 1978 devant la commission d'examen

par

Michel TIBAYRENC

JURY : MM. BERGERARD
COZ
MOUCHET

PLAN DU D.E.A.

Remerciements.	2
Introduction.	3
Présentation des lieux.	4
Les gîtes culicidiens.	4
Inventaire faunistique:	10
- matériel et méthodes.	
- résultats.	
Recherche des prédateurs par le test ELISA.	12
- Les travaux antérieurs.	
- Application du test ELISA.	
. Matériel et méthodes.	
. Résultats.	
Conclusion.	44
Bibliographie.	47

Les captures utiles à ce travail se sont déroulées dans l'enclos du Muséum, en forêt de SINAÏ, grâce à l'obligeance du Professeur DELAMARNE REBOUVILLE. Qu'il trouve ici mes remerciements, ainsi que son Assistant, Monsieur Guy VANNIER.

L'idée initiale de ce DEA m'a été soufflée par Monsieur MOUCHET, Inspecteur général de l'ORSTOM, que je remercie à cette occasion.

Les tests ELISA ont été effectués dans le service de Virologie de l'hôpital TROUSSEAU, grâce à l'amabilité:

- du Professeur ERICOUT, Directeur de cette unité;
- des Docteurs FORTIER, INGLAND, MOUPOU.

A tous, mes remerciements.

Enfin, je remercie:

Monsieur le Professeur BERGERARD;

Mademoiselle LAUGE;

Monsieur COZ (qui m'a adressé au Professeur Ericout);

Monsieur GILLON,

d'avoir bien voulu faire partie du jury de ce DEA.

Actuellement, beaucoup d'études sont menées sur les prédateurs de larves de moustiques; souvent avec une arrière-pensée de lutte biologique. Mais on est en somme très mal renseigné sur le régime alimentaire exact de ces futurs (?) auxiliaires.

Le présent rapport de DEA est une tentative d'application à problème d'une méthode immunologique récente.

PRESENTATION DES LIEUX:

L'enclos du Museum à Sénart est une parcelle ayant brûlé pendant la dernière guerre, fermée au public depuis lors. On y observe un taillis sous futaie. Les arbres sont jeunes, l'espèce dominante étant le Chêne commun, Quercus sersiliflora. Il n'y a pas de relief. Le terrain est excessivement humide, riche en collections d'eau permanentes, périodiques, temporaires. La moindre averse transforme le sol en bournier. Le passage des voitures d'exploitation des Eaux et Forêts provoque la formation de nombreuses ornières remplies d'eau presque constamment. Toutes ces conditions créent un paradis pour les moustiques.

LES GITES CULICIDIENS:

Pour chercher les prédateurs et leurs victimes, 28 points ont été prospectés entre mars et août 78. On peut les classer en:

- collections permanentes;
- " périodiques;
- " temporaires.

1- Collections permanentes:

Un seul point répond sans conteste à cette dénomination: c'est la "Mare du Capitaine". Il s'agit d'un petit "étang", selon le sens donné par DUSSART (collection artificielle fermée par une vanne). Comme on le voit sur la photo de la page

suiivante:



La Maro du Capitaine.

Il y a ébauche d'une zonation en ceinture, mais on ne retrouve guère la division classique en scirpaie, nupharaie, potamaie.

La Faune est très variée et abondante. Par contre, les larves de moustiques sont rares: 3 individus trouvés en 5 mois (Aedes annulipes, Anopheles sp., Culex territans).

Le gîte n° 21 (photo page suivante) est une grande ornière qui est restée constamment en eau de mars à août. On peut peut-être la considérer comme une mare permanente. Cependant, il n'y a pas de végétation aquatique macroscopique. La Faune est riche, fournissant des prédateurs variés, et de nombreu-



Gîte n° 21.

breuses larves de moustiques (Anopheles maculipennis, Culex pipiens, Culex torrentium).

2- Collections périodiques:

On peut ranger ici:

- les mares peu profondes des sous-bois, comme le point 12 photographié à la page suivante.
- les fossés de bordure des chemins.

La mise en eau périodique de ces gîtes pourrait s'expliquer par l'existence d'une "nappe perchée", présente superficiellement de mars à juin (BACHELIER et COMBEAU). Cet assèchement périodique en fait des pépinières d'Aedes. On y trouve en particulier Aedes cantans et Aedes cinereus. S'y capturent aussi Culex pipiens, et des Culiseta.

Il n'y a aucun peuplement phanérogame.

En règle, les prédateurs sont peu abondants: quelques petits Dytiscides adultes et larvaires, des Hémiptères du genre Gerris.

3- Collections temporaires:

Ce sont les ornières des chemins, terrain idéal pour les



Gîte n° 12.

"peuplements pionniers" de SERRA TOSIO. On y trouve fréquemment Anopheles maculipennis, Culex pipiens, Culex torrentium, ces 2 derniers souvent en très grande abondance.

Si l'on n'y trouve guère de gros Dytiscides, on récolte par contre aisément de petites et moyennes espèces (Agabus, Acilius, Colymbetes). On trouve aussi des Hémiptères (Gerris, Notonecta). La photo suivante montre le gîte n° 24.



Légende du plan de la page suivante (points prospectés):

1- Collections permanentes: 1, 21, 5, 8.

2- " périodiques:

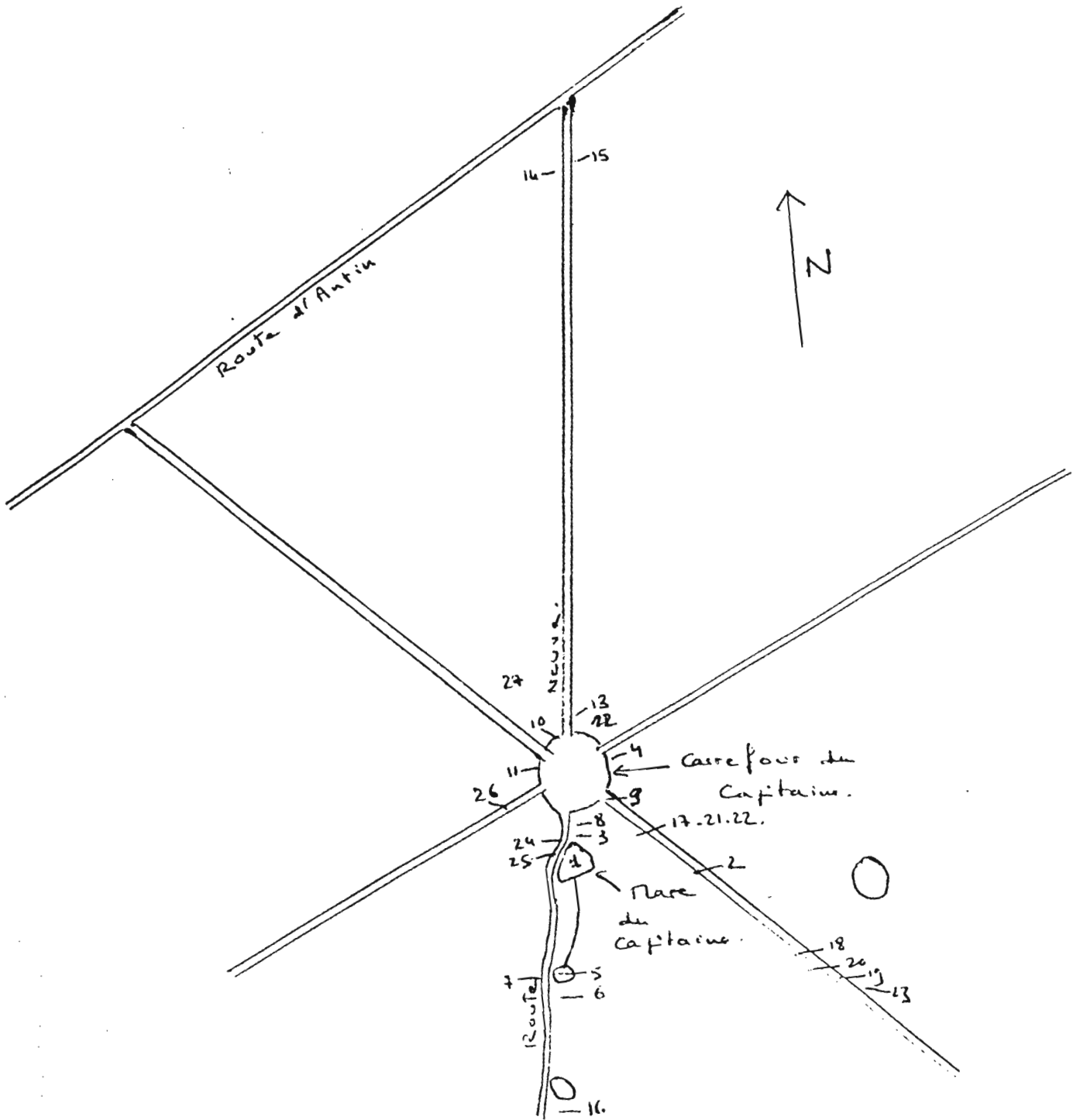
- mares de sous-bois: 12, 27.

