

UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

MEMOIRE PRESENTE A  
L'UNIVERSITE DU QUEBEC A TROIS-RIVIERES

COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DE LA MAITRISE EN SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT

PAR  
CLAUDE DUPONT B.Sc.

ETUDE DES MODIFICATIONS HISTOPATHOLOGIQUES DES STRUCTURES INTESTINALES DE  
LARVES DE MOUCHES NOIRES (Diptère:Simuliidae) A LA SUITE D'UNE INGESTION  
DE BACILLUS THURINGIENSIS SEROVARIETE ISRAELENSIS

OCTOBRE 1986

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

A mes parents, Hélène et Jean-Louis

A mon épouse, Céline

## RESUME

Afin de vérifier si le Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis (B.t.i.) induit les mêmes effets histopathologiques chez les mouches noires que ceux rapportés chez les moustiques, nous avons échantillonnés deux espèces de mouches noires (Simulium venustum\verecundum et Simulium corbis) et mené une étude dans ce sens. Les larves sont traitées en laboratoire avec une préparation commerciale de B.t.i. (Teknar<sup>R</sup>) à des températures variant entre 4,5 °C et 10,5 °C. Après traitements, des larves sont fixées dans le fixateur de Bouin et d'autres dans l'éthanol 70%. Les larves sont montées individuellement dans le Paraplast, selon les techniques usuelles d'histologie et sont coupées longitudinalement à une épaisseur de 5.0 µm.

Les coupes de larves fixées dans le liquide de Bouin, sont colorées à l'hématoxyline-éosine, tandis que les coupes fixées à l'éthanol 70% servent aux essais de détection de la toxine. Les premiers effets se produisent au niveau du cardia où l'on observe un relâchement cellulaire. Une modification de la sécrétion de la membrane péritrophique est observée de même qu'un élargissement des espaces intercellulaire des cellules responsables de cette sécrétion. Aucune altération d'ordre histologique n'est observée dans le cardia; il s'agit donc d'un effet de nature physiologique, ce qui est confirmé par nos essais de détection de la toxine. Ces essais n'ont démontré en aucun moment, la présence de fluorescence dans le cardia. Ensuite, on observe une série de

modifications de nature histologique au niveau des épithéliums du tube méésentérique. On observe une condensation du contenu nucléaire des cellules, suivie d'une perte de différenciation cellulaire et d'une perte des microvillosités. La première région atteinte est l'estomac intermédiaire suivie de l'estomac antérieur, des caeca gastriques et de l'estomac postérieur. Dans toutes ces structures, les cellules épithéliales sont lysées à la fin de l'intoxication, sauf pour l'estomac antérieur où elles sont hypertrophiées. Dans le cas des estomacs intermédiaire et postérieur, les premiers effets se manifestent en aval du bouchon de Teknar<sup>R</sup>. Les différents effets se manifestent beaucoup plus rapidement à des températures élevées ou avec des jeunes larves. Les différences inter et intraspécifiques n'entraînent aucune modifications de ces effets.

Ces résultats observés chez les mouches noires, correspondent à ceux observés chez les moustiques à l'exception de l'effet physiologique du Teknar<sup>R</sup> au niveau du cardia. Il s'agit de la première fois qu'on attribue un tel effet à un insecticide à base de B.t.i. et ce, tant chez les moustiques que chez les mouches noires. Cet effet est à notre avis, la principale étape du processus d'intoxication des larves par le Teknar<sup>R</sup>. En agissant sur les cellules sécrétant la membrane péritrophique, le Teknar<sup>R</sup> modifie la structure et/ou la fonction de cette dernière, ce qui facilite l'accès aux cellules cibles pour la toxine.

Les essais de détection des antigènes des cristaux par immunofluorescence ont permis de mettre en évidence l'hydrolyse intestinale du cristal de B.t.i., en des fractions solubles pouvant

migrer plus rapidement que ce dernier dans le tube digestif. Ceci explique que des effets histologiques peuvent être observés en aval du bouchon de Teknar<sup>R</sup>.

## REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement le Docteur Jacques L. Boisvert pour avoir su développer en moi une démarche scientifique rigoureuse, de même que pour sa patience et sa disponibilité exemplaire à mon égard au cours des trois dernières années.

Je remercie de façon particulière le Docteur Guy Charpentier pour ces judicieux conseils lors des difficultés rencontrées lors de cette étude.

Je remercie le Docteur Jean-François Charles, de l'Institut Pasteur de Paris, pour son aide apportée lors de l'interprétation des résultats histologiques.

Je remercie également mon épouse Céline, pour sa compréhension et ses encouragements constants durant toute la durée de cette étude.

Je remercie mes collègues de travail, soit M. Christian Back pour l'aide apportée en ce qui à trait aux considérations entomologiques de cette étude de même que Mme. M. Chantal Alarie, Liette Laganière, Mario Boisvert, Marcel Kouassi et Yvon Beaulieu pour leur aide et leur collaboration tout au long de ce travail.

Enfin, je remercie la compagnie Zoecon Ltd (Canada), l'Université du Québec à Trois-Rivières et le gouvernement du Québec pour leur aide financière tout au long de ce travail.

## TABLE DES MATIERES

|   | Page |
|---|------|
| PAGE TITRE . . . . .  | i    |
| RESUME . . . . .  | ii   |
| REMERCIEMENTS . . . . .   | v    |
| TABLE DES MATIERES . . . . .  | vi   |
| LISTE DES TABLEAUX . . . . .  | ix   |
| LISTE DES FIGURES . . . . .   | x    |
| LISTE DES ABREVIATIONS . . . . .  | xii  |
| <br>CHAPITRES   |      |
| I. INTRODUCTION . . . . .   | 1    |
| I-1 Historique de <u>Bacillus thuringiensis</u> sérovariété<br><u>israelensis</u> . . . . . | 1    |
| I-2 Situation de l'étude . . . . .  | 7    |
| I-2.1 Etudes portant sur l'ensemble des souches de<br><u>B.t.</u> . . . . .                 | 7    |
| I-2.2 Etudes avec <u>B.t.i.</u> . . . . .   | 12   |
| I-3 Problématique . . . . .   | 14   |
| II. MATERIEL ET METHODES . . . . .  | 16   |
| II-1 Provenance des larves . . . . .  | 16   |
| II-2 Traitements . . . . .  | 17   |
| II-3 Montage des spécimens . . . . .  | 21   |
| II-4 Coupes . . . . .   | 21   |



|   |    |
|---|----|
| II-5 Etudes histopathologiques . . . . .                                    | 22 |
| II-5.1 Coloration et observation . . . . .                                  | 22 |
| II-5.2 Photographie . . . . .   | 22 |
| II-6 Détection des antigènes du cristal par<br>immunofluorescence . . . . . | 23 |
| II-6.1 Préparation de l'antisérum . . . . .                                 | 23 |
| II-6.2 Détection, observation et photographie . . . . .                     | 23 |
| III. LA LARVE DE MOUCHE NOIRE . . . . .                                     | 24 |
| III-1 Introduction . . . . .  | 24 |
| III-2 Morphologie externe . . . . .   | 24 |
| III-2.1 La tête . . . . .   | 24 |
| III-2.2 Le corps . . . . .  | 26 |
| III-3 Anatomie interne . . . . .  | 28 |
| III-3.1 Système digestif . . . . .  | 28 |
| III-3.2 Autres systèmes . . . . .   | 43 |
| IV. RESULTATS . . . . .   | 48 |
| IV-1 Effets cellulaires . . . . .   | 48 |
| IV-1.1 Cardia . . . . .   | 49 |
| IV-1.2 Estomac intermédiaire . . . . .                                      | 54 |
| IV-1.3 Estomac antérieur . . . . .  | 60 |
| IV-1.4 Caeca gastriques . . . . .   | 66 |
| IV-1.5 Estomac postérieur . . . . .   | 74 |
| IV-2 Influence des facteurs étudiés . . . . .                               | 76 |
| IV-3 Influence de l'arrêt de la prise de nourriture . . . . .               | 81 |
| IV-4 Localisation de la toxine . . . . .                                    | 85 |
| V. DISCUSSION . . . . .   | 91 |

|  |     |
|--|-----|
| BIBLIOGRAPHIE . . . . .  | 98  |
| ANNEXES  |     |
| A. COMPOSITION DU FIXATEUR DE BOUIN . . . . .  | 111 |
| B. PROTOCOLE D'ECLAIRCISSEMENT ET DE DESHYDRATATION APRES<br>FIXATION PAR LE FIXATEUR DE BOUIN . . . . . | 112 |
| C. PROTOCOLE D'ECLAIRCISSEMENT ET DE DESHYDRATATION APRES<br>FIXATION PAR L'ETHANOL 70% . . . . .        | 113 |
| D. PROTOCOLE D'ENROBAGE DES LARVES . . . . .   | 114 |
| E. PROTOCOLE DE DEPARAFFINAGE DES LAMES . . . . .  | 115 |
| F. COLORATION A L'HEMATOXYLINE-EOSINE SUR COUPES . . . . .   | 116 |
| G. COLORATION A L'ORANGE D'ACRIDINE SUR COUPES . . . . .   | 117 |
| H. COMPOSITION DU MILIEU GLUCOSE - EXTRAIT DE LEVURE - SELS . .  | 118 |
| I. PROTOCOLE DE MARQUAGE EN IMMUNOFLOURESCENCE . . . . .   | 119 |

## LISTE DES TABLEAUX

| Tableau  | page |
|--|------|
| 1. Sérovariétés et sérotypes de <i>Bacillus thuringiensis</i> . . . . .                    | 4    |
| 2. Résumé des études portant sur les effets cellulaires chez les<br>lépidoptères . . . . . | 8    |
| 3. Résumé des études portant sur les effets cellulaires chez les<br>diptères . . . . .     | 13   |
| 4. Identification des lots larvaires . . . . .   | 17   |
| 5. Description des différentes expériences . . . . .                                       | 21   |

## LISTE DES FIGURES

| Figure   | page |
|--|------|
| 1. Bassin de maintenance . . . . .   | 19   |
| 2. Bassin d'expérimentation . . . . .  | 19   |
| 3. Schéma de la larve de mouche noire . . . . .  | 25   |
| 4. Schémas de la tête d'une larve de mouche noire . . . . .  | 27   |
| 5. Schémas de l'extrémité postérieure de la larve de mouche noire.   | 29   |
| 6. Système digestif de la larve de mouche noire . . . . .  | 31   |
| 7. Cardia de la larve de mouche noire . . . . .  | 35   |
| 8. Caeca gastriques de la larve de mouche noire . . . . .  | 35   |
| 9. Membrane péritrophique de la larve de mouche noire . . . . .  | 37   |
| 10. Estomac antérieur de la larve de mouche noire . . . . .  | 40   |
| 11. Estomac postérieur de la larve de mouche noire . . . . .   | 40   |
| 12. Estomac intermédiaire de la larve de mouche noire . . . . .  | 42   |
| 13. Schéma du système musculaire corporel de la larve de mouche<br>noire . . . . .                               | 44   |
| 14. Schéma du système respiratoire de la larve de mouche noire . .   | 45   |
| 15. Vue anatomique interne générale de la larve de mouche noire . .  | 47   |
| 16. Relâchement cellulaire des cardia suite à une ingestion de<br>Teknar <sup>R</sup> . . . . .                  | 51   |
| 17. Elargissement de l'espace intercellulaire des cellules<br>sécrétrices de la membrane péritrophique . . . . . | 53   |
| 18. Cardia d'une larve traitée pendant 30 minutes . . . . .  | 56   |

|   |    |
|---|----|
| 19. Premiers effets observés au niveau de l'estomac intermédiaire .   | 58 |
| 20. Dommages finaux dûs à l'action du Teknar <sup>R</sup> au niveau de l'estomac<br>intermédiaire . . . . .   | 62 |
| 21. Premiers effets observés au niveau de l'estomac antérieur . . .   | 64 |
| 22. Vacuolisation des cellules de l'estomac antérieur . . . . .   | 68 |
| 23. Dommages finaux dûs à l'action du Teknar <sup>R</sup> au niveau de l'estomac<br>antérieur . . . . .       | 70 |
| 24. Premiers effets observés au niveau des caeca gastriques . . . .   | 72 |
| 25. Dommages finaux dûs à l'action du Teknar <sup>R</sup> au niveau des caeca<br>gastriques . . . . .         | 76 |
| 26. Dommages dûs à l'action du Teknar <sup>R</sup> au niveau de l'estomac<br>postérieur . . . . .             | 78 |
| 27. Effets dûs à l'arrêt de la prise de nourriture . . . . .  | 83 |
| 28. Localisation du bouchon de Teknar <sup>R</sup> par immunofluorescence . . .                               | 88 |
| 29. Localisation de l'antigénicité au niveau des cellules en aval<br>bouchon de Teknar <sup>R</sup> . . . . . | 90 |
| 30. Effet lytique causé par le Teknar <sup>R</sup> vu par immunofluorescence .                                | 90 |

## LISTE DES ABREVIATIONS

|        |  |
|--------|--|
| A.a.   | <u>Aedes aegypti</u>   |
| B.t.   | <u>Bacillus thuringiensis</u>                                |
| B.t.i. | <u>Bacillus thuringiensis</u> sérovariété <u>israelensis</u> |
| conc.  | concentration  |
| FITC   | isothiocyanate de fluorescéine conjuguée                     |
| kDa    | kilodaltons  |
| MC     | matériel colorable   |
| mg     | milligramme  |
| min.   | minute   |
| ml     | millilitre   |
| mm     | millimètre   |
| PBS    | tampon phosphate salin                                       |
| sec.   | seconde  |
| temp.  | température  |
| µm     | micromètre   |
| °C     | degré Celsius  |

## CHAPITRE I

### INTRODUCTION

I-1 Historique de Bacillus thuringiensis sérovariété israelensis:  
Bacillus thuringiensis (B.t.) est une bactérie Gram positif aérobie facultative, mobile, sporulée (spore ovale, subterminale non déformante), largement répandue dans l'environnement et qui est très près phénotypiquement et biochimiquement de Bacillus cereus (Carleton et Gonzalez, 1985). Cependant elle se distingue de cette dernière espèce par la faculté de synthèse d'une inclusion protéique cristalline lors de sa phase de sporulation. Cette inclusion parasporale fait de B.t. l'un des microorganismes les plus utilisés pour le contrôle d'insectes puisqu'il possède des propriétés larvicides.

Les premières indications à ce sujet datent du début du siècle. Un scientifique japonais, Ishiwata (1905), isola chez des larves de vers à soie malades une bactérie qu'il nomma Bacillus sotto. Cette bactérie, responsable des symptômes observés chez le ver à soie, est aujourd'hui connue sous l'appellation de B.t. sérovariété sotto (sérototype H4a4b). La première mention de Bacillus thuringiensis, nous la devons à un chercheur allemand, Berliner, qui travailla entre 1909 et 1912 sur une maladie infectieuse de la pyrale méditerranéenne de la farine (Anagasta kuehniella). Il isola la bactérie causant l'infection et la désigna sous le nom de Bacillus thuringiensis (Berliner 1915), et qui est

de nos jours connue sous le nom de B.t. sérovariété thuringiensis ou Berliner (sérotypage H1).

Bien qu'il fut connu depuis longtemps, il fallut attendre près d'une quarantaine d'années avant que le potentiel larvicide de B.t. soit exploité. L'apparition de résistances aux divers insecticides chimiques de plus en plus nombreuses chez les insectes de même que des préoccupations environnementales plus grandes amenèrent à se tourner vers la possibilité d'utiliser certains pathogènes d'insectes comme agents de contrôle. C'est ainsi que déjà durant les années 50, on pouvait trouver quatre formulations commerciales à base de B.t. sérovariété thuringiensis soit (a) le Barthane L-69; (b) le Biotrol BTB; (c) le Parasporin et (d) le Thuricide (Couch et Ross, 1980). Durant cette période, plusieurs autres souches de B.t. furent découvertes et toutes ces souches présentaient alors une caractéristique commune, celle de n'être toxique que pour les larves de lépidoptères. Ainsi Bulla et al. (1985) rapportent qu'en 1972, les différentes souches de B.t. étaient toxiques pour les larves de plus de 150 espèces de lépidoptères. Afin de bien distinguer les différentes souches de B.t. on procéda, en 1962, à la classification de celles-ci, selon leur propriété antigénique flagellaire (de Barjac et Bonnefoi, 1962; Bonnefoi et de Barjac, 1963). L'activité toxique associée au bacille est en fait due au cristal synthétisé lors de la sporulation. De façon générale, plusieurs toxines sont sécrétées par diverses souches de B.t.: (a) la delta ( $\delta$ ) endotoxine issue du cristal; (b) la bêta ( $\beta$ ) exotoxine; (c) l'alpha ( $\alpha$ ) exotoxine; et (d) plusieurs exoenzymes et protoxines ne démontrant aucune activité biologique (Lüthy et Ebersold, 1981). La toxicité face aux larves d'insectes est due



spécifiquement à la  $\delta$ -endotoxine. La  $\beta$ -exotoxine est beaucoup moins spécifique que la précédente et présente une légère toxicité pour les mammifères. L' $\alpha$ -exotoxine n'est produite que sous certaines conditions et présente peu d'intérêt dans le cadre d'un contrôle biologique.

B.t. n'était donc utilisé que dans le cas de nuisance d'insectes ravageurs rencontrés en agriculture ou en foresterie. Son spectre d'action allait cependant s'élargir en 1977 avec l'isolation d'une nouvelle souche de B.t., à partir de boue de mares à moustiques, par Goldberg et Margalit (1977). Cette nouvelle souche, nommée variété israelensis et appartenant à un nouveau sérotype H14 (de Barjac 1978 a), présentait alors des propriétés larvicides pour certains diptères; soit les moustiques des genres Anopheles, Uranotaenia, Culex et Aedes (Goldberg et Margalit, 1977) de même que pour un large spectre d'espèces de mouches noires (Undeen et Nagel, 1978). On peut voir qu'il s'agit en fait d'une catégorie d'insectes piqueurs qui ont un intérêt particulier du point de vue médical puisqu'ils sont vecteurs de nombreuses maladies tropicales importantes dont la fièvre jaune, la dengue, la malaria et l'onchocercose. En Amérique du Nord, ces insectes sont également vecteurs de certaines maladies animales et potentiellement humaines (encéphalites, filarioses), tout en étant une nuisance sociale et économique (Conseil National de la Recherche du Canada, 1982).

