

Recherche du pouvoir pathogène de *Bacillus thuringiensis* sur les glossines (Diptera-Muscidae) Etude sur *Glossina tachinoides* en République du Tchad

par J. C. MAILLARD et A. PROVOST (*)

RESUME

Des essais d'infestation expérimentale ont prouvé que trois variétés différentes de *Bacillus thuringiensis* Berliner, des sérotypes 1 et 4a-4c, ne sont pathogènes ni pour les pupes ni pour les adultes de *Glossina tachinoides* West, sauvages ou d'élevage.

INTRODUCTION

Le pouvoir pathogène de *Bacillus thuringiensis* vis-à-vis des insectes est lié avant tout à une toxine (1, 10). La principale toxine est une endotoxine protéique : la toxine du « cristal », active uniquement sur les Lépidoptères. Une autre toxine importante est l'exotoxine « thermostable » nucléotidique (isolée en 1965) qui agit sur les cinq ordres d'insectes connus, y compris celui des Diptères (4, 9, 12).

Alors que la toxine du « cristal » est commune aux souches de tous les sérotypes de *B. thuringiensis* (actuellement 12 sérotypes et 17 biotypes), la toxine thermostable n'est produite que par certaines souches de quelques sérotypes (1, 4a-4c, 8, 9 et 10). C'est ainsi que les résultats positifs obtenus sur les Diptères (mouches et moustiques) l'ont été grâce à des cultures généralement du sérotype 1 (GINGRICH et ESDELE, 1966) sur *Haematobia irritans*; YENDOL et MILLER (1967) sur *Musca autumnalis*) ou à des filtrats à exotoxine « thermostable » brute (PERRON et BENZ,

1968) sur *Drosophila melanogaster*; GALICHET (1967) sur *Musca domestica*).

Notre étude est donc effectuée avec trois variétés différentes de *Bacillus thuringiensis* :

- *B. thuringiensis* var. *thuringiensis* n° 1 du sérotype 1;
- *B. thuringiensis* var. 996 du sérotype 1;
- *B. thuringiensis* var. *Kenya* n° 3 (Rhodesia) du sérotype 4a-4c.

Dans une première partie, nous étudions l'action de ces trois variétés, sur des pupes de Glossines et dans une deuxième partie sur des adultes.

A. ACTION DE *BACILLUS THURINGIENSIS* SUR LES PUPES DE *GLOSSINA TACHINOIDES*

I. Matériel et méthode (6, 8, 11)

Cette étude est réalisée sur des lots de 25 pupes :

- pupes sauvages d'âge indéterminé et donc infestées à des stades variables de pupaison;

(*) I.E.M.V.T., Laboratoire de Recherches Vétérinaires et Zootechniques de Farcha, B.P. 433 N'Djamena (Tchad).

- pupes d'élevages infestées vers la première semaine de pupaison;
- pupes d'élevages infestées vers le 15^e jour de pupaison.

Les pupes sont infestées par immersion (on admet que la pénétration des germes se fait par les pores stigmatiques (respiratoires), pendant des durées variables, dans des bouillons de culture (bouillon ordinaire) de chacune des 3 variétés pures (*Bacillus thuringiensis*: var *thuringiensis*, var 996 et var *Kenya* n° 3) et de ces variétés mélangées.

Les pupes sont ensuite mises à développer, étalées dans des tubes de verre de 22 × 2 bouchés avec du coton cardé. Ces tubes sont mis en position horizontale dans une chambre humide afin d'éviter le phénomène de dessiccation à une température de 28-30° C.

Sur le terrain, les pupes se développent dans un milieu ambiant qui n'est pas stérile. Par conséquent il n'est pas nécessaire de les stériliser extérieurement avant l'infestation, ni de les mettre à développer dans une atmosphère stérile. Par contre en cours d'expérience et surtout après sur certaines pupes non écloses et sur des adultes nés, une stérilisation extérieure a été nécessaire pour permettre une étude bactériologique de vérification (3). Ceci nous a permis de montrer que *Bacillus thuringiensis*

a bien pénétré dans les pupes lors de l'infestation par immersion.