- fossés de bordure de chemin: 7, 10, 11, 13, 14, 15,
18, 23.

- canaux: 2, 3, 6, 16.

3- Collections temporaires: ornières de chemins: 17, 19, 22,
24, 25, 26.

ECHELLE/ : 1/5000.



broyé. A chaque mue, l'exuvie est recueillie et placée dans un tube plus petit, fiché à côté du tube d'élevage sur la même plaque de polystyrène expansé, et contenant du lactophénol d'Amman.

2- Résultats:

12 espèces ont été retrouvées. Ce sont:

Aedes annulipes;

" cantans;

" cinereus;

" communis;

" rusticus;

Anopheles maculipennis;

Culex pipiens;

" territans;

" torrentium;

Culiseta annulata;

" fumipennis;

" morsitans.

Les Aedes ont été trouvés surtout dans les gîtes périodiques: mares peu profondes des sous-bois, fossés bordant les chemins. Anopheles maculipennis se rencontre dans les ornières des chemins, avec Culex pipiens et C. torrentium. Culex territans fréquente ici les fossés exposés au soleil (et 1 exemplaire pêché dans la mare du Capitaine). Les Culiseta fréquentent des endroits variés, mais apparemment toujours ombragés.

Les 2 espèces les plus abondantes semblent être Culex pipiens

et Aedes cantans. C'est finalement la première qui a été choisie pour ce travail. Malheureusement, dans les mêmes gîtes, se trouve à Sénart le Culex torrentium. Les larves en sont semblables, le seul critère de discrimination fiable étant l'hypopigium du mâle. Il est probable que les vaccins Culex piens que j'ai préparés ont été souillés par du C. torrentium. Pour éviter cet écueil, on pourrait recueillir des pontes et élever les larves. On serait ainsi assuré de disposer d'une souche pure, déterminable après coup par élevage individuel de quelques mâles.

Comme il a été dit au début de ce rapport, à l'heure actuelle, les connaissances sur les phénomènes de prédation chez les insectes aquatiques sont presque anecdotiques. On sait par exemple que telle espèce est carnivore. Mais il y a peu de données sur la spécificité ou l'intensité de tels comportements. Certains carnassiers semblent avoir un régime très exclusif. Ainsi, d'après BERTRAND, les larves du Coléoptère Hygrobia tarda se repaissent uniquement de Vers Tubificides. Ce fait constituerait plutôt une exception. D'après CUMMINS, les Insectes aquatiques carnassiers seraient éclectiques, et dans une même espèce, le régime pourrait varier selon le stade évolutif, et selon le lieu. En fait, toutes ces notions sont encore floues, et les données quantitatives dans les conditions naturelles sont presque inexistantes. Or, il est présomptueux de parler de "lutte biologique" avant de connaître parfaitement ces phénomènes.

1- Revue des travaux antérieurs:

Un nombre considérable de travaux sur les Insectes aquatiques prédateurs a été publié. Mais il s'agit presque toujours d'investigations de laboratoire. On peut schématiquement distinguer 3 catégories:

- les études conduites exclusivement au laboratoire;
- les travaux "mixtes";
- les recherches conduites uniquement dans les conditions

naturelles.

1-1: Les études de laboratoire:

A quelques variantes près, on suit le même protocole: le prédateur supposé et la proie subodorée sont placés dans une même enceinte, et on compte les assassinats commis. Il est aisé de noter les limites de telles observations: le comportement alimentaire du carnassier risque fort d'être troublé, de même que les réflexes de fuite de la victime. Cette dernière n'a pas les positions de repli qu'offre tout gîte naturel. Le meurtrier ne rencontre pas de rivaux pouvant lui disputer ses proies. Enfin, le menu lui est imposé. Ces travaux ne sont cependant pas dépourvus de valeur. Ainsi, en gardant constants les facteurs d'environnement (photopériode, température, etc), on constate au laboratoire des variations entre les performances meurtrières de différentes espèces, et même de différents individus d'une même espèce. On pourrait parler dans ce dernier cas de "phagotypes", et il serait instructif d'en rechercher un éventuel déterminisme génétique.

Dans ces études de laboratoire, on peut citer celles de SERVICE (1965), LEE (1967), WASHINO (1969), GARCIA, VOIGT et DES ROCHERS (1974), HAZELRIGG (1976), NELSON (1977).

1-2; Les travaux "mixtes":

Pour se rapprocher des conditions de terrain, on utilise un gîte plus ou moins naturel dans lequel on introduit un facteur artificiel. En quelque sorte, on reproduit les conditions d'une "lutte biologique". On peut espérer de la part des protagonistes un comportement moins troublé que dans les études de labo-

naturel.

HAZLEBRIIGG (1974) se sert de gîtes semi-naturels colonisés par Culex pens, dans lesquels il introduit des oeufs ou des adultes de Notonecta unifasciata. Dans ces conditions semi-naturelles, il observe une forte réduction des émergences de Culex.

EL RAYAH (1975) place des larves de l'Odonate Trithemis annulata scoriecii dans des canaux d'irrigation infestés d'Anopheles pharocensis, et enregistre d'encourageantes hécatombes. JAMES

(1961, 1965, 1966) inverse les données en introduisant non pas le prédateur, mais la proie, en l'occurrence des larves de moustique marquées au phosphore radioactif et relâchées dans des gîtes naturels. Il ne reste plus qu'à mesurer la radioactivité émise par les carcassiers qu'on capture. Mais il n'est pas certain que le comportement des larves ainsi traitées soit inchangé. Par exemple, leur vivacité pourrait être amoindrie, au moins transitoirement. Elles constitueraient alors des victimes faciles.

D'une façon générale, si ces études sont plus satisfaisantes que les données de laboratoire, elles ne peuvent prétendre reproduire exactement les conditions naturelles.

