



LE BACILLUS SPHAERICUS

UTILISATION POUR LE CONTRÔLE DES MOUSTIQUES



24 février 2010

*Développement durable,
Environnement
et Parcs*

Québec 

ÉQUIPE DE RÉALISATION

Lise Meilleur M. Sc.
Département de chimie-biologie
Université du Québec à Trois-Rivières

Jean Lacoursière Ph. D.
Water Management Programme
Université de Kristianstad
Suède

Jacques Boisvert Ph. D.
Département de chimie-biologie
Université du Québec à Trois-Rivières

L. MEILLEUR, J. LACOURSIÈRE et J. BOISVERT, 2010. *Le Bacillus sphaericus, Utilisation pour le contrôle des moustiques*, Québec, ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 36 pages.

Dépôt légal – Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2013
ISBN 978-2-550-68299-8 (PDF)
© Gouvernement du Québec, 2013

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	1
INTRODUCTION	2
1. BACILLUS SPHAERICUS (BSPH)	4
1.1 Mode d'action du <i>Bacillus sphaericus</i>	4
1.2 Effets sur les espèces non ciblées	7
1.3 Efficacité du <i>Bsph</i>	8
1.3.1 Facteurs influençant l'efficacité du <i>Bsph</i>	8
1.3.2 Persistance de la toxicité du <i>Bsph</i>	9
2. RÉMANENCE DE LA TOXICITÉ DU <i>BSPH</i>	10
2.1 Recyclage des spores	10
3. RÉSISTANCE	12
3.1 Mécanismes de résistance	13
3.1.1 Résistance au <i>Bacillus sphaericus</i>	13
3.2 Résistance croisée	14
4. DIFFÉRENTES SOLUTIONS POUR PRÉVENIR LA RÉSISTANCE	16
4.1 Contrôle limité	16
4.2 Rotation ou mélange de larvicides	16
4.2.1 Synergisme	17
4.2.2 Souche recombinante	18
4.3 Autres solutions.....	18
CONCLUSION	19
BIBLIOGRAPHIE	20
ANNEXE I	29
ANNEXE II	30

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Bactérie *Bacillus sphaericus* en cours de sporulation, montrant la spore et le cristal protéique contenant les toxines actives sur les larves de moustiques..... 5
- Figure 2 : Représentation schématique du mode d'action des cristaux *Bacillus sphaericus* sur une larve de moustique..... 6
- Figure 3 : Détermination de la résistance croisée 15

Résumé

Depuis plusieurs années, on observe un intérêt croissant pour la recherche sur des organismes biologiques tels que les moisissures, les virus et les bactéries concernant leur utilisation comme insecticides. Ces recherches ont pour but de trouver une solution de rechange aux produits chimiques qui soit moins à risque pour la santé et l'environnement tout en étant moins susceptible de développer de la résistance chez les espèces visées, comme c'est le cas pour plusieurs pesticides. Malgré les promesses de départ, peu d'organismes biologiques offrent une efficacité intéressante en condition d'utilisation réelle.

En Amérique du Nord, le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) et le *Bacillus sphaericus* (*Bsph*) sont les principales bactéries utilisées comme insecticides pour le contrôle des moustiques. Le *Bsph* est homologué au Canada depuis 2005 et a été utilisé pour la première fois dans un programme de traitement préventif contre le virus du Nil occidental (VNO). Le *Bsph* est une bactérie qui possède des toxines particulièrement efficaces et spécifiques contre les larves du genre *Culex* (moustique). Toutefois, l'apparition rapide et de plus en plus fréquente d'une résistance à cet insecticide biologique a incité les chercheurs à approfondir les connaissances sur cette bactérie afin d'améliorer son utilisation à titre d'insecticide.

Ce document est une revue de la littérature sur les recherches consacrées à cette bactérie. Il porte sur les aspects de sa morphologie, son mode d'action, son efficacité, sa persistance, sa rémanence, le développement de la résistance, le recyclage et ses effets sur les espèces non ciblées.

Aujourd'hui, alors que la résistance se développe plus fréquemment, tant en laboratoire que sur le terrain, des solutions sont proposées pour atténuer cet inconvénient. Il s'agit de concevoir un programme de lutte intégrée qui tienne compte non seulement de l'utilisation du *Bsph* en tant que larvicide, mais aussi du potentiel de résistance des espèces ciblées. Les solutions ont pour but d'éviter, de retarder, de diminuer ou de renverser la résistance des insectes ciblés sensibles au *Bsph*.

Introduction

Le Québec est un vaste territoire riche en ressources naturelles tels les forêts et les cours d'eau. Il est également riche en diptères piqueurs tels les moustiques et les mouches noires. Chaque année, la densité des populations ainsi que leurs piqûres créent des pertes de plusieurs millions de dollars au Canada. Les domaines forestiers, agroalimentaires et récréotouristiques sont durement touchés par ce phénomène et certaines maladies qui entraînent des encéphalites mortelles peuvent être transmises par les moustiques. La dernière des maladies entrées en lice est le virus du Nil occidental.

Les moyens pour contrôler ces populations de diptères ont été nombreux et souvent dommageables pour l'environnement (pensons seulement au dichlorodiphényltrichloréthane (DDT) utilisé dans les années 1940 à 1970). Pourtant, c'est depuis l'introduction du DDT comme insecticide que les produits chimiques de synthèse ont connu un essor fulgurant à travers le monde; tous avaient un seul et même but : contrôler les insectes nuisibles. Ce faisant, la production de denrées agricoles a augmenté, tout comme la protection des cultures et des forêts, sans oublier le contrôle des insectes vecteurs de maladies tant humaines qu'animales. Bien que l'utilisation massive et souvent incontrôlée de ces produits de synthèse ait eu un succès indéniable dans le contrôle de diverses populations, les problèmes qui y sont associés ont tôt fait d'alarmer le public et le monde scientifique en raison des effets secondaires engendrés. Toutefois, il a fallu attendre jusqu'en 1981 pour voir apparaître l'interdiction d'utiliser le DDT au Québec et que soit restreinte l'utilisation de certains autres produits pouvant être dommageables pour la santé et l'environnement.

Les effets secondaires comprennent la contamination des plans d'eau, l'intoxication d'espèces végétales et animales non ciblées, la bioaccumulation dans les chaînes trophiques et l'apparition de plus en plus fréquente de la résistance multiple (la résistance à un insecticide peut engendrer la résistance à plusieurs produits chimiques de la même famille) chez les espèces ciblées. Devant ce constat, les scientifiques ont cherché des solutions de rechange autant dans les domaines de la foresterie et de l'agriculture que dans la lutte contre les insectes vecteurs de maladies (malaria, onchocercose, dengue, fièvre jaune, etc.). C'est dans ce contexte qu'est apparue l'idée d'utiliser des microorganismes entomopathogènes comme le *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (*Bti*) et le *Bacillus sphaericus* (*Bsph*), deux insecticides bactériologiques efficaces contre les larves de moustiques (larvicides).

Au Québec, le *Bti* est utilisé depuis le début des années 1980 pour contrôler les moustiques et les mouches noires. Au Canada, le *Bsph* a été homologué au printemps 2005 et commercialisé sous le nom de *Vectolex WSP*. Il a été utilisé de 2002 à 2005 pour contrôler les moustiques pendant la crise du VNO, détecté pour la première fois au Québec en juillet 2002. Il n'était alors utilisé que dans les puisards de la région métropolitaine de Montréal. Toutefois, dès 2005, on a élargi son utilisation à d'autres gîtes (mares temporaires, pneus). L'intérêt premier de son utilisation demeure sa persistance d'environ trois semaines qui limite le nombre de traitements à effectuer (Boisvert *et al.* 2006). Malgré cela, son utilisation au Canada est très restreinte en raison des coûts du produit homologué.

Préalablement à une utilisation à grande échelle d'un insecticide biologique, tel le *Bsph*, il est essentiel de connaître les paramètres qui peuvent faire varier son efficacité. Ces connaissances comprennent notamment le mode d'application et le dosage appropriés en fonction du milieu, la

persistance du produit et son devenir dans l'environnement (tous des facteurs analysés pour l'homologation des insecticides). Il est également important de répertorier les effets sur les espèces non ciblées et les écosystèmes ainsi que de connaître le mode de reproduction de l'agent biologique, particulièrement en conditions de terrain (c'est-à-dire la multiplication et la sporulation). Finalement, il importe d'avoir une connaissance du potentiel de dispersion (dissémination directe du produit, immigration et émigration d'insectes contaminés ou non) et éventuellement de l'apparition d'une résistance des insectes visés (Juong et Côté 2000).

Les études portant sur l'utilisation du *Bsph*, tant en laboratoire que sur le terrain, ont démontré que ce produit n'avait pas d'effets nuisibles sur l'environnement. Différentes souches connues ont été étudiées (en laboratoire et sur le terrain) afin de déterminer, pour chacune d'elles, les niveaux de toxicité spécifique ainsi que les variables qui touchent cette toxicité (par exemple, la température, les doses) chez les espèces ciblées. La grande sélectivité du *Bsph* et son action létale qui se restreint à quelques espèces ciblées le différencient du *Bti*, par exemple, dont le spectre d'action est plus large.

Jusqu'à récemment, le *Bsph* semblait être un complément, voire une solution de rechange au *Bti* en raison de sa plus grande efficacité par rapport à certaines espèces de moustiques vecteurs de maladies. Cependant, ces espèces ciblées ont développé en peu de temps une résistance, tant en laboratoire (par pression sélective) que sur le terrain (après des traitements répétitifs). Cette résistance serait due à la composition de sa toxine binaire. Les insectes ciblés déjouent beaucoup plus facilement l'action létale du *Bsph* puisque celui-ci ne comporte qu'une seule classe de récepteurs, contrairement au *Bti*, qui a besoin de quatre récepteurs différents. Néanmoins, les cas de résistance répertoriés à ce jour ne semblent pas irréversibles. Il serait possible de renverser le processus de résistance grâce à différentes méthodes telles que l'arrêt temporaire de l'application du produit ou la rotation du *Bsph* avec d'autres produits tel le *Bti*. Enfin, des souches génétiquement modifiées (contenant les gènes toxiques de *Bsph* et de *Bti*) pourraient être utilisées pour contrer la résistance.

1. BACILLUS SPHAERICUS (BSPH)

Aujourd'hui, on compte plus de 300 souches de *Bsph* provenant de différentes sources, dont 17 présentent des toxicités différentes (Su 2008). Parmi celles-ci, trois ont fait l'objet de recherches intensives, car elles présentaient des toxicités plus élevées pour certaines espèces de larves de moustiques (Zahiri *et al.* 2004 et Su 2008). Les principaux traits phénotypiques servant à classer ces souches appartenant à l'espèce *Bsph* sont la présence de spores sphériques ainsi qu'une incapacité à croître en milieu anaérobie et à utiliser plusieurs sucres (Baumann *et al.* 1991). Le *Bsph* est un bacille Gram-positif, aérobic strict, mésophile, à métabolisme oxydatif et qui forme une spore sphérique et déformante en position terminale ou subterminale. Ubiquiste, cette bactérie est un saprophyte naturel des sols, des sédiments marins et de l'eau douce (Singer 1985, Davidson 1989, Sinègre *et al.* 1990 et Park *et al.* 2008).

Les bactéries entomopathogènes sont connues depuis les années 1900, bien que leur utilisation pour contrôler les diptères n'ait été envisagée que dans les années 1970. L'espèce *Bsph* est étudiée comme agent de contrôle depuis le milieu des années 1970 (Charles et Nielsen-Leroux 2000), mais a été isolée pour la première fois en 1965, en Californie, sur une larve de *Culiseta incidens* (DesRochers et Garcia 1983). Les chercheurs ont rapidement déterminé ses principaux avantages : sa toxicité, sa spécificité, sa persistance ainsi que son innocuité pour les espèces non ciblées et l'environnement (Zahiri *et al.* 2002). Cependant, c'est Singer (1985) qui a le premier montré le rôle toxique et non infectieux du *Bsph*. Il existe trois souches qui sont particulièrement toxiques pour les larves de certaines espèces de moustiques. La souche 1593 a été isolée pour la première fois sur des larves infectées de *Culex fatigans* en provenance de Jakarta, en Indonésie. Pour leur part, la souche OMS 2297 ou MR4 a été isolée à partir de larves de *Culex quinquefasciatus* du Sri Lanka et la souche 2362 a été isolée en 1981 à partir de mouches noires adultes *Simulium damnosum* du Nigeria (Sinègre *et al.* 1990).