Ainsi, bien que de nombreuses variétés soient présentement connues et identifiées: on dénombre à ce jour, 32 sérovariétés de B.t. réparties en 23 sérotypes différents (tableau 1), aucune autre souche qu'israelensis n'a démontré une activité larvicide pour les moustiques et

Tableau I.  
Sérovariétés et sérotypes de Bacillus thuringiensis\*

| Sérovariété          | Sérotipe H | Sérovariété            | Sérotipe H |
|----------------------|------------|------------------------|------------|
| <u>thuringiensis</u> | 1          | <u>darmstadiensis</u>  | 10         |
| <u>finitimus</u>     | 2          | <u>toumanoffi</u>      | 11a,11b    |
| <u>alesti</u>        | 3a         | <u>kyushuensis</u>     | 11a,11c    |
| <u>kurstaki</u>      | 3a,3b      | <u>thompsoni</u>       | 12         |
| <u>sotto</u>         | 4a,4b      | <u>pakistani</u>       | 13         |
| <u>dentrolimus</u>   | 4a,4b      | <u>israelensis</u>     | 14         |
| <u>kenyae</u>        | 4a,4c      | <u>dakota</u>          | 15         |
| <u>galleriae</u>     | 5a,5b      | <u>indiana</u>         | 16         |
| <u>canadensis</u>    | 5a,5c      | <u>tohokuensis</u>     | 17         |
| <u>entomocidus</u>   | 6          | <u>kumamotoensis</u>   | 18         |
| <u>subtoxicus</u>    | 6          | <u>tochigiensis</u>    | 19         |
| <u>aizawai</u>       | 7          | <u>yunnanensis</u>     | 20a,20b    |
| <u>morrisoni</u>     | 8a,8b      | <u>pondicheriensis</u> | 20a,20c    |
| <u>ostrinae</u>      | 8a,8c      | <u>colmeri</u>         | 21         |
| <u>nigeriensis</u>   | 8b,8d      | <u>shandongiensis</u>  | 22         |
| <u>tolworthi</u>     | 9          | <u>japonensis</u>      | 23         |

\*: Tiré des différents auteurs cités dans le texte.

les mouches noires aussi forte et pouvant être exploitée lors de traitements opérationnels. Il existe présentement trois grands fabricants (Zoecon USA, Abbott USA et Biochem Belgique), qui offrent une

gamme de préparations commerciales à base de B.t. sérovariété israelensis (B.t.i.).

A la suite de sa découverte, B.t.i. s'avéra un sujet de recherche intéressant à cause de sa grande spécificité et de l'absence de production de  $\beta$ -exotoxine. C'est ainsi que dès le début des années 80, une littérature imposante sur ce bacille était disponible et n'a cessé depuis, de s'accroître avec les années.

En fait, la majorité des études effectuées au début visaient toutes le même objectif: démontrer l'efficacité et la sécurité d'utilisation de B.t.i. dans le cadre de lutttes opérationnelles dirigées contre les moustiques et/ou les mouches noires. On retrouve de nombreuses études portant sur le pouvoir larvicide de B.t.i. et ce, tant en laboratoire (Undeen et Nagel, 1978; de Barjac et Coz, 1979; Undeen et Berl, 1979; Frommer et al., 1980; Van Essen et Hembree, 1980; Ignoffo, 1981) que sur le terrain (Guillet et de Barjac, 1979; Undeen et Colbo, 1980; Molloy et Jamnback, 1981; Frommer et al., 1981; Mulla et al., 1982; Lacey et al., 1984). Ces auteurs ont démontré de façon indéniable le haut potentiel de B.t.i. Ces résultats ont démontré une excellente toxicité (mortalité) pour de faibles doses. Pendant cette même période plusieurs études ont porté sur les facteurs pouvant affecter ou modifier d'une quelconque façon l'activité larvicide de B.t.i. (Gaugler et Molloy, 1980; Molloy et al., 1981; Wraight et al., 1981; Ramoska et al., 1982; Lacey et Undeen, 1984) tels la température, les matière en suspension, la concentration d'insecticide et la sensibilité intra et interspécifique. On retrouve également des études traitant des effets possibles de B.t.i. sur la faune associée aux moustiques ou aux mouches noires (Dejoux, 1979; Colbo et

Undeen, 1980; Miura et al., 1982). Ces auteurs sont unanimes à dire que B.t.i. est hautement sélectif et qu'aux concentrations opérationnelles aucun problème n'est à craindre pour la faune non cible. Enfin, toujours dans un but d'amélioration d'un contrôle biologique à base de B.t.i., certains auteurs s'intéressèrent à la possibilité de persistance et/ou de recyclage du bacille (Larget, 1981; Van Essen et Hembree, 1980; Aly et al., 1985; Dupont et Boisvert, 1986 ).

Ce n'est qu'un peu plus tard que les chercheurs explorèrent les aspects plus fondamentaux de B.t.i. Ainsi des études sur le cristal protéique, qui est en fait le seul agent responsable de la toxicité larvaire de B.t.i., furent entreprises (Armstrong et al., 1985; Cheung et Hammock, 1985; Insell et Fitz-James, 1985). Bien que plusieurs études soient disponibles, il existe toujours une vive controverse au sujet de la nature de la  $\delta$ -endotoxine et de son mode d'action précis. Certains auteurs affirment que le poids moléculaire de la fraction toxique est de 25-28 kDa tandis que d'autres mentionnent 65-68 kDa. Dans le cas des études portant sur la génétique de ce bacille, on trouve les premiers documents à partir de 1983 (Ward et Ellar, 1983; Gonzalez et Carlton, 1984; Carlton et Gonzalez, 1985). A ce niveau également, on ne peut obtenir de consensus au sujet du gène codant la  $\delta$ -endotoxine. Certains parlent d'une origine chromosomique, d'autre plasmidique.

On peut remarquer que peu d'auteurs travaillèrent sur les différents effets cellulaires causés par la toxine; et ce malgré le fait que déjà en 1978, de Barjac (1978 b) démontra des effets cytologiques de B.t.i. chez des larves de moustiques. On remarque aussi que ces auteurs n'ont choisi de travailler qu'avec des moustiques lors d'études in vivo,

ou qu'avec des cellules de moustiques lors d'essais in vitro. Il semble donc que l'aspect mouches noires ait été mis de côté lors de ces études, alors que dans le cas des autres types de travaux (terrain), on y retrouve aussi bien des études avec les moustiques qu'avec les mouches noires. Ceci s'explique par les difficultés rencontrées par l'établissement d'élevages continus de mouches noires et par la faible disponibilité de lignées cellulaires provenant de mouches noires.

I-2 Situation de l'étude: A cause de la quantité d'informations disponibles sur les effets cellulaires de B.t.i., il convient, pour fin de comparaison de faire une revue des différents travaux portant sur ce sujet, mais où les auteurs employèrent des variétés autres que le B.t.i. Ceci est important, puisque toutes les souches de B.t. présentent un spectre d'action général commun: i.e. qu'il faut toujours que les cristaux protéiques soient ingérés par la larve pour qu'il y ait manifestation des effets. Il en résulte donc que les effets majeurs se situent toujours au niveau du système digestif de la larve ayant ingéré les cristaux. On peut regrouper les travaux en deux grands groupes. Le premier concerne l'effet des cristaux pour l'ensemble des souches de B.t.; le second porte sur les effets de la souche nous intéressant, soit B.t.i.

I-2.1 Etudes portant sur l'ensemble des souches de B.t.: Comme on peut le constater dans le tableau 2, les études portant sur les effets cellulaires des cristaux de B.t. furent réalisées sur plusieurs espèces de lépidoptères. Ces études ont donc permis à leurs auteurs de mettre en

Tableau 2  
 Résumé des études portant sur les effets cellulaires chez les  
 lépidoptères

| Insecte                    | sérovariété          | auteur                     | année       | @ |
|----------------------------|----------------------|----------------------------|-------------|---|
| <u>Bombyx mori</u>         | <u>alesti</u>        | Toumanoff <u>et al.</u>    | (1953)      | 1 |
|                            | <u>kurstaki</u>      | Percy et Fast              | (1983)      | 1 |
|                            |                      | Endo et Nishiitsutsuji-Uwo | (1980)      | 1 |
|                            | <u>sotto</u>         | Fast et Angus              | (1965)      | 1 |
|                            | <u>aizawai</u>       | Endo et Nishiitsutsuji-Uwo | (1980)      | 1 |
|                            | <u>galleriae</u>     | Louloudes et Heimpel       | (1965)      | 1 |
| <u>Choristoneura</u>       | <u>thuringiensis</u> | Ebersold <u>et al.</u>     | (1980)      | 2 |
| <u>fumiferana</u>          | <u>kurstaki</u>      | Johnson                    | (1983;1981) | 2 |
|                            |                      | Murphy <u>et al.</u>       | (1976)      | 2 |
|                            | <u>israelensis</u>   | Thomas et Ellar            | (1983)      | 2 |
| <u>Ephestia cartella</u>   | <u>aizawai</u>       | Endo et Nishiitsutsuji-Uwo | (1981)      | 1 |
| <u>Lymantria dispar</u>    | <u>aizawai</u>       | Endo et Nishiitsutsuji-Uwo | (1981)      | 1 |
| <u>Malacosoma disstria</u> | <u>kurstaki</u>      | Murphy <u>et al.</u>       | (1976)      | 2 |
| <u>Manduca sexta</u>       | <u>alesti</u>        | Rupp et Spence             | (1985)      | 1 |
|                            |                      | Griego <u>et al.</u>       | (1980)      | 1 |
|                            | <u>kurstaki</u>      | Spies et Spence            | (1985)      | 1 |
|                            |                      | Gupta <u>et al.</u>        | (1985)      | 2 |
|                            |                      | deLello <u>et al.</u>      | (1984)      | 1 |
| <u>Pieris brassicae</u>    | <u>aizawai</u>       | Endo et Nishiitsutsuji-Uwo | (1981)      | 1 |
|                            | -----*               | Lüthy                      | (1973)      | 1 |

Tableau 2 (suite)

| Insecte                | sérovariété        | auteur                           | année       | @ |
|------------------------|--------------------|----------------------------------|-------------|---|
| <u>Spodoptera</u>      | <u>israelensis</u> | Thomas et Ellar                  | (1983)      | 2 |
| <u>frugiperda</u>      |                    |                                  |             |   |
| <u>Trichoplasia ni</u> | <u>kurstaki</u>    | Murphy <u>et al.</u>             | (1976)      | 2 |
|                        | <u>aizawai</u>     | Nishiitsutsuji-Uwo <u>et al.</u> | (1980;1979) | 2 |
|                        |                    | Himeno <u>et al.</u>             | (1985)      | 2 |
|                        | <u>israelensis</u> | Thomas et Ellar                  | (1983)      | 2 |

\*: sérovariété inconnue

1: études avec larves; 2: études avec cultures de cellules

évidence les différents effets dûs aux divers sérotypes de B.t. employés, de même que de proposer des hypothèses afin d'expliquer ces effets.

Les premières informations à ce sujet sont probablement celles de Toumanoff et Vago (1953). Ils décrivent, chez Bombyx mori, une paralysie larvaire, de même qu'une séparation et une destruction des cellules de l'intestin, le tout accompagné d'une septicémie.

C'est à la suite des travaux de Cooksey et al. (1969) sur Periplaneta americana et de Louloudes et Heimpel (1969) sur Bombyx mori, que l'on identifia le site d'action des cristaux de B.t. au niveau des tissus intestinaux. Ils ont alors émis l'hypothèse qu'une augmentation du transport ionique au niveau de ces tissus serait à l'origine du gonflement et de la lyse cellulaire observée. A ce sujet, Fast et Morrison (1972) proposèrent, suite à leur étude, que ce dérèglement

ionique ne serait qu'un effet secondaire de la toxine aboutissant à la destruction de l'épithélium larvaire. Cependant la controverse sur un effet ionophore possible de la  $\delta$ -endotoxine est loin d'être réglée, puisqu'en 1979 Griego et al. (1979), Salama et al. (1983) et plus récemment Gupta et al. (1985) attribuent un tel rôle à la  $\delta$ -endotoxine.

Lüthy (1973) démontra que le contenu intestinal d'une larve de Pieris brassicae pouvait provoquer des effets histologiques similaires à ceux causés par B.t., sur un système digestif dépourvu de membrane péritrophique. Bien que le rôle de protection face aux agresseurs externes de la membrane péritrophique fût déjà bien connu, il en déduisit que les enzymes intestinaux étaient impliqués dans l'action du B.t. En fait il avança l'hypothèse que lors d'une intoxication, on avait affaire à une auto digestion de l'épithélium intestinal par les enzymes en question.

Endo et Nishiitsutsuji-Uwo (1980) avec Bombyx mori et Griego et al. (1980) avec Manduca sexta établirent une cinétique des différents effets en fonction du temps, au niveau des cellules cibles. Au début de l'intoxication, il y a une déformation des cellules cylindriques, de même qu'une augmentation de la densité aux électrons des cellules caliciformes. Les effets se remarquent dans la région située entre l'estomac antérieur et postérieur, pour ensuite se propager plus profondément le long de l'estomac. On observe également qu'une inhibition de la prise de nourriture accompagne le début de ces effets. Au niveau des organites cellulaires, une vacuolisation du réticulum endoplasmique, une disparition des microvillosités de même qu'une condensation des mitochondries sont observées. Ces altérations au niveau



des mitochondries, rejoignent les travaux de Travers et al. (1976), qui avec des mitochondries isolées, nota une baisse de productivité en ATP ainsi qu'un découplément de la phosphorylation oxydative qui seraient dus à l'action de l'endotoxine de B.t. kurstaki. Endo et Nishiitsutsuji-Uwo (1981) observèrent de nouveau les mêmes effets face aux cellules cylindriques pour Pieris rapae, Lymantria dispar et Ephestia cautella. Au niveau des cellules caliciformes, quelques différences mineures apparurent entre les trois espèces. Ils attribuèrent ces différences à une distorsion des balances ioniques qui seraient variables entre les espèces. Des détails supplémentaires sur les organites atteints, furent obtenus par d'autres études en microscopie électronique. A titre d'exemple on peut mentionner de Lello et al. (1983) au niveau des appareils de Golgi et du réticulum endoplasmique chez Manduca sexta de même que Percy et Fast (1983) au niveau des microvillosités et mitochondries chez Bombyx mori.

Enfin, on trouve des études sur les effets d'une dose subléthale de B.t. En général, bien que ce soit toujours les mêmes cellules qui subissent les modifications, celles-ci sont moins drastiques et les larves récupèrent totalement entre 24 et 72 heures après l'intoxication (Spies et Spence, 1985; Hukuhara et al., 1984; Retnakaran et al., 1983).

Les différentes études faites sur cultures de cellules d'insectes n'ont pas apporté d'éléments nouveaux importants, par rapport aux études in vivo, concernant les modifications cellulaires causées par les endotoxines de B.t., sauf celle de Johnson (1984), où il obtient une lignée cellulaire de Choristoneura fumiferana (FPMI-CF1) résistante au B.t. kurstaki. Cette résistance est cependant limitée à des conditions

expérimentales très particulières. Ceci démontre donc la sécurité d'emploi de B.t. face à une apparition possible de résistance chez les insectes.

1-2.2 Etudes avec B.t.i.: Les premières mentions touchant le mode d'action de la toxine de B.t.i., sont dues à de Barjac (1978 b) (tableau 3). Elle indiqua que "l'effet primaire correspond à une désintégration de l'épithélium intestinal par gonflement, distorsion puis éclatement des cellules". Sans distinguer les cellules caractéristiques cibles, on peut voir qu'il s'agit d'effets assez comparables à ce qui se passe chez les lépidoptères.

Charles et de Barjac (1981 b) identifièrent de façon précise l'ordre d'apparition des effets chez Aedes aegypti. Les premiers effets sont retrouvés au niveau de l'estomac intermédiaire, ensuite au niveau des caeca gastriques et de l'estomac postérieur, pour finalement se manifester dans l'estomac antérieur. Les effets sont sensiblement les mêmes pour les différentes régions atteintes. On peut résumer ces effets par un gonflement cellulaire, perte des microvillosités, hypertrophie et lyse cellulaire. Mentionnons que contrairement aux lépidoptères, l'épithélium intestinal chez Aedes aegypti conserve son intégrité et seule la lyse finale fait en sorte que les cellules ne sont plus organisées en monocouche. Ces effets furent par la suite observés par Lahkim-Tsrer et al. (1983) sur Aedes aegypti et par Habib (1983) cette fois sur Culex declarator. A la suite d'une autre étude, Charles et de Barjac (1981 a) démontrèrent qu'une intoxication par B.t.i. ne provoquait pas une inhibition de la prise de nourriture chez des larves d'Aedes

Tableau 3

Résumé des études portant sur les effets cellulaires chez les diptères.

| Insecte                 | sérovariété          | auteur                           | année    | @ |
|-------------------------|----------------------|----------------------------------|----------|---|
| <u>Aedes albopictus</u> | <u>israelensis</u>   | Thomas et Ellar                  | (1983)   | 2 |
| <u>Aedes aegypti</u>    | <u>thuringiensis</u> | Laurent et Charles               | (1984)   | 2 |
|                         | <u>israelensis</u>   | Laurent et Charles               | (1984)   | 2 |
|                         |                      | Charles                          | (1983)   | 2 |
|                         |                      | Charles et de Barjac             | (1983)   | 1 |
|                         |                      | Lahkim-Trsor <u>et al.</u>       | (1983)   | 1 |
|                         |                      | Charles et de Barjac             | (1981 b) | 1 |
|                         |                      | de Barjac                        | (1978 b) | 1 |
| <u>Culex declarator</u> | <u>israelensis</u>   | Habib                            | (1983)   | 1 |
| <u>Culex moleslus</u>   | <u>aizawai</u>       | Nishiitsutsuji-Uwo <u>et al.</u> | (1980)   | 2 |

1: études avec larves; 2: études avec cultures de cellules

aegypti, même lorsque les effets histologiques sont apparents. Cette observation diffère donc avec celles de Endo et Nishiitsutsuji-Uwo (1980) et Griego et al. (1980) qui eux ont observé cette inhibition de la prise de nourriture chez les lépidoptères.

Des observations en microscopie électronique, ont permis de mettre en évidence des effets au niveau des organites cellulaires. Comme les effets observés en microscopie photonique sont semblables à ceux décrits chez les lépidoptères, on peut s'attendre à retrouver les mêmes organites affectés. Charles et de Barjac (1983) observèrent chez Aedes aegypti un

réticulum endoplasmique fragmenté, des mitochondries condensées, des microvillosités disparaissant et un élargissement des espaces intra et inter cellulaires. A noter que bien qu'aucun effet n'était visible au niveau du cardia, ils observèrent à quelques occasions, des appareils de Golgi sécrétant des vésicules denses aux électrons. Associées à cette sécrétion, ils retrouvèrent cependant des membranes péritrophiques ayant une allure anormale.