1-3: Les travaux conduits uniquement dans les conditions naturelles:

C'est l'analyse des contenus intestinaux de prédateurs trouvés dans la Nature. On connaît 2 procédés:

- l'étude directe;
- les méthodes immunologiques.

1-1: L'étude directe:

Un ornithologue désirant élucider le comportement alimentaire d'un rapace nocturne examine les débris osseux de petits mammifères contenus dans les "pelotes".

Un entomologiste s'interrogeant sur les goûts gastronomiques d'un insecte aquatique peut tenter la même démarche: en examinant les débris sclérifiés retrouvés dans les viscères du prédateur, on peut faire certaines déterminations. Ce procédé est simple, il a l'avantage de pouvoir être quantitatif. Il est totalement pris en défaut dans 2 cas:

- une proie peut ne pas offrir de restes sclérifiés déterminables;

- un prédateur peut ne pas ingérer les parties sclérifiées.

C'est le cas de tous les Hémiptères: Nepa, Lanatra, Naucoris, Notonecta, Gerris, Hydrotus, etc. Cela est vrai aussi pour bien des larves de Tytiscidae, à "digestion externe".

1-3-2: Les méthodes immunologiques:

Le principe en est le suivant: supposons qu'on veuille étudier les prédateurs de telle espèce, par exemple les larves de Culex pipiens. On vaccine un animal de laboratoire à l'aide d'extraits de ces larves. On obtient un sérum contenant des anticorps qu'on espère dirigés spécifiquement contre le Culex pipiens. On fait réagir ce sérum avec des extraits viscéraux de prédateurs soupçonnés. S'il y a eu consommation effective de Culex pipiens dans les précédents repas, la réaction est positive. Dans le cas contraire, on n'observe rien. En fait, depuis sa première utilisation il y a une trentaine d'années, cette méthode a été très discutée. Dans

le travail de HALL, DOWNE, MAC LILLAN et WEST (1955), on la présente comme très prometteuse. Or, peu d'études ont suivi. Les seules publications récentes sont celles de SERVICE (1973). En fait, le procédé est discutable dans son principe même. On peut imaginer deux objections principales:

1-3-2-1: Discussion de la méthode immunologique:

- les protéines constituant les préces risquent d'être dégradées par la digestion: cela ne peut que diminuer la valeur des tests immunologiques. C'est pour cette raison également que la méthode des isozymes est inutilisable dans le cadre de telles études.

- La sensibilisation de l'animal de laboratoire risque fort de ne pas être spécifique. En lui injectant des extraits totaux de larves de moustiques, on risque de l'immuniser contre un grand nombre d'antigènes, d'obtenir par exemple, au lieu du sérum anti-Culex pipiens convoité, un sérum anti-Culicidés, ou pire, un sérum anti-insectes.

En fait, d'après les données de la littérature, et après avoir pris les avis de gens supposés compétents, il est difficile de se faire une opinion sur la valeur de ces objections.

- Le problème de la détérioration des protéines par la digestion: dans ses études sur les ennemis naturels d'Aedes cantans, SERVICE (1973) a réussi des réactions positives non douteuses avec le procédé très simple du "ring test".

- la question de la spécificité des sérum: CUPP, et IZRAHIM (1963), puis SAITO, TSUJI, HOIYAMA et HAKANO (1975), ont pu distinguer les membres du complexe Culex pipiens par immunodiffusion et immunoelectrophorèse. Cela supposerait une spé-

difficulté au niveau de la sous-espèce, et même, du "type". Les tels résultats paraissent tout de même étonnants.

1-5-2-2: Les précédents travaux basés sur la méthode des sérums: ils utilisent tous le "ring-test": on superpose dans un tube de verre très fin l'antigène (ici les extraits viscéraux de prédateurs supposés contenir la proie) et le sérum qui lui correspond, c'est-à-dire qui contient les anticorps spécifiques. Si la réaction est positive, un mince anneau de précipitation apparaît à l'interface des deux liquides.

- Avantages de ce procédé: il est simple et nécessite un matériel peu coûteux. Il est quantifiable si l'on joue sur la dilution des sérums.

- Inconvénients: les manipulations sont longues et fastidieuses. Elles nécessitent des quantités assez importantes de sérum et d'antigène. SERVICE (1973) consomme 20 microlitres de chaque réactif. En fait, on se demande s'il ne s'agit pas d'une erreur, car il en faut couramment 10 fois plus. Enfin, la lecture est entachée de subjectivité.

Les inconvénients semblent l'emporter sur les avantages, puisqu'en Médecine, le ring-test est à peu près délaissé au profit de procédés plus récents. Ceci, et une tentative malheureuse avec ce test des "anneaux", m'ont conduit à tester une de ces réactions récentes dans le cadre de cette étude.

2- Application du test ELISA:

2-1: Matériel et méthodes:

2-1-1: Récolte des prédateurs:

Du 4-5-78 au 12-8-78, environ 400 insectes aquatiques carnassiers

ont été récoltés, se répartissant dans les catégories suivantes:

- <u>Dytiscides</u> adultes:	130.
- <u>Dytiscides</u> larvaires:	100.
- <u>Notonecta</u> adultes:	10.
- " larvaires:	18;
- <u>Corixa</u> :	40.
- <u>Naucoris</u> :	3.
- <u>Gerris</u> :	13.
- Larves <u>Odonata</u> :	43.
- Larves <u>Trichoptera</u> :	11.
- Larves <u>Ephemeroptera</u> :	24.
- Larves <u>Triturus</u> :	6.

Les insectes (et les tritons), capturés au filet Langeron, étaient placés dans des récipients non pas remplis d'eau, mais garnis d'herbe humide. Le tout était transporté au laboratoire dans une glacière garantissant une température de 10°. Le but cherché était de bloquer la digestion des captifs sans les tuer. De retour à la base, la récolte était placée au congélateur à -20° en attendant la dissection.

2-1-2: Récolte des larves de moustiques:

Au filet Langeron ou à la passoire à thé selon les dimensions de l'habitat. Rapportées dans les mêmes conditions que leurs ennemis, ceci afin de bloquer leur développement.

2-1-3: Préparation des vaccins:

- Manipulation initiale: L'espèce choisie pour cette étude étant Culex pipiens, on a cherché un gîte susceptible d'en fournir un grand nombre d'individus. A Sénart, cette condition est réalisée par de nombreuses ornières de chemin remplies par les pré-

circulations. Il a été utilisé 4g de larves trouvées le 15-6 dans le gîte n° 22 (voir p. 3). On s'est assuré, par l'examen de 30 individus pris au hasard, que l'ornière ne contenait que des larves de Culex pipiens. En fait, il y a probablement eu souillure par du Culex torrentium (voir p. 12), car je n'ai appris l'existence de cette espèce que longtemps après.

Les larves, rincées 2 fois, puis mises à dégorger quelques heures dans l'eau du robinet, ont été conservées au congélateur à -20° du 15-6 au 6-7. Elles ont été broyées au mortier puis incorporées à 20 ml de sérum salé isotonique stérile (1g de broyat pour 5ml de sérum). Entre les 2 utilisations, cette préparation a été conservée à -20°.

- 2° manipulation: le précédent vaccin risquant d'être inutilement agressif, un extrait plus pur a été obtenu comme suit: On a choisi des nymphes, car ainsi, on était certain de ne pas avoir de résidus digestifs. Les nymphes ont été congelées à -80° pendant 30 minutes, réchauffées brusquement à +37°, recongelées à -80°, réchauffées à nouveau. Elles ont été incorporées à du sérum salé isotonique stérile, à raison de 10 nymphes pour 2 ml de sérum, puis broyées par ultra-sons pendant 2 minutes. Le tout a été centrifugé à 4000G pendant 15 minutes, le surnageant a été ensuite extrait à la pipette Pasteur. Entre 2 utilisations, conservation à -20°.