Le *Bsph* est beaucoup plus sélectif que le *Bti* en ce qui concerne sa toxicité pour certaines espèces telles que les moustiques du genre *Culex*, lesquels sont les plus vulnérables au *Bsph* (Zahiri *et al.* 2004). Cependant, il y a certaines espèces de *Culex* qui demeurent insensibles au *Bsph*. C'est le cas de *Culex cinereus*, un prédateur de *Culex quinquefasciatus*. Celui-ci est toutefois très sensible au *Bsph* (Davidson 1985). Les genres *Anopheles* et *Aedes* sont moins sensibles que les *Culex*, surtout *Aedes aegypti*, qui est pratiquement insensible au *Bsph* (Dagnogo et Coz 1982, Davidson 1988, Davidson 1989, Sinègre *et al.* 1990, Federici *et al.* 2003 et Poopathi et Tyagi 2004).

1.1 Mode d'action du *Bacillus sphaericus*

L'activité larvicide du *Bsph* est due à un cristal protéique appelé *toxine binaire* ou *Bin*, qui est formé de deux polypeptides d'environ 51,4 kDa (BinB) et 42 kDa (BinA) (figure 1) (Baumann *et al.* 1985, Davidson et Yousten 1990, Charles *et al.* 1996 et Federici *et al.* 2003) et qui est produit uniquement au moment de la sporulation de *Bsph* (Karch *et al.* 1987).

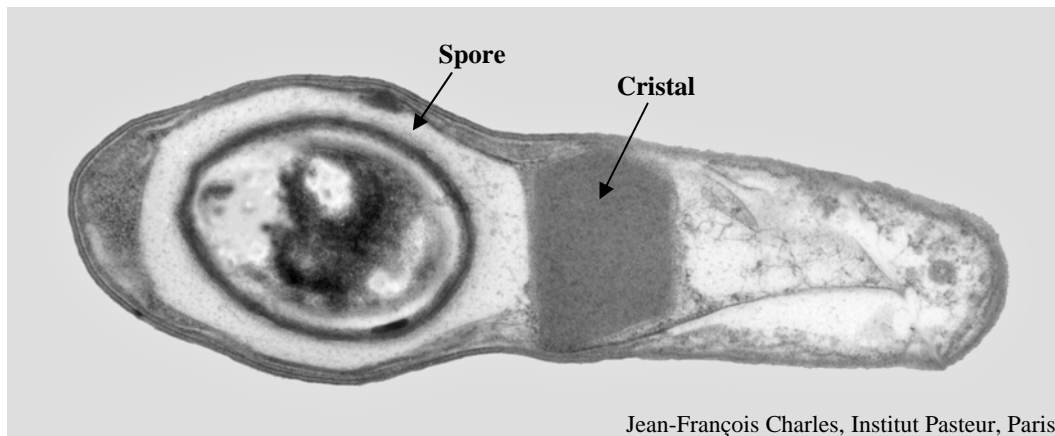


Figure 1 : Bactérie *Bacillus sphaericus* en cours de sporulation, montrant la spore (forme de résistance) et le cristal protéique contenant les toxines actives sur les larves de moustiques (microscopie électronique).

La propriété toxique des protéines qui composent le cristal du *Bsph* pour les larves de certaines espèces de moustiques a été suggérée pour la première fois par Singer en 1973 (cité par Davidson et Yousten 1990). Depuis, plusieurs chercheurs ont démontré qu'il y avait une corrélation directe entre la production du cristal, la sporulation et l'activité larvicide du *Bsph* (Baumann *et al.* 1985 et Singer 1990). Selon les connaissances actuelles, les toxines du *Bsph*, composées de différentes protéines, doivent être solubilisées dans le milieu alcalin de l'intestin moyen de l'insecte ciblé pour être actives. C'est donc à la suite de l'ingestion du complexe formé de la spore et du cristal par les larves de moustiques que les protéines se clivent sous l'effet combiné du pH élevé de l'intestin et d'une protéase donnant des polypeptides de 43 et 39 kDa respectivement. C'est sous cette forme que les toxines sont relâchées dans l'intestin des larves, et ce, même chez des espèces non sensibles au *Bsph* comme l'*Aedes aegypti* (Charles *et al.* 1996).

Cette toxine binaire se lie à un récepteur cellulaire spécifique, une α -glucosidase membranaire, soit une enzyme présente sur les cellules des microvillosités de l'intestin moyen des insectes (Darboux *et al.* 2001). Cette liaison cause la lyse des cellules par la formation de pores dans les cellules épithéliales de la paroi intestinale, ce qui provoque la mort de la larve (Davidson 1988). Les recherches ont montré que la liaison au récepteur des cellules intestinales ciblées se ferait de la même façon chez tous les insectes, qu'ils soient sensibles ou non au *Bsph* (Charles *et al.* 1996). Selon Nielsen-Leroux *et al.* (2002) et Darboux *et al.* (2001), la liaison de la toxine binaire au récepteur spécifique à la surface des cellules épithéliales de l'intestin moyen serait entreprise par la protoxine BinB (42 kDa) et la protoxine BinA (51,4 kDa) serait à l'origine de la toxicité (Darboux *et al.* 2001).

Le fait que la toxicité du *Bsph* soit associée à une seule classe de récepteurs dans l'intestin moyen de la larve, par les composantes de la BinA (Nielsen-Leroux et Charles 1992, Silva-Filha *et al.* 1999, Yuan *et al.* 2003 et Poopathi et Tyagi 2004), expliquerait que la résistance à cette toxine peut être aussi facilement induite, contrairement au *Bti*, qui a besoin de quatre récepteurs différents.

Chez les larves de moustiques sensibles, les premiers symptômes d'intoxication au *Bsph* peuvent être détectés dans un délai de 30 minutes à 1 heure après l'ingestion (Karch et Coz 1986, Davidson 1984, Davidson et Yousten 1990 et Charles *et al.* 2000). Toutefois, dans des bioessais, c'est généralement après un délai de 48 heures que la mort survient; la rapidité d'action serait fonction de la dose ingérée (Mulla *et al.* 1984 et Davidson et Yousten 1990). Après 4 heures, les larves cessent de se nourrir et après 36 heures, se produit une paralysie générale des larves (Singh et Gill 1988).

D'autres facteurs expliquent également la variabilité de la sensibilité chez les différentes espèces. Chez les *Aedes*, plus spécialement chez les *Aedes aegypti*, le faible taux de toxicité serait dû au fait que la toxine ne trouverait pas (ou trop peu) de récepteurs sur lesquels se lier (Rodcharoen et Mulla 1995). Chez les espèces d'*Anopheles*, la toxine du *Bsph* pourrait se lier, mais avec une spécificité et une affinité moins élevées que chez les *Culex*. Mulla *et al.* (1984) ont également démontré que les larves d'un stade plus avancé (stade 4) étaient de deux à dix fois moins sensibles que les larves de deuxième stade; le stade larvaire joue donc un rôle important dans la sensibilité de l'espèce.

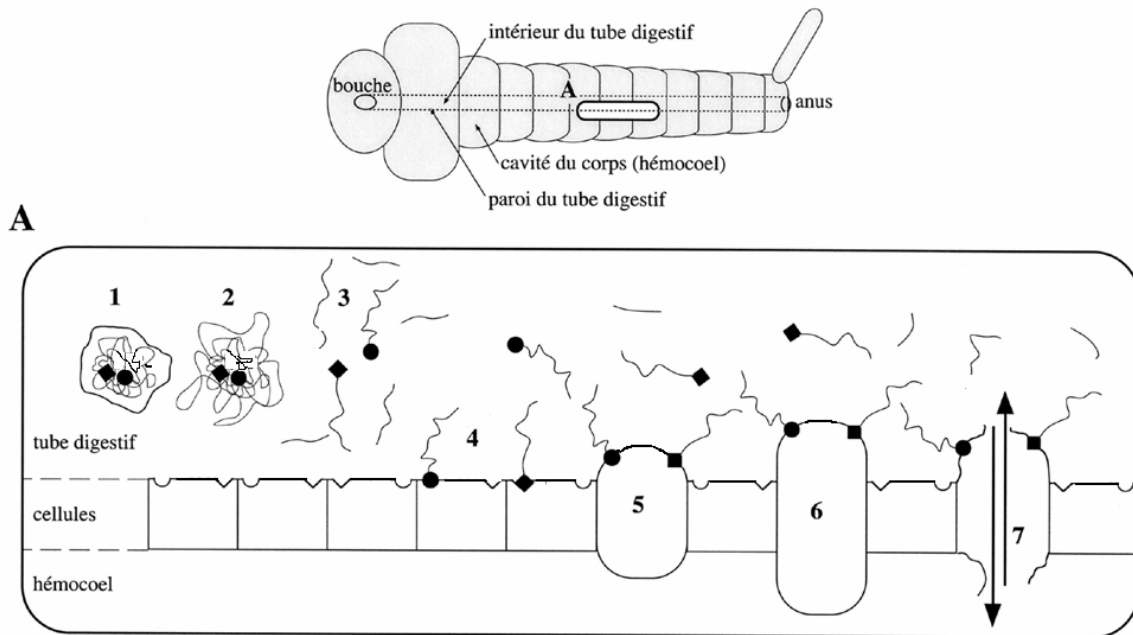


Figure 2 : Représentation schématique du mode d'action des cristaux *Bacillus sphaericus* sur une larve de moustique.

Après ingestion, les cristaux sont dissous dans le liquide alcalin du tube digestif (1), ce qui libère de longues chaînes de protéines (BinA et BinB) (2) qui sont par la suite sectionnées par des enzymes pour produire les segments toxiques (3). Cette toxine binaire se fixe sur une classe de récepteurs spécifiques localisés sur la membrane des cellules qui forment la paroi du cæcum gastrique et de l'intestin moyen postérieur (4). L'effet toxique s'exerce par un mécanisme peu connu (5) : la cellule se gonfle (6) et il y a création de pores ou de canaux dans la membrane cellulaire (7) avant l'éclatement de la cellule, puis la mort de la larve (texte inspiré de Baumann *et al.* 1991, Charles *et al.* 2000, et schéma tiré de <http://www.mddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/>, de Lacoursière et Boisvert 2004).

Plusieurs études démontrent que l'action toxique du cristal sur les larves sensibles suit une séquence de cinq étapes (figure 2) : 1) l'ingestion du complexe formé par le cristal et la spore, 2) la solubilisation dans l'intestin moyen sous l'effet du pH alcalin, 3) les protéines de 51 et 42 kDa qui se clivent pour donner des protéines de 43 et 39 kDa, 4) la liaison de la protéine toxique aux cellules du cæcum gastrique et de l'intestin moyen, 5) l'effet toxique dont les mécanismes sont plus ou moins connus (Baumann *et al.* 1991, Charles *et al.* 2000 et Poopathi et Tyagi 2004).

1.2 Effets sur les espèces non ciblées

Grâce à toute la littérature concernant les différentes recherches sur l'efficacité du *Bsph*, il est possible d'établir une liste de différentes espèces non ciblées et insensibles au *Bsph*. Toutefois, l'utilisation de plusieurs souches de *Bsph* sous différents types de formulations (poudre, liquide, granules) rend l'interprétation et la comparaison des résultats plus difficiles. Dans une étude portant sur des essais effectués avec le *Bti* mais qui peuvent parfaitement s'appliquer au *Bsph*, Lacoursière et Boisvert (2004) mentionnent ceci : « Comme les tests sont souvent conduits en utilisant des préparations pures ou mixtes de cristaux entiers ou dissous, de spores, de débris cellulaires, de fermentation et autres, l'interprétation des résultats est très complexe lorsque faite en fonction de l'utilisation normale de ces produits sur le terrain. » De plus, l'utilisation du *Bsph* étant plus récente et moins importante que le *Bti*, la liste des espèces non ciblées (annexes I et II) est beaucoup plus modeste que celle des espèces non ciblées répertoriées pour le *Bti*. Pour la comparer avec la liste des espèces non ciblées répertoriées pour le *Bti*, le lecteur peut se référer à celle qui est proposée par Lacoursière et Boisvert (2004) ainsi qu'au document produit par Boisvert et Boisvert (2000).

Plusieurs études démontrent que le *Bsph* est non toxique pour certaines espèces non ciblées (Mulla *et al.* 1984, Singer 1985, Sinègre *et al.* 1990, Pham *et al.* 1998, Lacey et Siegel 2000 et Zahiri *et al.* 2002). Alors que Dagnogo et Coz (1982) mentionnent que le *Bsph* est non toxique pour les crustacés, les poissons et les mammifères, Aly *et al.* (1989) énumèrent les avantages de la sélectivité du *Bsph*, notamment en ce qui concerne le respect de la santé humaine et la sécurité de l'environnement. D'après Lacey et Siegel (2000), le *Bsph* est non infectieux et non pathogénique en laboratoire sur les animaux étudiés, et ce, à des doses rencontrées dans les pires conditions comme des injections intraoculaires et intracérébrales. Selon ces auteurs, le faible nombre d'études sur les effets toxiques du *Bsph* sur la faune est dû à sa commercialisation récente et à son utilisation limitée en différents types de gîtes (par exemple, puisards ou pneus usagés).