II. Résultats (Tableau I)

Si on calcule le $\chi^2 = 0,58$, on voit qu'il n'est pas significatif. L'important pourcentage de naissances des pupes infestées (plus de 80 p. 100) comparé au lot témoin, ainsi que le χ^2 non significatif, tendent à prouver qu'aucune des 3 variétés pures ni des mélanges de *Bacillus thuringiensis* ne sont pathogènes pour les pupes de *Glossina tachinoides*.

L'autopsie des pupes non écloses a montré un nombre important de pupes pourries ainsi que quelques pupes desséchées au stade primaire donc préexpérimental.

B. ACTION DE *BACILLUS THURINGIENSIS* SUR LES ADULTES DE *GLOSSINA TACHINOIDES*

Matériel et méthode (2, 5, 7, 11)

Les mouches adultes sont maintenues en survie pendant toute la durée de l'expérience, dans 2 cages en « tulle » de nylon de 125 dm³ de volume, avec un fond sableux.

Ces cages se trouvent dans une pièce assez sombre, jamais ensoleillée, climatisée et humi-

TABLEAU I

Variétés infestantes des différents lots	Nombre de pupes écloses	Nombre de pupes mortes	Pourcentage de naissance	Pourcentage de mortalité
Lot témoin	22	3	88	12
<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>thuringiensis</i>	20	5	80	20
<i>Bacillus thuringiensis</i> var 996	21	4	84	16
<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>kenya</i>	20	5	80	20
<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>thuringiensis</i> + <i>B. thuringiensis</i> var 996	20	5	80	20
<i>Bacillus thuringiensis</i> var <i>thuringiensis</i> + <i>B. thuringiensis</i> var <i>Kenya</i>	21	4	84	16
<i>Bacillus thuringiensis</i> var 996 + <i>B. thuringiensis</i> var <i>Kenya</i>	20	5	80	20
Mélange des 3 variétés de <i>B. thuringiensis</i>	21	4	84	16
Moyenne des lots infestés	20,43	4,57	81,72	18,28

difiée en permanence. La température ambiante est de 25° C avec 55 à 60 p. 100 d'humidité relative (H.R.).

Nous disposons au début de l'expérience de 250 mouches par cage. Ces mouches des deux sexes sont âgées de 2 à 7 jours.

L'alimentation s'opère sur des rats (*Rattus norvegicus*) contentionnés et déposés à plat ventre sur le « tulle » de nylon, les mouches se nourrissent en piquant, à travers celui-ci, l'abdomen épilé des rongeurs.

Les rats sont exposés aux mouches quotidiennement pendant 3 heures.

Les glossines du lot « témoin » se nourrissent sur des rats sains et celles du lot « expérimental » sur des rats ayant subi 30 mn auparavant une injection intrapéritonéale de 3 ml de bouillon de culture, mélange des 3 variétés de *Bacillus thuringiensis*.

Chaque jour, on enlève, après les avoir comptés, les morts de chacune des cages et on les conserve séparément selon les lots.

L'expérience a été suspendue au 10^e jour, après avoir obtenu plus de 80 p. 100 de mortalité. D'après les pourcentages colligés dans le tableau II, on remarque qu'il y a légère-

ment plus de morts dans le lot « Témoin » que dans le lot « Expérimental ». Les 7 mouches de différence, soit 2,80 p. 100, ne représentent pratiquement rien par rapport au total initial. Dans les conditions précaires de notre élevage on peut considérer, vu cet écart insignifiant, que les résultats sont sensiblement identiques. Ceci nous permet d'affirmer que l'expérience est négative et donc que *B. thuringiensis* ne semble pas non plus pathogène pour les adultes de *Glossina tachinoides*.

Cependant, pour être certain que le mode d'infestation est efficace, nous avons effectué quelques vérifications.

1. Dans les mêmes conditions expérimentales, 3 rats (*Rattus norvegicus*) subissent chacun une injection intrapéritonéale de 3 ml du mélange en bouillon ordinaire des 3 variétés de *B. thuringiensis* ayant été utilisé au cours de l'expérience.