2-1-4: Immunisation des lapins, obtention des sérums:

En tout, 5 lapins ont été vaccinés, tous pesant environ 2,5Kg. Une 1° génération de lapins, que nous appellerons N1, B1 et R1 (pour noir, blanc et roux) a subi les sévices suivants:

- vaccination les 6-7 et 18-7 avec vaccins "de première fournée".

-1-): Attention des extraits viscéraux "étalon":

Dans le but d'étalonner les réactions, on a fait ingérer des repas connus à des carnivores selon le protocole suivant:

prédateurs et proies ont dégorgé dans l'eau du robinet pendant 48 heures. Il s'agissait de:

-prédateurs: 128 Notonecta sp. et 9 Araabus sp. capturés

le 18-8 dans une des mares artificielles de l'ONSTOM à Bondy.

-Proies:

. Culex riviana larves L4 ou L5 prises le 11-8 à

Sénart dans le gîte n° 21.

. Anopheles stephensi et Aedes aegypti, les pre-

mière fournie par l'insectarium de l'ONSTOM, les seconde offerts par le docteur BROUHAÏR de l'Institut Pasteur.

. Larves de Chironomus plumosus achetées dans le com-

merce.

Chaque prédateur a été placé dans un gobelet de plastique transparent, aux 2/3 rempli d'eau du robinet, laissé à température de la pièce (non salon), photopériode naturelle.

16 notonectes ont reçu 5 Culex.

- " 2 " .
- " 5 Anophélos.
- " 2 " .
- " 5 Aedes.
- " 2 " .
- " 5 Chironomus.
- " 2 " .

Aux Araabus, il a été offert 5 Culex.

À la fin des repas, on a sacrifié 2 notonectes de chaque série, et on a recommencé toutes les 5 heures. De même, on a discr-

qué 1 Agabus toutes les 5 heures.

Cette manipulation avait pour but d'apprécier:

- l'impact de la digestion et de l'importance des repas sur l'intensité des réactions immunologiques.

- La spécificité de ces réactions.

Malheureusement, la plaque ELISA concernée semblent avoir connu des fautes de manipulation, comme nous le verrons plus loin.

2-1-6: Préparation des extraits viscéraux:

7 espèces de carnassiers ont été retenues pour les tests définitifs:

- Dytiscus marginalis;
- Colymbetes fuscus;
- Acilius sulcatus;
- Agabus sp.;
- Notonecta sp.;
- Gerris sp.;
- Sympetrum sp. (larves);

Les 4 premiers sont des Coléoptères de la Famille des Dytiscidae, la Notonecte est un Hémiptère de la Famille des Notonectidae. Le Gerris, également un Hémiptère, se range dans la Famille des Gerri-
dae. Enfin, le Genre Sympetrum est de la Famille des Libellulidae. Pour le Gerris, la dissection a compris seulement l'ablation de la tête, des pattes et des élytres. Pour les autres espèces, on a cherché à isoler les viscères eux-mêmes. Ces dissections ont subi la même préparation que les vaccins "purifiés": congélation à -80° pendant 1/2 heure, suivie de réchauffement à +37°, ceci par 2 fois. Puis, incorporation dans du sérum salé isotonique, 5ml pour Dytiscus (insecte de grande taille), 2ml pour les autres. Broyage par ultra-sons, centrifugation à 3000G pendant 1/4 d'heure,

nombreux essais préliminaires. In effet, même en Médecine, la méthode ELISA est loin d'être standardisée, et les manipulations en sont encore parfumées d'empirisme. Malheureusement, le temps m'a manqué, et j'ai été contraint de pratiquer rapidement des réactions, alors même que les résultats des plaques d'essai étaient un peu discordants. In effet, avant de tenter des réactions sur les prédateurs capturés à Sénart, il fallait s'assurer de plusieurs points:

- que les lapins avaient été sensibilisés;
- que les anticorps ainsi obtenus étaient spécifiques de

Culex pipiens;

- que la méthode ELISA était applicable à l'étude de ces Ag et de ces AC;

Il était souhaitable également de choisir pour les réactions définitives le meilleur sérum parmi tous ceux obtenus des 5 lapins.

Dans de telles intentions, 2 plaques d'essais préliminaires ont été composées.

1^o plaque (8-8-78):

Elle comprenait les 8 antigènes suivants:

A = nymphes de Culex pipiens de Sénart (en fait, le vaccin "purifié").

B = nymphes de Culex territans de Sénart .

C = nymphes d'Aedes caspius (ORSTOM).

D = nymphes d'Anopheles stephensi (ORSTOM).

E = larves de Chaoborus crystallinus de Sénart, non dégorgées.

F = viscères de Colymbetes fuscus de Sénart, à jeun.

G = " Graphoderus sp. (Dytiscide) de Sénart, à jeun.

H = petit dytiscide de Sé art, indéterminé; à jeun. Individu entier.

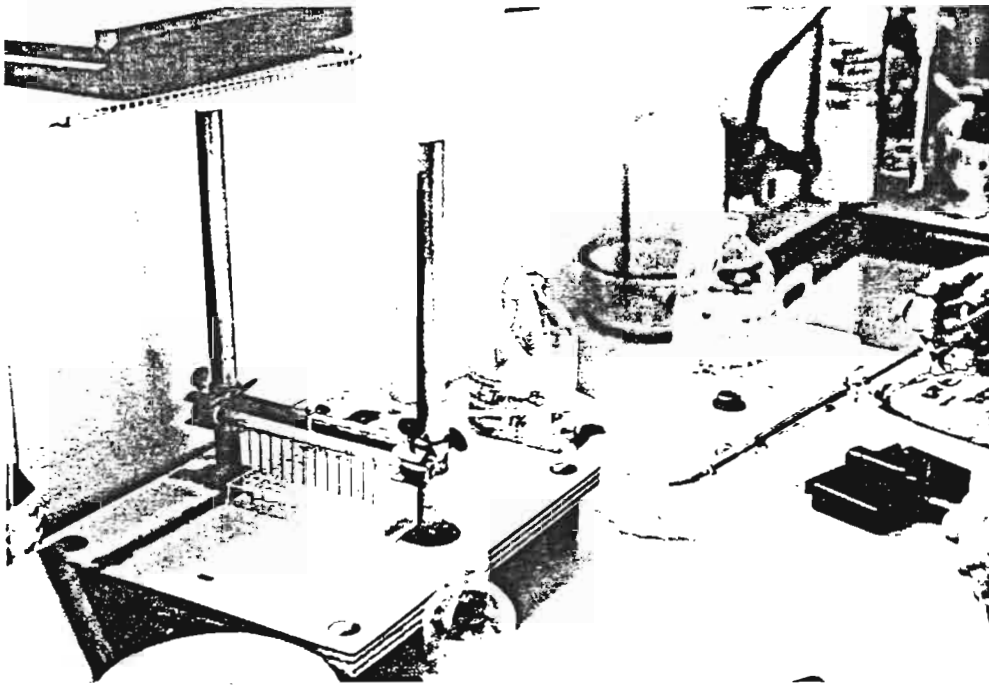


Photo n° :

L'appareil
utilisé
pour rin-
cer les
plaques.

