O. C. C. G. E.
Institut de Recherches
sur la Trypanosomiase
et l' Onchocercose

O. M. S.
Programme Spécial de
Recherches et de Formation
concernant les maladies tropicales

EVALUATION DES FORMULATIONS EXPERIMENTALES ET COMMERCIALES A BASE DE BACTERIES ENTOMOPATHOGENES UTILISABLES CONTRE LES LARVES DES VECTEURS D'ONCHOCERCOSE HUMAINE EN AFRIQUE INTERTROPICALE

RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITES 1980

par

P. GUILLET *, H. ESCAFFRE ** et J.M. PRUD'HOM **

N° 2/ONCHO/RAP/81

* Entomologiste médical de l'ORSTOM

** Technicien d'Entomologie médicale de l'ORSTOM - OCCGE - Institut de Recherches sur la Trypanosomiase et l'Onchocercose - B.P. 1500 - BOUAKE (Côte d'Ivoire)

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire
N° : 28423
Cote : B

1. INTRODUCTION

Le présent rapport fait la synthèse des résultats acquis en 1980 dans le cadre de la convention de recherches passée entre l'OCCGE/IRTO et l'OMS/TDR. Cette convention concerne l'évaluation des formulations expérimentales et commerciales à base de bactéries entomopathogènes utilisables contre les larves des vecteurs d'onchocercose humaine en Afrique intertropicale. Quelques recherches moins directement appliquées ont également été entreprises dans le cadre de cette convention.

Un rapport de travail a été fourni au Programme Spécial en juin 1980. Ce rapport (27 pages, 22 tableaux) bien que non référencé, contenait les résultats d'évaluation des 7 formulations expérimentales de *B. thuringiensis* H 14 confiées à l'IRTO, de la poudre primaire de *B. sphaericus* 1593, ainsi que des données complémentaires concernant les points suivants :

- relation entre la durée de mise en observation après traitement et la mortalité des larves de *S. damnosum s.l.* ;
- relation entre le titre biologique exprimé en unités internationales *A. aegypti* et la toxicité vis à vis des larves de *S. damnosum* ;
- relation entre la taille des particules, leur consistance et leur ingestion par les larves de *S. damnosum s.l.* ;
- relation entre la taille des particules et l'efficacité des formulations.

Ces deux derniers points, bien que n'entrant pas directement dans le cadre de cette convention, avaient été exposés dans la mesure où il s'agissait de formulations de *B. thuringiensis* H 14 mais ne seront pas repris dans le présent rapport. Des données complémentaires ont été acquises au cours du 2ème semestre 1980 concernant notamment, pour diverses formulations de *B. thuringiensis* H 14, la relation entre le temps de contact et l'efficacité, ainsi que leur influence sur le rythme de nutrition des larves au cours du traitement. Ces résultats feront l'objet d'un rapport différent.

.../...

Nous reprendrons dans le présent rapport les conclusions du précédent qui seront rediscutées à la lumière des résultats acquis depuis juin 1980.

2. EVALUATION DE LA TOXICITE DU *B. SPHAERICUS* .. SOUCHE 1593 A L'EGARD DES LARVES DU COMPLEXE *S. DAMNOSUM*

Nous avions testé une poudre primaire fournie par les laboratoires Abbott et mis en évidence la toxicité pratiquement nulle de ce produit à l'égard des larves du complexe *S. damnosum* (respectivement 4,1 % et 24,8 % de mortalité à 10 et 40 mg/l pendant 10 mn avec lecture à 24 heures).

Afin de confirmer ces résultats et de mettre éventuellement en évidence une augmentation significative de la mortalité 48 heures ou 72 heures après le traitement, ou encore l'influence du temps de contact, nous avons testé à nouveau le même dosage de 40 ppm/10 mn respectivement en 10, 20 et 40 mn de contact et contrôlé la mortalité après 24 heures, 48 heures et 72 heures.

Les résultats obtenus, présentés dans le tableau n° 1 nous permettent de confirmer la toxicité nulle de ce produit à l'égard des larves du complexe *S. damnosum*. Les résultats ne varient pas significativement que le temps de contact soit de 10 mn, 20 mn ou 40 mn et que la lecture se fasse au bout de 24 heures, 48 heures ou 72 heures. Dans tous les cas, la mortalité des lots traités a été inférieure à la dérive du lot témoin. Les jeunes larves (stades 1 à 3) sont probablement plus sensibles que les larves âgées mais il est difficile dans ce type d'évaluation de le mettre en évidence du fait de la dérive dans les gouttières témoins.

Nous ne pouvons cependant conclure définitivement à la non toxicité de la souche 1593 à l'égard des larves du complexe *S. damnosum* ; en effet nous avons mis en évidence chez *S. damnosum* (cf. § 3) l'influence du mode de préparation des poudres sur leur toxicité. Il serait bon donc de tester au préalable d'autres poudres primaires. Nous devons également tester d'autres souches de *B. sphaericus* gardant présent à l'esprit que la toxicité des souches vis-à-vis des larves de *Culicidae*, notamment *C. quinquefasciatus* ne laisse peut être rien présager de leur toxicité vis à vis des larves de

.../...

Simuliidae en général et *S. damnosum s.l.* en particulier. A cet effet, trois souches de *B. sphaericus* envoyées par le Dr. SINGER (Western Illinois University) vont nous parvenir prochainement et seront évaluées au laboratoire et sur le terrain contre les larves du complexe *S. damnosum*.

		Stades 1 à 3	Stades 4 et 5	Stades 6 et 7	Tous stades	% de nymphose
10 ppm / 40mm	24 h	33,3 % (27)	1,8 % (167)	0,64 % (472)	2,2 % (666)	1,1 %
	48 h	37	3,6	1,1	3,1	12,7
	72 h	44,4	3,6	1,3	3,6	23,5
20 ppm / 20mm	24 h	12,8 (39)	1,6 (123)	0,8 (370)	1,9 (532)	2,2
	48 h	17,9	5,7	0,8	3,2	10,3
	72 h	20,5	6,5	1,1	3,7	14,6
40 ppm / 10mm	24 h	29,5 (44)	5,1 (156)	0,2 (458)	3,3 (658)	0,9
	48 h	38,6	6,4	0,6	4,5	5,5
	72 h	43,1	7,7	1,1	5,5	12,9
0	24 h	42,4 (33)	10,9 (119)	0,4 (271)	6,6 (423)	2,2
	48 h	45,5	12,6	1,1	7,8	9,9
	72 h	48,5	16,8	2,2	9,9	16,2

Tableau n° 1 : % de mortalité (exprimés en % cumulés) des larves de *S. damnosum s.l.* exposées à une même dose de *B. sphaericus* 1593 en 10', 20', et 40mm (région de Touba, espèces savanicoles dominantes) (entre parenthèses : nombre de larves testées).

3. RELATION ENTRE LES SOUCHES DE *B. THURINGIENSIS* H 14, LEUR TITRE *A. AEGYPTI* ET LEUR TOXICITE A L'EGARD DES LARVES DE SIMULIES

Lors d'une étude préliminaire présentée dans le précédent rapport, nous avons conclu qu'il n'y avait apparemment pas de relation entre les titres biologiques exprimés en unités internationales *A. aegypti* et la toxicité vis-

.../...