Yousten *et al.* (1991) sont arrivés à la même conclusion au sujet de la faible toxicité du *Bsph* à la suite de tests effectués sur des escargots et des huîtres. Aucun effet nocif n'a été observé sur ces espèces. Également, Lacey et Mulla (1990) concluent que le *Bsph* offre un contrôle très sélectif et n'a pas d'effets néfastes sur l'environnement à la suite de tests de toxicité qui ont été faits sur différentes espèces d'insectes, de crustacés et autres. En 2003, Lacey et Merritt réitèrent que le *Bsph* n'est pas toxique pour la faune, et ce, tant chez les insectes que chez les poissons et les mammifères. Cependant, ils précisent que les résultats pourraient varier en fonction de la souche de *Bsph* utilisée. C'est d'ailleurs ce qui se produit avec des moustiques non ciblés du genre *Toxorhynchites*, dont les larves sont des prédateurs des insectes ciblés. Selon leurs recherches, les *Toxorhynchites* seraient sensibles à certaines souches et non à d'autres. Au sujet de cette susceptibilité variable en fonction de la souche, Mulla *et al.* (1984) confirment qu'il n'y a pas

d'effets néfastes significatifs sur la faune. Ils concluent leur étude en précisant que les deux souches (1593 et 2362) peuvent être utilisées pour le contrôle des larves de *Culex* sans danger pour la faune aquatique non ciblée.

Plus récemment, d'autres études, comme celles de Poopathi et Tyagi (2004) et de Merritt *et al.* (2005), ont démontré que le *Bsph* n'a aucun effet néfaste significatif sur la faune non ciblée testée. Les recherches de Merritt *et al.* (2005) s'appuient sur des échantillons de plus de 130 organismes aquatiques recueillis après trois ans d'application d'une formulation commerciale de *Bsph* sur les mêmes sites. Les analyses ont porté sur la richesse (le nombre de taxa ainsi que le nombre de diptères en excluant les moustiques), la diversité (combinant la richesse des taxa et l'abondance) et l'abondance des diptères (en excluant les moustiques) en proportion de l'abondance de tous les macro-invertébrés. Cette étude, qualifiée par les auteurs comme étant la plus exhaustive jamais réalisée sur l'effet des traitements avec du *Bsph*, démontre l'innocuité du *Bsph* pour les invertébrés non ciblés. L'annexe I donne donc un aperçu de différentes espèces non ciblées qui ont été considérées par différents auteurs comme non sensibles au *Bsph*. L'annexe II présente un résumé tiré des résultats de Merritt *et al.* (2005).

1.3 Efficacité du *Bsph*

Il faut signaler au préalable, comme le remarque Davidson (1989), qu'il est très difficile de comparer les résultats obtenus dans les différentes recherches menées sur l'efficacité du *Bsph*. Les protocoles expérimentaux ne sont pas uniformes, les manipulations en laboratoire diffèrent et les conditions environnementales et géographiques varient d'une étude à l'autre sur le terrain. De surcroît, les souches ainsi que les préparations de *Bsph* utilisées en laboratoire et sur le terrain ne sont pas les mêmes et les espèces ciblées (moustiques) sont différentes d'une étude à l'autre.

1.3.1 Facteurs influençant l'efficacité du *Bsph*

Plusieurs facteurs, tant biotiques qu'abiotiques, peuvent influencer l'activité de *Bsph* sur les espèces ciblées et non ciblées. Ces facteurs sont l'espèce, l'âge (stade), la place dans la chaîne alimentaire et le mode de nutrition des différentes espèces. Des facteurs environnementaux comme la température, la turbidité (quantité de matière en suspension) et la pollution peuvent agir sur l'efficacité du *Bsph*. La formulation utilisée (liquide, granules, etc.), le dosage (en spores, milligrammes ou unités toxiques) et la fréquence des traitements sont autant de facteurs qui peuvent aussi influencer l'efficacité du produit (Lacey et Merritt 2003).

Certaines recherches ont démontré que le *Bsph*, dans une eau fortement chargée de matières organiques en suspension, pouvait conserver son effet toxique pendant quelques semaines (Nicolas *et al.* 1987, Regis et Nielsen-Leroux 2000 et Floore *et al.* 2002) et même pendant des mois (Hertlein *et al.* 1978, Karch et Coz 1986 et Su 2008). Mulla *et al.* (1984) ont d'ailleurs constaté que l'efficacité du *Bsph* était inversement proportionnelle au taux de matières organiques. Cela semble dû au fait que le cristal du *Bsph* est étroitement lié à la spore par un exosporium qui conférerait à ce complexe formé par la spore et le cristal une protection contre les facteurs environnementaux (Karch et Hougard 1986 et Becker *et al.* 1993). Cependant, d'après Sinègre *et al.* (1990), une eau trop chargée de particules en suspension (nutritives ou non) diminue les probabilités d'ingestion des cristaux et, par le fait même, l'efficacité du *Bsph*. La densité des larves a également un impact significatif sur l'efficacité du *Bsph*; Becker *et al.* (1993)

ont ainsi trouvé une relation négative entre la densité des larves et l'efficacité du *Bsph*. Plus il y a de larves, plus la densité du *Bsph* doit être élevée.

Parmi les autres facteurs environnementaux jouant un rôle important dans l'efficacité du *Bsph*, la température de l'eau est l'un des plus importants (Su 2008). En effet, des recherches ont démontré qu'à 25 °C, l'efficacité sera plus élevée qu'à 5 °C (Becker *et al.* 1993). Dans une eau froide, les larves se nourrissent peu et les cristaux se sédimentent avant d'être ingérés. À des températures variant de 12,0 à 20,5 °C, l'action du *Bsph* serait retardée. La mortalité maximale ne s'obtiendrait alors que sept jours après le traitement (Hougard *et al.* 1985 et Sinègre *et al.* 1990).

Le rayonnement solaire, particulièrement les rayons ultraviolets, a également un effet important sur le *Bsph* en diminuant la rémanence (retour de l'effet toxique après un certain temps) du produit (Burke Jr. *et al.* 1983, Sinègre *et al.* 1990, Becker *et al.* 1993 et Silva-Filha *et al.* 2001). C'est un mécanisme de dégradation de plusieurs insecticides microbiens pour lequel le *Bsph* ne fait pas exception. Hougard *et al.* (1985) précisent toutefois que la pollution de l'eau peut protéger les spores contre le rayonnement ultraviolet. Selon Burke *et al.* (1983), la souche 1593 de *Bsph* perd toute son activité larvicide après seulement six heures d'exposition à la lumière du soleil. Vaňková (1984) conteste cette affirmation en mentionnant que, bien que la viabilité des spores soit diminuée, voire complètement réduite, l'activité larvicide ne serait pas touchée par un traitement aux rayons ultraviolets conduit en laboratoire. Pour leur part, les recherches de Hadapad *et al.* (2008) démontrent bien l'importance de trouver et de mettre au point des agents de protection dans les différentes formulations afin de prolonger l'efficacité du *Bsph*. Pour ce faire, Hadapad *et al.* (2009) ont testé les propriétés de 26 composants naturels et synthétiques dans le but de protéger les spores contre les effets de la radiation ultraviolette et ainsi prolonger la persistance du biopesticide.

1.3.2 **Persistance de la toxicité du *Bsph***

Plusieurs études traitent de la persistance ou de la rémanence du *Bsph* sans distinction apparente. Certains chercheurs exposent les effets résiduels lorsqu'il est question de recyclage (Lacey *et al.* 1988, Skovmand et Bauduin 1996 et Su 2008). Dans cette revue de la littérature, la persistance sera décrite comme étant l'activité toxique continue (sans interruption) du produit utilisé. Mulla *et al.* (1994) font état d'une persistance de quatorze jours pour le *Bsph*. Selon certains chercheurs, le recyclage des spores serait une source importante de la prolongation de la persistance du *Bsph* (Uspensky *et al.* 1998). Lacey et Merritt (2003) mentionnent que la persistance de l'activité toxique (non observée pour le *Bti*) pourrait jouer un rôle important dans le risque d'apparition de la susceptibilité chez des espèces non ciblées. La persistance cause un accroissement de la pression sélective et donc une augmentation du risque d'apparition de la résistance. Par contre, conformément à ce qui est mentionné dans la section 2.2, la sensibilité des espèces non ciblées n'a pas encore été démontrée.

Le recyclage des spores confirmé dans plusieurs habitats après analyse bactérienne peut, dans certains cas, devenir un handicap dans des programmes mis en œuvre pour contrer la résistance. Ainsi, Regis et Nielsen-Leroux (2000) mentionnent que le recyclage des spores contribue à ralentir la diminution de la résistance en maintenant la toxicité du produit même après l'arrêt des traitements. Toutefois, pour certains (Hougard *et al.* 1985), la persistance de l'effet toxique sur les larves dépendrait de la concentration utilisée (dosage).

Tout comme pour l'efficacité, divers facteurs peuvent jouer un rôle dans la persistance du *Bsph*. Ludwig *et al.* (1994) ont constaté, en laboratoire, qu'une aération continue diminuait la persistance du *Bsph* en accélérant les processus de décomposition de la toxine. Toutefois, une eau riche en matières organiques maintiendrait le niveau de toxicité du *Bsph* plus longtemps en protégeant la toxine des rayons ultraviolets.

2. RÉMANENCE DE LA TOXICITÉ DU BSPH

Pour plusieurs auteurs, la rémanence est un retour de l'effet toxique du *Bsph* après qu'il y a eu interruption partielle ou totale de la toxicité. Bien que le *Bsph* soit moins toxique pour certaines espèces de moustiques que le *Bti*, l'intérêt pour le *Bsph* est surtout lié à sa rémanence. C'est d'ailleurs ce qui permet la suppression des populations préimaginales de *Culex* durant plus d'un mois dans certaines conditions environnementales (Mulla *et al.* 1984, Hougard *et al.* 1985, Karch *et al.* 1987, Sinègre *et al.* 1990 et Zeze *et al.* 1996).

La rémanence de la toxicité peut être liée à plusieurs facteurs, notamment les différentes espèces d'arthropodes, autres que les espèces ciblées, se nourrissant sur le fond du gîte et qui interviennent dans la remise en suspension du cristal puisque celui-ci a tendance à sédimenter rapidement (Karch *et al.* 1987). Le transit alimentaire peut également intervenir dans la réactivation des spores et la remise en circulation dans l'eau ainsi que dans le recyclage des spores (par exemple, la décomposition de cadavres infectés par le *Bsph*) (Karch *et al.* 1987). Selon le temps écoulé entre le recyclage et la fin de l'effet toxique, on parlera de persistance ou de rémanence. Dans certaines conditions (vides sanitaires, gîtes obscurs et sans renouvellement d'eau), la rémanence de la toxicité du *Bsph* peut s'échelonner sur plusieurs mois, voire une année (Sinègre *et al.* 1990).

2.1 Recyclage des spores

On connaît peu de chose à propos du recyclage des spores du *Bsph*, bien que cette bactérie soit étudiée depuis près d'une trentaine d'années. Le recyclage des spores peut se faire de façon permanente ou semi-permanente dans des gîtes à moustiques qui ont déjà été soumis à un contrôle (Hertlein *et al.* 1978). Toutefois, pour qu'il y ait un recyclage de spores, il faut qu'elles puissent germer afin que la multiplication des cellules végétatives ait lieu (Karch *et al.* 1987). Ainsi, les spores germent dans l'intestin moyen de la larve, se multiplient de façon végétative et produisent de nouvelles spores, qui seront relâchées lorsque le cadavre de la larve se désintègrera (Nicolas *et al.* 1987).