Elle testait les 12 échantillons de sérums suivants:

1 = N1 28-7, 1/10 (sérum du lapin noir n°1, ponctionné le 28-7, utilisé avec une prédilution de 1/10°).

2 = N1 28-7 1/100.

3 = B1 28-7 1/10.

4 = " 1/100.

5 = N1 7-8 1/10.

6 = " 1/100.

7 = N2V 7-8 1/10 (sérum du lapin noir n°2, utilisé avant toute vaccination, donc sans anticorps spécifique: donne le "zéro" de la plaque).

8 = N2V 7-8 1/100.

9 = R1 7-8 1/10.

10 = " 1/100.

11 = B1 7-8 1/10.

12 = " 1/100.

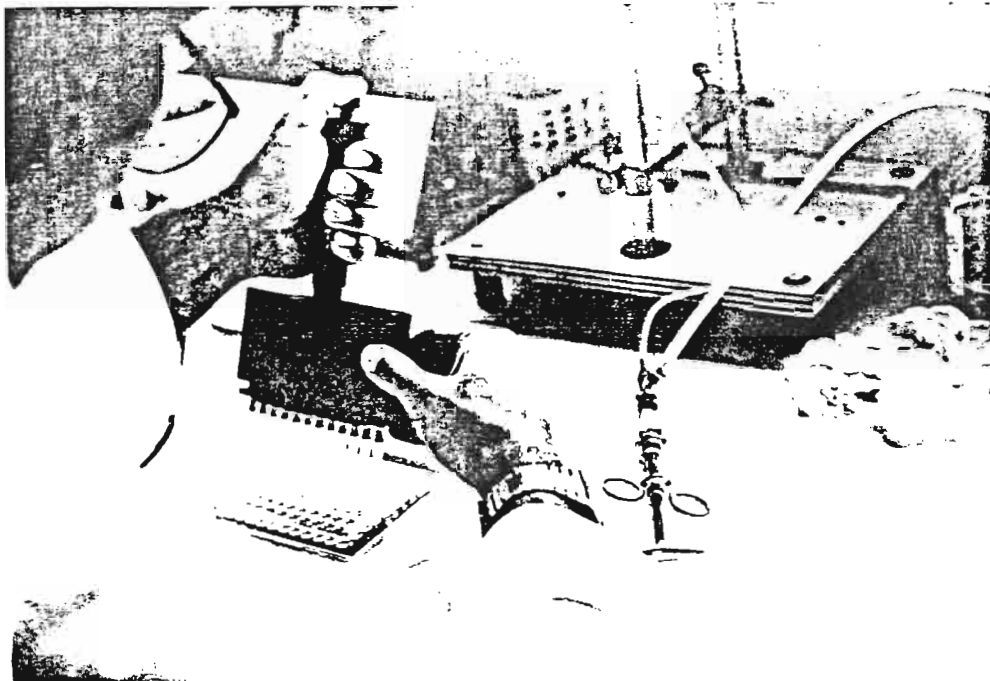


Photo :
 ensemen-
 cement des
 plaques a-
 vec le "ra-
 teau".

Les résultats indiqués sont des densités optiques en unités arbitraires données par le spectrophotomètre. Le chiffre 2000 indique que l'intensité de coloration de la cupule concernée était supérieure à la capacité de lecture de l'appareil.

	A	B	C	D	E	F	G	H
1:	2000	2000	2000	1867	2000	0478	1297	0863
2:	1166	1345	0963	0889	2000	0165	0455	0289
3:	1806	1993	1315	1369	2000	0262	0715	0441
4:	0717	0899	0492	0510	1015	0101	0264	0154
5:	2000	2000	1958	1756	2000	0685	1306	0726
6:	1024	1170	0949	0768	1066	0236	0519	0307
7:	0412	0505	0533	0447	0720	0359	0683	0326
8:	0176	0231	0260	0214	0265	0211	0308	0196
9:	2000	2000	1919	1902	2000	0464	1224	0724
10:	1225	1194	0896	0823	1299	0234	0558	0383
11:	2000	2000	1904	1894	2000	0394	1063	0865
12:	1156	1319	0905	0900	1458	0331	0539	0477

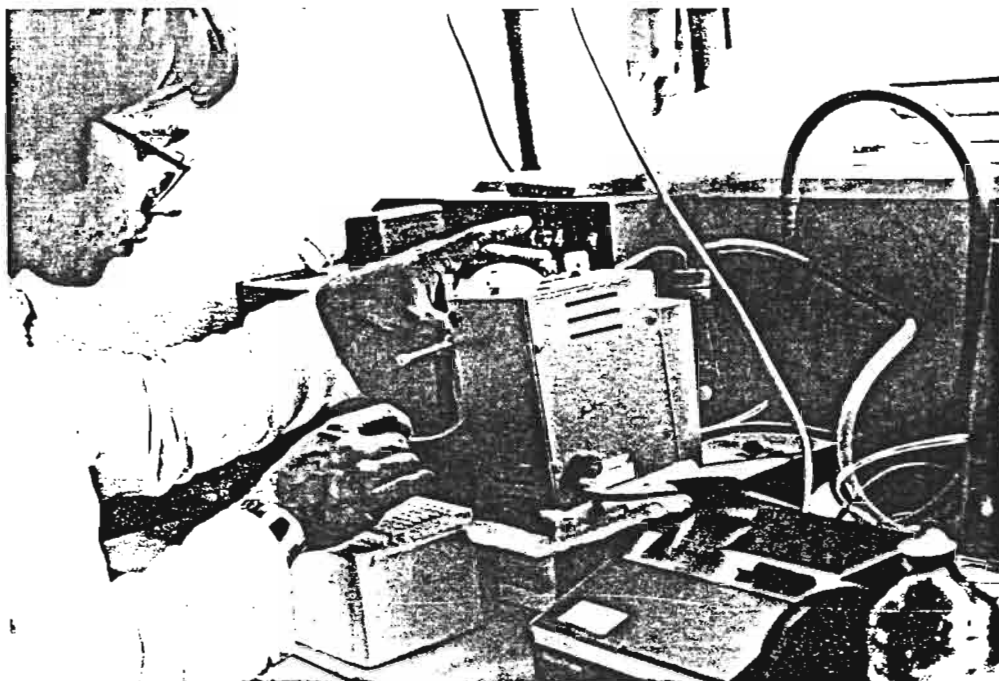


Photo ____ :
lecture des
résultats
au spectro-
photomètre.

Que conclure de cet amas de chiffres?

D'abord, que les réactions pratiquées avec une prédilution du sérum au 1/100° sont mieux lisibles. Par la suite, c'est cette quantité qui a toujours été adoptée.

Ensuite, que l'antigène à base de Culex pipiens n'est pas celui qui donne les plus fortes réactions. En effet, si l'on fait la moyenne, antigène par antigène, de tous les résultats (sauf ceux obtenus avec le sérum vierge de référence), on obtient: (prédilution au 1/100°)

- <u>Culex pipiens</u> :	1057
- <u>Culex territans</u> :	1185
- <u>Aedes caspius</u> :	841
- <u>Anopheles stephensi</u> :	778
- <u>Chaoborus crystallinus</u> :	1233
- Viscères de <u>Colymbetes</u> :	213
- Viscères de <u>Graphoderus</u> :	467
- Petit dytique indéterminé:	321

Photo _____ :

Une plaque
que ELISA
révélée.



On constate que les viscères de prédateurs à jeun réagissent nettement moins fort que les extraits de Culicidés. Cela n'était pas évident a priori, et il importait de le vérifier.