à-vis des larves du complexe *S. damnosum*. Devant l'aspect contradictoire des résultats obtenus, nous avons entrepris une étude plus complète qui sera bientôt achevée, en testant simultanément 9 poudres primaires sur *A. aegypti*, *S. squamosum* (espèce forestière du complexe *S. damnosum*) et *S. hargreavesi* (groupe *medusaeforme*).

3.1. Méthodologie

La méthodologie concernant les tests sur larves de simulies a déjà été exposée dans le précédent rapport (dispositif de Colbo et Thompson, 200 t/mn, nourriture Tetra 10 ppm six heures après introduction du *B. thuringiensis* H 14). Toutefois, nous avons utilisé le mode de dilution des poudres proposé par l'OMS (200 mg/5 ml d'eau distillée et vortex trois minutes). Cette même méthode est appliquée *in extenso* pour tester les larves d'*A. aegypti* (notons que nous utilisons la souche Koro/Haute-Volta localement disponible). Nous avons effectué 3 à 4 répliques de 50 larves chacune dans les tests sur larves de simulies. Dans le cas des larves d'*A. aegypti*, nous avons effectué successivement 2 séries de tests comprenant 4 concentrations et 4 répliques par concentration soit en tout 200 larves par concentration.

3.2. Matériel testé

B. thuringiensis H 14 : 9 poudres primaires ont été testées dont 7 lyophilisats (RB1 à RB7) et deux poudres obtenues par un moyen de déshydratation tout à fait différent couvert par le secret de fabrication (R 153/78 et Bt B1 45). Les souches à l'origine de ces différentes poudres sont mentionnées dans le tableau n° 3.

A. aegypti : larves de quatrième stade jeunes, souche Koro (Haute-Volta).

S. damnosum s.l. : larves stades 5 à 7 de *S. damnosum* provenant du M'pedo (Sud Côte d'Ivoire) et mises en élevage à l'IRTO de Bouaké.

S. hargreavesi ; groupe *medusaeforme*, larves stades 5 à 7 provenant de gîtes péri-urbains (Bouaké) et testées immédiatement après leur collecte.

.../...

	Titre Roger Bellon	Titre IRTO
IPS/78	-	-
RB 1	14.500	6.871
RB 2	7.000	5.469
RB 3	11.000	en cours
RB 4	4.400	en cours
RB 5	12.500	8.645
RB 6	6.200	10.720
RB 7	7.200	en cours
Bt B1 45	8.780	9.925
R 153/78	3.500	3.080

Tableau n° 2 : Comparaison entre les titres *A. aegypti* communiqués par la Firme Roger Bellon et les titres obtenus à l'IRTO de Bouaké avec différentes poudres de *B. thuringiensis* H 14.

		Titres biologiques		
Préparation	Souche	*A.aegypti* (IRTO)	*S. damnosum s.l.*	*S. hargreavesi s.l.*
RB 1	W1.00	6.871	10.142	8.578
RB 2	W1.00	5.469	10.142	6.520
RB 3	WI.36			8.443
RB 4	W1.36			7.169
RB 5	1884	8.645	12.814	15.098
RB 6	1884	10.720	17.151	18.899
RB 7	H14-21			3.920
R 153/78	W1.36	3.080	1.267	1.752
Bt B1 45	1884	9.925		8.110

Tableau n°3 : Titrage biologique de diverses poudres primaires de *B. thuringiensis* H 14 sur les larves d'*A. aegypti*, *S.damnosum s.l.* et *S. hargeavesi*.

3.3. Résultats

On constate, au niveau des titres *A. aegypti* (tableau n° 2) des différences importantes entre les titres obtenus à l'IRTO et ceux communiqués par les Laboratoires Roger Bellon. L'éventail des titres obtenus à l'IRTO est plus resserré et le classement par unité de titre est sensiblement différent.

Les résultats des titrages sur larves de simulies sont présentés dans les tableaux 3 et 4 (les résultats détaillés des tests sont présentés en annexe, tableaux A1 à A23) , et sur les graphiques I à III.

	A. aegypti (IRTO)	*S. damnosum s.l.*	*S. hargreavesi s.l.*
RB 1	0,039 mg/l	0,014 mg/l	0,019 mg/l
RB 2	0,049	0,014	0,025
RB 3			0,013
RB 4			0,015
RB 5	0,031	0,0087	0,009
RB 6	0,025	0,0065	0,0072
RB 7			0,029
R 153/78	0,087	0,11	0,093
Bt B1 45	0,027		0,014
IPS/78 *	0,27	0,11 - 0,14	0,11-0,11-0,13-0,16

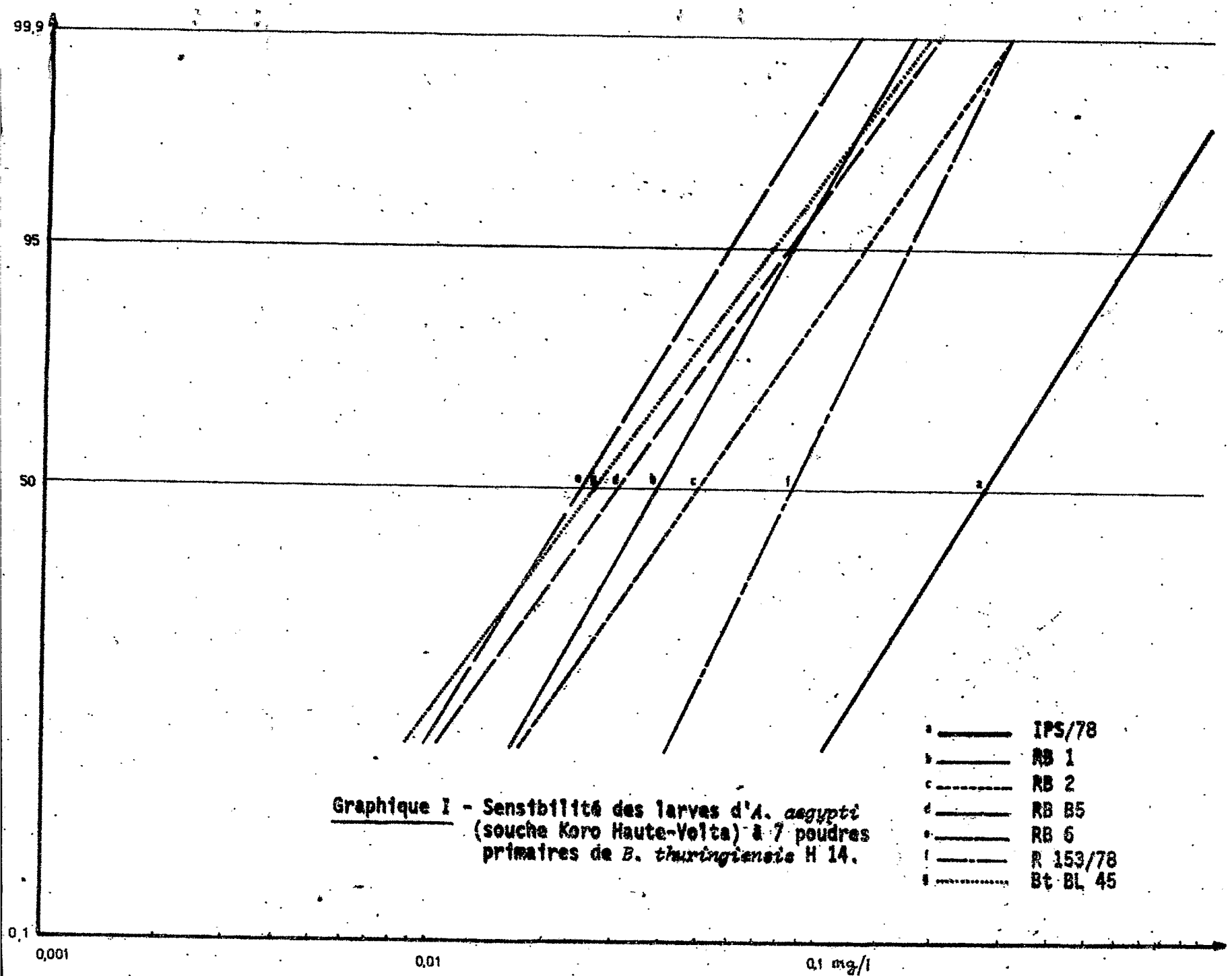
Tableau n°4 : Répartition des CL 50 exprimées en mg/l observées simultanément sur *A. aegypti*, *S. damnosum s.l.* et *S. hargreavesi*.