Selon Charles et Nicolas (1986), lorsqu'une larve de quatrième stade ingère des spores de *Bsph*, les inclusions cristallines sont rapidement dissoutes. Ce processus est suivi d'une germination végétative (passage de la spore à la cellule végétative) à l'intérieur même du tube digestif des larves vivantes. La sporulation aurait lieu seulement une fois que la larve est morte (Karch et Coz 1986 et Karch *et al.* 1990). Le nombre de spores viables dans le tube digestif décroît progressivement durant les douze premières heures pour atteindre un minimum vers la vingt-quatrième heure (Charles et Nicolas 1986, Nicolas *et al.* 1987 et Sinègre *et al.* 1990). En même temps, le nombre de cellules végétatives augmente, ce qui confirme que la germination a lieu pendant cette période (Karch et Coz 1986). Par la suite, dès que les larves meurent, le nombre de spores dans les cadavres se met à augmenter rapidement entre le premier et le deuxième jour

après le début de l'ingestion, passant de 10^2 à 10^5 spores par larve. Après une semaine, ce nombre atteindrait une vingtaine de fois le nombre de spores initialement ingérées. Plusieurs études confirment que le recyclage peut effectivement se faire à partir des larves de moustiques (DesRochers et Garcia 1984, Hertlein *et al.* 1978, Charles et Nicolas 1986, Karch et Charles 1987 et Nicolas *et al.* 1987). Des bioessais réalisés à partir de spores recyclées ont donné des CL50 (concentrations létales à 50 %) équivalentes au *Bsph* 2362 de départ (Charles et Nicolas 1986). Toutefois, Charles et Nicolas (1986) ainsi que Nicolas *et al.* (1987) précisent que pour augmenter l'efficacité du traitement, les cadavres qui permettent ce recyclage doivent être dans la zone de nutrition des larves, c'est-à-dire à la surface de l'eau, ce qui est peu probable si le site de reproduction est profond (expérience menée en Côte d'Ivoire). Selon DesRochers et Garcia (1984), une eau riche en matières organiques en suspension (par exemple, les égouts) accélérera le processus de recyclage, car la décomposition des cadavres sera plus rapide.

Karch *et al.* (1988) ont démontré que le *Bsph* avait persisté durant plus de quatre ans après un traitement dans un gîte à moustiques. En effet, ils ont réussi à isoler de nouveau une souche de *Bsph* à partir de larves mortes de *Culex pipiens*. Karch *et al.* (1988) pensent que cette bactérie, retrouvée en nombre constant sous forme de spores dans le fond du gîte, expliquerait l'absence quasi totale des larves de stade 3 et 4 et des nymphes de *Culex pipiens*, et ce, malgré le fait que la présence des larves de stade inférieur soit constante. Par ailleurs, selon Hougard *et al.* (1985) et Sinègre *et al.* (1990), le recyclage naturel serait insuffisant pour contrôler efficacement les populations de *Culex* à court ou moyen terme. Selon Uspensky *et al.* (1998), si le nombre de cadavres est suffisant, le recyclage peut assurer la rémanence du *Bsph*. Ils concluent en précisant que le fait d'avoir des populations denses durant presque toute l'année dans les régions tropicales et subtropicales explique les contradictions au sujet de la persistance du *Bsph*. En effet, il faut un remplacement continu des cadavres de moustiques pour que la persistance se maintienne, ce qui est possible si les populations visées sont présentes de façon permanente. Thau *et al.* (1987) pensent également que le recyclage des spores à partir des cadavres contribue à prolonger la persistance du *Bsph*.

Le recyclage des spores peut également se faire à partir des larves mortes d'autres arthropodes. Une étude démontre effectivement que d'autres espèces d'arthropodes se nourrissant par filtration ingèrent également des spores de *Bsph*, sans toutefois que celles-ci soient toxiques pour ces espèces (Karch *et al.* 1990). Lorsque les larves de ces différentes espèces d'arthropodes meurent à leur tour, comme il a été observé pour *Daphnia sp.* et *Cypris sp.*, elles contribuent également à la dispersion des spores de *Bsph* dans les zones traitées. Selon Karch *et al.* (1990), les arthropodes prédateurs qui ingèrent des proies infestées se retrouveraient à leur tour infestés et, de la même manière, contribueraient au relargage de spores au moment de leur mort.

Karch *et al.* (1988) émettent l'hypothèse que la zone de nutrition des *Culex pipiens* n'est pas strictement limitée à la surface de l'eau. Cette observation est intéressante : il ne serait pas nécessaire que le *Bsph* soit à la surface de l'eau pour être efficace. Ainsi, les spores qui sont remises en suspension sous l'effet des mouvements de l'eau (inversion thermique, bulles de fermentation ou remous divers) augmentent le temps de rémanence du produit.

3. RÉSISTANCE

La résistance aux insecticides est l'aptitude acquise par les insectes à survivre et éventuellement à se reproduire à des doses d'insecticides auparavant létales pour la majorité des individus de la population visée (Abedi et Brown 1960, Mouchet 1968 et Georghiou 1980). La résistance à différents insecticides est devenue fréquente dans les années 1950 et affectait en 1980 plus de 414 espèces d'arthropodes qui étaient régulièrement visés par les traitements chimiques (Georghiou 1980). Les moustiques ont acquis une résistance à pratiquement tous les types d'agents de contrôle chimiques; sur les 414 espèces d'arthropodes résistants, 84 étaient des moustiques répartis à travers le monde (Rodcharoen et Mulla 1994). En 1992, on comptait plus de 56 espèces d'anophèles et 39 espèces de culicidés, tous vecteurs de maladies (Brogdon et McAllister 1998), notamment la malaria, la fièvre jaune, la dengue et d'autres maladies tout aussi problématiques. Dans le contexte actuel où des signes évidents de résistance au *Bsph* sont apparus, il devient urgent de concevoir de nouveaux moyens de contrôle ou d'améliorer l'application de ceux qui existent déjà. Les cas de résistance au *Bsph* sont en nombre important. Cela serait dû au mode d'action qui n'implique qu'un seul site d'ancrage (site récepteur de la toxine) et à la persistance de la toxicité qui peut durer plusieurs semaines. En comparaison, le *Bti* requiert plus d'un site d'ancrage et sa persistance n'est que de quelques jours.

Il existe différents types de résistance qu'il est important de distinguer. D'abord, la résistance simple est le développement d'un mécanisme de résistance à un insecticide donné. Pour sa part, la résistance multiple est le développement de plusieurs mécanismes de résistance à différents produits; par exemple, le doryphore de la pomme de terre est résistant à plusieurs insecticides selon des mécanismes différents pour chacun d'eux. Enfin, la résistance croisée est celle où un seul mécanisme permet de résister à plusieurs produits souvent analogues en raison de leurs structures chimiques.

Les premiers cas de résistance concernaient des produits chimiques. Aujourd'hui, le développement de la résistance va au-delà des insecticides chimiques et atteint les produits microbiologiques. L'arrivée de produits entomopathogènes comme le *Bti*, le *Btk* et le *Bsph* nous a laissé croire pendant plusieurs années que le problème de résistance était révolu en raison de la variété de toxines produites par ceux-ci. Toutefois, des études ont tôt fait de rapporter les premiers cas de résistance, tant en laboratoire qu'en conditions de terrain (Silva-Filha *et al.* 1995, Nielsen-Leroux *et al.* 1997, Brogdon et McAllister 1998 et Pei *et al.* 2002). En 1992, Rodcharoen et Mulla réussissaient à induire une résistance au *Bsph* chez *Culex quinquefasciatus*, par des expériences menées en laboratoire. Dès 1994, on observait les premières apparitions de résistance au *Bsph* en milieu naturel, et ce, presque simultanément en France, en Inde et au Brésil (Regis et Nielsen-Leroux. 2000).

Présentement, nous savons qu'après la solubilisation et l'activation de la toxine produite par le *Bsph* et la liaison à un récepteur spécifique logé dans l'intestin moyen de l'insecte, il y a lyse de la cellule et dérèglement de la pression osmotique, causant la mort de l'insecte (Charles *et al.* 1996 et Chevillon *et al.* 2001). La résistance serait probablement attribuable à une mutation du site cible de l'insecticide qui aurait pour effet de diminuer la sensibilité à l'insecticide ou encore, un changement qualitatif ou quantitatif des enzymes de détoxification (Chevillon *et al.* 2001 et Small 2001). Selon Nielson-Leroux *et al.* (2002), un haut niveau de résistance serait dû à une interruption dans la liaison du récepteur et de la toxine alors qu'un

faible niveau de résistance serait attribuable à une concentration relativement faible de récepteurs dans les cellules de l'intestin moyen de la larve.

Les recherches de Mulla *et al.* (2001) ont démontré que cinq traitements sur un même site étaient suffisants pour voir apparaître une résistance à l'espèce ciblée, avec le *Bsph* souche 2362. Après cinq traitements, ces auteurs ont constaté une diminution du pourcentage de réduction des larves qui est passé de 87-98 % au premier traitement à 18-33 % au dernier traitement. De plus, la période d'efficacité (persistance) entre chaque traitement a diminué, passant de sept semaines entre le premier et le deuxième traitement à moins de six jours entre le quatrième et le cinquième traitement. Paul *et al.* (2005) confirment également que la résistance est généralement plus élevée là où les larvicides sont les plus utilisés après avoir fait des expériences avec quatre larvicides différents dans l'État de New York.

3.1 Mécanismes de résistance

Différents mécanismes semblent participer au développement de la résistance au *Bsph*, et ce, chez une même espèce. Ces mécanismes vont d'une diminution de la concentration du nombre de récepteurs disponibles jusqu'à la mutation de certains gènes. Une étude publiée par Weill *et al.* (2003) et portant sur la résistance mentionne que « ... le moustique ne mute pas pour résister aux insecticides. De nombreuses mutations préexistent déjà dans les populations de moustiques ». Ainsi, les individus ayant des mutations de résistance à certains insecticides vont survivre et se reproduire. D'après ces auteurs, les moustiques résistants sont donc sélectionnés; ils ne sont pas engendrés par le traitement insecticide ou par la pression sélective. Ainsi, plus on utilise un produit, plus on exerce une pression sélective sur les populations en cause et plus les individus résistants de ces populations sont sélectionnés.

3.1.1 Résistance au *Bacillus sphaericus*

Selon Charles et Nielsen-Leroux (2000), il existerait des conditions particulières prédisposant des populations à développer une résistance. Ces éléments clés seraient la pression sélective dans le temps, les différentes doses appliquées ainsi que le bagage génétique des populations en cause. Actuellement, les mécanismes de résistance les plus connus sont la résistance associée au récepteur et celle qui est associée à la détoxification par des enzymes de l'intestin. Le premier se produit quand la toxine de l'insecticide ne peut plus se fixer au récepteur cible sur la cellule. Ce phénomène pourrait être occasionné par le changement d'un seul acide aminé dans la structure primaire du récepteur. Le second mécanisme serait dû à l'activité enzymatique, qui empêcherait l'insecticide de rejoindre son site d'action (Brogdon et McAllister 1998).

Selon Rodcharoen et Mulla (1995), une diminution du taux d'ingestion des particules toxiques serait suffisante pour amorcer l'émergence d'une résistance. Ce mécanisme de résistance, basé sur le comportement alimentaire des larves, a été proposé à la suite des travaux sur des larves susceptibles et sur des larves résistantes. Les auteurs ont observé une différence significative du taux d'ingestion entre les larves susceptibles et les larves résistantes. Cette différence était encore plus marquée lorsque les larves venaient d'un milieu naturel. Toujours selon Rodcharoen et Mulla (1995), les larves résistantes semblent être capables de développer un mécanisme leur permettant de reconnaître une substance chimique provenant du *Bsph* ou de sa formulation, ce qui diminue le taux d'ingestion des spores de *Bsph*.

D'après les travaux de Nielsen-Leroux *et al.* (1997), de Charles *et al.* (2000) et de Chevillon *et al.* (2001) portant sur la résistance chez certaines espèces de *Culex*, il y aurait au moins deux mécanismes différents. D'abord, il y aurait la résistance due à la mutation d'un gène codant au niveau du récepteur cellulaire de l'insecte, ce qui crée un changement d'affinité pour la toxine binaire du *Bsph*. Ensuite, Nielsen-Leroux *et al.* (1997) ont démontré qu'un autre mécanisme pouvait être en cause dans le développement de la résistance. Ce mécanisme serait également lié aux récepteurs de l'intestin moyen, mais ne serait pas lié à leur affinité pour la toxine. En effet, Charles et Nielsen-Leroux (2000) ainsi que Nielsen-Leroux *et al.* (1997) ont démontré que chez certaines populations de *Culex* très résistantes, aucune liaison ne s'effectuait, ce qui laisse supposer que les récepteurs n'étaient pas fonctionnels ou absents. Dans les deux cas, les mutations toucheraient soit des allèles différents d'un même gène, soit deux gènes différents. Quoi qu'il en soit, différents gènes peuvent participer à la résistance au *Bsph* et dépendre de différents facteurs comme l'origine des populations de *Culex*, la fréquence des gènes de résistance et les conditions de sélection.

Une première étude au niveau ultra-structural des cellules de l'intestin des larves de *Culex quinquefasciatus* a été réalisée par De Melo *et al.* (2008). Les analyses morphologiques comparatives ont démontré que les cellules de l'intestin des larves résistantes étaient caractérisées par une augmentation en grosseur et en nombre des inclusions lipidiques, alors qu'il y en a un petit nombre chez les larves sensibles au *Bsph*.