Mais, si le Culex pipiens est plus positif que l'Aedes (lui-même surclassant l'Anopheles), il est par contre un peu inférieur au Culex (neoculex) territans, et assez nettement moins fort que le Chaoborus. On peut extraire quelques rapports:

CP = Culex pipiens; CT = C. territans; AE = Aedes; AN = Anopheles;
CH = Chaoborus.

CP/AN = 1,358. CT/AN = 1,523. AE/AN = 1,080. CH/AN = 1,584.

Deux fautes de conception peuvent peut-être expliquer ces anomalies:

D'abord, pour cette plaque, l'Ag Culex pipiens a subi une manipulation de plus que les autres : s'agissant d'un vaccin, il a été filtré à travers un "millipore" de diamètre 40 microns, (ce raffinement a été utilisé pour une seule journée de vaccin; il s'est révélé inutile par la suite), ce qui risque de retenir un certain

nombre de molécules antigéniques de grande taille.

D'autre part, les larves de Chaoborus (Diptère Nématocère, proche parent des moustiques) sont prédatrices de Culex. Or, celles utilisées pour cette plaque n'avaient pas vidé leur tube digestif. Il est possible qu'elles se soient repues de Culex avant leur capture.

Sur cette plaque, on peut vérifier que les lapins se sont sensibilisés: en comparant les résultats obtenus avec chaque Ag pour le sérum vierge (SV), la moyenne des sérums obtenus le 28-7 (28-7) et la moyenne des sérums ponctionnés le 7-8 (7-8), on lit:

	SV	28-7	7-8	28-7/SV	7-8/SV	7,8/28-7
CP:	0176	0941	1135	5,34	6,44	1,20
CT:	0231	1122	1227	4,85	5,31	1,09
AE:	0260	0727	0916	2,79	3,52	
AN:	0214	0699	0830	3,26	3,87	
CH:	0265	1172	1274	4,42	4,80	1,08
COL:	0211	0133	0267	0,63	1,26	
GRA:	0308	0359	0538	1,16	1,74	
PD:	0196	0221	0389	1,12	1,98	

(COL = Colymbetes; GRA = Graphoderus; PD = petit Dytiscide indéterminé).

Deux faits sont à noter:

D'abord, la sensibilisation aux viscères de prédateurs est très lente, bien moins bonne que pour les Culicides.

Ensuite, la réactivité au Culex pipiens, si elle est faible dans l'absolu, augmente relativement plus vite que les autres. Ceci nous a encouragés à poursuivre les injections de vaccin, dans

l'essai d'accentuer cette à une tendance.

2° place d'essai (29-8):

La lecture s'en annonçait fructueuse. Malheureusement, une panne du spectrophotomètre m'a contraint à une lecture estimée en ce qui concerne la seconde moitié de la plaque. Cette lecture a été faite par un tiers, pour en supprimer l'aspect passionnel.

Les antigènes:

- A = Gulex siriacus : 10 nymphes de Sénart (site n° 21, 29-8).
- B = Aedes aegypti : 10 nymphes ORSTOM.
- C = Anopheles maculipennis : 10 nymphes Sénart (site 21, 29-8).
- D = Cheborus crystallinus : 10 larves dégorées Sénart (site 21, 29-8).
- E = Viscères 1 Notanecta (Marc ORSTOM, Bondy) à jeun depuis 48h.
- F = " " " " " " ayant consommé 2 larves de Gulex siriacus (elles-mêmes à jeun) 1h avant.
- G = Acilius à jeun depuis 48h: viscères (Sénart, 29-8, site 21).
- H = Acilius même provenance, ayant consommé 2 larves L4 de Gulex siriacus 1h avant.

Les sérums:

- 1 et 2: N2V (lapin noir n° 2 avant vaccination).
- 3: N1 7-8.
- 4: N1 17-8.
- 5: N1 29-8.
- 6: B1 7-8.
- 7: B1 17-8.
- 8: B1 7-8.
- 9: B1 17-8.
- 10: B1 29-8.

11 = N2 29-8 ("2^e génération" de lapins, vaccinés les 8-8 et 18-8, uniquement avec l'extrait purifié).

Les résultats ne concernent que Culex, Aedes et Anopheles. Après cela, l'appareil de lecture a rendu l'âme.

	A	B	C
1:	0389	0457	0557
2:	0342	0267	0414
3:	2000	1917	1765
4:	2000	2000	1651
5:	1835	1484	0925
6:	2000	2000	1571
7:	2000	1356	0896
8:	2000	2000	1439
9:	2000	1907	1344
10:	2000	1899	1243
11:	0665	0414	0522
12:	0660	0414	0517

Moyenne des Culex tous sérums confondus (sauf sérum vierge):
1716. $CP/AN = 1,44$

Moyenne des Aedes (AE): 1539. $AE/AN = 1,29$

Moyenne des Anopheles: (AN): 1187.

Les sérums 11 et 12 (N2 et R2) paraissent insuffisamment sensibilisés après 2 injections de vaccin. En considérant les résultats obtenus avec les autres sérums, on peut suivre l'immunisation progressive:

7-6 = moyenne des sérums du 7-8; etc.

	7-8	17-8	29-8
CP:	2000	2000	1917
AE:	1917	1754	1691
AN:	1591	1297	1084
CP/AN:	1,25	1,54	1,76
AE/AN:	1,20	1,35	1,55

Les sérums perdent de leur force dans l'absolu: le vaccin "purifié" paraît moins immunisant que l'extrait grossier employé primitivement. Par contre, l'immunisation envers Culex tritaeniorhynchus croît relativement plus vite que celles concernant ses cousins Aedes et Anopheles. Autrement dit, les sérums sont de plus en plus spécifiques.

Quant aux autres antigènes testés sur cette plaque, il apparaissait nettement que les viscères de prédateurs repus étaient plus positifs que les "étalons" à jeun. Mais la défaillance malencontreuse du spectrophotomètre a empêché de chiffrer cette différence. Le temps venant à manquer, il m'a fallu interrompre là les essais préliminaires pour entrer, trop hâtivement à mon goût, dans le vif du sujet.

Plaquas définitives:

Comme il a été dit plus haut, 7 prédateurs ont été testés. Pour chacun d'eux, on a pris comme étalons:

- viscères d'un individu à jeun testés avec du sérum vierge;
- " du même testés avec le sérum choisi pour toutes les réactions = N1 du 29-8.

Chaque test a été doublé, et on a fait la moyenne des 2 lectu-

res. (résultat 1). On a fait ensuite le quotient de 1 par le résultat obtenu sur le prédateur de la même espèce testé avec le sérum N° 29-8, = résultat 2. Enfin, on a fait la différence du résultat 2 avec +1, = résultat 3.



Le 1° prédateur testé a été:
Acilius sulcatus (photo ci-contre), Iyctis-
 cide de taille moyenne, aisément reconnaissable, abondant à

Sénart.

n° ELISA	Référ.	1	2	3
A 1-2	X7	0499	0,819	-181
<u>A 3-4</u>	X7	0499	1,000	0
A 5-6	Y2	0698	1,318	+318
A 7-8	1A	0369	0,731	-269
A 9-10	2A	0676	1,254	+254
A 11-12	3A	0353	0,707	-293
B 1-2	4A	0480	0,961	-039
B 3-4	5A	0403	0,807	-193
B 5-6	6A	0304	0,609	-391

B 7-8	7A	0317	0,635	-365
B 9-10	8A	0334	0,669	-331
B 11-12	9A	0282	0,565	-435
C 1-2	22A	0799	1,601	<u>+601</u>
C 3-4	23A	0511	1,024	+024
C 5-6	24A	0374	0,749	-251
C 7-8	3C	0353	0,707	-293
C 9-10	4C	0542	1,086	+086
C 11-12	5C	0688	1,378	+378
D 1-2	19C	0573	1,148	+148

Cette plaque n° 1 a été faite le 31-8. Le seul résultat assez nettement positif concerne l'individu 22A, trouvé le 20-8 dans le gîte 21. Je me garderai bien de conclure que l'Acilius est un médiocre prédateur de Culex !