1-3 Problématique: Comme on a pu le constater, les études démontrant les effets histologiques et/ou les effets cellulaires causés par l'action des divers sérotypes de B.t. actifs contre les lépidoptères, furent conduites avec plusieurs espèces d'insectes (tableau 2). Dans le cas de B.t.i., ces études n'impliquaient que des espèces de moustiques et pour la majorité des cas, il s'agit de Aedes aegypti. Toutes ces études, indiquées dans le tableau 3, ont comme dénominateur commun le fait d'être menées à des températures élevées, soit des températures de l'ordre de 25,0 à 29,0 °C.

Etant donné que B.t.i. est de plus en plus utilisé pour le contrôle des mouches noires, il devenait important de réaliser des travaux du même type. Les résultats de telles études permettraient de savoir si B.t.i., du point de vue histopathologique, se comporte de la même manière aussi bien chez les moustiques que chez les mouches noires, ou s'il y a lieu d'identifier les différences entre ces deux insectes cibles.

Nous avons décidé de mener nos étude en utilisant deux espèces de mouches noires, puisqu'elles étaient disponibles en grand nombre à ce moment. Etant donné que les traitements opérationnels se font habituellement en eaux froides (moins de 15,0 °C) dans nos régions, nous

avons décidé de travailler à des températures similaires. Ceci nous permet donc de vérifier si les basses températures affectent l'action de B.t.i. au niveau cellulaire. Afin de savoir s'il y a une relation entre la localisation des antigènes du cristal et les effets cellulaires observés, nous avons effectué des essais de détection de ces derniers. Ceci devrait donc nous permettre une meilleure compréhension de l'action cellulaire de B.t.i.

## CHAPITRE II

### MATERIEL ET METHODES

La méthodologie employée lors des différentes expériences se divise en plusieurs étapes. Il s'agit de (a) la récolte des larves; (b) de leur traitement; (c) de la préparation et du montage des spécimens; (d) des coupes et de leur coloration; (e) de l'observation et de la prise de photographies.

II-1 Provenance des larves: Les larves de mouches noires furent récoltées à différentes périodes de l'année et dans différents sites dépendamment du stade larvaire et/ou de l'espèce que l'on voulait étudier. Trois sites furent utilisés au cours de cette étude: (a) la décharge du lac Plaisant ( $46^{\circ}30'N;72^{\circ}57'O$ ) distant de 36 km de Trois-Rivières; (b) la décharge du lac des Souris ( $46^{\circ}35'N;73^{\circ}00'O$ ) distant de 45 km; (c) le ruisseau du lac Boitel ( $46^{\circ}57'N;73^{\circ}02'O$ ) situé à une distance de 80 km de Trois-Rivières. Les espèces récoltées dans ces différents sites, de même que les dates de récolte sont indiquées dans le tableau 4, chaque récolte correspondant à un lot de larves distinct.

A la suite de la récolte, les larves sont placées dans un bassin de maintenance (Figure 1), au laboratoire, en présence d'eau provenant de leur ruisseau d'origine. Cette eau est renouvelée périodiquement (tous les 2 ou 3 jours). La température de l'eau est contrôlée de façon à ne pas provoquer la pupaison tout en n'occasionnant pas de stress thermique.

Tableau 4.  
Identification des lots larvaires

| Date de récolte | Espèce récoltée*                              | Site     | # de lot |
|-----------------|---|----------|----------|
| 04/10/84        | <u>Simulium</u><br><u>venustum\verecundum</u> | Souris   | 1        |
| 14/05/85        | <u>Simulium</u><br><u>venustum\verecundum</u> | Plaisant | 2        |
| 04/06/85        | <u>Simulium</u> <u>corbis</u>                 | Boitel   | 3        |

\*: Identification selon Wood et al., 1962.

Pour le lot # 1; les larves furent maintenues à 6,0 °C tandis que pour les lots # 2 et 3; la température fut de 10,0°C. Le contrôle de la température fut obtenu en plaçant le bassin de maintenance dans une chambre environnementale (Convion). Les larves furent utilisées dans la semaine suivant la récolte.

II-2 Traitements: Pour toutes les expériences de cette étude, nous avons employé le même insecticide. Il s'agit du Ternar<sup>R</sup>, formulation commerciale de B.t.i. qui titre à 1500 unités A.a./mg. Nous avons utilisé un échantillon provenant du lot # 2229. Les traitements au Teknar<sup>R</sup> furent tous effectués en béciers, au laboratoire, dans un bain thermostaté ( $\pm 0,2^\circ\text{C}$ ), avec arrivée d'air comprimé filtré pour chaque bécier, le bain ayant une capacité maximum de 40 béciers (Figure 2). Dans chacun de ces béciers, nous avons placé 500 ml d'eau distillée non déminéralisée, que nous laissons reposer toute la nuit dans le bain

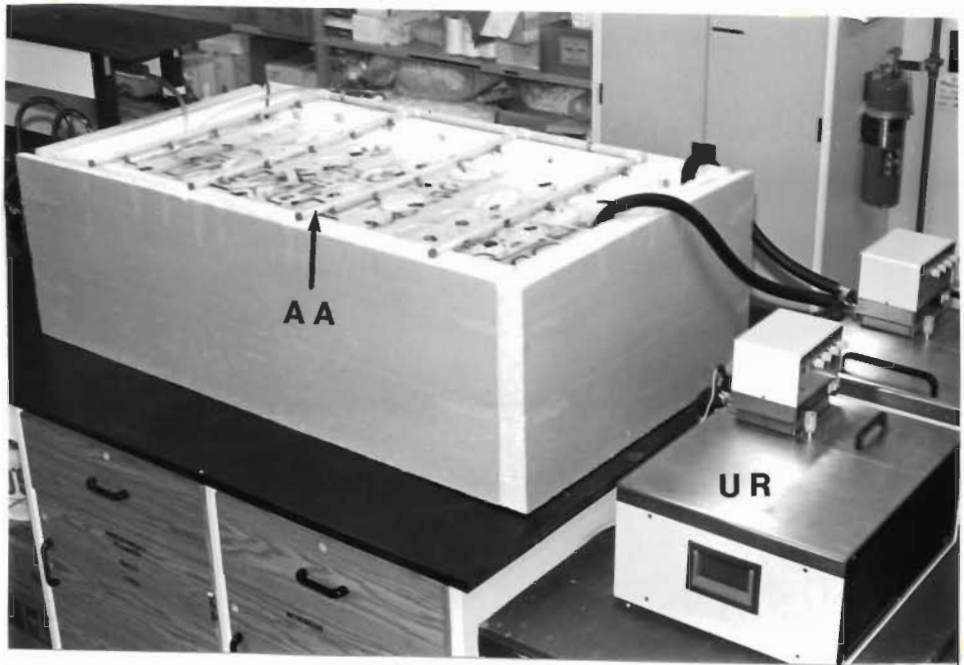
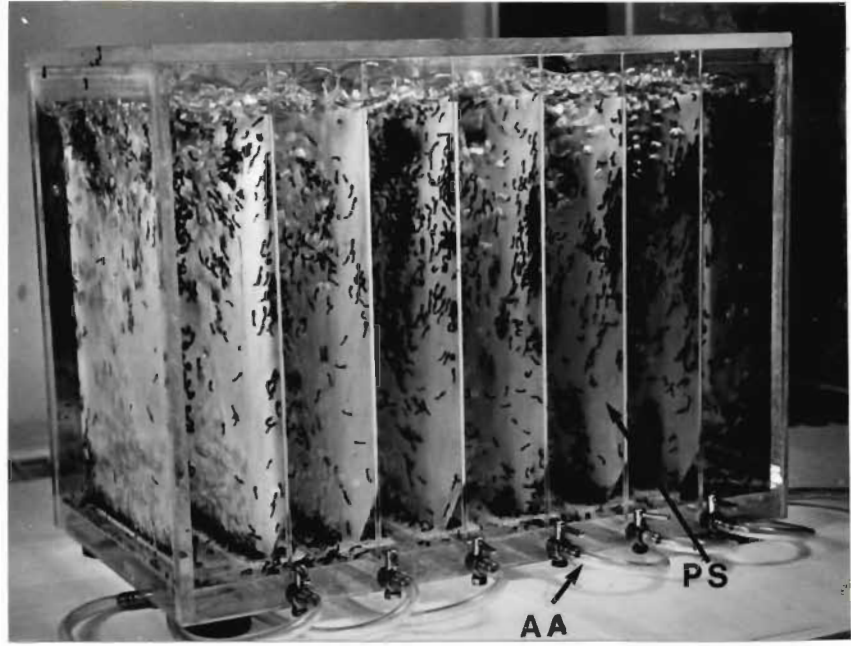
Figure 1. Bassin de maintenance.

AA: arrivée d'air filtré, PS: plaquette de support.

Figure 2. Bassin d'expérimentation.

AA: arrivée d'air filtré, UR: unité de refroidissement.





thermostaté. Ensuite, 30 larves, de même taille, ont été transférées du bassin de maintenance à chacun des bécchers. Les bécchers contenant les larves ont été de nouveau acclimatés à la température du bain. Cette seconde période d'acclimatation a duré entre 4 et 4,5 heures.

La suspension de Teknar<sup>R</sup> est préparée quelques minutes avant le début du traitement. La préparation commerciale est diluée dans l'eau distillée non déminéralisée de manière à obtenir une concentration 500 fois supérieure à celle désirée. Au temps 0, on ajoute 1 ml de la suspension diluée dans tous les bécchers à l'exception de deux d'entre eux (témoins). Ensuite, on prélève toutes les 5 minutes, un béccher contenant l'insecticide et on récupère les larves traitées à l'aide d'une pincette. Ces larves sont séparées en deux groupes; un premier groupe de 20 larves que l'on fixe immédiatement dans le fixateur de Bouin (Annexe A) et qui servira aux études histopathologiques. Le second groupe de 10 larves, qui sera utilisé pour les expériences de détection de la toxine, sont fixées dans l'éthanol 70%. Un des deux bécchers n'ayant pas reçu de larvicide et dont les larves sont considérées comme témoins, est prélevé au début du traitement. Le second béccher sert à vérifier si, au cours du traitement, d'autres facteurs que le Teknar<sup>R</sup> provoquent la mortalité des larves. La durée de chaque traitement est variable et celui-ci est arrêté lorsque la mortalité est de 100% dans quatre prélèvements successifs. On retrouve, au tableau 5, une description des conditions pour chacune des expériences de cette étude.

Tableau 5.  
Description des différentes expériences

| # | Date     | Temp.<br>(°C) | Conc.<br>finale<br>(mg/ml) | Temps<br>d'exposition<br>(min.) | # lot |
|---|----------|---------------|----------------------------|---------------------------------|-------|
| 1 | 10/10/84 | 4,5           | 0,5                        | 100                             | 1     |
| 2 | 11/10/84 | 10,5          | 0,5                        | 75                              | 1     |
| 3 | 15/05/85 | 6,0           | 0,5                        | 85                              | 2     |
| 4 | 22/05/85 | 6,0           | 0,5                        | 120                             | 2     |
| 5 | 13/06/85 | 6,0           | 0,5                        | 105                             | 3     |
| 6 | 14/06/85 | 10,0          | 0,5                        | 80                              | 3     |

II-3 Montage des spécimens: Les larves sont fixées à 4,0°C pendant 24 heures. Après cette étape de fixation, on procède à l'étape d'éclaircissement et de déshydratation selon les protocoles décrits en annexes B et C. Une fois les spécimens débarrassés du fixateur, on passe à l'enrobage des larves. Les larves sont amenées du butanol au Paraplast (Monoject Scientific) selon le protocole décrit en annexe D, pour être ensuite montées, individuellement, dans un cadre d'inclusion. Les blocs ainsi formés sont conservés à la température de la pièce.

II-4 Coupes: Les larves enrobées sont coupées longitudinalement avec un microtome Spencer 820 (American Optical) en coupe rubannée de 5 µm d'épaisseur. Chaque ruban compte entre 8 et 12 coupes de larves. Les rubans sont déposés, individuellement, sur une eau contenant 0,2% de

gélatine, maintenue à 50,0 °C dans un bain thermostaté. On récupère le ruban sur une lame de verre de 25 X 75 mm Superfrost de Fisher, préalablement chauffée à 50,0 °C. Les lames sont séchées à l'air durant une période variant de 6 à 24 heures pour être ensuite déparaffinées, selon l'annexe E.

II-5 Etudes histopathologiques: Les études histopathologiques sont faites à partir des larves ayant été fixées par le fixateur de Bouin. Lorsque ces larves sont coupées, on procède à leur coloration et à leur observation.

II-5.1 Coloration et observation: Les colorations utilisées sont l'hématoxyline-éosine et l'orangé d'acridine (annexes F et G). A la suite de la coloration, on monte des lamelles 24 X 50 mm, épaisseur #1 (Fisher), à l'aide du milieu de montage CoverBond (American Scientific Products) sur nos lames, afin de les conserver. L'observation des lames est faite avec un microscope Leitz Wetzlar équipé d'un appareil photographique Orthomat.

II-5.2 Photographie: Les photographies sont prises sur film Kodak Plus-X panchromatique noir et blanc 35 mm, d'une sensibilité de 125 ASA. Les négatifs sont développés avec le Microdol X (Kodak) et fixés dans une solution concentrée de Kodafix (Kodak). Les photos sont tirées sur papier Ilfospeed glacé (Ilford) # 3, révélées dans le Dextol (Kodak) dilué au 1/3 et fixées dans le Kodafix (Kodak) dilué au 1/4. Les solutions sont maintenues à 21 °C lors des différentes étapes de développement.

II-6 Détection des antigènes du cristal par immunofluorescence: Les études de détection des antigènes se font à partir des larves ayant été fixées par l'éthanol 70%. Ces études se font directement sur les coupes à l'aide d'un sérum dirigé contre les cristaux de B.t.i.

II-6.1 Préparation de l'antisérum: Le sérum fut produit à partir de cristaux purifiés de B.t.i. provenant de bactéries cultivées dans un bouillon glucose - peptone - sels (annexe H). Les cristaux furent purifiés sur gradient continu de bromure de sodium (20%-40%) suivant Ang et Nickerson (1978), et ce deux fois. Les cristaux ainsi purifiés furent mis en suspension dans l'eau distillée et injectés à de jeunes lapins de Nouvelle-Zélande âgés de 6 à 8 semaines. Des injections intra-musculaires (muscle de la cuisse), à une fréquence de une par semaine accompagnées d'adjuvant complet de Freund, furent faites pendant quatre semaines. Le sang est recueilli par ponction cardiaque. Le sérum obtenu, par centrifugation est conservé à -70 °C.

II-6.2 Détection, observation et photographie: La détection des antigènes se fait selon les étapes décrites en annexe I. L'observation des réactions est réalisée avec un microscope Leitz Laborlux 12 équipé d'un appareil photographique Orthomat. Les photographies sont prises sur film Kodacolor (Kodak) couleur 35 mm, d'une sensibilité de 400 ASA. Les négatifs et photographies sont développés et tirés selon un procédé industriel.

## CHAPITRE III

### LA LARVE DE MOUCHE NOIRE

III-1 Introduction: Dans ce chapitre, on décrira la larve de mouche noire afin d'être en mesure de bien se situer lors de la présentation des résultats. On débutera par la morphologie externe de la larve, suivie d'une description des systèmes physiologiques internes. On s'attardera de façon particulière sur le système digestif, puisque l'étude porte sur ce système. Les différentes descriptions sont tirées de Puri (1925), de Peterson (1981) et de nos observations.

III-2 Morphologie externe (Figure 3): Vue de l'extérieur, la larve de mouche noire peut se diviser en deux parties: (a) la tête et ces appendices et (b) le corps larvaire. Le corps est lui même subdivisé en deux parties, le thorax et l'abdomen.

III-2.1 La tête: A la tête sont associés différents appendices (Figure 3). Les antennes de forme cylindrique et constituées de quatre segments; juste devant les antennes, les plumeaux céphaliques, qui servent à la capture de nourriture par la larve, enfin, les pièces buccales: les mâchoires, les maxillaires, le labrium, le labium, l'hypopharynx et l'épipharynx regroupés devant les plumeaux céphaliques.

La tête, ou capsule céphalique, est composée de matériel chitineux et se présente sous une forme d'un tonneau aussi long que large. Elle

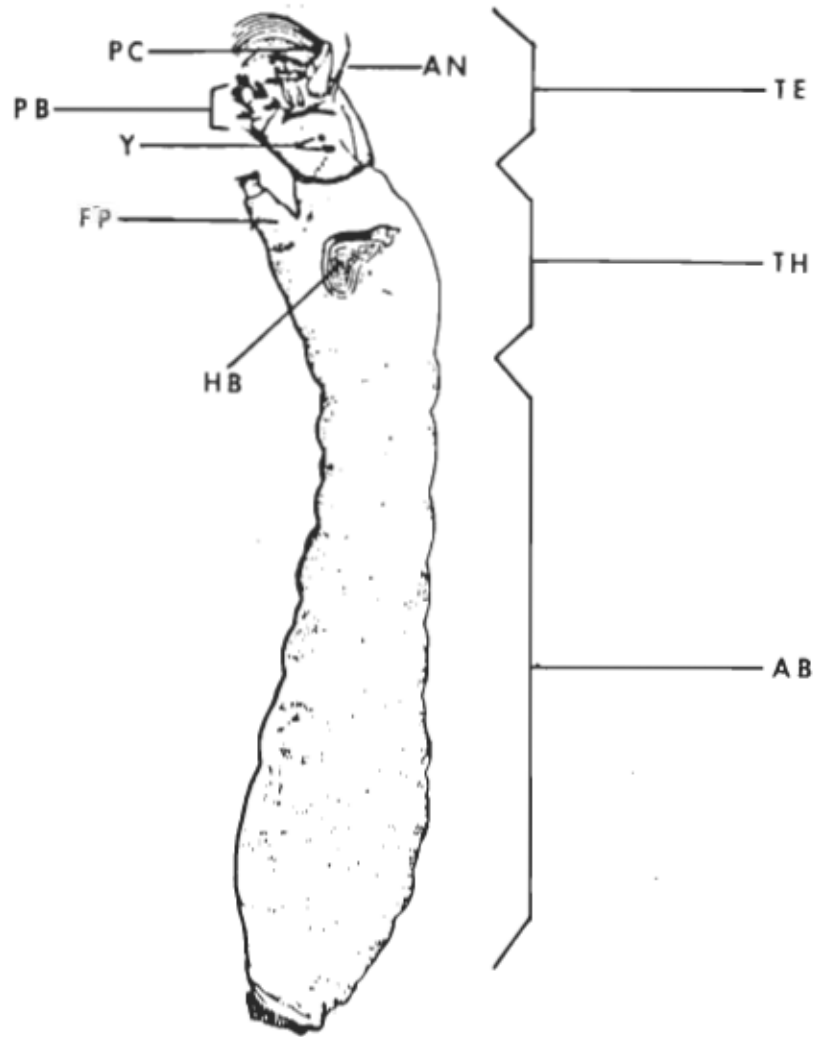


Figure 3. Schéma de la larve de mouche noire.