Su et Mulla (2004) ont mené des expériences en Thaïlande sur des *Culex quinquefasciatus* Say où les contrôles ont échoué après seulement quatre mois d'utilisation de la formulation VectoLex WDG, soit après seulement cinq traitements. Cette population de moustiques de la province de Nonthaburi en Thaïlande a été documentée comme étant une souche particulièrement résistante au *Bsph* comparativement à d'autres populations de la Thaïlande et de la Californie (États-Unis). Cette différence de résistance semble être le résultat d'un bagage génétique différent des souches de *Culex quinquefasciatus* retrouvées en Californie. En effet, ces dernières n'ont développé qu'une faible résistance en laboratoire sous une pression sélective au *Bsph*, mais aucune résistance notable en milieu naturel, et ce, après plus de sept années d'application. Élevée en laboratoire, cette population très résistante de la Thaïlande a démontré qu'il n'y avait pas de résistance croisée entre le *Bti* et le *Bsph*. Cette étude vient confirmer les dires de Charles et Nielsen-Leroux (2000) selon lesquels la résistance peut dépendre d'un certain nombre de facteurs, dont l'origine des populations de moustiques.

La migration de moustiques adultes d'un site non traité vers un site où la résistance s'est développée ne rend pas les individus susceptibles de ce dernier site non susceptibles. Comme l'expliquent Regis et Nielsen-Leroux (2000), la migration ne fait que diluer la fréquence des allèles de résistance dans la population susceptible et influence ainsi la stabilité et le niveau de résistance.

3.2 Résistance croisée

La résistance croisée est la capacité d'une même espèce à être résistante à plus d'un produit en même temps (Mouchet *et al.* 1972 et Brogdon et McAllister 1998). Lenormand et Raymond (1998) précisent que la résistance croisée s'explique par le fait que chacune de ces résistances en question est indépendante. Toutefois, Small (2001) indique que la résistance croisée se produit lorsqu'un seul mécanisme de résistance permet de résister à plus d'un insecticide. Cette

multirésistance s'est répandue en même temps que les différentes classes d'insecticides chimiques se succédaient dans les programmes de contrôle et s'est poursuivie avec les insecticides biologiques. Mouchet (1968) explique que la résistance peut se traduire de deux façons différentes, soit par l'augmentation de la CL₅₀, soit par la présence de survivants mais cette fois à des doses supérieures aux CL₉₀ normalement utilisées, et ce, sans que la CL₅₀ ne change. Ce phénomène se rencontrerait surtout lorsque la résistance se trouve sur un gène majeur. Enfin, la résistance croisée ne peut être déterminée qu'après plusieurs tests, quand on peut comparer les différentes pentes de mortalité entre elles, comme le montre la figure 3.

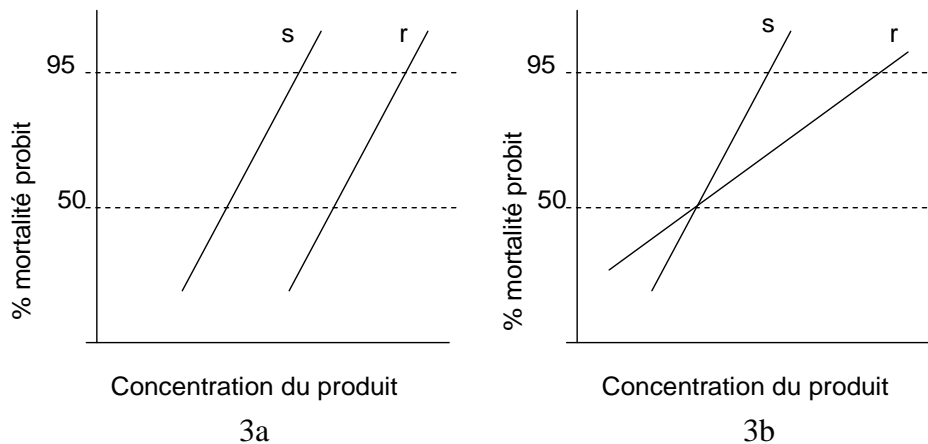


Figure 3 : Détermination de la résistance croisée

Les deux points représentant les individus résistants pour une concentration X ont le même pourcentage de mortalité (échelle probit). Toutefois, si d'autres tests sont effectués, il arrive, comme c'est le cas sur cette figure, que pour d'autres concentrations, on obtienne des mortalités (échelle probit) différentes et, ainsi, des pentes différentes. Sur la figure 3a, on a deux pentes représentant une population susceptible (s) devenue résistante (r). Sur la figure 3b, le croisement des pentes laisse supposer que l'on compare deux populations différentes. Toutefois, si l'on regarde seulement la CL₅₀, on ne remarque pas l'apparition de la résistance avec des CL (concentrations létales) plus élevées.

Plusieurs études portant sur la résistance croisée tentent d'expliquer pourquoi certaines espèces de *Culex*, comme *Culex quinquefasciatus*, peuvent être résistantes à plusieurs souches de *Bsph* en même temps (Yuan *et al.* 2003), mais non au *Bti*. Des chercheurs ont démontré que certaines souches de *Bsph* produiraient un nouveau composant actif toxique dont le mode d'action serait différent de celui des autres souches (Yuan *et al.* 2003 et Amorim *et al.* 2007). Certains autres chercheurs ont identifié une nouvelle protéine de 49 kDa en plus de la toxine binaire habituelle pour ces deux souches (Yuan *et al.* 2003). Quant à Regis et Nielsen-Leroux (2000), ils mentionnent que les toxines Bin de plusieurs souches différentes de *Bsph* ont les mêmes sites d'ancrage, ce qui augmente les risques de voir apparaître la résistance croisée.

4. DIFFÉRENTES SOLUTIONS POUR PRÉVENIR LA RÉSISTANCE

Comprendre et déterminer les mécanismes de résistance (simple, multiple ou croisée) des diverses espèces de moustiques à différentes souches de *Bsph* serviront à mettre au point des solutions pour prévenir, retarder, diminuer ou même renverser la résistance de ces moustiques dans les différentes stratégies de contrôles utilisant le *Bsph* (Yuan *et al.* 2003).

Selon Regis et Nielsen-Leroux (2000), il faudrait élaborer des stratégies pour prévenir la résistance avant de commencer un programme de contrôle utilisant le *Bsph*. Pour Lenormand et Raymond (1998), la taille de la zone à traiter est un paramètre important à considérer dans la planification de stratégie. Les différentes tactiques utilisées pour contrer la résistance devraient conduire en une réduction de la pression sélective. Plusieurs approches sont suggérées, dont la rotation ou l'alternance du *Bsph* avec d'autres larvicides, la réduction du nombre de traitements et l'exclusion de traitements qui induisent une pression sélective sur les populations d'insectes visées. Ces différentes approches ne sont que quelques exemples qui peuvent, dans un programme de contrôle, contribuer à atténuer, à prévenir ou à retarder le développement d'une résistance dans la population cible.

4.1 Contrôle limité

Brogdon et McAllister (1998) décrivent un exemple de réalisation d'un programme de contrôle visant 75 % d'une population vecteur de maladie. Dans un tel cas, si l'on suppose que le niveau de résistance ne dépasse pas 10 % de la population, la résistance n'aura pas d'incidence sur le contrôle de la population, et vice versa. C'est d'ailleurs par cette approche que le niveau de résistance n'a pas changé de façon significative dans l'ouest du Kenya deux ans après que les premières apparitions de résistance eurent été observées. Cette méthode a permis une entrée massive et continue d'individus susceptibles.

4.2 Rotation ou mélange de larvicides

Les principaux moyens utilisés pour contrer la résistance sont l'emploi d'un mélange ou la rotation de différents produits (ingrédients actifs) en alternance. Le principe du mélange de produits est basé sur l'hypothèse qu'il y a un gène de résistance pour chaque famille de produits, autant chimiques que biologiques, et que de les retrouver tous présents chez une même espèce de moustiques serait un phénomène excessivement rare. Il est donc important de mélanger des produits qui ont des modes d'action différents. Pour ce qui est de la rotation ou de l'alternance, il s'agit d'une approche basée sur le fait que la résistance à un produit diminue en l'absence d'une pression sélective.

Ainsi, si l'on utilise différents produits en rotation, les individus n'ont pas le temps de développer une résistance à un produit en particulier puisqu'on le change avant. L'utilisation du *Bti* en rotation avec le *Bsph* ou dans un mélange est une approche intéressante pour une stratégie visant à interrompre la pression sélective causée par le *Bsph* (Zahiri *et al.* 2002, Yuan *et al.* 2003, Mulla *et al.* 2003, Su et Mulla 2004 et Oliveira *et al.* 2004). Les concentrations de chaque produit à utiliser dans les mélanges restent toutefois à déterminer. Regis et Nielsen-Leroux (2000) suggèrent une rotation entre différentes souches de *Bsph*. Pour cette approche, plusieurs études sont effectuées dans le but de trouver de nouvelles souches de *Bsph* qui soient aussi efficaces sinon plus que les souches actuellement utilisées. C'est ce que Litaiff *et al.* (2008) ont fait en

testant en laboratoire cinq nouvelles souches. Ils ont ainsi démontré que les souches de *Bsph* IB16 et S116 étaient de 300 à 400 % plus efficaces sur les *Culex quinquefasciatus* que la souche 2362. Cependant, cette approche est actuellement envisageable dans un nombre restreint de situations en raison des sensibilités différentes des espèces de moustiques aux diverses souches de *Bsph*.

Pour ces deux approches (rotation et mélange), il faut se demander si l'une est meilleure que l'autre. Zahiri et Mulla (2003) ont démontré que la rotation des produits entre le *Bsph* et le *Bti* pouvait augmenter la vitesse d'apparition de la résistance au *Bsph* (après quinze générations). Avec ces mêmes produits appliqués en mélange, ils n'ont pas noté d'émergence de résistance significative après 36 générations. Tout comme Mulla *et al.* (2003), Zahiri et Mulla (2003) sont d'accord sur le fait qu'un mélange serait plus efficace pour prévenir l'émergence d'une résistance. Toutefois, d'autres chercheurs, tels Oliveira *et al.* (2004), suggèrent plutôt les rotations de ces produits. Il demeure que l'utilisation de traitements à base de *Bsph* au Québec, comme partout ailleurs, devrait inclure un suivi serré de l'évolution de la résistance sur le terrain. Au Québec, trois produits sont utilisés pour le contrôle des diptères, soit le *Bti*, le *Bsph* et le méthoprène (régulateur de croissance utilisé au Canada depuis 1977). Ces trois pesticides, tout comme les pesticides utilisés directement dans l'eau, sont classés comme des produits à usage restreint par l'Agence de réglementation de la lutte antiparasitaire (ARLA). Le *Bsph* et le méthoprène sont très peu utilisés et quand ils le sont, leur utilisation est restreinte aux collecteurs d'eaux pluviales et aux puisards. D'où la quasi-impossibilité de les utiliser en rotation ou en mélange.

4.2.1 Synergisme

Le synergisme, ou l'effet synergique, c'est lorsque deux produits différents, combinés entre eux, agissent ensemble pour créer un effet plus grand que la somme des actions produites par chacun des produits.

Nicolas *et al.* (1993) ont émis l'hypothèse que les toxines du *Bsph* agissaient par synergisme. Ils ont constaté que la protoxine BinA (42 kDa), utilisée seule, était toxique pour les larves de *Culex pipiens*, mais que la protoxine BinB (51,4 kDa) ne l'était pas. Toutefois, cette dernière demeure essentielle pour qu'il puisse y avoir une liaison de la toxine sur le récepteur, ce qui met en évidence l'effet de synergie existant dans ce mode d'action des deux toxines (Yuan *et al.* 2001). Cela implique donc que l'action combinée des deux toxines est plus efficace en ce qui concerne la toxicité que l'addition des deux toxines utilisées séparément.

Des effets de synergisme pourraient aussi se produire avec des produits différents selon les concentrations utilisées, et ce, même si ces deux produits ont une action limitée sur les moustiques ciblés. Deux produits agissant par synergisme verraient donc leur potentiel toxique augmenter. C'est précisément la conclusion de deux études menées par Wirth *et al.* (2004), qui ont démontré que le *Bti* pouvait accroître la toxicité du *Bsph* chez les larves de *Culex quinquefasciatus* devenues résistantes au *Bsph* ainsi que de *Aedes aegypti*, qui est naturellement peu sensible au *Bsph*.

En 1987, Kelada et Shaker ont démontré que le *Bsph* pouvait être combiné avec d'autres insecticides, aussi bien bactériologiques que chimiques. En combinant le *Bsph* et différents insecticides, ils ont augmenté l'effet toxique pour des larves de *Culex pipiens* et *Aedes aegypti*,

tout en minimisant de façon substantielle les concentrations à utiliser. Cette combinaison atténuait les risques sur l'environnement.