* Les différents chiffres représentent les CL 50 obtenues au cours des différents titrages successifs.

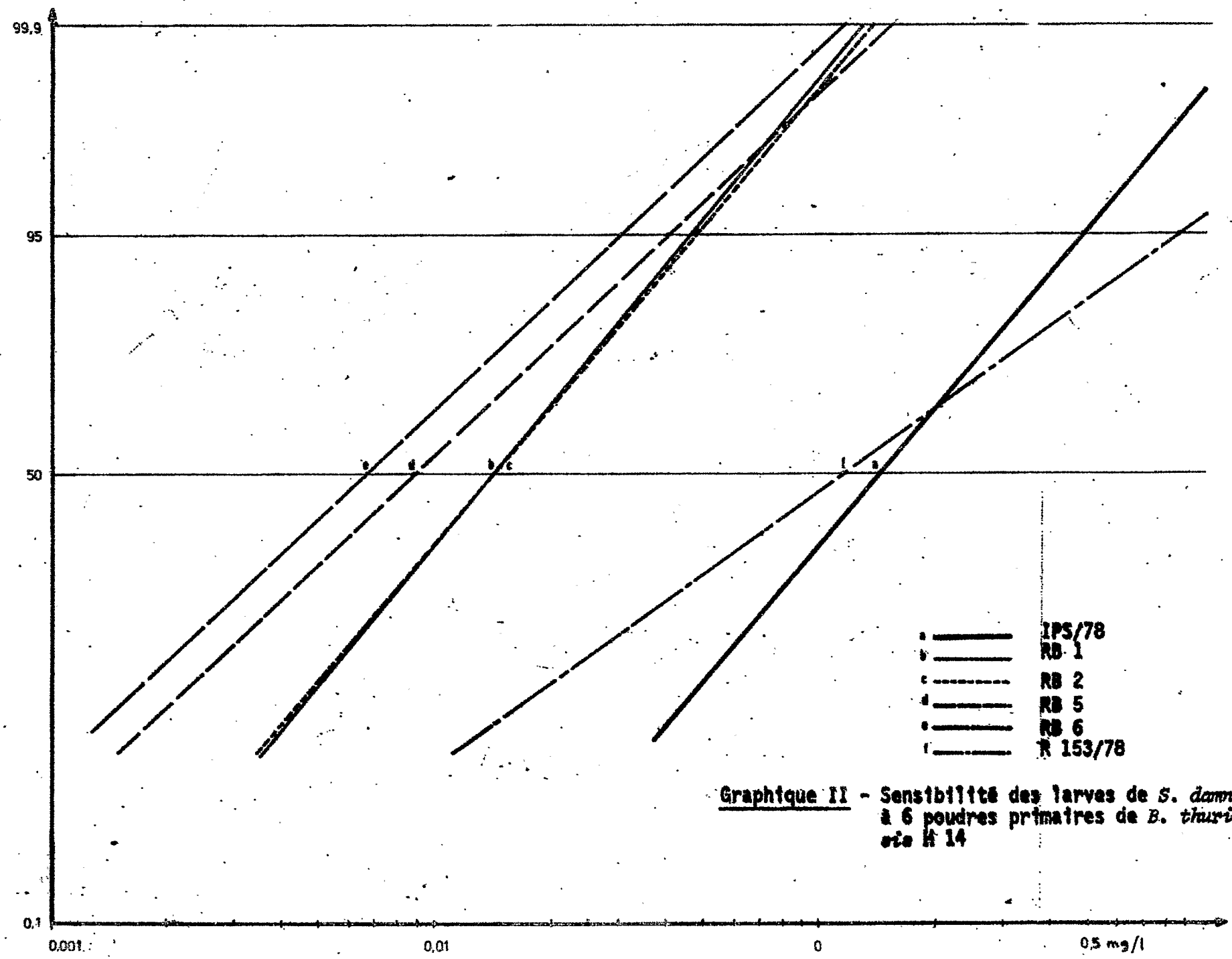
3.4. Discussion - Conclusion

Nous remarquons, dans un premier temps, qu'il existe une correspondance pratiquement parfaite dans le classement des titres observés sur *A. aegypti*, *S. damnosum s.l.* et *S. hargreavesi* (tableau n° 5), sauf pour

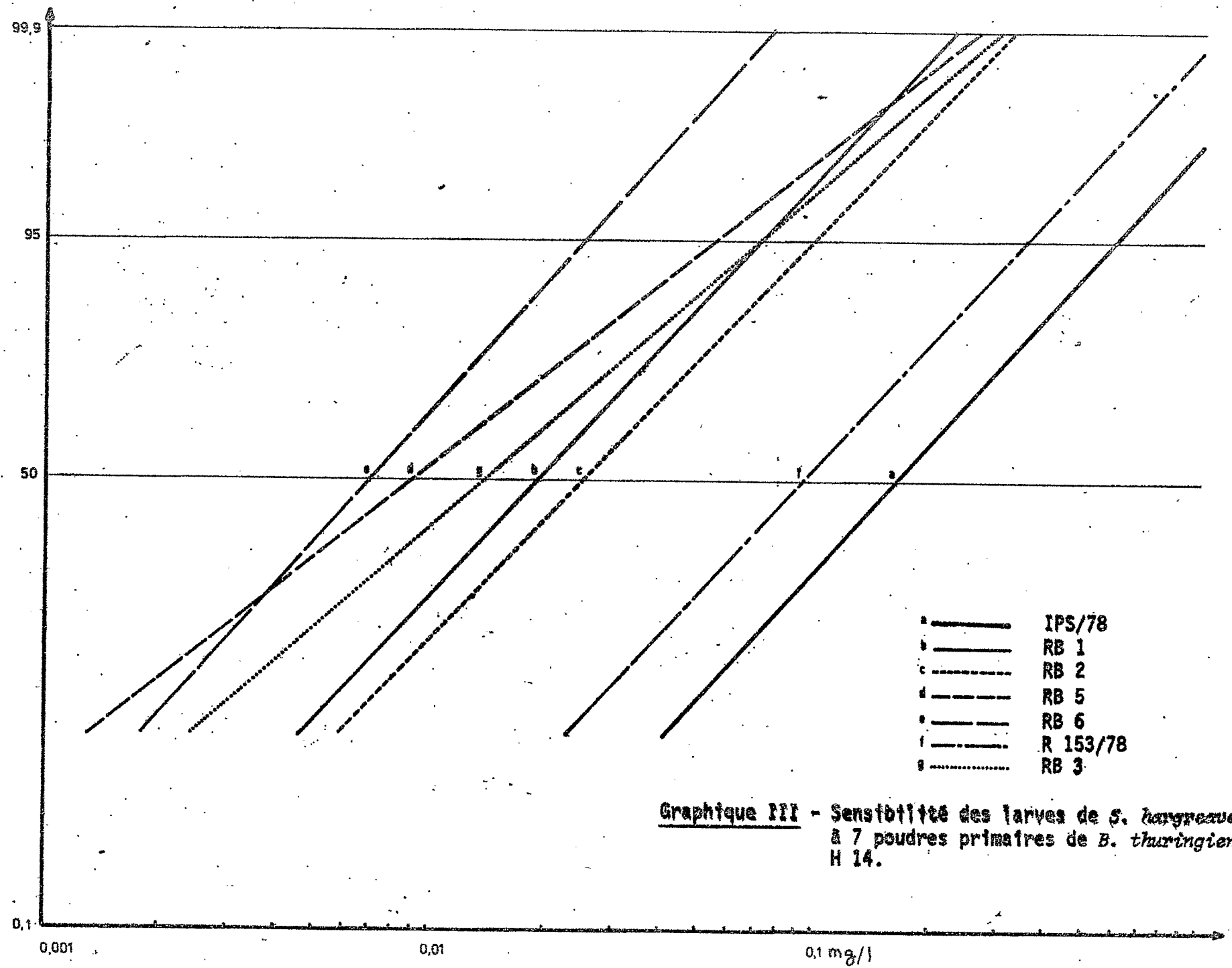
.../...