AB: abdomen, AN: antenne, FP: fausse patte ("proleg"), HB: histoblastes, PB: pièces buccales, PC: plumeau céphalique, TE: tête, TH: thorax, Y: yeux. [Schéma tiré de Peterson, 1981.].

forme un angle de 150° avec le thorax. De façon générale, la tête peut se diviser en trois régions: (a) la région dorso-médiane (Frons Clypeus), et (b) deux régions latérales ou épicroâniennes. Le Frons Clypeus forme la partie dorsale de la tête et est séparé des régions épicroâniennes par une suture bien définie. Les parties épicroâniennes forment les côtés et la portion ventrale de la tête. Dans le centre de chacune des régions épicroâniennes on retrouve deux taches réniformes pigmentées, noires, qui représentent les yeux (Figure 4A).

La pigmentation de la tête montre un patron bien défini pour chaque espèce larvaire. Les couleurs varient entre le brun clair et le brun foncé. On retrouve sur la partie dorsale, des séries de disques qui forment un patron particulier pour chaque espèce (Figure 4B). De la même façon, on retrouve sur la portion ventrale, à l'intersection postérieure des deux régions épicroâniennes, une section plus claire montrant un patron particulier à chaque espèce: la suture histomale ou fente ventrale (Figure 4C).

### III-2.2 Le corps:

III-2.2,1 Le thorax (Figure 3): Le thorax est constitué des trois premiers segments du corps de la larve. Il s'agit, dans l'ordre, des segments pro-, méso- et méta-thoraciques. Au niveau du segment prothoracique, on retrouve une fausse patte ventrale ("proleg") formée de deux segments distincts, dont le deuxième porte un anneau de crochets disposés en rangées. Au niveau des trois segments thoraciques on remarque une série de cinq paires de taches blanches, qui foncent



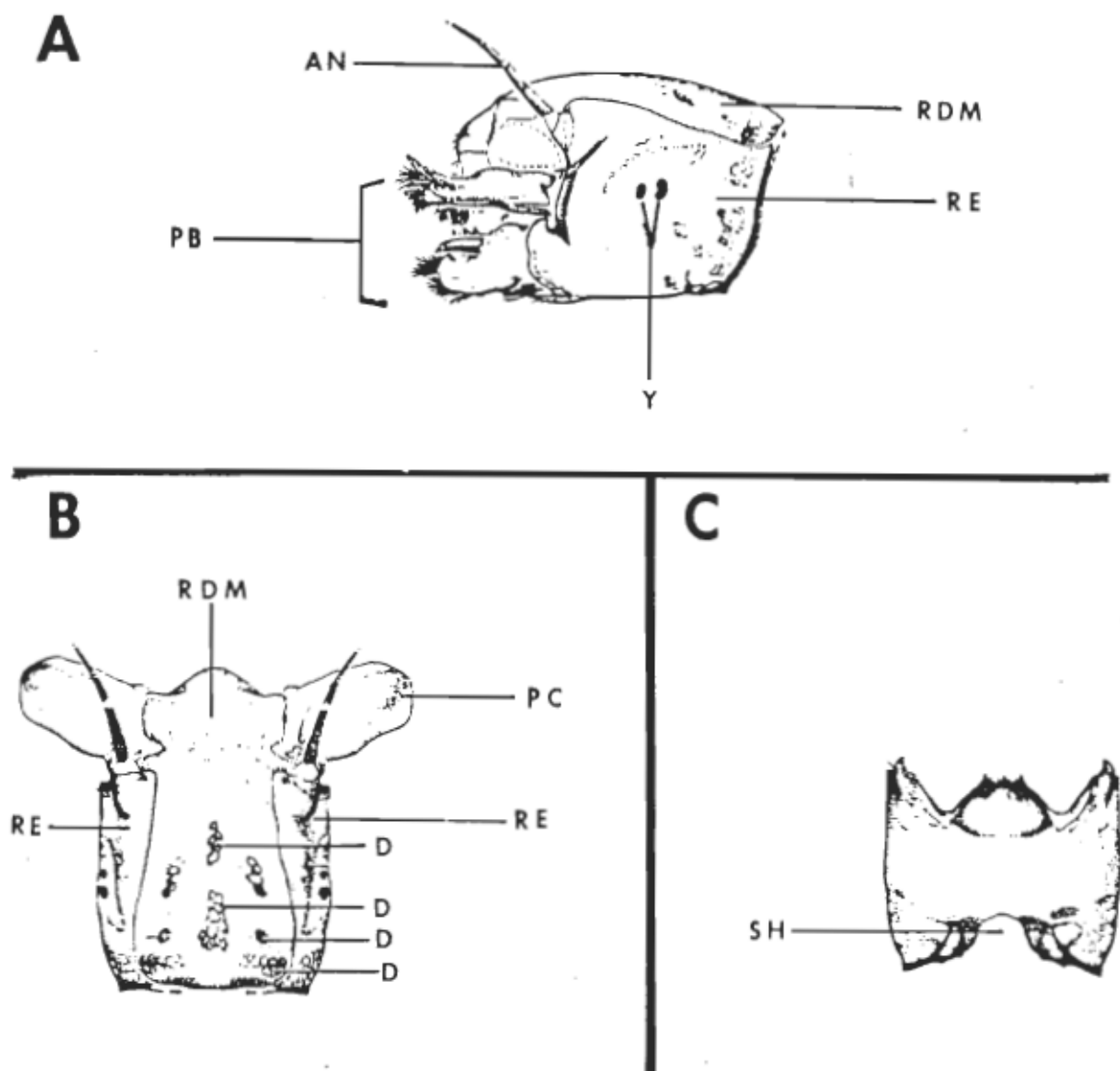


Figure 4. Schémas de la tête d'une larve de mouche noire.

A: Vue latérale; B: Vue dorsale; C: Vue ventrale.

AN: antenne, D: disque dorsal, PB: pièces buccales, PC: plumeau céphalique, RDM: région dorso-médiane, RE: région épicroanienne, SH: suture histomale, Y: yeux. [Schémas tirés de Peterson, 1981.].

avec l'âge. Il s'agit des histoblastes des pattes, des ailes et des haltères.

III-2.2,2 L'abdomen (Figure 3): L'abdomen est constitué des huit segments dont la taille augmente graduellement, pour atteindre un maximum au segment abdominal # 7. Au segment 8, on retrouve une paire de tubercules ventraux. Dans certains cas, les tubercules ont fusionné pour former un tubercule unique ventro-médian. A l'extrémité de l'abdomen, on retrouve un anneau de plusieurs rangées de crochets. Antérieurement à cet anneau on retrouve le sclérite anal, en forme de X chez le genre Simulium, surmonté par les papilles anales (Figure 5).

### III-3 Anatomie interne:

III-3.1 Système digestif (Figure 6): Chez la larve de mouche noire le système digestif peut se diviser en trois parties. Il s'agit de (a) l'intestin antérieur ou stomodéum ("foregut"); (b) l'intestin moyen ou mésentéron ("midgut") et (c) l'intestin postérieur ou proctodéum ("hindgut").

III-3.1,1 L'intestin antérieur: Cette partie du système digestif peut être divisée en deux régions: le pharynx et l'oesophage. La paroi du pharynx consiste en un épais intima chitineux, en continuité avec la cuticule de la larve, ainsi qu'une couche de cellules épithéliales. Une nervure étroite fortement chitinisée, divise le pharynx antérieur et du pharynx postérieur. Le pharynx postérieur se distingue de l'antérieur par la présence d'une couche de muscles

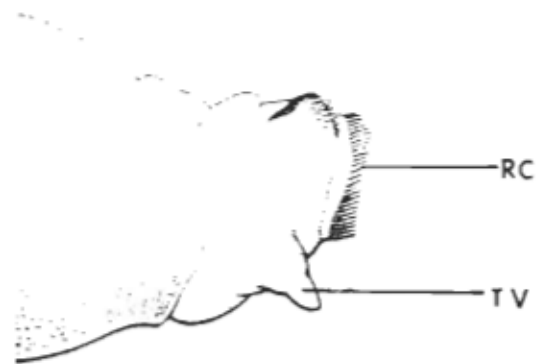
**A****B**

Figure 5. Schémas de l'extrémité postérieure de la larve de mouche noire.

A: Vue dorsale; B: Vue latérale

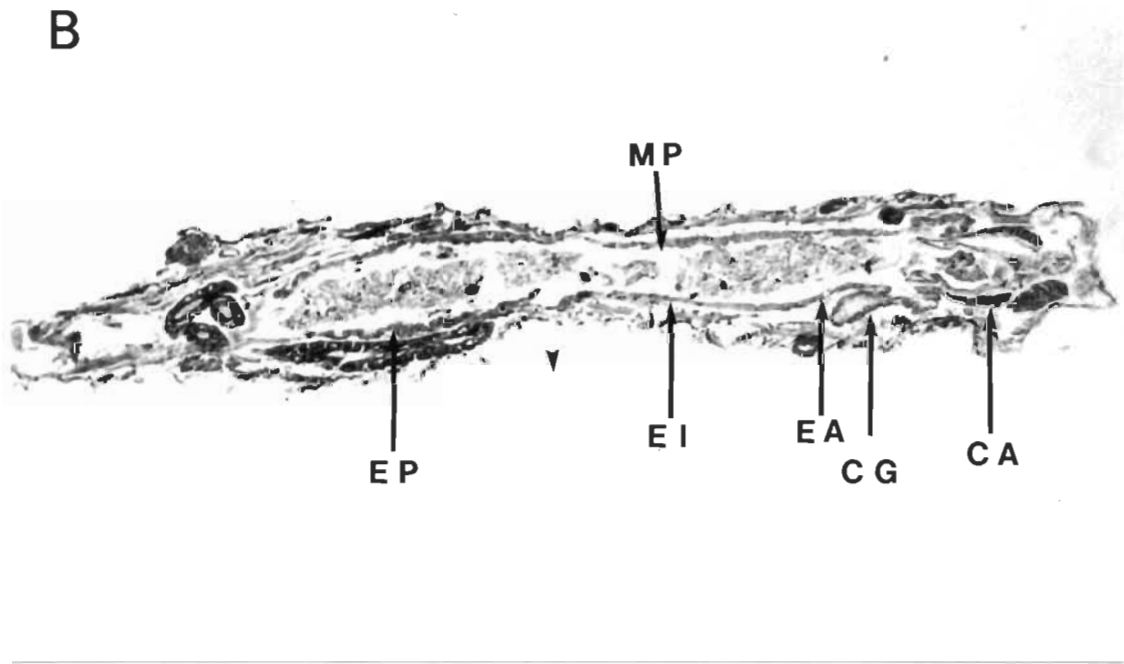
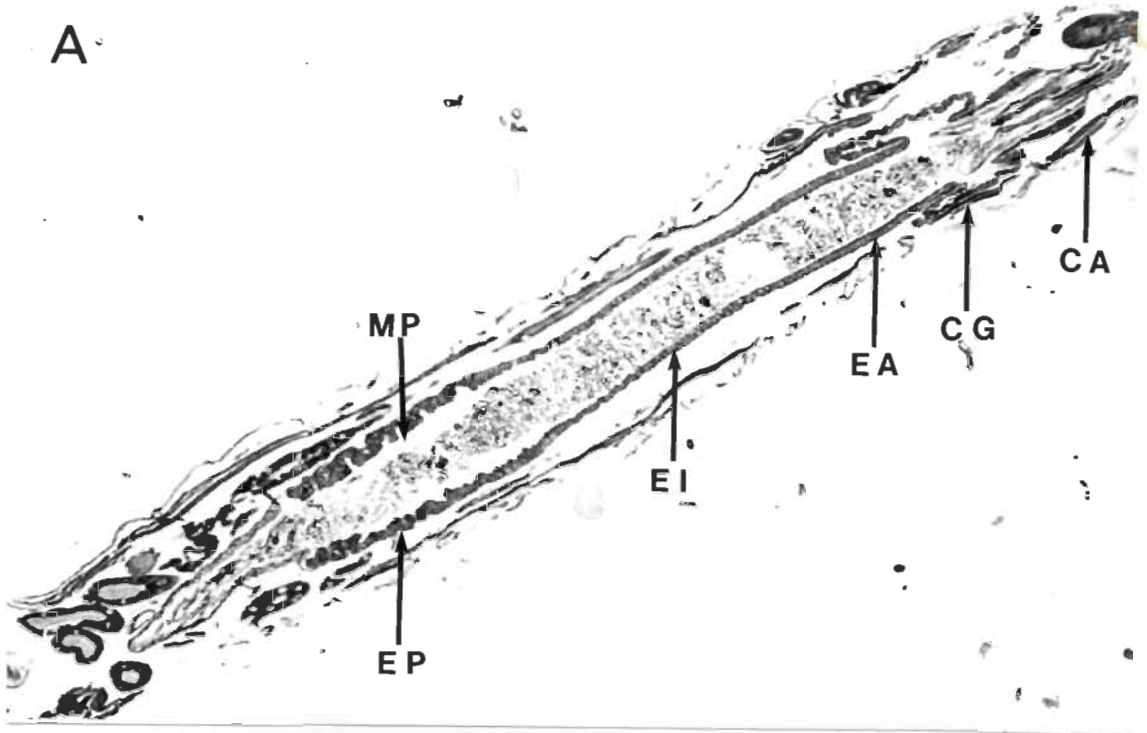
PA: papilles anales, SA: sclérite anale, RC: rangée de crochet, TV: tubercules ventraux. [Schéma tiré de Peterson, 1981.].

Figure 6. Système digestif de la larve de mouche noire

CA: cardia, CG: caeca gastrique, EA: estomac antérieur, EI: estomac intermédiaire, EP: estomac postérieur, MP: membrane péritrophique.

A) Larve de Simulium corbis ( X 55 )

B) Larve de Simulium venustum\verecundum ( X 65 )



circulaires et longitudinaux, de même que de plusieurs couches le rattachant à la capsule céphalique.

Le pharynx conduit graduellement à l'oesophage, les parois de ce dernier étant constituées par le prolongement de l'intima pharyngique, recouvert successivement de la couche épithéliale, des muscles circulaires et d'une mince membrane de tissu conjonctif.

III-3.1,2 L'intestin moyen: Cette partie correspond aux 2/3 de la longueur du système digestif. On y retrouve la valve oesophagique ou cardia, les quatre caeca gastriques et le tube stomacal. On peut diviser le tube stomacal en trois régions, de la même manière que Charles et de Barjac (1981 b) l'ont fait pour Aedes aegypti. Il s'agit des estomacs antérieur, intermédiaire et postérieur .

Première structure de l'intestin moyen, le cardia se situe après le repli postérieur des couches chitineuses et musculaires de l'oesophage. Il est constitué de grosses cellules cylindriques fortement colorables, à l'intérieur desquelles on observe la présence de larges noyaux (Figure 7). A l'extérieur, on retrouve une mince couche de tissu conjonctif qui est en fait la continuité de la couche oesophagique. Le tout est soutenu par une paire de muscles plats (muscles cardiaques) prenant appui aux parois dorsales du cardia et se rattachant au corps entre les segments pro et méso thoraciques. Richards et Richards (1977) mentionnent que la démarcation entre l'intestin antérieur et le mésentéron est faite par l'apparition de microvillosités apicales chez les cellules épithéliales. Ceci s'observe, chez les mouches noires, au niveau des cellules ci dessus

décrites. Ces auteurs précisent que ces cellules sont responsables de la sécrétion de la membrane péritrophique.

Suivant immédiatement le cardia, on retrouve quatre "sacs" faisant saillies du tube stomacal. Il s'agit des caeca gastriques, arrangés autour du mésentéron en deux paires; une ventrale et l'autre dorsale. Ces caeca apparaissent remplis d'un fluide colorable qui coagule lors de la fixation. Les parois sont constituées d'une couche de larges cellules épithéliales et d'une mince couche de muscles à disposition circulaires, le tout recouvert par la couche de tissu conjonctif. Dans la cavité des caeca, les cellules épithéliales sont habituellement bombées et possèdent des microvillosités apparentes (Figure 8). Parfois à la base de certaines cellules, apparaissent des cellules globulaires correspondant à des cellules de remplacement.

Le tube stomacal est de forme tubulaire, légèrement dilaté au niveau des cinquième et sixième segments abdominaux. On retrouve à l'intérieur du tube, le bol alimentaire contenu dans la membrane péritrophique. La membrane péritrophique, sécrété par le cardia, se trouve présente tout le long du tube stomacal. Elle assure la protection de l'épithélium stomacal, afin d'éviter l'abrasion des cellules par les particules dures contenues dans les aliments capturés par la larve. Décrite chez les mouches noires par Peters (1976, 1979), la membrane péritrophique est épaisse de 1 à 2  $\mu\text{m}$  et est constituée de plusieurs couches distinctes (Figure 9). La première couche est formée par des petits bâtonnets, qui se trouvent attachés à la seconde. Cette deuxième couche est également faite de petits bâtonnets, mais cette fois très compacts. Ces bâtonnets sont composés d'hydrates de carbone, dont des

Figure 7. Cardia de la larve de mouche noire (Simulium venustum\verecundum)

CG: caeca gastrique, EI: espace intercellulaire, EO: épithélium oesophagique, LC: lumière du cardia, LO: lumière de l'oesophage, MP: membrane péritrophique, MV: microvillosité. ( X 800 )

Figure 8. Caeca gastrique de la larve de mouche noire (Simulium venustum\verecundum).