4.2.2 Souche recombinante

Basée précisément sur cet effet de synergie, une nouvelle souche recombinante produisant à la fois les toxines du *Bsph* et du *Bti* semble être une voie d'avenir en matière de stratégie pour lutter contre l'apparition de résistance. C'est ce qui ressort de différentes recherches, dont celles de Wirth *et al.* (2004) et de Zahiri *et al.* (2004), où le recombinant *Bti-Bsph* a été testé. En plus d'être très efficace contre les espèces de moustiques résistantes au *Bsph*, ce nouveau recombinant s'avère également toxique pour *Aedes aegypti*, qui est une espèce non sensible au *Bsph* (Zahiri *et al.* 2004).

4.3 Autres solutions

Regis et Nielsen-Leroux (2000) proposent la création de sites refuges non traités qui pourraient contribuer à retarder l'apparition de la résistance sur des sites voisins qui, eux, sont traités avec du *Bsph*. Ces mêmes chercheurs suggèrent également la création de refuges temporels, c'est-à-dire une interruption de traitement pour une période de temps limitée. Cette dernière méthode a d'ailleurs fait ses preuves au Brésil où la sensibilité d'une population a été restaurée entièrement après seize mois d'arrêt de traitement. La même constatation a été faite en Chine où, après seulement six mois sans traitement au *Bsph*, le niveau de résistance a diminué de façon draconienne (Regis et Nielsen-Leroux 2000). Silva-Filha *et al.* (1995) pensent également que des refuges non traités amènent des individus susceptibles à immigrer vers des zones traitées, ce qui entraîne une hétérogénéité plus grande chez les moustiques.

CONCLUSION

Le contrôle d'une espèce nuisible doit nécessairement comprendre des mesures de gestion de la résistance. Cette gestion doit être conçue pour empêcher ou retarder le développement de la résistance tout en maintenant un niveau de contrôle acceptable.

Il est important de rappeler que la résistance en milieu naturel est très localisée. Si une région complète peut posséder des populations d'individus très résistantes à d'autres endroits (par exemple, sur deux sites voisins), il est possible d'avoir des populations qui présentent des différences en ce qui concerne la résistance ainsi que des différences dans les mécanismes en cause (Brogdon et McAllister 1998). Lorsque des expériences sont menées en milieu naturel, plusieurs paramètres doivent être considérés. Toutefois, en milieu naturel, nous n'avons pas nécessairement le contrôle de tous les paramètres. Il est donc important de connaître les risques potentiels de résistance au produit utilisé et de prévoir des mesures pour les atténuer. Lorsqu'une résistance est détectée, il faut éviter de faire une rotation ou encore un mélange avec un autre insecticide de même catégorie et qui possède les mêmes mécanismes de résistance que le produit précédent (Small 2001).

Selon De Oliveira *et al.* (2003), cette inversion de la résistance vers la susceptibilité des individus serait attribuable à l'immigration d'individus susceptibles venant de zones non traitées. Comme ce renversement se fait relativement rapidement lorsque la pression sélective est interrompue par l'arrêt de l'utilisation du larvicide, la rotation de produits semble donc être une approche intéressante pour contrôler à la fois les insectes et la résistance (Yuan *et al.* 2003).

À ce jour, le *Bsph* demeure un excellent larvicide pour contrôler certaines espèces de moustiques. Si des recherches permettent de trouver un moyen de gérer efficacement la résistance des moustiques à ce produit, ce larvicide biologique pourrait devenir un moyen de contrôle important des moustiques.

Bibliographie

Abedi, Z.H. et A.A. Brown. 1960. Development and Reversion of DDT-Resistance in *Aedes aegypti*. Canadian Journal of Genetic Cytology. 2:252-261.

Aly, C., M.S. Mulla et B.A. Federici. 1989. Ingestion, Dissolution, and Proteolysis of the *Bacillus sphaericus* Toxin by Mosquito Larvae. Journal of Invertebrate Pathology. 53:12-20.

Amorim, L.B., C.M.F. de Oliveira, E.M. Rios, L. Regis et M.H. Silva-Filha. 2007. Development of *Culex quinquefasciatus* Resistance to *Bacillus sphaericus* Strain IAB59 Needs Long Term Selection Pressure. Biological Control. 42:155-160.

Baumann, P., M.A. Clark, L. Baumann et A.H. Broadwell. 1991. *Bacillus sphaericus* as a Mosquito Pathogen: Properties of the Organism and its Toxins. Microbiological Reviews. 55:425-436.

Baumann, P., B.M. Unterman, L. Baumann, A.H. Broadwell, S.J. Abbene et R.D. Bowditch. 1985. Purification of the Larvicidal Toxin of *Bacillus sphaericus* and Evidence for High-Molecular-Weight Precursors. Journal of Bacteriology. 163:738-747.

Becker, N., M. Ludwig, M. Beck et M. Zgomba. 1993. The Impact of Environmental Factors on the Efficacy of *Bacillus sphaericus* against *Culex pipiens*. Bulletin for the Society for Vector Ecology. 18:61-66.

Berticat, C., G. Boquien, M. Raymond et C. Chevillon. 2001. Insecticide Resistance Genes Induce a Mating Competition Cost in *Culex pipiens* Mosquitoes. Genetic Research. 79:41-47.

Boisvert, M. et J. Boisvert. 2000. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on Target and Nontarget Organisms: A Review of Laboratory and Field Experiments. Biocontrol Science and Technology. 10:517-561.

Boisvert, M., A. Lavoie et G. Sanfaçon. 2006. Field Trials Using *Bacillus sphaericus* Pouches (Vectolex® WSP) in Catch Basins in Montreal Areas (Québec, Canada). American Mosquito Control Association Meeting, Detroit (MI, USA). Mars.

Brogdon, W.G. et J.C. McAllister. 1998. Insecticide Resistance and Vector Control. Emerging Infectious Diseases. 4:605-613.

Burke, Jr. W.F., K.O. McDonald et E.W. Davidson. 1983. Effect of UV Light on Spore Viability and Mosquito Larvicidal Activity of *Bacillus sphaericus* 1593. Applied and Environmental Microbiology. 46:954-956.

Carson, R.L. 1962. Le printemps silencieux. Édition Plon, Paris.

Charles, J.-F., A. Delécluse, P. Laurent, C. Nielsen-Leroux et F. Barloy. Unité de bactériologies entomopathogènes, 1996, [En ligne] 1996. [<http://www.pasteur.fr/recherche/RAR/RAR96/Ecoentomo.html>] (Consulté en janvier 2005).

- Charles, J.-F. et L. Nicolas. 1986. Recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 in Mosquito Larvae: A Laboratory Study. *Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie*. 137:101-111.
- Charles, J.-F. et C. Nielsen-Leroux. 2000. Mosquitocidal Bacterial Toxins: Diversity, Mode of Action and Resistance Phenomena. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95: 201-206.
- Charles, J.-F., M.H. Silva-Filha et C. Nielsen-Leroux. 2000. Mode of Action of *Bacillus sphaericus* on Mosquito Larvae: Incidence on Resistance. Dans J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-Leroux (dir.). *Entomopathogenic Bacteria: From Laboratory to Field Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 227-252.
- Chevillon, C., C. Bernard, M. Marquine et N. Pasteur. 2001. Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): Interaction Between Recessive Mutants and Evolution in Southern France. *Journal of Medical Entomology*. 38:657-664.
- Dagnogo, M. et J. Coz. 1982. Un insecticide biologique : *Bacillus sphaericus*. 1. Activité larvicide de *B. sphaericus* sur quelques espèces et souches de moustiques. *Cahier O.R.S.T.O.M., série « Entomologie médicale et parasitologie »*. 20:133-138.
- Darboux, I., C. Nielsen-Leroux, J.-F. Charles et D. Pauron. 2001. The Receptor of *Bacillus sphaericus* Binary Toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Midgut: Molecular Cloning and Expression. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31:981-990.
- Davidson, E.W. 1984. Microbiology, Pathology and Genetics of *Bacillus sphaericus*: Biological Aspects which Are Important to Field Use. *Mosquito News*. 44:147-152.
- Davidson, E.W., 1985. Effects of *Bacillus sphaericus* 1593 and 2362 Spore/Crystal Toxin on Cultured Mosquito Cells. *Journal of Invertebrate Pathology*. 47:21-31.
- Davidson, E.W. 1988. Variation in Binding of *Bacillus sphaericus* Toxin and Wheat Germ Agglutinin to Larval Midgut Cells of Six Species of Mosquitoes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53:251-259.
- Davidson, E.W. 1989. The Present Status of *Bacillus sphaericus*. *Israel Journal of Entomology*. 23:9-15.
- Davidson, E.W. et A.A. Yousten. 1990. Chapitre 15. The Mosquito Larval Toxin of *Bacillus sphaericus*. Dans H. de Barjac et D. J. Sutherland (dir.). *Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies*. Rutgers University Press, New Brunswick, p. 237-255.
- De Melo, J.V., R.H.T. Vasconcelos, A.F. Furtado, C.A. Peixoto et M.H. Silva-Filha. 2008. Ultrastructural Analysis of Midgut Cells from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Larvae Resistant to *Bacillus sphaericus*. *Micron*. 39:1342-1350.
- De Oliveira, C.M.F., F. Costa Filho, J.N.F. Beltran, M.H. Silva-Filha et L. Regis. 2003. Biological Fitness of a *Culex quinquefasciatus* Population and its Resistance to *Bacillus sphaericus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 19(2):125-129.

- DesRochers, B. et R. Garcia. 1983. The Efficacy of *Bacillus sphaericus* in Controlling Mosquitoes Breeding in Sewer Effluent. *Reprinted from: Proceedings and Papers of the Fifty-First Annual Conference of the California Mosquito and Vector Control Association inc.* p. 35-37.
- DesRochers, B. et R. Garcia. 1984. Evidence for Persistence and Recycling of *Bacillus sphaericus*. *Mosquito News*. 44:160-165.
- Federici, B.A., H.-W. Park, D.K. Bideshi, M.C. Wirth et J.J. Johnson. 2003. Recombinant Bacteria for Mosquito Control. *The Journal of Experimental Biology*. 206:3877-3885.
- Floore, T., K. Rolen, G. Medrano et F. Jones. 2002. Operational Studies with Valent Vectolex® WDG. *Bacillus sphaericus*, in Three Florida Mosquito Control Districts. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 18:344-347.
- Georghiou, G.P. 1980. Mosquito Resistance to Insecticides. *California Agriculture*, march:33-34.
- Georghiou, G.P., M. Raymond, O. Dary, R. Mellon, R. Halliday, P. Wirth, M.K. Hawley, H. Tran, N. Pasteur et L.L. Luna. 1985. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Mechanismes, Detection Methods, and Management Strategies. University of California Division of Agriculture And Natural Resources. Berkeley, p. 130-134.
- Grisolia, C.K., E.C. Oliveira-Filha, F.R. Ramos, M.C. Lopes, D.H.F. Muniz et R.G. Monnerat. 2009. Acute Toxicity and Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* Strains on Fish and Mouse Bone Marrow. *Ecotoxicology*. 18:22-26.
- Hadapad, A.B., N. Vijayalakshmi, R.S. Hire et T.K. Dongre. 2008. Effect of Ultraviolet Radiation on Spore Viability and Mosquidocidal Activity of an Indigenous ISPC-8 *Bacillus sphaericus* Neide Strain. *Acta Tropica*. 107:113-116.
- Hadapad, A.B., R.S. Hire, N. Vijayalakshmi et T.K. Dongre. 2009. UV Protectants for the Biopesticide Based on *Bacillus sphaericus* Neide and their Role in Protecting the Binary Toxins from UV Radiation. *Journal of Invertebrate Pathology*. 100:147-152.
- Hertlein, B.C., R. Levy et T.W. Jr. Miller. 1978. Recycling Potential and Selective Retrieval of *Bacillus sphaericus* from Soil in a Mosquito Habitat. *Journal of Invertebrate Pathology*. 33:217-221.
- Hougaard, J.-M., G. Kohoun, P. Guillet, J. Doannio, J. Duval et H. Escaffre. 1985. Évaluation en milieu naturel de l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* Neide, 1904 souche 1593-4 dans des gîtes larvaires à *Culex quinquefasciatus* Say, 1823 en Afrique de l'Ouest. *Cahier O.R.S.T.O.M., série « Entomologie médicale et parasitologie »*. 23:35-44.
- Juong, K.-B. et J.-C. Côté. 2000. Une analyse des incidences environnementales de l'insecticide microbien *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture et Agroalimentaire Canada. Bulletin technique n° 29*.