Graphique I - Sensibilité des larves d'*A. aegypti* (souche Koro Haute-Volta) à 7 poudres primaires de *B. thuringiensis* H 14.



Graphique II - Sensibilité des larves de *S. damnosum* à 6 poudres primaires de *B. thuringiensis* H 14



Graphique III - Sensibilité des larves de *S. hargreavesi* à 7 poudres primaires de *B. thuringiensis* H 14.

les poudres R 153/78 et Bt B1 45. En valeur absolue, les titres obtenus sur larves de simulies avec les lyophylisats sont supérieurs aux titres *A. aegypti* et inférieurs dans le cas des poudres R 153/78 et Bt B1 45.

A. aegypti	RB 6	Bt BL 45	RB 5	RB 1	RB 2	R 153/78
S. damnosum s.l.	RB 6		RB 5	RB 1	RB 2	R 153/78
S. hargreavesi	RB 6	RB 5	RB 1	Bt B1 45	RB 2	R 153/78

Tableau n° 5 : Classement par ~~ordre~~ de titre décroissant des différentes poudres primaires de Bt H 14 actuellement testées.

Les larves de *S.squamosum* ont une sensiblité voisine de celle de *S. hargreavesi* (tableau n° 4). Chez cette dernière espèce, on peut mettre en évidence une variation de sensibilité en fonction de la souche de *B. thuringiensis* H 14. Les titres de la W1.00 sont 1,2 fois supérieurs aux titres *A. aegypti* contre 1,75 fois pour la souche 1884 qui paraît être la plus active, tant vis-à-vis des larves de simulies que d'*A. aegypti*. En revanche, la souche H.14-21 paraît être la moins pathogène des 4 à l'égard des larves de simulies. On ne dispose pas encore d'assez de données sur *S. damnosum s.l.* pour vérifier si cet effet souche est aussi net que chez *S. hargreavesi*.

On observe pour les poudres R 153/78 et Bt B1 45 une diminution de toxicité très nette vis-à-vis des larves de simulies, surtout pour la R 153/78.

Nous serons prochainement en possession de toutes les données qui nous permettront de préciser nos conclusions. Toutefois, nous pouvons déjà remarquer qu'il y a, pour un type de poudre donné une correspondance très nette entre le titre *A. aegypti* et la toxicité vis-à-vis des larves de simulies. Le titrage sur *A. aegypti* pour un type de poudre primaire déterminé, peut donner une idée valable de la toxicité de cette poudre vis-à-vis des larves de simulies sous réserve que "l'effet souche" ne dépasse pas les valeurs observées jusqu'à présent.

Nos conclusions présentées à ce sujet dans le précédent rapport sont partiellement erronées. Nous avions mis en évidence l'importance du type de poudre mais avions raisonné sur des fausses valeurs de titre *A. aegypti* et des données beaucoup plus fragmentaires. Il serait souhaitable que

.../...

toutes les unités de recherche y compris celles des firmes utilisent la même méthode d'évaluation afin que les résultats obtenus puissent être comparés.

Au vu des résultats obtenus avec les poudres R 153/78 et Bt Bl 45, tant sur *S. damnosum s.l.* que *S. hargreavesi*, il semblerait que leurs procédés de fabrication s'accompagnent d'une perte de toxicité vis-à-vis des larves de moustiques et de simulies dans le cas de la R 153/78 et de simulies seulement dans le cas de la Bt Bl 45. Il serait donc peutêtre plus judicieux dans le cas présent de formuler le *B. thuringiensis* H 14 à partir des lyophilisats plutôt que de poudres primaires du type R 153/78.

Bien que nous ne possédions pas encore le titre *A. aegypti* de la poudre RB 7, il semblerait que l'effet souche puisse atteindre une valeur significative indiquant qu'il serait souhaitable dans le futur d'évaluer systématiquement en laboratoire la toxicité des nouvelles souches vis-àvis des larves de simulies. Il faut toutefois remarquer que cette notion de souche, qui ne simplifie pas le travail des formulateurs, se complique d'autant plus que, pour une souche donnée, les paramètres de la fermentation influent très significativement sur la toxicité du produit résultant. Il n'est pas exclu que cet effet "culture" joue dans nos résultats un plus grand rôle que l'effet souche lui-même, mais il nous est malheureusement impossible de le mettre en évidence dans l'immédiat.

Nous allons également recevoir d'autres souches de *B. thuringiensis* (2013-1, 2013-5, 2013-9) du Dr. SINGER qui seront testées dans des conditions analogues. Nous testerons également toutes ces souches sur *A. gambiae* et *C. quinquefasciatus* afin de contrôler si le degré de pathogénicité d'une souche donnée concerne toutes ces espèces (*A. aegypti*, *C. quinquefasciatus*, *A. gambiae* et *S. squamosum*) ou bien plus spécifiquement l'une ou l'autre d'entre elles.

Ces recherches sur la pathogénicité des préparations de *B. thuringiensis* H 14 à l'égard des Culicidae et Simuliidae peuvent avoir une incidence opérationnelle même si dans l'immédiat, et avec les réserves que nous avons émises, les différences observées n'excèdent pas un rapport de 1 à 2 chez *A. aegypti* et de 1 à 5 chez *S. hargreavesi*.

.../...

Toujours dans le cadre de cette étude, nous sommes en train de compléter les résultats présentés dans le tableau 10 page 10 de notre précédent rapport en testant à nouveau en gouttières sur *S. damnosum s.l.* ces 10 préparations de *B. thuringiensis* H 14 à la concentration de 0,05 mg/l pendant 10 mn après les avoir mises en suspension selon la méthode OMS (Vortex 3 mn).

Nous disposerons donc prochainement de suffisamment de résultats concernant la relation entre la souche de *B. thuringiensis* H 14, son titre *A. aegypti* et sa toxicité à l'égard des larves de Simuliidae pour étayer nos conclusions actuelles et proposer leur diffusion rapide dans la série WHO/VBC.