FC: fluide colorable, ● : lumière intestinale. ( X 960 )



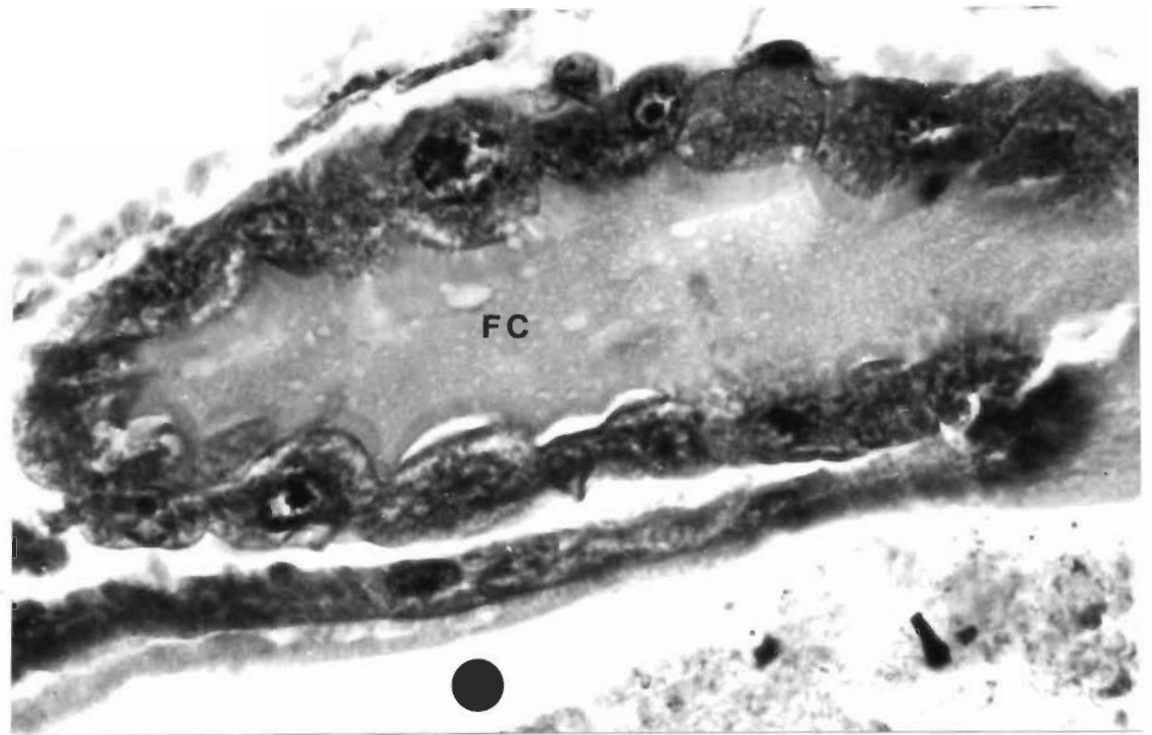
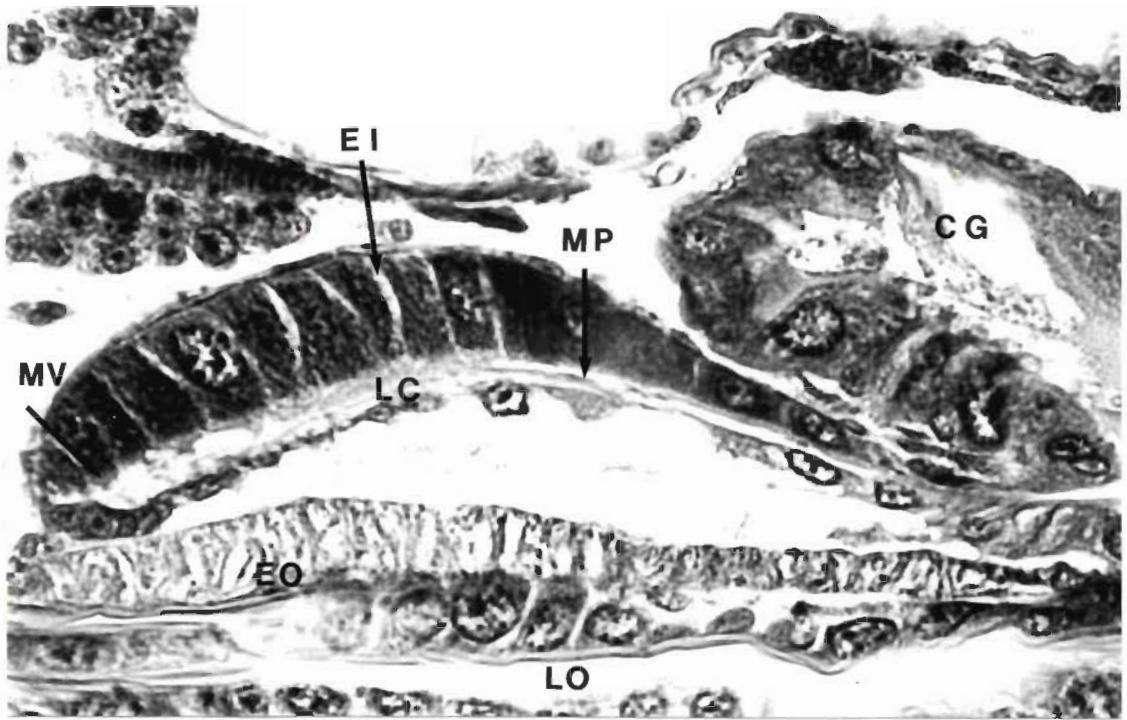
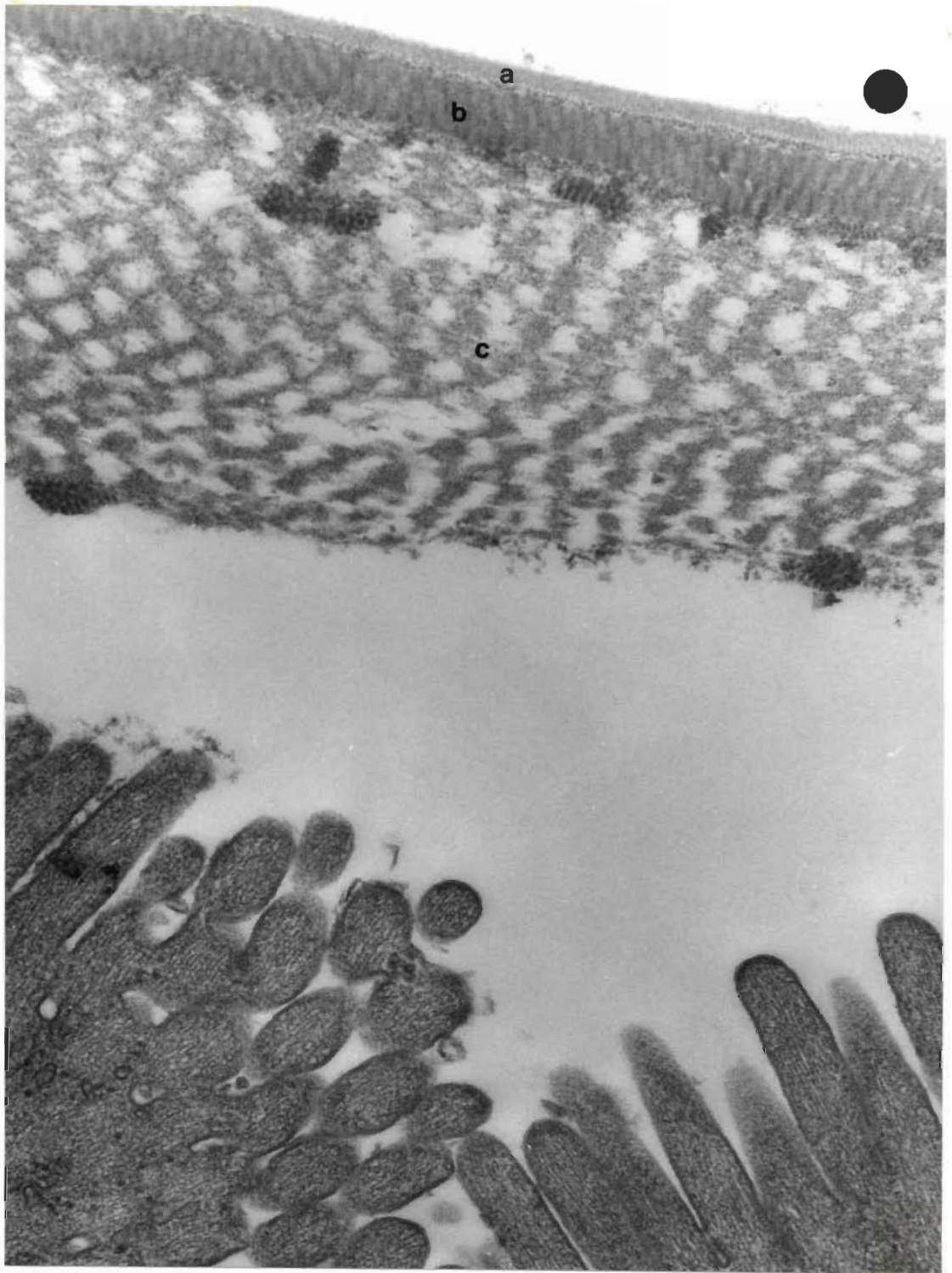


Figure 9. Membrane péritrophique de la larve de mouche noire (Simulium vittatum) en microscopie électronique à transmission.

a, b, c: couches constitutives de la membrane péritrophique.

● : lumière intestinale ( X 64 000)

(Gracieuseté du Dr. Garzon, Université de Montréal).



mucopolysaccharides. Une troisième couche, beaucoup plus épaisse que les précédentes, supporte les deux autres. Elle est composée de microfibrilles chitineuses.

Les parois du tube stomacal sont en continuité avec les caeca gastriques et consistent en une monocouche de cellules, une couche musculaire et une couche de tissu conjonctif. Les cellules épithéliales, de forme cylindrique et polygonale, présentent des microvillosités apicales tout le long du tube stomacal. Ces microvillosités sont plus ou moins apparentes selon la région du mésentéron observée. C'est dans la région dilatée du tube, que l'on verra le mieux les microvillosités. A ce niveau également, les cellules sont plus larges et présentent une membrane apicale bombée. La couche musculaire soutenant l'épithélium est constituée de muscles circulaires, ainsi que de muscles longitudinaux.

Tel que mentionné auparavant, on peut diviser le tube stomacal en trois régions. L'estomac antérieur débute immédiatement après les caeca gastriques, et est constitué de cellules cylindriques, où les microvillosités sont très difficiles à voir (Figure 10). On peut attribuer, arbitrairement, une longueur de 40 à 50 cellules à cette portion du tube stomacal. L'estomac postérieur débute au niveau de la dilation du tube et comprend les larges cellules bombées pour se terminer au proctodéum (Figure 11). Enfin, l'estomac intermédiaire correspond à la portion comprise entre les estomacs antérieur et postérieur. Il s'agit d'une section constituée de cellules cylindriques, mais où les microvillosités sont plus apparentes que dans l'estomac antérieur (Figure 12).

Figure 10. Estomac antérieur de la larve de mouche noire (Simulium corbis).

CG: caeca gastrique, MP: membrane péritrophique, ● : lumière intestinale. ( X 270 )

Figure 11. Estomac postérieur de la larve de mouche noire (Simulium corbis).

MP: membrane péritrophique, MV: microvillosité, ● : lumière intestinale. ( X 320 )

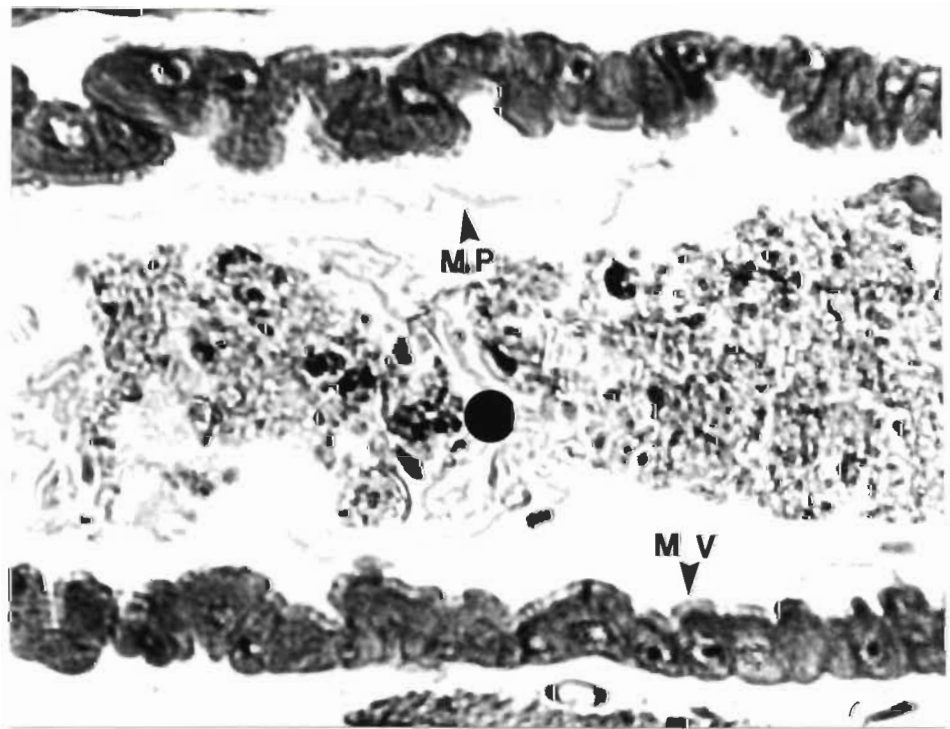
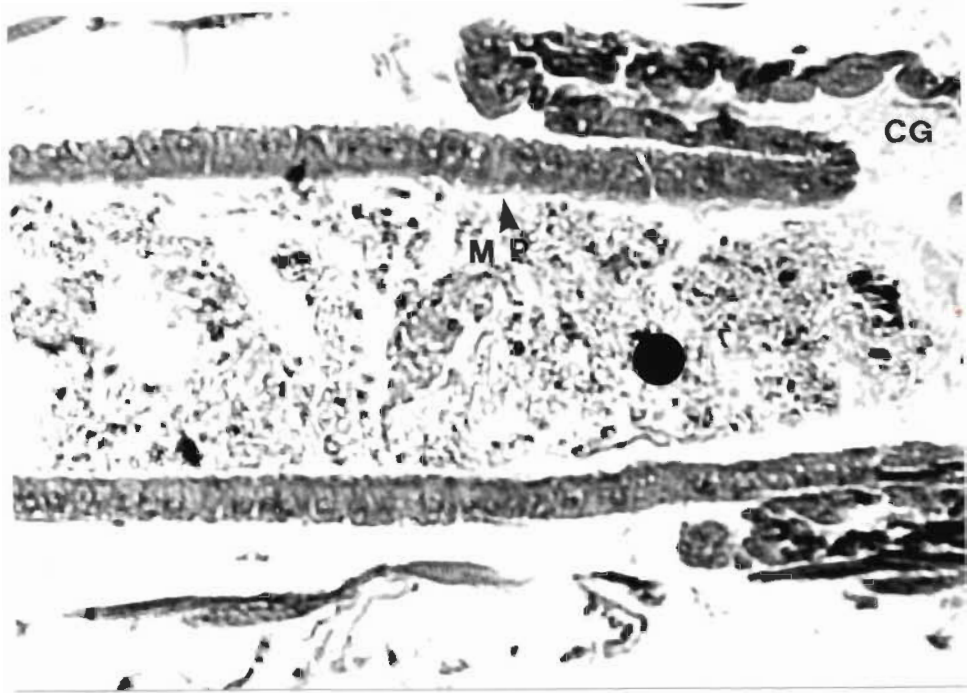
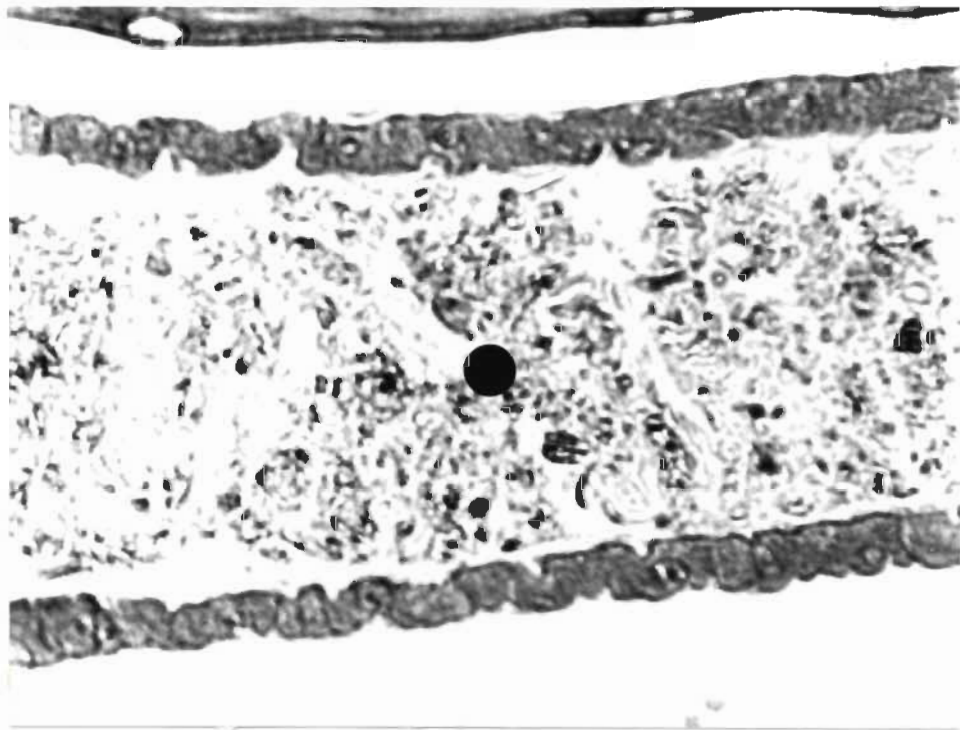


Figure 12. Estomac intermédiaire de la larve de mouche noire (Simulium corbis).

● : lumière intestinale ( X 360 )







III-3.1.3 L'intestin postérieur: L'intestin postérieur débute au niveau du septième segment abdominal et forme une boucle. Il se divise en trois parties, soit (a) l'iléon; (b) le colon; et (c) le rectum.

L'iléon a une forme d'entonnoir où les tubes de Malpighi s'abouchent. Il est constitué d'un intima chitineux, d'un épithélium, d'une couche musculaire et d'une couche de tissu conjonctif. A ce niveau, l'épithélium cellulaire est très mince, mais les cellules sont bien définies.

Les parois du colon sont plus épaisses et plus larges qu'au niveau de l'iléon. On y retrouve les mêmes couches, à l'exception des muscles longitudinaux. Les cellules épithéliales sont plus grosses et mieux définies. Au niveau du centre du huitième segment abdominal, les parois du colon s'amincissent pour former le rectum, dont l'anus s'ouvre sur la face dorsale de la larve.