- Karch, S. et J. Coz. 1986. Recycling of *Bacillus sphaericus* in Dead Larvae of *Culex pipiens* (Diptera, Culicidae). Cahier O.R.S.T.O.M., série « Entomologie médicale et parasitologie ». 24:41-43.
- Karch, S. et J.-M. Hougard. 1986. Étude comparative au laboratoire du devenir de la matière active et des spores de *Bacillus sphaericus* souche 2362 et de *Bacillus thuringiensis* serotype H14 en milieu aqueux. Cahier O.R.S.T.O.M., série « Entomologie médicale et parasitologie ». 24:175-179.
- Karch, S. et J.-F. Charles. 1987. Toxicity, Viability and Ultrastructure of *Bacillus sphaericus* 2362 Spore/Crystal Complex Used in the Field. Annales de l'Institut Pasteur/Microbiologie. 138:485-492.
- Karch, S., N. Monteny et J. Coz. 1988. Persistence de *Bacillus sphaericus* dans un gîte à moustiques 4 ans après son introduction en vue de lutte biologique. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Paris. Tome 307, série III, p. 289-292.
- Karch, S., N. Monteny, C. Toneatti et J. Coz. 1987. Intervention de l'entomofaune dans le recyclage et le potentiel d'action du complexe cristal/spore de *Bacillus sphaericus*, larvicide anti-moustiques. Cahier O.R.S.T.O.M., série « Entomologie médicale et parasitologie ». Numéro spécial 1987:121-125.
- Karch, S., N. Monteny, L. Julien, G. Sinègre et J. Coz. 1990. Control of *Culex pipiens* by *Bacillus sphaericus* and Role of Nntarget Arthropods in its Recycling. Journal of the American Mosquito Control Association. 6:47-54.
- Kelada, N.L. et N. Shaker. 1987. Toxicity of Three Chemical Insecticides in Combination with *Bacillus spp.* against Mosquito Larvae. Insect Science and its Applications. 9:229-231.
- Lacey, L.A., C.M. Lacey, B. Peacock et I. Thiéry. 1988. Mosquito Host Range and Field Activity of *Bacillus sphaericus* Isolate 2297 (Serotype 25). Journal of the American Mosquito Control Association. 4:51-56.
- Lacey, L.A. et M.S. Mulla. 1990. Chapitre 12. Safety of *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* to Nontarget Organisms in the Aquatic Environment. Dans M. Laird, L. Lacey et E.W. Davidson. Safety of Microbial Insecticides. CRC Press inc. Boca Raton, Florida, p. 169-188.
- Lacey, L.A. et J.P. Siegel. 2000. Safety and Ecotoxicology of Entomopathogenic Bacteria. Dans J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-LeRoux (dir.). Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to Field Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 253-273.
- Lacey, L.L. et R.W. Merritt. 2003. The Safety of Bacterial Microbial Agents Used for Black Fly and Mosquito Control in Aquatic Wnvironments. Dans H.M.T. Hokkanen et E Hajak. Environmental Impacts of Microbial Insecticides, Need and Methods for Risk Assessment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 151-168.

- Lacoursière, J.O. et J. Boisvert. Le *Bacillus thuringiensis israelensis* et le contrôle des insectes piqueurs au Québec, [En ligne] mars 2004. [<http://www.mddep.gouv.qc.ca/pesticides/virus-nil/bti/>] (Consulté le 14 novembre 2009).
- Lenormand, T. et M. Raymond. 1998. Resistance Management: The Stable Zone Strategy. Proceedings of the Royal Society of London. Série B. 265:1985-1990.
- Litaiff, E.D.C., W.P. Tadei, J.I.R. Porto et I.M.D.A. Oliveira. 2008. Analysis of Toxicity on *Bacillus sphaericus* from Amazonian Soils *Anopheles darlingi* and *Culex quinquefasciatus* Larvae. Acta Amazonica. 38:255-262.
- Ludwig, M., M. Beck, M. Zgomba et N. Becker. 1994. The Impact of Water Quality on the Persistence of *Bacillus sphaericus*. Bulletin for the Society for Vector Ecology. 19:43-48.
- Merritt, R.W., J.L. Lessard, K.J. Wessell, O. Hernandez, M.B. Berg, J.R. Wallace, J.A. Novak, J. Ryan et B.W. Merritt. 2005. Lack of Effects of *Bacillus sphaericus* (Vectolex) on Nontarget Organisms in a Mosquito-Control Program in Southeastern Wisconsin: A 3-Years Study. Journal of the American Mosquito Control Association. 21(2):201-212.
- Mouchet, J. 1968. Résistances des culicidés aux insecticides. Cahier O.R.S.T.O.M., série « Entomologie médicale et parasitologie ». 6:225-232.
- Mouchet, J., R. Cordellier, M. Germain, P. Carnevale, J. Barathe et C. Sannier. 1972. Résistance aux insecticides d'*Aedes aegypti* L. & *Culex pipiens fatigans* en Afrique Centrale. Cahier O.R.S.T.O.M., série « Entomologie médicale et parasitologie ». 10:347-354.
- Mulla, M., H.A. Darwazeh, E.W. Davidson et H.T. Dulmage. 1984. Efficacy and Persistence of the Microbial Agent *Bacillus sphaericus* against Mosquito Larvae in Organically Enriched Habitats. Mosquito News. 44:166-173.
- Mulla, M., H.A. Darwazeh, E.W. Davidson et H.T. Dulmage. 1984. Larvicidal Activity and Field Efficacy of *Bacillus sphaericus* Strains against Mosquito Larvae and their Safety to Nontarget Organisms. Mosquito News. 44:336-342.
- Mulla, M., U. Thavara, A. Tawatsin, W. Kong-ngamsuk, J. Chomposri et T. Su. 2001. Mosquito Larval Control with *Bacillus sphaericus*: Reduction in Adult Populations in Low-Income Communities in Nonthaburi Province, Thailand. Journal of Vector Ecology. 26:221-231.
- Mulla, M., U. Thavara, A. Tawatsin, J. Chomposri et T. Su. 2003. Emergence of Resistance and Resistance Management in Field Populations of Tropical *Culex quinquefasciatus* to Microbial Control Agent *Bacillus sphaericus*. Journal of the American Mosquito Control Association. 19:39-46.
- Nicolas, L., J. Dossou-Yovo et J.-M. Hougard. 1987. Persistence and Recycling of *Bacillus sphaericus* 2362 Spores in *Culex quinquefasciatus* Breeding Sites in West Africa. Applied Microbiology and Biotechnology. 25:341-345.

- Nicolas, L., C. Nielsen-Leroux, J.-F. Charles et A. Delécluse. 1993. Respective Role of the 42- and 51kDa Components of the *Bacillus sphaericus* Toxin Overexpressed in *Bacillus thuringiensis*. FEMS Microbiology Letters. 106:275-280.
- Nielsen-Leroux, C. et J.-F. Charles. 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* Binary Toxin to a Specific Receptor on Midgut Brush-Border Membranes from Mosquito Larvae. European Journal of Biochemistry. 210:585-590.
- Nielsen-Leroux, C., F. Pasquier, J.-F. Charles, G. Sinègre, B. Gaven et N. Pasteur. 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* Involves Different Mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Larvae. Journal of Medical Entomology. 34:321-327.
- Nielsen-Leroux, C., N. Pasteur, J. Prêtre, J.-F. Charles, H.B. Sheikh et C. Chevillon. 2002. High Resistance to *Bacillus sphaericus* Binary Toxin in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): The Complex Situation of West Mediterranean Countries. Journal of Medical Entomology. 39:729-735.
- Oliveira, M.F., M.H. Silva-Filha, C. Nielsen-Leroux, G. Pei, Z. Yuan et L. Regis. 2004. Inheritance and Mechanism of Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. Journal of Medical Entomology. 41:58-64.
- Park, H.-W., S.R. Hayes et C.M. Mangum. 2008. Distribution of Mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* from Sediments Samples in Florida. Journal of Asia-Pacific Entomology. 11:217-220.
- Paul, A, L.C. Harrington, L. Zhang et J.G. Scott. 2005. Insecticide Resistance in *Culex pipiens* from New York. Journal of the American Mosquito Control Association. 21:305-309.
- Pei, G., C.M.F. Oliveira, Z. Yuan, C. Nielsen-Leroux, M.H. Silva-Filha, J. Yan et L. Regis. 2002. A Strain of *Bacillus sphaericus* Causes Slower Development of Resistance in *Culex quinquefasciatus*. Applied and Environmental Microbiology. 68:3003-3009.
- Pham, C., E. Ruber, J. Card et W. Montgomery. Investigating the Effects of *Bacillus sphaericus* (Vectolex®) on *Aedes* Larvae and Non-Target Organisms, [En ligne] 1998. [<http://www.nmca.org/Nmca98-12.htm>] (Consulté le 18 décembre 2009).
- Poopathi, S. et B. Tyagi. 2004. Mosquitocidal Toxins of Spore Forming Bacteria: Recent Advancement. African Journal of Biotechnology. 3:643-650.
- Regis, L. et C. Nielsen-Leroux. 2000. Management of Resistance to Bacterial Vector Control. Dans J.-F. Charles, A. Delécluse et C. Nielsen-LeRoux (dir.). Chapitre 6.5 dans Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to Field Application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 419-439.
- Rodcharoen, J. et M.S. Mulla. 1992. Cross-Resistance to *Bacillus sphaericus* Strains in *Culex quinquefasciatus*. Journal of the American Mosquito Control Association. 12:247-250.
- Rodcharoen, J. et M.S. Mulla. 1992. Acquired Resistance and its Stability in *Culex quinquefasciatus* to *Bacillus sphaericus*. University of California Division of Agriculture. And Natural Resources. Oakland, p. 20-22.

- Rodcharoen, J. et M.S. Mulla. 1994. Resistance Development in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus*. Journal of Economic Entomology. 87:1133-1140.
- Rodcharoen, J. et M.S. Mulla. 1995. Comparative Ingestion Rates of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Susceptible and Resistant to *Bacillus sphaericus*. Journal of Invertebrate Pathology. 66:242-248.
- Shaddock, J.A., S. Singer et S. Lause. 1980. Lack of Mammalian Pathogenicity of Entomocidal Isolates of *Bacillus sphaericus*. Environmental Entomology. 9:403-407.
- Silva-Filha, M.-H., L. Regis, C. Nielsen-Leroux et J.-F. Charles. 1995. Low-Level Resistance to *Bacillus sphaericus* in a Field-Treated Population of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Insecticide Resistance and Resistance Management. 88: 525-530.
- Silva-Filha, M.-H., C. Nielsen-Leroux et J.-F. Charles. 1999. Identification of the Receptor of *Bacillus sphaericus* Crystal Toxin in the Brush Border Membrane of the Mosquito *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology. 29:711-721.
- Silva-Filha, M.-H., L. Regis, C.M.F. Oliveira et A.F. Furtado. 2001. Impact of 26 Month *Bacillus sphaericus* Trial on the Preimaginal Density of *Culex quinquefasciatus* in an Urban Area of Recife, Brazil. Journal of the American Mosquito Control Association. 17:45-50.
- Sinègre, G., B. Gaven, J.L. Julien et O. Moussiegt. 1990. Utilisation de *Bacillus sphaericus* dans la lutte contre les moustiques : présentation, performances et limites d'emploi. Document E.I.D.L.M. n° 57, Montpellier, France.
- Singer, S. 1985. *Bacillus sphaericus* (Bacteria). Dans H.C. Chapman (dir.). Biological Control of Mosquitoes. American Mosquito Control Association. Fresno, Ca. Bulletin n° 6:123-131.
- Singer, S. 1990. Chapitre 13. Introduction to the Study of *Bacillus sphaericus* as a Mosquito Control Agent. Dans Huguette de Barjac et Donald J. Sutherland. Bacterial Control of Mosquitoes & Black Flies. Rutgers University Press, New Brunswick, p. 221-227.
- Singh, G.J.P. et S.S. Gill. 1988. An Electron Microscope Study of the Toxin Action of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* Larvae. Journal of Invertebrate Pathology. 52:237-247.
- Skovmand, O. et S. Bauduin. 1996. Efficacy of a Granular Formulation of *Bacillus sphaericus* against *Culex quinquefasciatus* and *Anopheles gambiae* in West African Countries. Journal of Vector Ecology. 22:43-51.
- Small, G. 2001. Titrages biologiques pour évaluer la résistance croisée chez les insectes. Université de Cardiff, R-U. Rapport MIM/AFRO/OMS/TDR.
- Su, T. 2008. Evaluation of Water-Soluble Pouches of *Bacillus sphaericus* Applied as Prehatch Treatment against *Culex* Mosquitoes in Simulated Catch Basins. Journal of the American Mosquito Control Association. 24:54-60.