Enfin, il nous apparaît souhaitable de souligner la nécessité évidente qu'il y a de dissocier les résultats obtenus avec les poudres primaires que nous pourrions assimiler tant bien que mal à de la matière active pure, de ceux obtenus à partir des formulations.

La mise en parallèle des titres observés sur les larves d'*A. aegypti* d'une part, et sur les larves de simulies d'autre part, n'a de signification que dans la mesure où elle concerne les produits primaires (poudres ou cultures) à l'exclusion de toute formulation. Le titrage d'un produit primaire peut être assimilé à un dosage de matière active. Il exprime en fait globalement la quantité pondérale de toxine par unité de poids et la toxicité intrinsèque de cette toxine vis-à-vis de l'insecte testé. Dès lors qu'il s'agit de formulations, le titre biologique n'a plus la même signification puisqu'il intègre les notions d'efficacité de la formulation et celle de dosage de la matière active. Il traduit même en réalité beaucoup plus la notion d'efficacité que la quantité pondérale de toxine et perd donc de ce fait une grande partie de sa signification. La notion de titre biologique ne devrait, à notre sens, n'être appliquée qu'aux produits primaires.

4. RECHERCHES PRELIMINAIRES CONCERNANT UN EVENTUEL EFFET DE SYNERGIE ENTRE LE *B. THURINGIENSIS* H 14 ET LES INSECTICIDES CONVENTIONNELS

Bien que la protéine du cristal possède une toxicité remarquable à l'égard des Culicidae et des Simuliidae, il était intéressant de vérifier

s'il n'existe pas un effet de synergie entre le *B. thuringiensis* H 14 et les insecticides conventionnels.

Nous avons, dans un premier temps, testé cet effet sur larves de stade 4 d'*A. aegypti* en associant la matière active des insecticides conventionnels en solution éthanolique à une suspension de poudre primaire R 153/78 de *B. thuringiensis* H 14. Nous avons ensuite testé sur larves de *S. damnosum s.l.* à l'aide des gouttières, l'association de deux formulations Abate® 200 CE ou Chlorphoxim 20 % CE avec la suspension Sandoz 402 I.

Les résultats sont présentés dans les tableaux n° 6 et 7.

Temephos * (OMS 786) 3,1 (97)	Bt. H 14 27,8 (97)	Téméphos + Bt. H 14 55,1 (198)
Chlorphoxim (OMS 1197) 6,2 (97)	Bt. H 14 27,8 (97)	Chlorphoxim + Bt. H 14 64 (197)
DDT 17,3 (98)	Bt. H 14 27,8 (97)	DDT + Bt. H 14 54,8 (199)
Permethrine (OMS 1821) 3,2 (95)	Bt. H 14 27,8 (97)	Permethrine + Bt. H 14 23,7 (190)
Decamethrine (OMS 1998) 4,4 (99)	Bt. H 14 27,8 (97)	Décamethrine + Bt. H 14 38 (200)

Tableau n° 6 : Effet de synergie entre le *B. thuringiensis* H 14 et quelques insecticides conventionnels testés sur des larves stade 4 d'*A. aegypti* (exprimé en % de mortalité).

* Concentrations : Bt. H 14 : 0,1 mg/l - temèphos : 10^{-4} g/l - Chlorphoxim : 5.10^{-4} g/l - DDT : 2.10^{-2} g/l - Permèthrine : 5.10^{-5} g/l et Décamethrine : 5.10^{-5} g/l.

.../...

	Stades 1 à 3	Stades 4 et 5	Stades 6 et 7	Tous stades
Abate® 200 CE 0,2 mg/1/10 mn	35,1 (114)	22,5 (258)	27,7 (477)	27,1 (849)
Chlorphoxim 20 % CE - 0,0125 mg/1/10 mn	51 (51)	7,2 (193)	6,9 (450)	10,2 (694)
Sandoz 402 1 WDC 0,05 mg/1/10 mn (Bt. H 14)	42,8 (56)	33,2 (229)	24,7 (344)	29,4 (629)
Bt. H 14 + abate	80,3 (71)	38,7 (217)	18,7 (433)	30,8 (721)
Bt. H 14 + Chorphoxim	68,1 (72)	45 (140)	39,4 (348)	44,4 (560)

Tableau n° 7 : Effet de synergie entre deux formulations larvicides conventionnelles et une formulation de *B. thuringiensis* H 14 (évaluation en gouttières).

On observe chez les larves d'A.aegypti un effet de synergie de l'ordre de 2 fois avec le Temephos et le Chlorphoxim. Cette synergie est pratiquement nulle avec le DDT et la Decamethrine et négative avec la Permethrine. On n'observe en revanche aucun effet de synergie dans le cas des formulations testées sur larves de simulies.

Il est peu probable que l'association *B. thuringiensis* H 14/insecticide présente un intérêt dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose. En revanche, l'association *B. thuringiensis* H 14/insecticide conventionnel, si l'effet synergie existe également avec les formulations, peut présenter un intérêt certain dans le cas de la lutte contre les Culicidae responsables de nuisance. Il est intéressant de noter que l'effet de synergie n'apparaît pas avec les produits agissant vite tels que les pyrethrinoïdes.

Nous nous proposons de tester en laboratoire sur les larves de simulies l'association de poudre primaire de *B. thuringiensis* H 14 et de matières actives d'insecticides conventionnels. Nous allons également reprendre des essais en gouttières en associant une formulation de *B. thuringiensis* H 14 avec une formulation microencapsulée agissant uniquement comme poison stomacal. Il n'est pas exclu qu'une atteinte partielle des cellules de

.../...

l'épithelium intestinal puisse augmenter la sensibilité des larves aux produits agissant comme poison stomacal.

5. EVALUATION DES FORMULATIONS EXPERIMENTALES DE *B. THURINGIENSIS* H 14

Nous avons testé à ce jour 9 formulations expérimentales de *B. thuringiensis* H 14 contre les larves du complexe *S. damnosum* au stade IV (gouttières) et 2 au stade V. La plupart des résultats obtenus figurent dans le précédent rapport (chapitre V) ainsi que dans le document WHO/VBC/79.735.

5.1. Essais au stade IV (2ème semestre 1980)

Nous avons testé récemment une nouvelle suspension aqueuse S.A.687 de Roger Bellon, reçue en janvier 1981.

Nous ne sommes en mesure de présenter ici que les résultats préliminaires (tableau 8), l'évaluation de ce produit étant en cours. Nous pouvons cependant constater une amélioration très sensible de l'efficacité par rapport à la première suspension aqueuse fournie en 1979 (93,5 % contre 7,7 % à 1,6 ppm/10 mn). Il semble toutefois que cette formulation, qui présente des caractéristiques voisines de la suspension Sandoz 402 I, soit un peu moins efficace que cette dernière. Les résultats complets seront communiqués prochainement.

Concentration ppm/10 mn	% de mortalité			
	Stades 1 à 3	Stades 4 et 5	Stades 6 et 7	Tous stades
1,6 *	50 (4)	73,7 (19)	98,2 (115)	93,5 (138)
0,8 *	30,8 (13)	62,5 (16)	91,8 (122)	83,4 (151)
0	0 (125)	0,4 (270)	2,4 (500)	1,4 (895)

Tableau n° 8 : Evaluation préliminaire au stade IV (gouttières) de l'efficacité de la suspension SA 687 (Roger Bellon) vis-à-vis des larves du complexe *S. damnosum* (entre parenthèses le nombre de larves testées).
* une réplique par concentration.