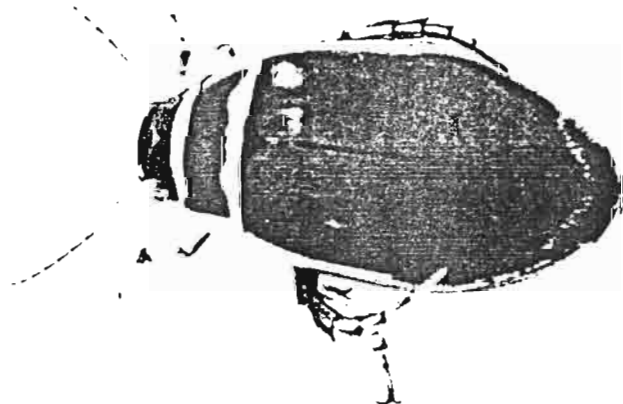


Le Dytiscide testé ensuite (sur la même plaque) a été Colymbetes fuscus (photo ci-dessus), insecte de taille et de moeurs proches

de celles de Blattellus.

n° BLISSA	NO. d'inv.	1	2	3 (x1000)
D 3-4	X6	0479	1,069	+069
<u>D 5-6</u>	X6	0448	1,000	0
D 7-8	10A	0371	0,623	-172
D 9-10	11A	0391	0,872	-128
D 11-12	12A	0272	0,607	-393
E 1-2	13A	1890	4,123	+ <u>3129</u>
E 3-4	14A	1671	3,729	+ <u>2729</u>
E 5-6	15A	1327	2,962	+ <u>1962</u>
E 7-8	16A	0708	2,076	+ <u>1076</u>
E 9-10	17A	0781	1,743	+ <u>743</u>
E 11-12	18A	1379	3,075	+ <u>1075</u>
F 1-2	19A	1404	3,767	+ <u>2767</u>
F 3-4	21A	0488	1,089	+089
F 5-6	18B	0550	1,183	+183

Les individus 13A à 19A sont très fortement positifs. Ils ont tous été capturés dans le gîte 21 le 12-8.



L'espèce suivante est Dytiscus marginalis, bel insecte de forte taille (3cm de long). Il n'est pas fréquent dans les petites collections temporaires. Par contre, dans les gîtes pérennes, il est abondant à Sénart. Il est représenté sur la photo de la page précédente. Il a été testé sur la même plaque que les 2 précédents.

n° ELISA	Référ.	1	2	3X1000
F 7-8	X8	0321	0,398	-602
<u>F 9-10</u>	X8	0806	1,000	0
F 11-12	20A	0793	0,923	-017
G 1-2	29B	0830	1,029	+029
G 3-4	30B	0501	0,621	-379
G 5-6	1C	1239	1,537	<u>+537</u>
G 7-8	2C	0784	0,972	-028

Tous les spécimens viennent du gîte 21 (12-8). Une seule positivité, médiocre, celle de 1C. Il faut souligner que, lors de la dissection, tous ces insectes sont apparus franchement gavés par rapport à l'étalon à jeun X8.

L'insecte suivant est Gerris sp., curieux Hémiptère se déplaçant à la surface de l'eau sans jamais plonger. A Sénart comme ailleurs, il colonise rapidement la moindre ornière. Testé sur la même plaque que les 3 précédents.

n° ELISA	Référ.	1	2	3X1000
G 9-10	X11	0424	0,296	-704
G 11-12	X11	1430	1,000	0
H 1-2	18B	1494	1,044	+044
H 3-4	19B	1395	0,975	-025
H 5-6	20B	1802	1,260	+260

H 7-8	21B	1175	0,70	-185
H 9-10	22B	1155	0,723	-207
H 11-12	23B	1205	0,827	-103

Un fait saillant est à noter: la réaction G 11-12 (Gerris à jeun + sérum sensibilisé) est très fortement positive par rapport à la précédente (le même + sérum vierge). Autrement dit, le sérum anti-Culex a nettement réagi avec les Ag du Gerris. Cela montre combien il a été utile de prendre dans cette étude un "étalon" à jeun pour chaque espèce testée. Rappelons que dans le cas du Gerris, la dissection a été sommaire (ablation de la tête, des pattes, des élytres). Sinon, on ne constate ici aucune réaction positive par rapport à G 11-12.

Comme il a été dit plus haut, la plaque portant les résultats de l'expérience de prédation avec Habonecta sp. s'est montrée fortement discordante, en total désaccord par exemple avec les données de la plaque d'essai n° 2. Il est possible que je me sois simplement trompé de godet (l'opération de remplissage est fastidieuse et complexe, du moins si l'on veut obtenir un grand nombre de réactions différentes par plaques: il est théoriquement possible d'en avoir 96). Tous les résultats se sont alors trouvés décalés.

L'insecte suivant est A-siur sp. , genre de lyticide extrêmement abondant partout. Les différentes espèces sont délicates à distinguer entre elles.

Plaque n° 2. Agabus sp.

n° ELISA	Référ.	1	2	3X1000
E 9-10	X9	0306	0,505	-495
<u>E 11-12</u>	X9	0605	1,000	0
F1-2	X3	0429	0,709	-291
F 3-4	3A	0337	0,557	-443
F 5-6	1B	0298	0,492	-508
F 7-8	2B	0240	0,396	-604
F 9-10	3B	0710	1,173	+173
F 11-12	4B	0640	1,057	+057
G1-2	5B	0679	1,122	+122
G 3-4	6B	0628	1,038	+038
G 5-6	7B	0383	0,633	-367
G 7-8	8B	0457	0,755	-245
G 9-10	9B	0944	1,560	<u>+560</u>
G 11-12	23C	1181	1,952	<u>+952</u>
H 1-2	24C	0700	1,157	+157
H 3-4	25C	1073	1,773	<u>+773</u>
H 5-6	26C	1242	2,052	<u>+1052</u>
H 7-8	27C	0610	1,008	+008

Plaque n° 3 Agabus sp.

A 1-2	X9	0262	0,399	-601
<u>A 3-4</u>	X9	0656	1,000	0
A 5-6	30C	1248	1,902	<u>+902</u>
A 7-8	1D	1125	1,714	<u>+714</u>
A 9-10	2D	1218	1,857	<u>+857</u>
A 11-12	3D	0363	0,554	-446

Arabus sp. (suite de la plaque n° 3):

B 1-2	4D	1490	2,271	<u>+1271</u>
B 3-4	5D	0851	1,297	+297
B 5-6	6D	0340	0,518	-482
B 7-8	7D	0395	0,602	-398
B 9-10	8D	0977	1,489	+489
B 11-12	9D	0945	1,441	+441
C 1-2	10D	0551	0,853	-161
C 3-4	11D	1291	1,967	<u>+967</u>
C 5-6	12D	1086	1,655	<u>+655</u>
C 7-8	13D	0953	1,452	+452
C 9-10	14D	0863	1,316	+316
C 11-12	15D	0650	0,990	-010
D 1-2	16D	1254	1,912	<u>+912</u>
D 3-4	17D	1005	1,532	<u>+532</u>
D 5-6	19D	0857	1,047	+047
D 7-8	20D	0507	0,772	-228
D 9-10	21D	0588	0,896	-104
D 11-12	22D	0629	0,959	-041
E 1-2	23D	1961	2,990	<u>+1990</u>
E 3-4	24D	1150	1,753	<u>+753</u>
E 5-6	25D	2000	3,048	<u>+2048</u>

Il y a 2 remarques à faire:

- les positivités sont assez nombreuses, parfois très fortes. Tous ces insectes ont été pêchés dans le gîte 21 (constamment riche en Culex pipiens) les 15-6, 12-8, 20-8.