III-3.2 Autres systèmes: La larve de mouche noire possède d'autres systèmes physiologiques que le système digestif. Puisque l'étude ne porte que sur le système digestif, on verra de façon plus sommaire, ces différents systèmes.

La larve possède un réseau musculaire (Figure 13) et un système respiratoire (Figure 14) couvrant l'ensemble de celle-ci. Le réseau musculaire peut se diviser en deux grandes parties, les muscles de la tête (non représentés sur la figure 13) et les muscles corporels. Le système respiratoire est constitué d'une paire de troncs trachéens longitudinaux allant du prothorax à l'extrémité postérieure de la larve. Ces deux troncs principaux sont prolongés par des ramifications. On

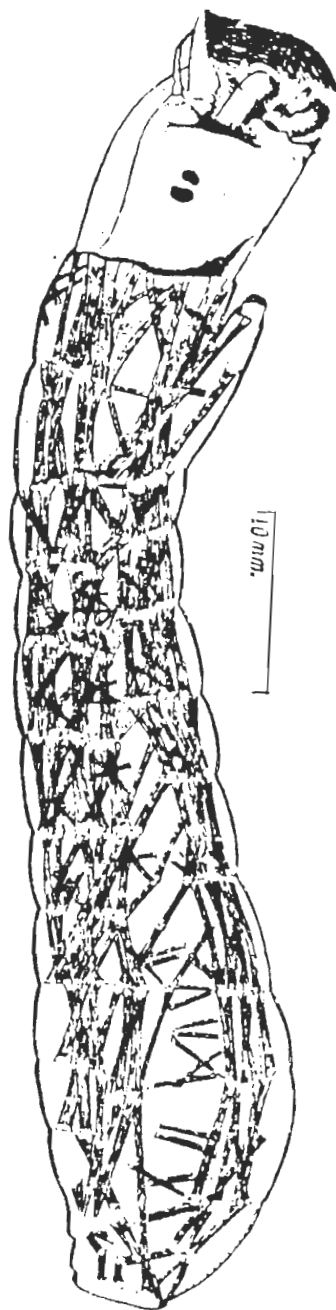


Figure 13. Schéma du système musculaire corporel de la larve de mouche noire. [Schéma tiré de Puri, 1925.].

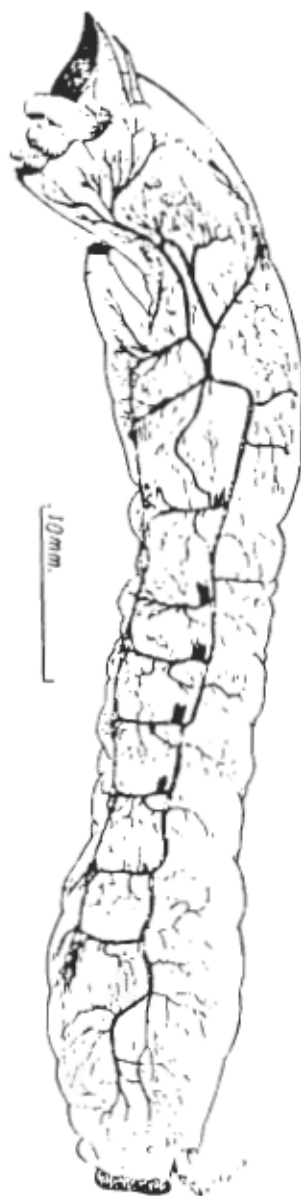


Figure 14. Schéma du système respiratoire de la larve de mouche noire.  
[Schéma tiré de Puri, 1925.].

retrouve 10 spiracles larvaires, soit une à chaque segment abdominal et deux au niveau du thorax. Les larves de mouches noires sont apneustiques, ce qui signifie que ces spiracles sont fermés.

Le système nerveux est composé de trois parties principales; le ganglion supra-oesophagique, duquel part le nerf frontal, le nerf optique et celui de l'antenne; le ganglion sub-oesophagique duquel part les nerfs contrôlant les mandibules et les pièces buccales; enfin, la chaîne nerveuse ventrale qui compte 11 ganglions, trois thoraciques et huit abdominaux (Figure 15).

Le système circulatoire est composé d'un vaisseau dorsal qui part des ganglions cérébroïdes, jusqu'au septième ganglion abdominal. La portion postérieure est légèrement dilatée et forme le coeur. Sur la partie ventrale du coeur, on retrouve un réseau de fibres lâches formant le septum péricardiaque. Le vaisseau dorsal supportant le coeur est divisé en deux parties, l'aorte située au niveau de la portion réduite antérieure et la partie intermédiaire située entre l'aorte et le coeur (Figure 15).

On trouve deux systèmes glandulaires, les glandes salivaires et les glandes pharyngiennes ou dorsales. Les glandes salivaires (Figure 15) sont bien développées et sont accolées au tube digestif. Elles ont une forme tubulaire qui varie de diamètre par endroit. Les glandes rétrécissent dans leur partie antérieure et se rencontrent dans la région ventrale du prothorax au niveau de la chaîne nerveuse. Les glandes pharyngiennes sont attachées à la paroi dorsale du pharynx. Elles apparaissent comme des protubérances de l'épithélium du pharynx.

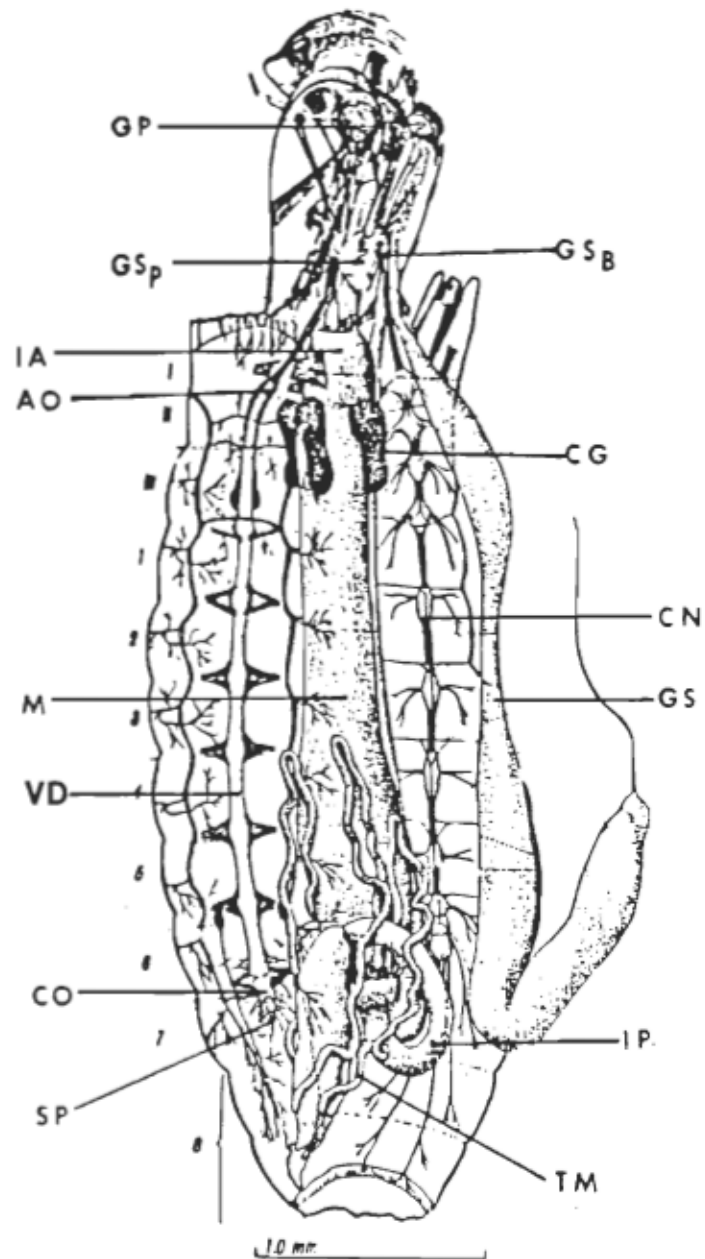


Figure 15. Vue anatomique interne générale de la larve de mouche noire. AO: aorte, CG: caeca gastrique, CN: chaîne nerveuse, CO: coeur, GP: glande pharyngique, GS: glande salivaire, GSB: glande sub-oesophagique, GSP: glande supra-oesophagique, IA: intestin antérieur, IP: intestin postérieur, M: mésentéron, SP: septum péricardiaque, TM: tube de Malpighi, VD: vaisseau dorsal. [Schéma tiré de Puri, 1925.].

## CHAPITRE IV

### RESULTATS

Dans un premier temps, on décrira les effets cellulaires causés par B.t.i. Cette description se fera selon l'ordre d'apparition de ces effets, au niveau des différentes régions du système digestif larvaire. En fait, ce n'est qu'au niveau du mésentéron que les effets furent observés. Les effets seront décrits au niveau du cardia, puis de l'estomac intermédiaire, ensuite au niveau de l'estomac antérieur, des caeca gastriques et enfin de l'estomac postérieur.

Dans un second temps on verra l'influence de divers facteurs sur ces effets. Il s'agit de la température, de l'espèce et de l'âge des larves. Ensuite on s'attardera sur un phénomène observé lors de cette étude soit l'influence d'un arrêt de la prise de nourriture par les larves lors des traitements. Enfin, pour terminer ce chapitre on présentera les résultats des essais de détection de la toxine.

IV-1 Effets cellulaires: Les temps d'exposition au Teknar<sup>R</sup> associés aux différents effets qui seront décrits dans cette section correspondent à ceux de l'expérience #4 (tableau 5, Matériel et méthodes p.21). Il s'agit d'une expérience menée avec des larves âgées de Simulium venustum\verecundum provenant du lac Plaisant et ayant durée 120 minutes.

IV-1.1 Cardia: C'est au niveau du cardia que l'on observe les premières modifications structurales pouvant être attribuées à l'intoxication des larves par le Teknar<sup>R</sup> (figure 16). Le cardia subit un relâchement cellulaire et/ou musculaire qui se manifeste par un élargissement de l'espace situé entre les structures soutenant le cardia. On remarque également une perte du matériel contenu dans cet espace. L'élargissement le plus grand se fait sentir dans la section postérieure du cardia, section qui chez les témoins est la plus resserrée. Chez certaines larves traitées, on remarque une légère dilatation de l'espace intercellulaire des cellules sécrétrices de la membrane péritrophique (figure 17).

Ces symptômes apparaissent très tôt après le début du traitement. Ainsi, après seulement dix minutes de contact, certaines larves montrent déjà un début de relâchement cellulaire. Après 30 à 35 minutes, tous les cardia larvaires observés montrent un relâchement et une ouverture de la lumière du cardia.

Cependant, aucun effet de nature histologique tel que gonflement, granulation, ou lyse n'est observé au niveau du cardia. Cette constatation nous amène à penser que l'action du Teknar<sup>R</sup>, au niveau du cardia, serait de nature physiologique. Cet effet physiologique influencerait sur la sécrétion de la membrane péritrophique, puisque cette dernière, visible au niveau des cardia chez les larves non traitées devient de plus en plus difficile à voir chez les larves traitées. Les rares occasions où l'on peut détecter la membrane péritrophique chez des sujets traités, il s'agit de larves exposée moins de 30 minutes au Teknar<sup>R</sup> (figure 18). Au-delà de ce temps d'exposition, la membrane

Figure 16. Relâchement cellulaire des cardia suite à une ingestion de Teknar<sup>R</sup>.

PP: partie postérieure

A) Cardia d'une larve témoin ( X 600 )

B) Cardia d'une larve exposée au Teknar<sup>R</sup> durant 10 minutes ( X 680 )



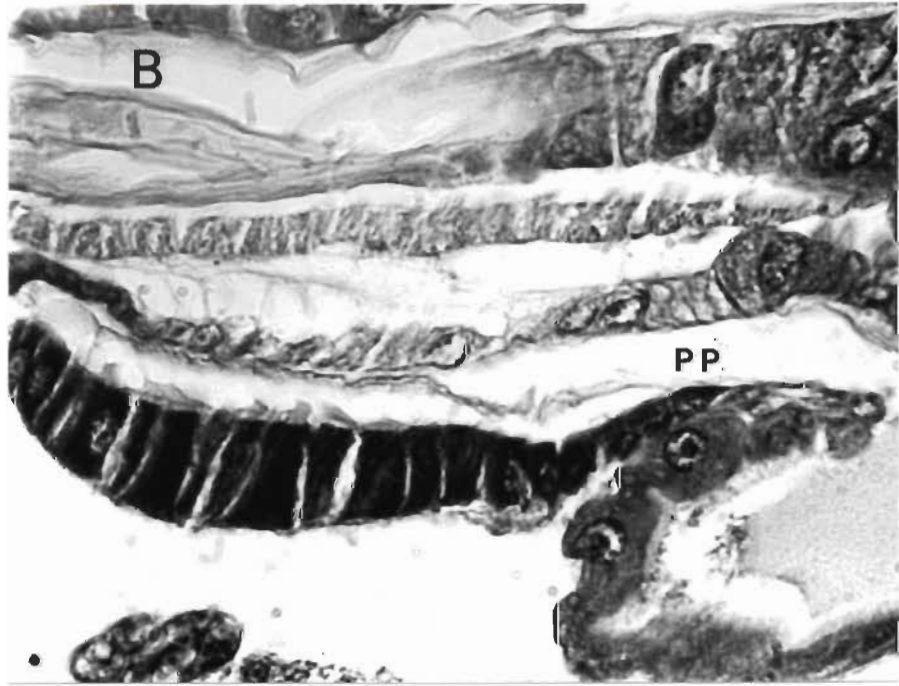
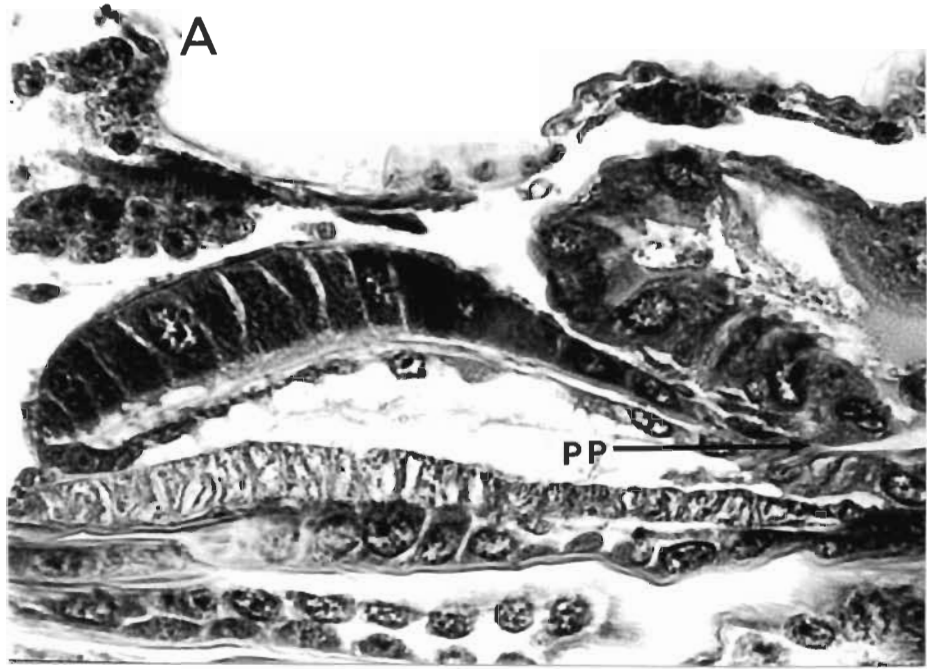
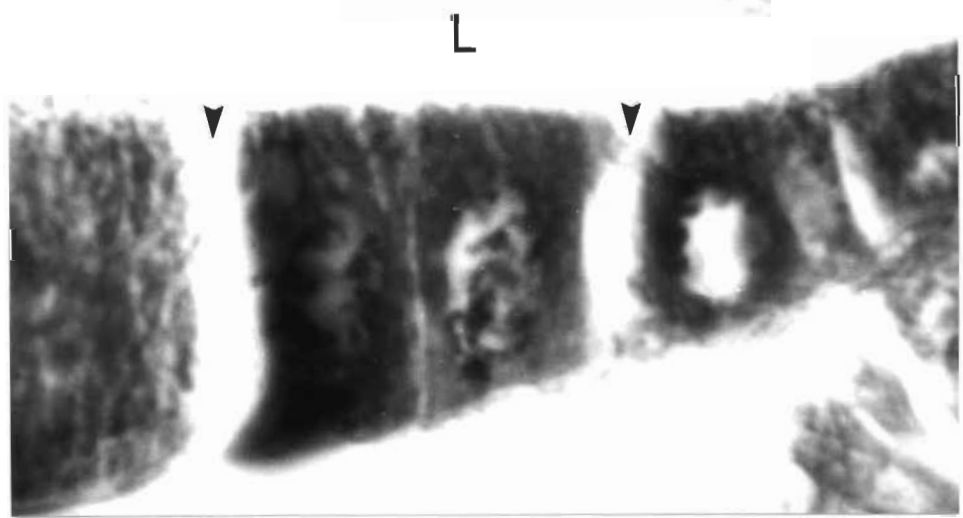
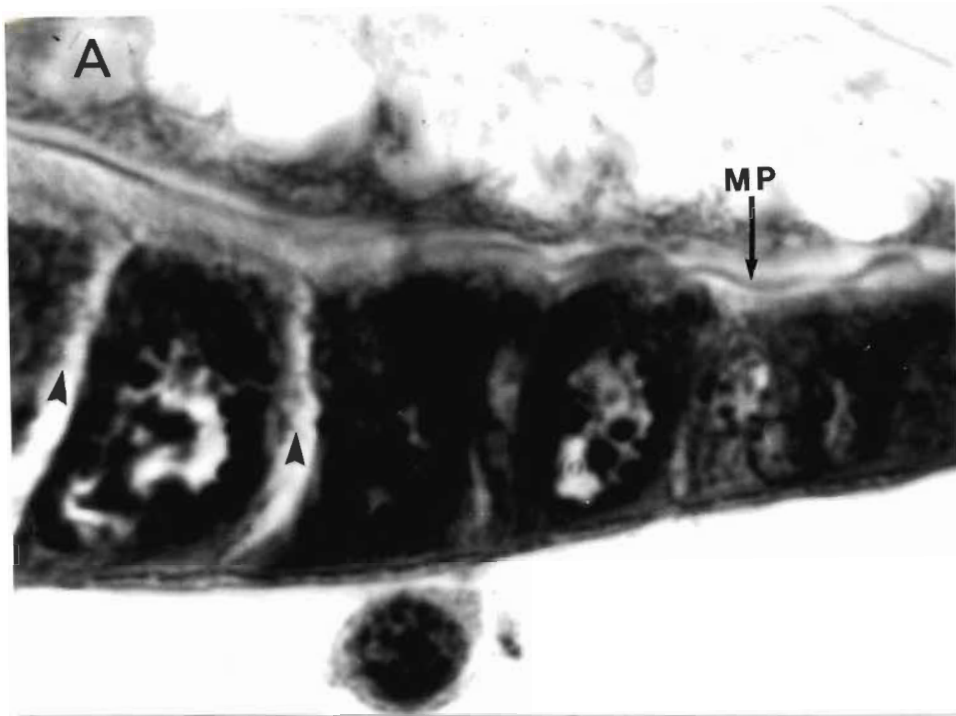


Figure 17. Elargissement de l'espace intercellulaire des cellules sécrétrices de la membrane péritrophique.