.../...

5.2. Essais au stade V (2ème semestre 1980)

5.2.1. Sandoz 402 I. Dans tous les cas nous avons testé cette formulation en la diluant préalablement avec 50 % d'eau de la rivière. A 0,8 ppm/10 mn, dans des conditions optima de dilution, cette formulation provoque 100 % de décrochement dans les conditions de saison sèche tant en forêt qu'en savane (tableau n° 9). A 0,4 ppm, l'effet n'est que partiel sur l'ensemble du gîte.

Concentration ppm/10mn	Rivière	Débit m3/s	Date	Effet observé
0,8	Feredougouba	4,3	9.07.80	Efficacité totale sur tout le gîte observée 3 h après le traitement
0,8	Goué	2	7.07.80	Efficacité totale sur tout le gîte. Effet également très rapide.
0,4	Feredougouba	3,8	10.07.80	Effet partiel
0,4	Goué	2	7.07.80	Effet partiel

Tableau n°.9 : Essais complémentaires au stade V de la formulation Sandoz 402 I WDC.

5.2.2. Formulation Abbott ABG 6108. La quantité disponible de poudre mouillable ABG 6108 ne nous a permis, après les divers essais au stade IV, de réaliser qu'un seul essai au stade V. Ce traitement a été réalisé à 3,2 ppm/10 mn en utilisant la poudre sans dilution préalable le 7.07.80 sur le Goué (2 m3/s, région de Danané). Le traitement "en bande" a été réalisé 20 m en amont du gîte. La poudre s'est très bien dispersée spontanément et était entièrement mouillée en atteignant le gîte. Toutefois, nous avons observé un effet partiel à l'entrée du gîte tandis qu'il était presque total dans les parties médiane et aval.

La poudre ABG 6108, comparée par exemple à la poudre mouillable Roger Bellon 50 % présente tant en gouttières qu'en rivière, un niveau d'efficacité qui ne permet pas d'envisager son utilisation opérationnelle.

.../...

5.3. Discussion générale sur les formulations expérimentales de *B. thuringiensis* H 14 testées à l'IRTO

La première formulation de *B. thuringiensis* H 14 testée contre les larves du complexe *S. damnosum* est la poudre primaire R 153/78 dont l'efficacité est totale à 0,2 mg/l pendant 10 mn (0,2 ppm/ 10 mn). Nous avons récapitulé dans le tableau n° 10 les résultats obtenus par la suite au stade IV avec toutes les formulations expérimentales.

Tout d'abord, il importe de souligner à nouveau qu'il n'existe aucune relation significative entre l'activité de ces formulations sur *A. aegypti* et sur les larves du complexe *S. damnosum*. Nous n'aborderons donc pas la notion de titre biologique dans notre discussion qui se limitera aux problèmes spécifiques des formulations.

Globalement, nous avons testé deux types de formulations bien différentes :

- des formulations à particules très fines (spores et cristaux isolés, 1 à 2 µ) telles que les suspensions Sandoz (402 I) et Roger Bellon (SA 10 %) ;
- des formulations en poudre à grosses particules (20 à 40 µ) telles que l'ABG 6108, la Bt 673, la Bt BI 42-43.

Nous avons clairement démontré que l'efficacité des formulations à grosses particules était proportionnelle à la taille de ces particules (précédent rapport, chapitre IV, p. 14). Il est donc possible, pour un type de poudre donné, de rechercher la fraction granulométrique la plus efficace globalement et de formuler de préférence autour de cette fraction granulométrique.

La notion de taille moyenne de particules ne peut en fait pas être séparée d'autres facteurs tels que leur consistance (plus ou moins grande friabilité, le temps de contact formulation/larves et le stade larvaire.

Les résultats obtenus avec les poudres s'expliquent assez clairement si l'on s'en réfère au mode de nutrition des larves de simulies. Les

.../...

Formulation \ Dosage en ppm/10 mn	0,05	0,1	0,2	0,4	0,8	1,6	3,2	6,4
R 153/78 (Roger Bellon)	74	98,7	100					
Poudre mouillable 50 % (Roger Bellon)		4,4	13,5	100				
Poudre mouillable ABG 6108 (Abbott)					22	83,8	100	
Poudre Bt 673 (Roger Bellon) normale (moyenne 35 µ)					32,4	67	92,6	98,3
Poudre Bt 673 fine (moyenne 18 µ)						46,2		
Poudre Bt 673 grosse (moyenne 45 µ)						75,9		
Poudre Bt B1 42-43 (Roger Bellon)				5,2	13,1	34,3	47,3	
Concentré émulsionnable à 5 % (Roger Bellon)		3,3	35,5	23,2				
Suspension aqueuse à 10 % (Roger Bellon)		0,3	5,4	5,7		7,6		
Suspension aqueuse 402 1 WDC (Sandoz)			40,2	72,6	91,3	100		
Suspension aqueuse SA 687 (Roger Bellon)					83,4	93,5		

Tableau n° 10 - Efficacité comparée des formulations expérimentales testées par l'IRTO (évaluation en gouttière, efficacité exprimée en % de mortalité des larvesdu complexe *S. damnosum*).

grosses particules sont captées mécaniquement au niveau des soies prémandibulaires, dilacérées par les mandibules puis ingérées. Elles seront ingérées d'autant plus vite qu'elles seront plus friables. La formulation idéale devrait donc posséder des grosses particules friables. C'est ce qui explique que de toutes les formulations testées, la poudre primaire R 153/78 soit la plus efficace. Lorsque la friabilité diminue, la masse ingérée et, partant, l'efficacité diminuent. C'est exactement ce que l'on observe si l'on met en parallèle pour les formulations R 153/78, PM 50 % Roger Bellon (particules friables) d'une part, Bt B1 42-43 (particules non friables) et ABG 6108 d'autre part, la masse ingérée à partir d'une même concentration donnée et l'efficacité (tableau n° 11). Il y a une corrélation presque parfaite entre la consistance des particules, la masse ingérée par les larves et l'efficacité de la formulation. On peut aussi aisément démontrer que le temps mis par les larves à ingérer les grosses particules est un facteur limitant l'efficacité car celle-ci varie dans le cas de la poudre ABG 6108 (peu ingérée) de 58,1 % à 94,6 % lorsque le temps d'épandage varie de 1 à 54 mn avec une concentration de base de 1 ppm/10 mn (données non encore divulguées).

	R 153/78	PM 50 % Roger Bellon	Bt B1 42-43	ABG 6108 Abbott
Stade 7 jeunes	415,5 (72)	470,3 (68)	95,3 (52)	108,8 (47)
Stade 7 âgées	407,9 (24)	577,3 (29)	112,8 (30)	125,8 (33)
CL 100	0,2 ppm/10 mn	0,4 ppm/10 mn (en fait 0,2 ppm/10 de poudre R 153/78)	> 3,2 ppm	3,2 ppm

Tableau n° 11 : Relation pour différentes poudres de Bt H 14 entre la masse ingérée par les larves de *S. damnosum* (en 10^{-4} mm3) à partir d'une concentration donnée et le niveau d'efficacité exprimé par la CL 100.