Le premier rat est sacrifié 30 mn après, le second 1 h après et le troisième 2 h après. Leurs sangs sont mis respectivement en culture dans des bouillons ordinaires et 24 h après, dans les 3 cas, nous retrouvons *B. thuringiensis*. La concentration de ce germe semble plus importante dans le bouillon de culture ensemencé avec le sang du rat sacrifié 30 mn après l'injec-

TABLEAU II

Durée de l'expérience	Nombre de morts par jour		Pourcentage de mortalité par rapport au total initial (250 mouches)	
	Lot "Témoin"	Lot "Expérimental"	Lot "Témoin"	Lot "Expérimental"
1er jour	19	19	7,60	7,60
		Début de l'infestation		Début de l'infestation
2e jour	69	56	27,60	22,40
3e jour	39	47	15,60	18,80
4e jour	7	19	2,80	7,60
5e jour	7	7	2,80	2,80
6e jour	20	19	8,00	7,60
7e jour	20	15	8,00	6,00
8e jour	15	4	6,00	1,60
9e jour	6	9	2,40	3,60
10e jour	11	11	4,40	4,40
Total à l'arrêt de l'expérience	213	206	85,20	82,40

tion, que dans le bouillon de culture ensemencé avec le sang du rat sacrifié après 1 h. Ce phénomène de « clearance » est tout à fait compréhensible.

Bacillus thuringiensis a donc bien pénétré dans la circulation sanguine générale des rats servant à la nourriture des mouches du lot « expérimental ».

2. Sur quelques mouches mortes, conservées, du lot « expérimental » et stérilisées extérieurement, nous réalisons un broyat en sérum physiologique stérile. Ce broyat est ensemencé en anaérobiose sur bouillon VF (viande-foie) puis 48 h après sur gélose ordinaire.

Ensuite une identification biochimique sur les colonies obtenues nous permet de retrouver *B. thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis a donc bien été absorbé par les mouches pendant leurs repas infestant.

Ainsi donc les mouches ont bien été infestées par *Bacillus thuringiensis* mais le pourcentage de mortalité obtenu, sensiblement identique (même inférieur) à celui du lot témoin, nous permet d'affirmer qu'aucune des 3 variétés de *Bacillus thuringiensis* (var. *thuringiensis*, var. 996, var. *Kenyae*) n'est pathogène pour les adultes de *Glossina tachinoides* West.

CONCLUSION

Notre précédente étude (8) a montré que ni *Bacillus alvei*, ni *Bacillus circulans* n'avaient de pouvoir pathogène pour les pupes de *Glossina tachinoides*.

Maintenant, nous pouvons également affirmer qu'aucune des 3 variétés pures ou mélangées de *Bacillus thuringiensis* (var. *thuringiensis*,

var. 996, var. *Kenyae*) des sérotypes 1 et 4a-4c, ne sont pathogènes ni pour les pupes ni pour les adultes de *Glossina tachinoides* West.

Des recherches bibliographiques (13, 14, 15, 16, 17) nous ont permis d'établir une liste d'une trentaine d'espèces et d'une centaine de sous-espèces de micro-organismes (bactéries, champignons, parasites, etc.) pathogènes pour les Diptères et pouvant donc éventuellement avoir une action pathogène pour les Glossines (*Diptera-Muscidae*).

Récapitulation des bactéries étudiées et n'ayant aucun pouvoir pathogène pour *Glossina tachinoides* West (*Diptera-Muscidae*).

— *Bacillus alvei* Cheshire et Cheyne;

— *Bacillus circulans* Jordan;

— *Bacillus thuringiensis* Berliner.

- var. *thuringiensis* du sérotype 1;
- var. 996 du sérotype 1;
- var. *Kenyae* n° 3 (Rhodesia) du sérotype 4a-4c.

Remerciements

Nous tenons à remercier :

— Monsieur J. ITARD, chef du Service d'Entomologie de l'I.E.M.V.T. à Maisons-Alfort, qui a bien voulu nous faire parvenir dans les délais extrêmement rapides et dans d'excellentes conditions des pupes et des mouches d'élevages.