- Il y a bonne concordance, pour un même spécimen (X9),

entre les plaques 2 et 3.

Les derniers essais concernent la larve de Sympetrum. Comme ses proches parentes, les Libellula, cette larve se tient plus ou moins enfouie dans les fonds bourbeux des mares. A Sénart, elle est commune dans les ornières plus ou moins pérennes à fond très argileux. Tests faits sur la plaque n° 3.

E 7-8	X5	0288	0,325	-675
<u>E 9-10</u>	X5	0886	1,000	0
E 11-12	10B	0629	0,710	-290
F 1-2	11B	0861	0,972	-028
F 3-4	12B	1690	1,908	+908
F 5-6	13B	1296	1,462	+462
F 7-8	14B	1228	1,386	+386
F 9-10	15B	0824	0,830	-20
F 11-12	16B	1225	1,383	+383
G 1-2	6C	0844	0,953	-047
G 3-4	7C	1067	1,204	+204
G 5-6	8C	1218	1,374	+374
G 7-8	9C	1109	1,251	+251
G 9-10	10C	0980	1,106	+106
G 11-12	11C	0531	0,599	-401
H 1-2	12C	0656	0,740	-260
H 3-4	13C	1166	1,316	+316
H 5-6	14C	0821	0,926	-074
H 7-8	15C	1458	1,645	+645
H 9-10	16C	0612	0,691	+309
H 11-12	17C	0667	0,752	-248

44

2 réactions nettement positives seulement: 12B (gîte 21, 20-8),
15C (gîte 18, 11-6).

Conclusions générales sur ces tests:

1- Les faits sûrs:

- Les lapins se sensibilisent.
- Il y a une certaine spécificité, au moins quantitative.
- Les tests ELISA sont applicables à de tels antigènes.

2- Avantages d'ELISA par rapport au ring-test:

Les mêmes dans le cadre de telles recherches qu'en Médecine:

- Emploi de quantités minimales de réactifs. Ainsi, dans la présente étude, chaque prédateur aurait pu être testé 200 fois.
- Sensibilité très supérieure.
- Standardisation plus aisée.

3- Perfectionnements à apporter:

- Adsorption des sérums pour augmenter leur spécificité.
- Recherche par tâtonnements des meilleures dilutions possibles.
- Meilleure standardisation:
 - : des dissections de prédateurs.
 - . des préparations de vaccins et d'antigènes.

4- Protocoles possibles pour de prochains tests:

- Dans l'étude de tel gîte, procéder toujours à un inventaire faunistique préalable pour déterminer les proies potentielles.
- Tester les prédateurs contre une batterie de sérums, dirigés contre les principales proies trouvées dans le gîte. Ainsi,

par recouplements, on pourra arriver à des conclusions plus sûres.

- toujours comparer ces échantillons de terrain à des étalons obtenus au laboratoire.

Actuellement, l'analyse immunologique des repas de prédateurs pié-
tinne. La méthode ELISA augmente les possibilités théoriques de tel-
les recherches. Mais il faudra encore d'autres tâtonnements que
ceux-ci pour passer de la théorie à la pratique.

BIBLIOGRAPHIE.

BACHELIER (G), COMBEAU (A) 1966.

Dynamique saisonnière de deux sols en climat tempéré.
Recherche coopérative sur programme du CNRS.

BAY (FC) 1974.

Predator-prey relationship among aquatic insects.
Ann. Rev. Ent. 19 : 441-454.

BERTRAND (H) 1954.

Les Insectes aquatiques d'Europe.
Lechevalier Ed. Paris.

CUTRINS (RW) 1973.

Trophic relations of aquatic insects.
Ann. Rev. Ent. 18: 183-206.

CUPP (EW) & IBRAHIM (AN) 1973.

Identification of members of the Culex pinians complex by
immunodiffusion and immunoelectrophoresis.
J. med. Ent. 10: 277-281.

EL SAYAH (EA) 1973.

Dragonfly nymphs as active predators of mosquito larvae.
Entom. News 55: 229-230.

GARCIA (R), VOIGT (WG) & DES ROCHERS (BS) 1974.

Studies of the predatory behavior of notonectids on mosquito
larvae.

Proc. Pap. 42nd ann. Conf. Calif. Mosquito Control Ass.: 64-69.

HALL(RR), DOWNE (AER), MAC LELLAN (CR) & WEST (AS) 1953.

Evaluation of insect predator-prey relationship by precipitation test studies.

Mosq. News 13: 199-204.

HAZELRIGG (J) 1974.

Notonecta unifasciata as predators of mosquito larvae in simulated field habitats.

Proc. Pap. 42nd ann. Conf. Calif. Mosquito Control Ass.: 60.

HAZELRIGG (J) 1976.

Laboratory rate of predation of separate and mixed sexes of adult Notonecta unifasciata on fourth-instar larvae of Culex pens.

Proc. Pap. 44th ann. Conf. Calif. Mosq. Cont. Ass. 57-59.

JAMES (HG) 1961 .

Some predators of Aedes stimulans (Walk) and Aedes trichurus (Dyar) in woodland pools.

Can. J. Zool. 39: 533-540.

JAMES (HG) 1965.

Predators of Aedes atropalpus (Coq.) and of other mosquitoes breeding in rockpools in Ontario.

Can. J. Zool. 43: 155-159.

JAMES (HG) 1966.

Location of univoltine Aedes eggs in woodland pool areas and experimental exposure to predators.

Mosq. News 26: 59-63.

LIE (S) 1967.

Laboratory observations on certain mosquito predators.

Mosc. News, 27: 352-358.

NELSON (JRS) 1977.

Predation on mosquito larvae by beetle larvae Hydrophilus trien-
gularis and Byticus marginalis.

Mosc. News 37: 628-630.

SAITO (S), TSUJI (M), MOJIYAMA (N) & NAKANO (M) 1975.

Comparative studies of the adults of Culex pipiens complex
by immunoelectrophoresis.

Japan J. sanit. Zool. 26: 139-143.

SERVA-BOEIO (B.) 1977.

Ecologie des mares et flaques.

Biologie-géologie, Grenoble n° 43: 1-36.

SERVICE (MW) 1965.

Predators of the immature stages of Aedes (Stegomyia) vittatus
(Bigot) in water-filled rockpools in Northern Nigeria.

WHO/PBL/33 64: 1-19.

SERVICE (MW) 1973.

Study of the natural predators of Aedes cantans (Meigen) using
the precipitin test.

J. med. Ent. 10: 503-510.

WASHINO (FR) 1969.

Predator prey studies in relation to an integrated mosquito
control program. A progress report.

Proc. Rep. 24th. Conf. Calif. Mosq. Cont. Ass. 36th. 36: 33-34.