Un facteur entre également en ligne de compte c'est la digestibilité du ciment liant entre eux les cristaux de *B. thuringiensis* H 14 pour en faire une grosse particule. Les cristaux ne peuvent en fait libérer leur

.../...

toxine que s'ils sont en contact avec les enzymes digestifs et non enrobés dans un ciment ou une quelconque matière. Nous allons étudier prochainement la relation entre la durée du transit intestinal chez les larves du complexe *S. damnosum* et l'efficacité de certains types de formulation afin d'apprécier dans quelle mesure la digestibilité peut représenter un facteur limitant de l'efficacité des formulations.

La rétention des grosses particules par les larves de simulies est donc essentiellement un phénomène mécanique actif de filtration qui explique clairement les résultats obtenus à partir des différentes formulations de *B. thuringiensis* H 14 à grosses particules. L'effiacité de ces formulations dépend donc essentiellement de la taille des particules et de leur consistance, ce qui explique que la poudre primaire R 153/78 reste à ce jour la préparation la plus efficace contre les larves du complexe *S. damnosum* suivie de la poudre mouillable 50 % Roger Bellon.

Ces observations reportées ci-dessus laisseraient penser que l'efficacité des formulations de *B. thuringiensis* H 14 à très fines particules devrait être médiocre comparée à celle des formulations à grosses particules. Ce n'est en réalité pas exact dans la mesure où les modalités de rétention des fines particules (d'une taille de l'ordre de 1 u et moins) par les larves de simulies sont différentes. Ces particules ne peuvent pas être retenues mécaniquement entre les mailles des soies prémandibulaires et de leurs microtriches. Les fines particules sont en fait retenues par un mucus qui tapisse toutes les surfaces des soies exposées au courant. Les observations effectuées par ROSS et CRAIG, 1980 (Fine particle capture by larval Simuliidae : use of mucus by a filter feeding insect larva) semblent se confirmer avec ce type de formulations de *B. thuringiensis* H 14. L'efficacité du Sandoz 402 I ne varie pas significativement pour une concentration de base donnée (0,4 ppm/10') que les temps d'épandage soient de 1, 3, 9, 27 ou 54 mn (nous avions observé l'inverse avec la poudre ABG 6108). La rétention des cristaux isolés de *B. thuringiensis* H 14 est donc essentiellement un phénomène de filtration passive, les cristaux tapissant progressivement les parties des soies prémandibulaires enduites de mucus.

ROSS & CRAIG ont également suggéré l'influence qu'ont les propriétés physicochimiques des particules sur leur rétention par les larves de

.../...

simulies, en d'autre termes, l'importance de la liaison mucus-particule. Nous vérifions également ce phénomène si l'on compare l'efficacité du Sandoz 402 I (100 % à 1,6 ppm/10 mn) à celle de la suspension aqueuse Roger Bellon (7,6 % au même dosage) sachant que ces deux formulations ont une concentration en cristaux voisine, une présentation similaire et n'ont apparemment pas, l'une comme l'autre, d'influence significative sur la nutrition des larves de *S. damnosum s.l.* (données non encore divulguées). Les cristaux de la formulation sont dans un cas retenus et dans l'autre ne le sont pratiquement pas. Ces différences de rétention ne peuvent raisonnablement s'expliquer que par les propriétés physicochimiques que les adjuvants de formulation confèrent dans l'un et l'autre cas aux cristaux de *B. thuringiensis* H 14.

Ces données concernant le mode d'action des différentes formulations de *B. thuringiensis* H 14 peuvent servir à définir un certain nombre de spécifications. Toutefois, ces spécifications sont étroitement contingentes de celles imposées par les conditions opérationnelles d'utilisation des formulations dans la lutte contre l'onchocercose.

Il paraît souhaitable d'orienter les recherches vers la mise au point de formulations en phase liquide, prêtes à l'emploi, ayant une dispersion spontanée et une suspensibilité remarquables. La formulation Sandoz et maintenant la S.A. 687 (Roger Bellon) sont une première approche imparfaite de ce genre de formulation. Il est bon de souligner les résultats déjà prometteurs obtenus avec la formulation Sandoz, tant en saison sèche qu'en saison des pluies. Toutefois, leur stabilité dans les conditions opérationnelles de stockage risque de poser de sérieux problèmes. On a observé par exemple très rapidement un gonflement considérable des fûts de *B. thuringiensis* H 14 Sandoz stockés à Bouaké à l'extérieur (sous abri et en plein air). Ce gonflement dû probablement à une fermentation pourrait s'expliquer par une fuite de l'inhibiteur de fermentation (hydrocarbure benzenique en général) à travers le plastique des fûts. Si les firmes garantissent une stabilité suffisante dans le cas des poudres mouillables, il risque d'en aller autrement des suspensions et ce, d'autant plus que l'on ne possède que peu de données relatives à leur stabilité au cours du stockage sur le terrain en région tropicale. Une étude est en cours à Bouaké à ce propos avec la formulation Sandoz.

.../...

Par ailleurs il est possible que les formulations poudres puissent donner des résultats intéressants. Il sera toutefois difficile de se placer dans les conditions optimum d'ingestion des formulations à grosses particules friables sans que ces particules se fragmentent suite au brassage dans les rapides et ne sédimentent rapidement tant dans les fûts (dans l'optique d'une formulation liquide) qu'en rivière.

La mise au point des formulations de *B. thuringiensis* H 14 se heurte donc en pratique à un certain nombre de nécessités souvent contradictoires. Il est certain que dans tous les cas, il faille augmenter la proportion de toxine dans les formulations, que ce soit par centrifugation, culture sur un lieu clair ou tout autre procédé.

6. CONCLUSION

Le *B. thuringiensis* H 14 est un insecticide biologique qui possède toutes les caractéristiques requises pour devenir un atout de premier plan dans la lutte contre l'onchocercose en Afrique de l'Ouest. Depuis la mise en évidence récente d'une forte résistance au Temephos et de son extension géographique en Côte d'Ivoire, l'utilisation du *B. thuringiensis* H 14 n'est plus une solution d'avenir élégante mais une nécessité opérationnelle immédiate et impérieuse.

Les problèmes posés par l'utilisation des sérotypes 1 et 3 contre le les lépidoptères défoliants sont à l'étude depuis plus de 20 ans et ne sont pas tous pour autant résolus.

Le *B. thuringiensis* H 14 a été formulé pour la première fois en 1979, testé en grandeur réelle en 1980 contre les larves des vecteurs d'onchocercose alors que son identification ne remonte qu'à 1978.

Certes l'expérience acquise avec les autres sérotypes permet d'accélérer les recherches sur le H 14. Toutefois la nécessité pressante d'utiliser le plus rapidement possible ce sérotype conduit à un certain état de

.../...

- Tableau A18. RB 4

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,005	36	107	143	12,7
0,01	55	76	131	32,3
0,02	131	72	203	58,6
0,04	129	12	141	90,1

- Tableau A19. RB 5

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,005	28	75	103	27,4
0,01	141	104	245	57,6
0,02	222	63	285	77,9
0,04	232	25	257	90,3

- Tableau A20. RB 6

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,005	27	63	90	30,2
0,01	176	81	257	68,5
0,02	261	32	293	89,1
0,04	248	2	250	99,2

- Tableau A21. RB 7

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,005	18	128	146	3,9
0,01	48	143	191	18
0,02	86	99	185	41,5
0,04	122	78	200	57,4

.../...