- Su, T. et M.S. Mulla. 2004. Documentation of High-Level *Bacillus sphaericus* 2362 Resistance in Field Populations of *Culex quinquefasciatus* Breeding in Polluted Water in Thailand. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 29:405-411.
- Thau, M.M., M. Paing et S. Min. 1987. Persistancy and Recycling of *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* Say in the Laboratory. *Journal of Communication Disorders*. 19:300-303.
- Thiéry, I., S. Hamon, A. Delécluse et S. Orduz. 1998. The Introduction into *Bacillus sphaericus* of the *Bacillus thuringiensis* Subsp. *Medellin* Cyt1Ab1 Gene Results in Higher Susceptibility of Resistance Mosquito Larva Populations to *B. sphaericus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 10:3910-3916.
- Uspensky, I., D. Klein et S. Braun. 1998. Persistence of *Bacillus sphaericus* in Cadavers of Mosquito Larvae. *Israel Journal of Entomology*. 32:49-56.
- Vaňková, J. 1984. Persistence and Efficacy of *Bacillus sphaericus* Strain 1593 and 2362 against *Culex pipiens* Larvae under Field Conditions. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*. 98:185-189.
- Weill, M., O. Duron, P. Labbé, A. Berthomieu et M. Raymond. La résistance du moustique *Culex pipiens* aux insecticides, [En ligne], vol. 19, n° 12 (décembre 2003), p. 1190-1192. [<http://www.erudit.org/revue/MS/2003/v19/n12/007392ar.html>] (Consulté le 18 décembre 2009).
- Wirth, M., J.A. Jiannino, B.A. Federici et W.E. Walton. 2004. Synergy between Toxins of *Bacillus thuringiensis* Ssp. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*. 41:935-941.
- Wirth, M., J.A. Jiannino, B.A. Federici et W.E. Walton. 2005. Evolution of Resistance toward *Bacillus sphaericus* or a Mixture of *B. sphaericus* + Cyt1A from *Bacillus thuringiensis*, in the Mosquito, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 88:154-162.
- Yousten, A.A., E.F. Benfield, R.P. Campbell, S.S. Foss et F.J. Genthner. 1991. Fate of *Bacillus sphaericus* 2362 Spore Following Ingestion by Nontarget Invertebrates. *Journal of Invertebrate Pathology*. 58:427-435.
- Yuan, Z., C. Rang, R.C. Maroun, V. Juarez-Perez, R. Frutos, N. Pasteur, C. Vendrely, J.-F. Charles et C. Nielsen-Leroux. 2001. Identification and Molecular Structural Prediction Analysis of a Toxicity Determinant in the *Bacillus sphaericus* Crystal Larvicidal Toxin. *European Journal of Biochemistry*. 268:2751-2760.
- Yuan, M.Z., G.F. Pei, L. Regis, C. Nielsen-Leroux et Q.X. Cai. 2003. Cross-Resistance between Strains of *Bacillus sphaericus* but not *B. thuringiensis israelensis* in Colonies of Mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 17:251-256.
- Zahiri, N.S., T. Su et M.S. Mulla. 2002. Strategies for the Management of Resistance in Mosquitoes to the Microbial Control Agent *Bacillus sphaericus*. *Journal of Medical Entomology*. 39:513-520.

Zahiri, N.S. et M.S. Mulla. 2003. Susceptibility Profile of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus sphaericus* on Selection with Rotation and Mixture of *Bacillus sphaericus* and *Bacillus thuringiensis israelensis*. Journal of Medical Entomology. 40:672-677.

Zahiri, N.S., B.A. Federici et M.S. Mulla. 2004. Laboratory and Simulated Field Evaluation of a New Recombinant of *Bacillus thuringiensis* Ssp. *Israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex* Mosquito Larvae (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 41:423-429.

Zeze, G.D., J.M.C. Doannio, J. Dossou-Yovo, F. Rivière et G. Chauvancy. 1996. Évaluation de l'efficacité de *Bacillus sphaericus* neid 1904 appliqué dans des caniveaux préalablement nettoyés, pour lutter contre *Culex quinquefasciatus* Say 1823 à Abidjan (Côte d'Ivoire). Bulletin de la Société de pathologie expérimentale. 89:220-226.

Annexe I

Espèces non ciblées et non sensibles au *Bsph.*

Auteurs	Non sensible	Genres	Espèces
Aly <i>et al.</i> (1989) Poopathi et Tyagi (2004)	Humains		
Dagnogo et Coz (1982)	Crustacés		
Dagnogo et Coz (1982) Lacey et Siegel (2000)	Poissons		
Dagnogo et Coz (1982) Shaddock <i>et al.</i> (1980) Sinègre <i>et al.</i> (1990)	Mammifères : souris, rats, lapins et cobayes		
Grisolia <i>et al.</i> (2009)	Poissons		<i>Danio rerio</i> et <i>Oreochromis niloticus</i>
Lacey et Siegel (2000)	Simulies		
Lacey et Siegel (2000)	Oiseaux		
Mulla <i>et al.</i> (1984)	Éphémères		<i>Callibaetis pacificus</i>
Mulla <i>et al.</i> (1984)	Ostracodes		
Mulla <i>et al.</i> (1984)	Conchostracans		
Mulla <i>et al.</i> (1984)	Dytiques	Dytiscidae et Hydrophilidae	<i>Berosus metallicept</i> et <i>Tropisternus lateralis</i>
Mulla <i>et al.</i> (1984)	Têtards		
Yousten <i>et al.</i> (1991)	Diptères	Chironomidae	<i>Chironomus riparius</i>
Yousten <i>et al.</i> (1991)	Escargots		<i>Helisoma trivoli</i>
Yousten <i>et al.</i> (1991)	Huîtres		<i>Crassostrea virginica</i>
Karch <i>et al.</i> (1990)	Odonates	Anisoptera	
Karch <i>et al.</i> (1990)	Diptères	Chironomidae	
Karch <i>et al.</i> (1990)	Hémiptères		<i>Corixa punctata</i> et <i>Nepa cinerea</i>
Karch <i>et al.</i> (1990)	Éphéméroptères		<i>Cleon dipterum</i>
Karch <i>et al.</i> (1990)	Coléoptères		<i>Enochrus melanocephalus</i>
Karch <i>et al.</i> (1990)	Crustacés	<i>Daphnia sp.</i> e <i>Isopoda sp.</i>	
Karch <i>et al.</i> (1990)	Ostracodes	<i>Cypris sp.</i>	
Merritt <i>et al.</i> (2005)	Voir annexe II		

Liste de certaines espèces non ciblées et non sensibles au *Bsph.* Pour comparer avec les espèces non ciblées et non sensibles au *Bti*, on peut se référer à une liste proposée par Lacoursière et Boisvert (2004).

Annexe II

Liste des invertébrés non ciblés récoltés et identifiés dans des marais à prédominance de *Phalaris sp.* (roseaux) et de *Typha sp.* (quenouilles) à Brookfields, Wisconsin, États-Unis, de mai 2000 à août 2000. Liste compilée à partir de l'article de Merritt *et al.* (2005).

Taxa	SPÉCIMENS RÉCOLTÉS		MARAIS	
	Larve	Adulte	<i>Phalaris sp.</i>	<i>Typha sp.</i>
Turbellara	X		X	X
Oligochaeta (Lumbriculidae)	X			X
Hirundinea				
Erpobdellidae	X		X	X
Glossiphoniidae	X	X	X	X
ISOPODA				
Asellidae (<i>Caecidotea</i>)	X	X	X	X
AMPHIPODA				
Crangonyctidae	X		X	X
Gammaridae		X	X	X
Physidae	X	X	X	X
Lymnaeidae				
<i>Fossaria</i>		X	X	X
<i>Pseudosuccinea</i> et <i>Stagnicola</i>	X		X	X
Planorbidae		X	X	X
PELECEPODA				
Sphaeridae et Corbiculidae	X		X	X
INSECTA				
Collembola				
Entomobryidae	X		X	X
Isotomidae	X	X		X
Sminthuridae	X	X	X	X
Ephemeroptera (Leptophlebiidae)	X		X	X
ODONATA				
Aeshnidae				
<i>Aeshna</i> et <i>Boyeria</i>	X		X	X
<i>Anax</i>	X		X	
Lestidae (<i>Lestes</i>)	X		X	X
Coenagrionidae			X	
<i>Ischnura</i>	X			X
Libellulidae	X		X	X
DECAPODA				
Cambaridae (<i>Procambarus</i>)	X		X	X
Hydracarina	X		X	X
Psocoptera	X		X	X
HEMIPTERA				
Corixidae	X		X	X
Notonectidae				
<i>Notonecta</i>		X		X
Pleidae		X	X	X
Veliidae (<i>Microvelia</i>)	X			X
TRICHOPTERA				
Polycentropodidae (<i>Cernotina</i>)	X			X
Limnephilidae				
<i>Eocosmoecus</i>	X		X	
<i>Limnephilus</i> et <i>Ironoquia</i>	X		X	X

Taxa	SPÉCIMENS RÉCOLTÉS		MARAIS	
	Larve	Adulte	<i>Phalaris sp.</i>	<i>Typha sp.</i>
COLEOPTERA				
Dytiscidae				
<i>Agabus</i> et <i>Hygrotus</i>		X	X	X
<i>Agabinus</i> et <i>Celina</i>	X		X	X
<i>Dytiscus</i>	X	X		X
<i>Hydaticus</i> et <i>Uvarus</i>	X	X	X	X
<i>Hydrovatus</i>	X			X
<i>Hydroporos</i> et <i>Hydroporina</i>	X		X	
<i>Leodessus</i> et <i>H.bius</i>	X		X	
<i>Laccophilus</i> et <i>Oreodytes</i>		X	X	
<i>Rhantus</i>		X		X
Gyrinidae (<i>Gyrinus</i>)	X		X	
Haliplidae (<i>Halipilus</i>)	X	X	X	X
Helophoridae (<i>Helophorus</i>)		X	X	X
Hydrochidae (<i>Hydrocus</i>)		X	X	X
Hydrophilidae				
<i>Anacaena</i> et <i>Enochrus</i>		X	X	X
<i>Berosus</i> et <i>Hydrochara</i>		X	X	
<i>Crenitus</i> et <i>Dibolocerus</i>	X		X	X
<i>Dactylosternum</i>		X		X
<i>Helochares</i> et <i>Paracymus</i>	X		X	X
<i>Hydrobius</i>	X	X	X	X
<i>Tropisternus</i>	X		X	X
Lampyridae	X		X	X
Scirtidae				
<i>Elodes</i>	X		X	X
<i>Scirtes</i>	X		X	
Curculionidae (<i>Lixus</i>)		X		X
Staphylinidae	X		X	X
LEPIDOPTERA (papillon)				
<i>Noctuidae</i> et <i>Pyalidae</i>	X		X	X
DIPTERA				
Chironomidae				
<i>Acricotopus</i> , <i>Chaetocladius</i> , <i>Chironomus</i> , <i>Corynoneura</i> , <i>Gymnometriocnemus</i> , <i>Larsia</i> , <i>Limnophyes</i> , <i>Paratanytarsus</i> , <i>Polypedilum</i> , <i>Pseudosmittia</i> et <i>Tanytarsus</i>	X		X	X
<i>Brillia</i> , <i>Dicrotenpides</i> , <i>Parachironomus</i> , <i>Paramerina</i> , <i>Phaenopsectra</i> , <i>Psectrocladius</i> , <i>Tanypus</i> , <i>Tvetenia</i> et <i>Zalutschia</i>	X		X	
<i>Cricotopus</i> , <i>Orthocladius</i> , <i>Paratendipes</i> , <i>Psectrotanypus</i> , et <i>Thienemannimyia</i>	X			X
Ceratopogonidae				
<i>Bezzia</i>	X		X	X
<i>Forcipomyia</i>	X			X
Chaoboridae				
<i>Chaoborus</i> et <i>Mochlonyx</i>	X		X	

Taxa	SPÉCIMENS RÉCOLTÉS		MARAIS	
	Larve	Adulte	<i>Phalaris sp.</i>	<i>Typha sp.</i>
DIPTERA (suite)				
Dixidae (<i>Dixella</i>)	X		X	X
Dolichopodidae	X			X
Ephydriidae				
<i>Scatella, Ephydra et Nostima</i>	X		X	X
Empididae	X			X
Psychodidae (<i>Pericoma</i>)	X		X	X
Stratiomyidae				
<i>Allognosta, Odontomyia et Stratiomys</i>	X		X	X
<i>Caloparyphus</i>	X		X	
Sciomyzidae (<i>Sepedon</i>)	X		X	X
Syrphidae	X		X	
Tabanidae				
<i>Chrysops</i>	X		X	
<i>Hybomitra, Haematopota et Silvius</i>	X			X
<i>Tabanus</i>	X		X	X
Tipulidae				
<i>Helius</i>	X		X	
<i>Tipula</i>	X		X	X
<i>Pilaria, Prionocera, Hexatoma,</i>				
<i>Limonia et Ormosia</i>	X			X
Muscidae	X			X