— Mademoiselle H. de BARJAC, du Service de lutte bactériologique contre les Insectes, de l'Institut Pasteur de Paris, qui nous a fourni les souches de *Bacillus thuringiensis* ainsi que de précieux renseignements concernant ce germe.

SUMMARY

Investigations on the pathogenic capacity of *Bacillus thuringiensis* on *Glossina* (*Diptera-Muscidae*). Study on *Glossina tachinoides* in Chad

Experimental infestation tests showed that three different varieties of *Bacillus thuringiensis* Berliner, — serotypes 1 and 4a-4c — are pathogenic neither for the pupae nor the adults of *Glossina tachinoides* West, reared or not reared.

RESUMEN

Búsqueda del poder patógeno de *Bacillus thuringiensis* sobre las glosinas (*Diptera-Muscidae*). Estudio sobre *Glossina tachinoides* en República de Chad

Ensayos de infestación experimental probaron que tres variedades diferentes de *Bacillus thuringiensis* Berliner, de los serotipos 1 y 4a-4c, son patógenas ni para las pupas ni para los adultos de *Glossina tachinoides* West., salvajes o criadas.

BIBLIOGRAPHIE

1. BONNEFOI (A.), BARIAC (H. de) et LECADET (M.). Modes d'action du *Bacillus thuringiensis* sur les insectes. *Meded. Rijkofac. Landbouwrus en Gent*, 1966, **31** (3): 526-535.
2. DETHIER (V. G.). Notes on the biting response of tsetse flies: *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 1954 (3): 160-171.
3. DUMAS (J.). *Bacteriologie Médicale*. Paris, Flammarion, 1951, pp. 517-520.
4. FRYE (R. D.). Infectivity tests utilizing *Bacillus thuringiensis* against several species of insects. *J. Invert. Pathol.*, U.S.A., 1967, **9** (2): 284-287.
5. GRUVEL (J.) et BALIS (J.). Essai d'élevage de *Glossina tachinoides* M. au Laboratoire. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1966, **19** (1): 21-28.
6. HEGH (E.). Les tsé-tsés. Bruxelles, Ministère des colonies, 1929, tome 1, 742 p.
7. ITARD (J.) et MAILLOT (L.). Notes sur un élevage de glossines (*Diptera-Muscidae*) entrepris à partir de pupes expédiées d'Afrique, à Maisons-Alfort. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1966, **19** (1): 29-44.
8. MAILLARD (J. C.). Recherches sur des bacilles présumés pathogènes pour les glossines. Etude sur *Glossina tachinoides* West en République du Tchad. *Rev. Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1974, **27** (1): 67-73.
9. MORRIS (O. N.). Susceptibility of several forest insects of British Columbia to commercially produced *Bacillus thuringiensis*. II. Laboratory and field pathogenicity test. *J. Invert. Pathol.*, U.S.A., 1969, **13** (2): 285-295.
10. NORRIS (J. R.). *Bacillus thuringiensis* in insect control. *Ann. appl. Biol.*, G.-B., 1965, **56** (2): 335.
11. PETERSON (A.). *Entomological techniques*. Michigan, U.S.A., Edwards Brothers INC, 1959.
12. SHAIKH (M. V.) et MORRISON (F. O.). Susceptibility of nine insect species to infection by *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.*, U.S.A., 1968, **8** (3): 347-350.
13. STEINHAUS (E. A.). An orientation with respect to members of the genus bacillus pathogenic for insects. *Bact. Rev.*, 1946, **10** (1, 2): 51-61.
14. STEINHAUS (E. A.). Potentialities for microbial control of insects. *Agric. Food. Chem.*, 1956, **4** (8): 676-680.
15. STEINHAUS (E. A.). Microbial diseases of insects. *Am. Rev. Microb.*, 1957, **11**: 165-182.
16. STEINHAUS (E. A.). Bacteria as microbial control agents. Trans. 1st conf. Insect Pathol. and Biol. control, Praha 1958, pp. 37-50.
17. STEINHAUS (E. A.). *Insect Pathology*. Tomes I et II. New York, London, Academic Press, 1963.