L: lumière du cardia, MP: membrane péritrophique, ► : espace intercellulaire,

A) Partie d'un cardia d'une larve témoin. ( X 2400 )

B) Partie d'un cardia d'une larve exposée au Teknar<sup>R</sup> durant 15 minutes ( X 2400)



péritrophique n'est plus visible au niveau des cardia.

IV-1.2 Estomac intermédiaire: L'estomac intermédiaire est la seconde région du mésentéron qui est affectée par le Teknar<sup>R</sup>. C'est à ce niveau que l'on observe pour la première fois des modifications d'ordre histologique.

Après 20 à 30 minutes d'exposition, on observe une légère condensation du nucléoplasme dans les cellules épithéliales de l'estomac intermédiaire. Puis les cellules deviennent de plus en plus difficile à distinguer, car il y a disparition des membranes cytoplasmiques basales. Après 40 minutes, les microvillosités apicales sont toujours visibles par endroit et la condensation du matériel nucléaire s'est accentuée (figure 19 A et B). On observe également un changement évident au niveau d'une "structure" que l'on a nommée "matériel colorable" (MC), puisqu'il s'agit d'un matériel de nature non définie. Ce MC chez les témoins, est très difficile à observer à cause de sa faible épaisseur (figure 10). De plus, il est toujours associé de très près à la membrane péritrophique. Après ingestion du Teknar<sup>R</sup> par les larves, ce MC s'épaissit (figure 19 B), donc est plus visible et laisse voir une texture différente au niveau des cellules présentant des modifications histologiques. On assiste également à plusieurs autres modifications. Il y a une forte granulation cytoplasmique, avec disparition des membranes cytoplasmiques basales et on observe des ruptures et des déchirures dans l'épithélium (figure 19 C).

Figure 18. Cardia d'une larve traitée pendant 30 minutes.

MP: membrane péritrophique, ► : espace intercellulaire. ( X 760 )

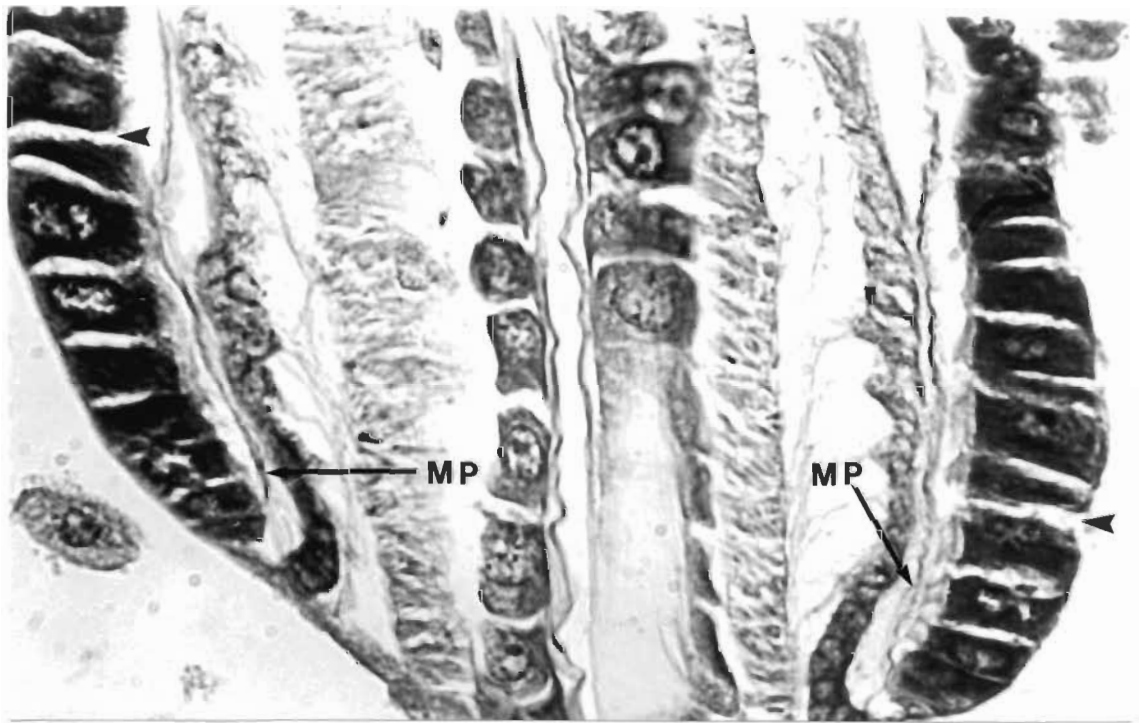


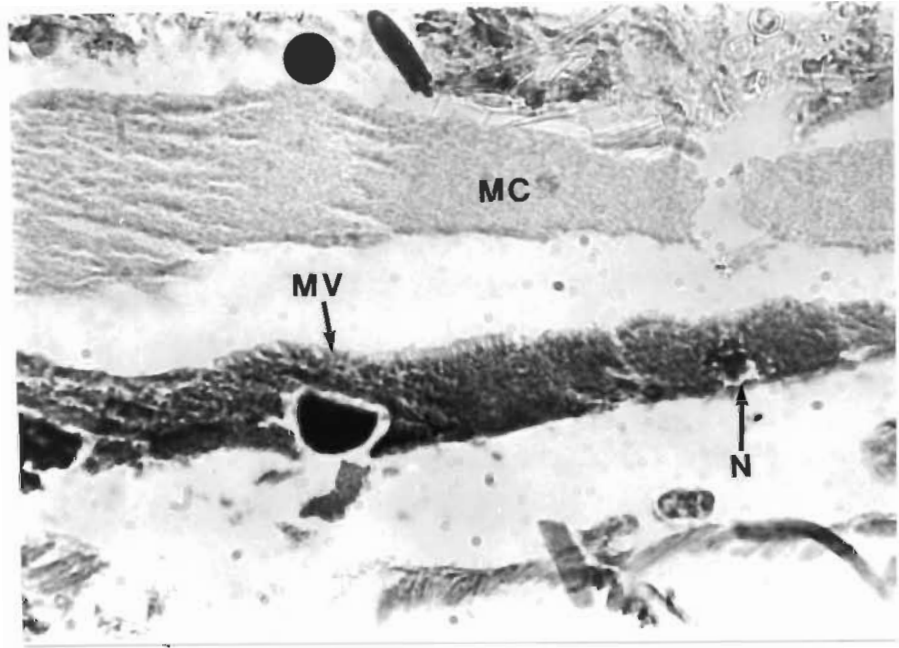
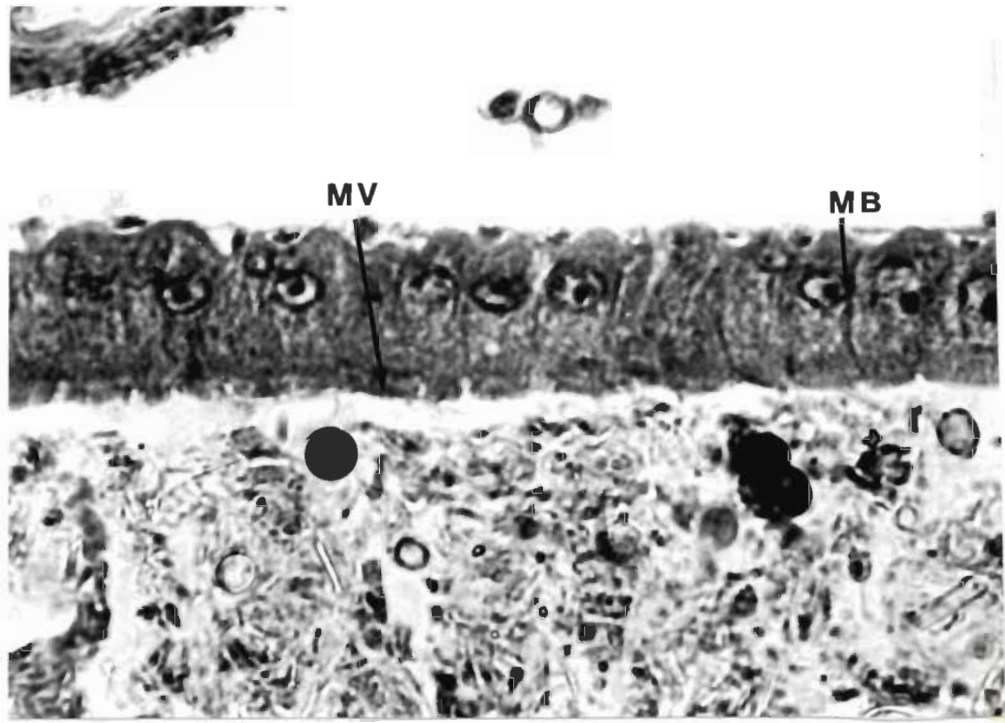
Figure 19. Premiers effets observés au niveau de l'estomac intermédiaire.

D: déchirure, MB: membrane basale, MC: matériel colorable, MV: microvillosité, N: noyau, R: rupture, ● : lumière intestinale

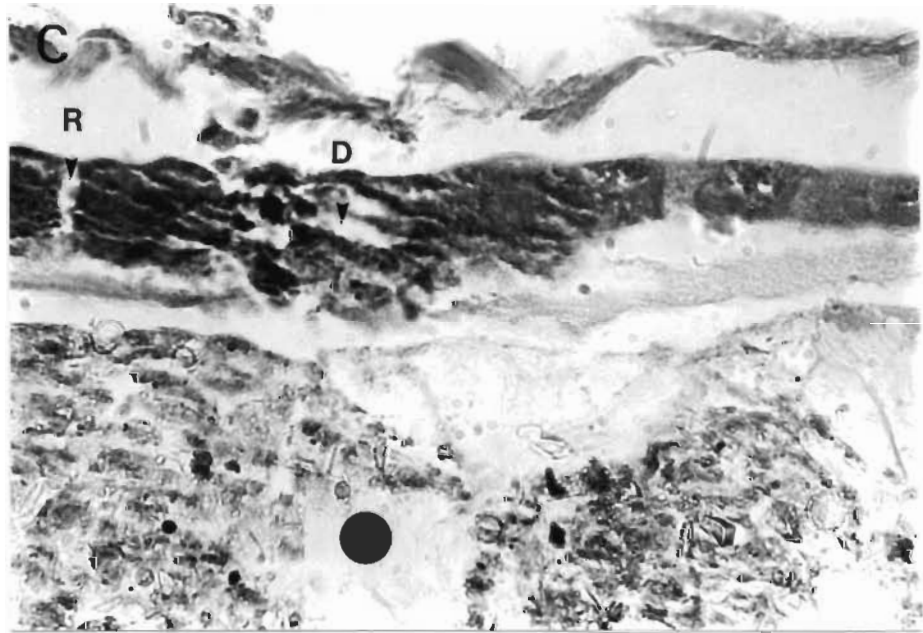
A) Estomac intermédiaire d'une larve témoin. ( X 960 )

B) Estomac intermédiaire d'une larve après 40 minutes de traitement.  
( X 560 )

C) Estomac intermédiaire après 40 minutes de traitement, présentant des ruptures et des déchirures. ( X 560 )







Bien que les modifications décrites soient dues au Teknar<sup>R</sup>, celles-ci se produisent en aval du bouchon de l'insecticide. Cette observation laisse supposer que l'agent responsable de la toxicité cellulaire du Teknar<sup>R</sup>, la  $\delta$ -endotoxine de B.t.i., diffuse plus rapidement que le bol alimentaire. Lorsque le bouchon de Teknar<sup>R</sup> a progressé au niveau de l'estomac intermédiaire (65 à 75 minutes), ce dernier a perdu toute son intégrité à la suite d'une lyse cellulaire complète (figure 20). On reconnaît quelques vestiges d'organites cellulaires inclus dans un matériel granulaire. A ce temps, le MC a disparu et on observe un espace vide entre l'épithélium détruit et le bouchon de Teknar<sup>R</sup> (figure 20). Après cette étape, plus aucune modification n'est observée au niveau de l'estomac intermédiaire.

IV-1.3 Estomac antérieur: Les dommages histologiques dus à l'ingestion de Teknar<sup>R</sup> apparaissent au niveau de l'estomac antérieur, peu de temps après le début de ceux observés à l'estomac intermédiaire. Cependant, les effets ne se manifestent pas à la même vitesse et de la même manière que pour le cas précédent (figure 21).

Entre 30 et 45 minutes d'intoxication, les cellules de l'épithélium de l'estomac antérieur montrent une condensation du matériel nucléaire, qui s'agglomère en périphérie et au centre. On observe un début de gonflement cellulaire, et la face apicale des cellules devient plus bombée que chez les témoins (figure 21 B). Ce gonflement fait en sorte que les cellules se séparent les unes des autres (figure 21 C). A ce niveau, le MC n'a guère changé d'aspect et est très mince comparativement à celui de l'estomac intermédiaire, au même moment.

Figure 20. Dommages finaux dus à l'action du Teknar<sup>R</sup> au niveau de l'estomac intermédiaire.

EP: épithélium, TK: Teknar<sup>R</sup>, ● : lumière intestinale, ► : résidu de noyau.

A) Epithélium en coupe sagittale. ( X 800 )

B) Epithélium en coupe longitudinale. ( X 600 )

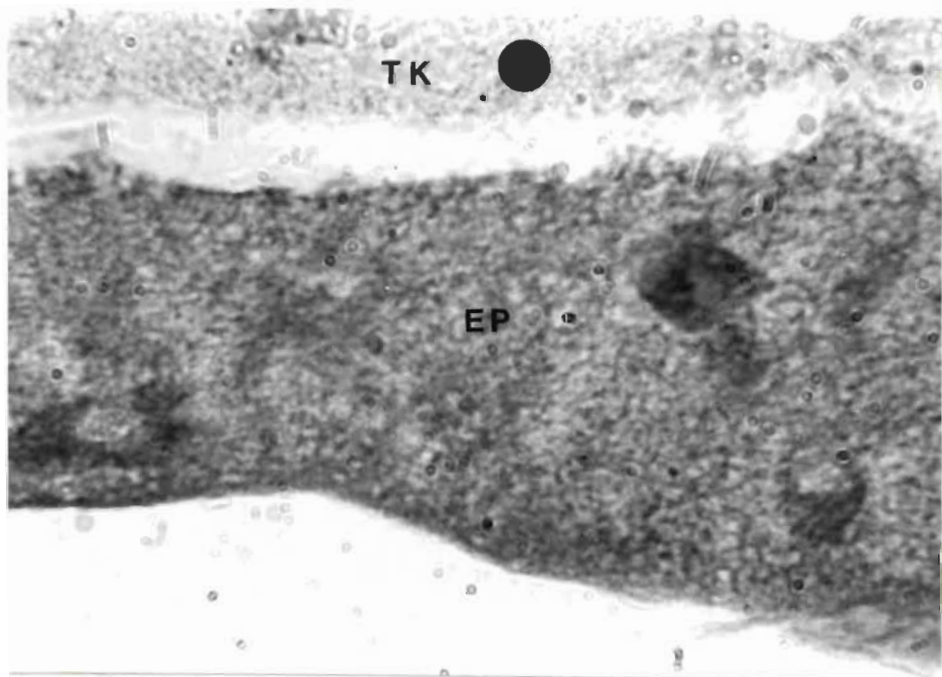
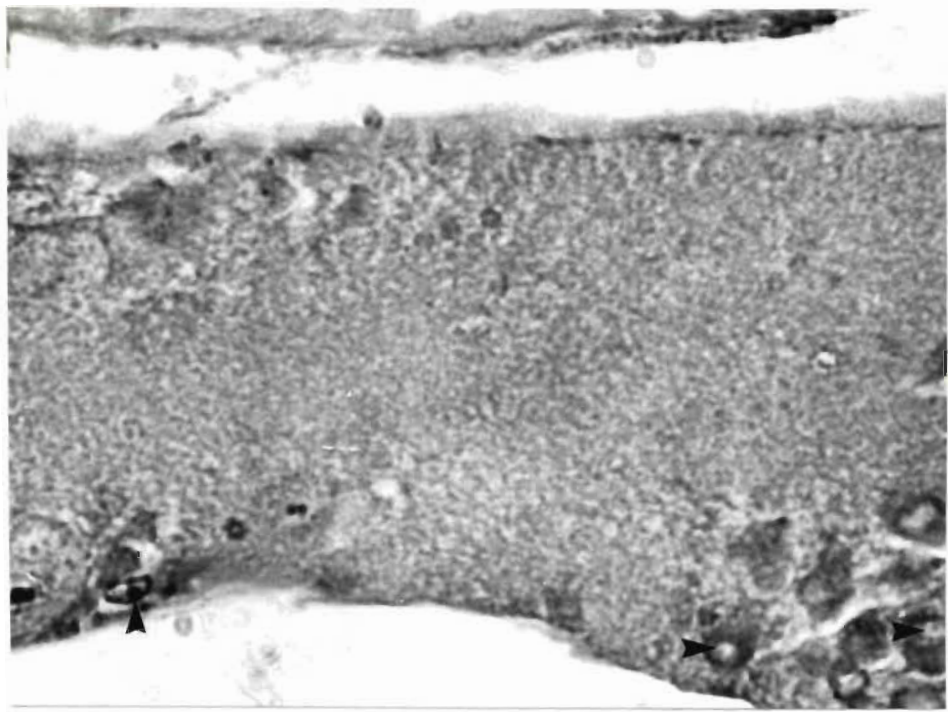


Figure 21. Premiers effets observés au niveau de l'estomac antérieur.