- Tableau A22. R 153/78

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,05	31	96	127	24,4
0,1	88	89	177	49,7
0,2	124	22	146	84,9

- Tableau A23. Bt B1 45

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,005	27	121	148	13,9
0,01	81	118	199	37,5
0,02	127	70	197	62,6
0,04	126	20	146	85,6

- Tableau A9. RB 1

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,01	80	113	193	31,3
0,02	158	42	200	75,4
0,04	182	16	198	90,3

- Tableau A10. RB 2

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,01	59	89	148	26,5
0,02	147	35	182	76,5
0,04	136	15	151	88,2

- Tableau A11. RB 5

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,005	53	96	149	31,8
0,01	99	96	192	48,7
0,02	161	28	189	84,3
0,04	141	7	148	95

- Tableau A12. RB 6

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,005	67	61	128	41,4
0,01	140	47	187	69,1
0,02	173	21	194	86,7
0,04	190	2	192	98,7

- Tableau A13. R 153/78

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,05	72	110	182	24,8
0,1	102	74	176	47,9
0,2	136	49	185	67,2

.../...

III - SENSIBILITE DES LARVES DE *SIMULIUM HARGREAVESI* (GROUPE *MEDUSAEFORME*) A DIVERSES SOUCHES DE *B. THURINGIENSIS* H 14

- Tableau A14. IPS/78

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,1	41	95	136	30,1
0,2	106	85	191	55,5
0,4	126	14	140	90

- Tableau A15. RB 1

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,01	31	107	138	22,5
0,02	64	71	135	47,4
0,04	109	21	130	83,8

- Tableau A16. RB 2

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,01	17	82	99	17,2
0,02	40	81	121	33,1
0,04	107	33	140	76,4
0,08	128	14	142	90,1

- Tableau A17. RB 3

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,005	21	58	79	14,3
0,01	87	104	191	36,5
0,02	135	41	176	76,8
0,04	173	13	186	91,8

.../...

confusion dans les recherches dans la mesure où les différents aspects qui devaient être abordés selon une chronologie logique le sont tous simultanément.

Les recherches entreprises à l'IRTO l'ont été dans l'optique de mettre au point le plus rapidement possible une formulation antisimulidienne opérationnelle. De ce fait, les différents points abordés et discutés dans ce rapport ne constituent souvent qu'une première approche des problèmes posés. Il sera nécessaire, tout en accordant la priorité à l'évaluation rapide des formulations, de reprendre plus en détail ces différents points.

Les problèmes des formulations antisimulidiennes et de leur utilisation dans les programmes de lutte contre l'onchocercose sont des problèmes très spécifiques. Les firmes qui produisent le *B. thuringiensis* H 14 ont toutes une solide expérience dans le domaine des formulations à usage agricole ou forestier et formulent le *B. thuringiensis* H 14 en fonction de cette expérience. Il importe donc que les formulateurs aient une idée très précise des modalités d'utilisation de leurs formulations dans le cas de la lutte contre l'onchocercose. Des progrès rapides ne seront enregistrés que dans la mesure où une coopération étroite s'établira entre les firmes et les équipes de recherches leur donnant des informations et spécifications et évaluant leurs produits.

Les résultats acquis en 1980 dans le cadre de cette convention (notamment avec la poudre mouillable 50 % (Roger Bellon) et la suspension aqueuse 402 (Sandoz), portant soit sur la toxicité des produits primaires et leur titrage, soit sur le mode d'action des formulations et leur évaluation aux stades IV et V, permettent de penser que le *B. thuringiensis* H 14 devrait pouvoir devenir rapidement opérationnel dans le cadre de la lutte contre l'onchocercose.

De sérieux progrès restent toutefois à enregistrer :

- au niveau des firmes : en améliorant les caractéristiques physiques des formulations (dispersion spontanée et suspensibilité), en augmentant la concentration en cristaux et en améliorant la stabilité au stockage ;

.../...

- au niveau de l'évaluation sur le terrain : en étudiant toutes les possibilités d'utilisation opérationnelle des deux types de formulations (entre autre les problèmes de dilution préalable minimum et de stabilité de ces dilutions) et éventuellement en adaptant, dans la mesure du possible, le mode d'utilisation des formulations aux particularités et contraintes imposées par l'utilisation du *B. thuringiensis* H 14.

PERSPECTIVES DE RECHERCHES

Les recherches qui seront entreprises à l'IRTO en 1981 dans le cadre de cette convention porteront essentiellement sur les points suivants :

- Evaluation aux stades IV et V des nouvelles formulations
- Pathogénicité des nouvelles souches et poudres primaires de *B. thuringiensis* H 14 et *B. sphaericus* vis-à-vis des larves de simulies.
- Pathogénicité de ces mêmes souches vis-à-vis des larves d'autres vecteurs (*Anopheles*, *Aedes* et *Culex*).
- Synergie éventuelle entre les poisons stomacaux conventionnels (microcapsules) et le *B. thuringiensis* H 14.
- Relation entre la durée du transit intestinal des larves de *S. damnosum s.l.* et l'efficacité de divers types de formulations de *B. thuringiensis* H 14.
- Relation entre le temps de contact et l'efficacité des formulations.

D'autres recherches concernant notamment les formulations de *B. thuringiensis* H 14 seront également entreprises en accord avec OCP.

ANNEXE

RESULTATS DES TESTS EFFECTUES

POUR LE TITRAGE DE DIFFERENTES SOUCHES DE *B. THURINGIENSIS* H 14

SUR *A. AEGYPTI*, *S. DAMNOSUM (S. SQUAMOSUM)* ET *S. HARGREAVESI*

-=-=-=-

I - Tableaux A1 à A7 : Sensibilité *A. aegypti*

II - Tableaux A8 à A13 : Sensibilité *S. damnosum*

III - Tableaux A14 à A23 : Sensibilité *S. hargreavesi*

-=-=-=-=-

I - SENSIBILITE DES LARVES D'*A. AEGYPTI* (L_4 JEUNES, SOUCHE KORO) A DIFFERENTES POUDRES PRIMAIRES DE Bt H14 :

- Tableau A1. IPS/78

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,1 *	8	190	198	4,0
0,2	56	141	197	28,4
0,4	154	44	198	77,8
0	1	197	198	0,5

- Tableau A2. R 153/78

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,05	20	177	197	10,1
0,1	119	77	196	60,7
0,2	194	4	198	97,9

- Tableau A3. Bt E1 45

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,01	16	182	198	8,1
0,02	53	143	196	27,0
0,04	150	47	197	76,1

- Tableau A4. RB 1

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,02	21	178	199	10,6
0,04	128	145	273	46,9
0,08	191	9	200	95,5

* en mg/l

- Tableau A5. RB 2

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,02	14	174	188	7,5
0,04	74	122	196	37,8
0,08	153	45	198	77,3
0,16	199	2	201	99

- Tableau A6. RB 5

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,01	7	187	194	3,6
0,02	44	159	203	21,7
0,04	128	70	198	64,6
0,08	187	10	197	94,9

- Tableau A7. RB 6

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,01	7	193	200	3,5
0,02	67	132	199	33,7
0,04	140	31	171	81,9

II - SENSIBILITE DES LARVES DE *S. DAMNOSUM S.L. (S. SQUAMOSUM)* A DIFFERENTES POUDRES DE *B. THURINGIENSIS* H 14

- Tableau A8. IPS/78

	Morts	Vivants	Total	% corrigé
0,05	44	156	200	8,5
0,1	82	119	201	30,5
0,2	149	51	200	69,6

.../...