CC: chromatine condensée, G: gonflement cellulaire, TK: Teknar<sup>R</sup>,

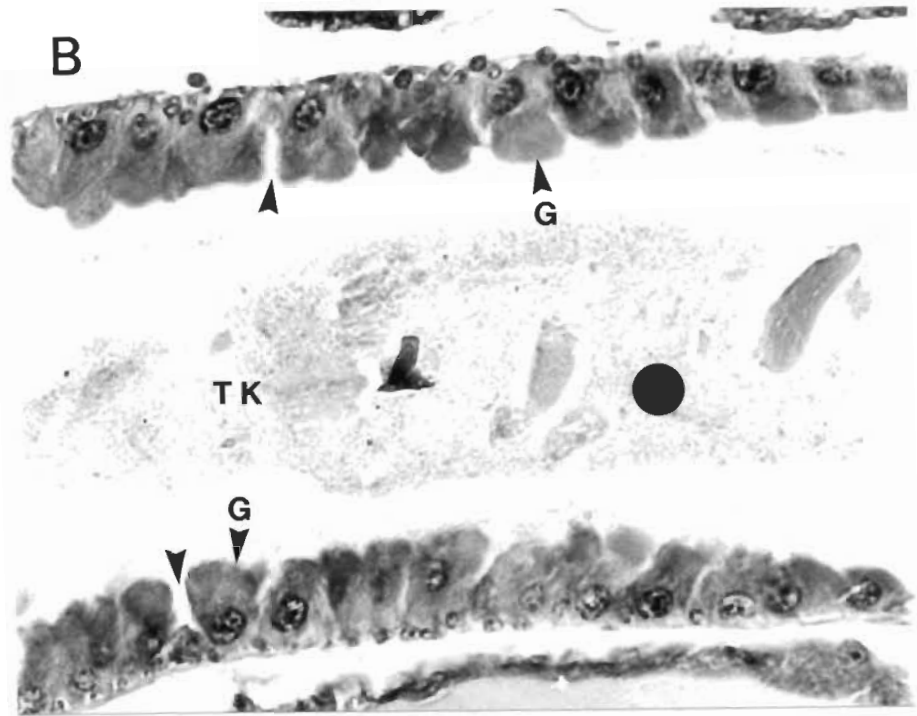
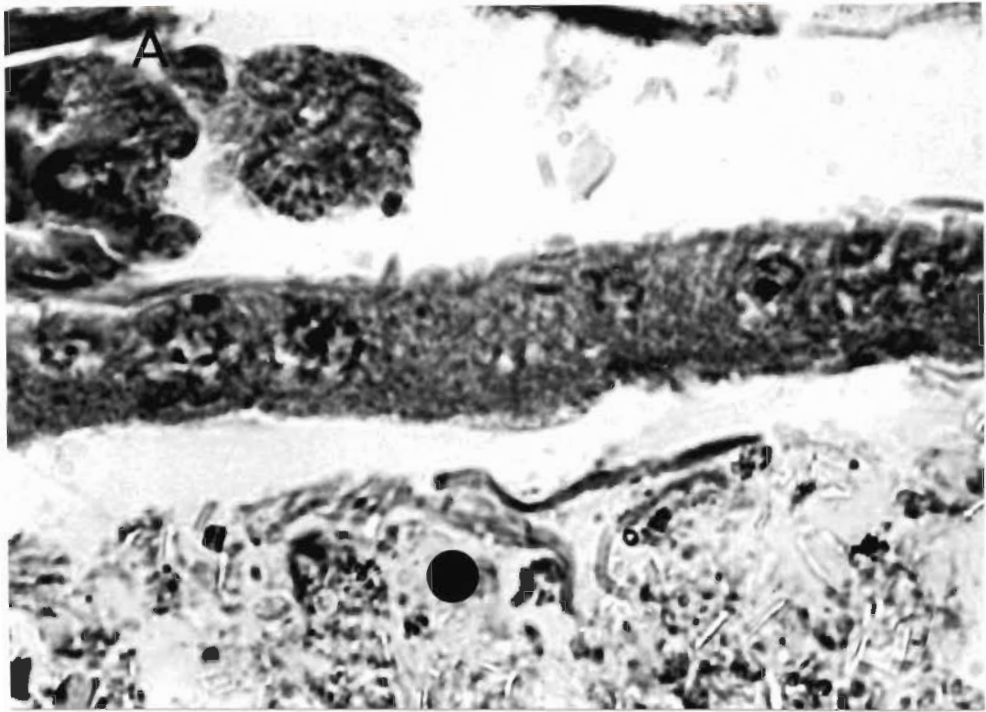
● : lumière intestinale, ► : espace intercellulaire.

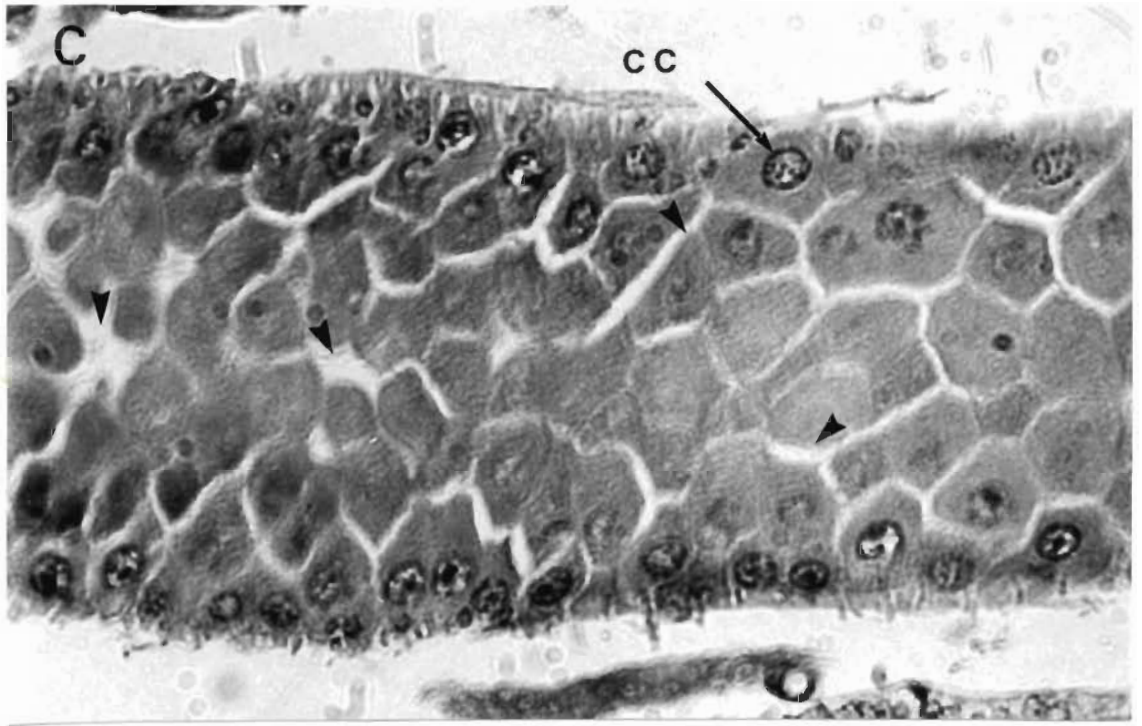
A) Estomac antérieur d'une larve témoin. ( X 960 )

B) Estomac antérieur après 40 minutes de traitement. ( X 800 )

C) Estomac antérieur après 40 minutes de traitement, en coupe sagittale.

( X 650 )





Entre 60 et 70 minutes, on observe une vacuolisation cytoplasmique de certaines cellules de l'épithélium (figure 22). Vers 90 à 100 minutes, l'épithélium, malgré les modifications subies conserve une structure linéaire en monocouche. Les cellules sont gonflées et seulement quelques unes d'entre elles ont conservé leur noyau au contenu fortement condensé (figure 23). Les microvillosités apicales ne sont plus visibles et le cytoplasme cellulaire n'a pas changé d'allure de façon significative. L'identification des cellules est rendue très difficile due à une altération des membranes cytoplasmiques. Quelques cellules ont subi une lyse (figure 23 A et B). A ce temps, le MC a disparu et on observe le même espace vide entre l'épithélium et le bouchon de Teknar<sup>R</sup> que dans le cas de l'estomac intermédiaire. Chez certaines larves, on remarquera de légères ruptures dans l'épithélium hypertrophié (figure 23 A). Mentionnons que pour l'estomac antérieur, les effets ne se manifestent pas en aval du bouchon de Teknar<sup>R</sup>, mais seulement lorsque ce dernier est au niveau des cellules de l'estomac antérieur.

IV-1.4 Caeca gastriques: L'apparition des modifications histologiques au niveau des caeca gastriques s'observe vers le milieu de l'expérimentation, soit après 45 à 55 minutes d'intoxication par le Teknar<sup>R</sup> (figure 24). Les noyaux présentent une condensation périphérique de la chromatine. Les cellules bombées caractéristiques des caeca sont déformées et les microvillosités ne demeurent visibles sur quelques cellules seulement. Cette déformation cellulaire et la perte de microvillosités se poursuivent avec le temps, et on assiste finalement à une hypertrophie cellulaire suivi d'une lyse de plusieurs cellules (figure 25).



Figure 22. Vacuolisation des cellules de l'estomac antérieur. ( X 880 )

TK: Teknar<sup>R</sup>, ● : lumière intestinale.

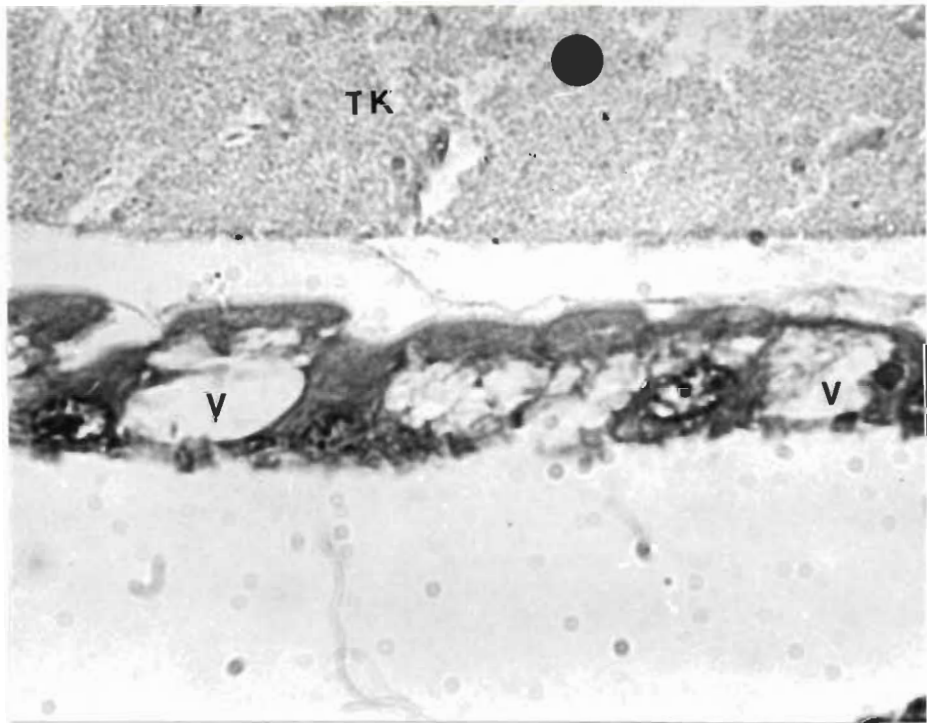


Figure 23. Dommages finaux dûs à l'action du Teknar<sup>R</sup> au niveau de l'estomac antérieur.

CC: chromatine condensée, H: hypertrophie cellulaire, R: rupture, TK: Teknar<sup>R</sup>, ● : lumière intestinale.

A) Epithélium en coupe sagittale. ( X 800 )

B) Epithélium en coupe longitudinale. ( X 880 )

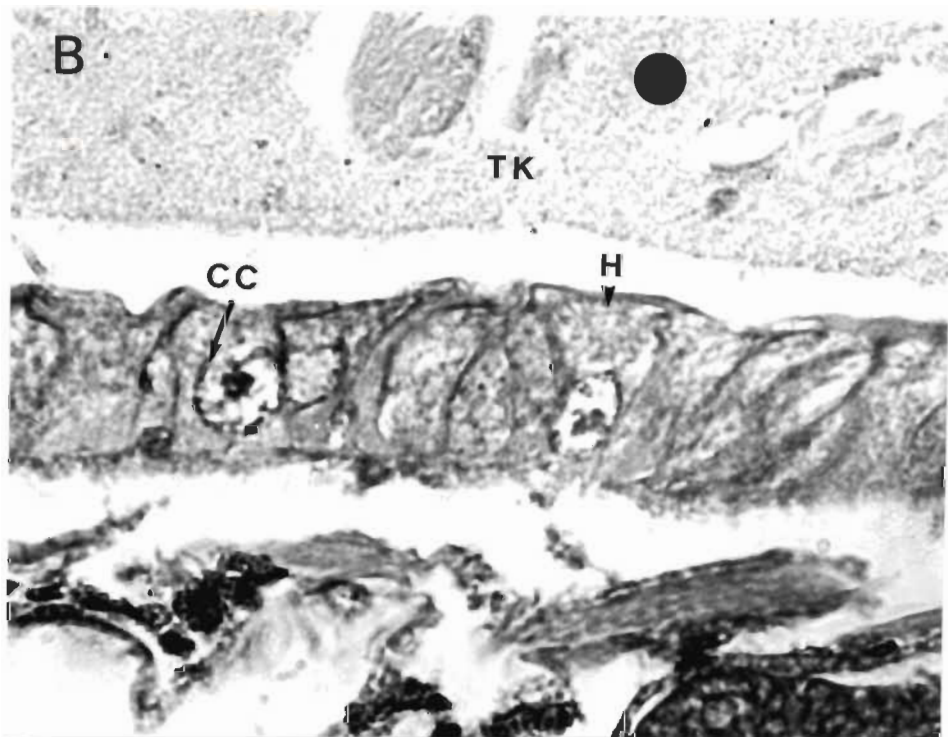
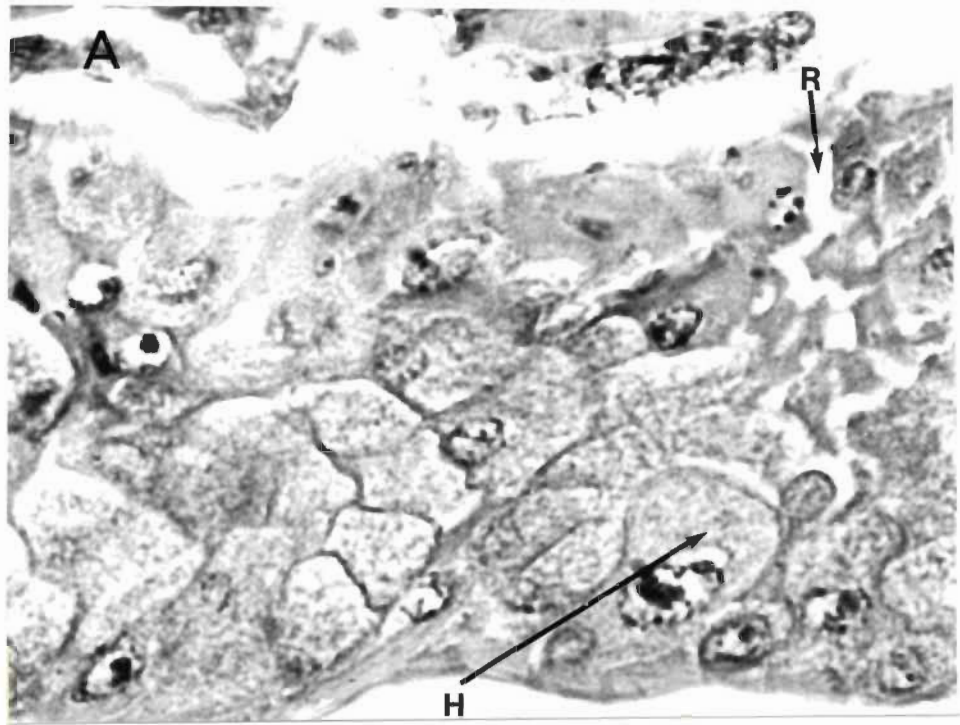


Figure 24. Premiers effets observés au niveau des caeca gastriques.

FC: fluide colorable, MV: microvillosité, H: hypertrophie cellulaire,

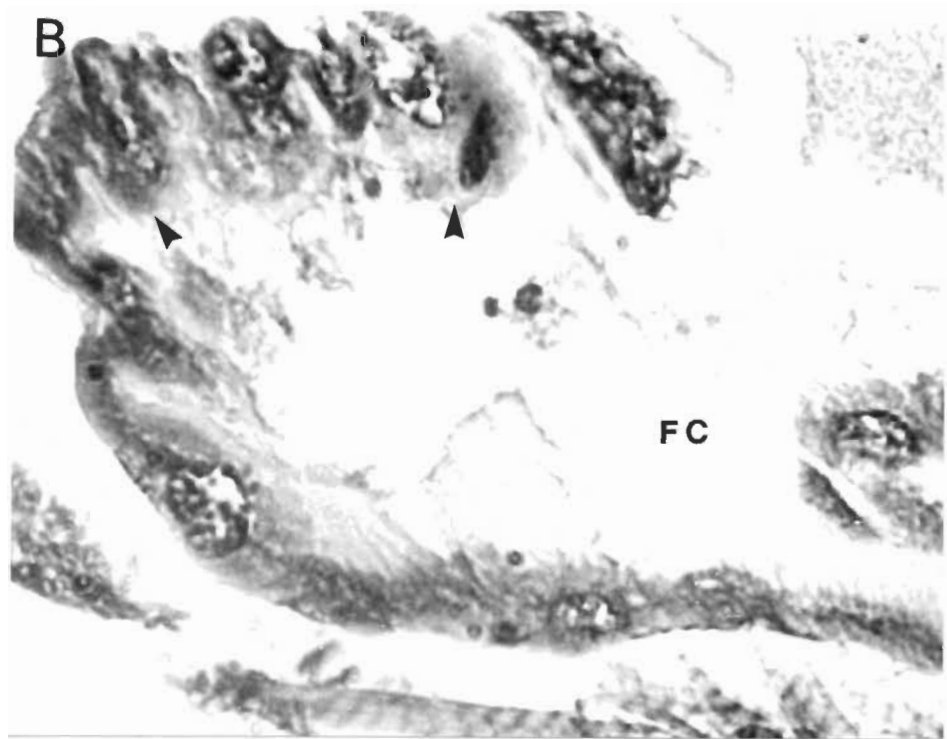
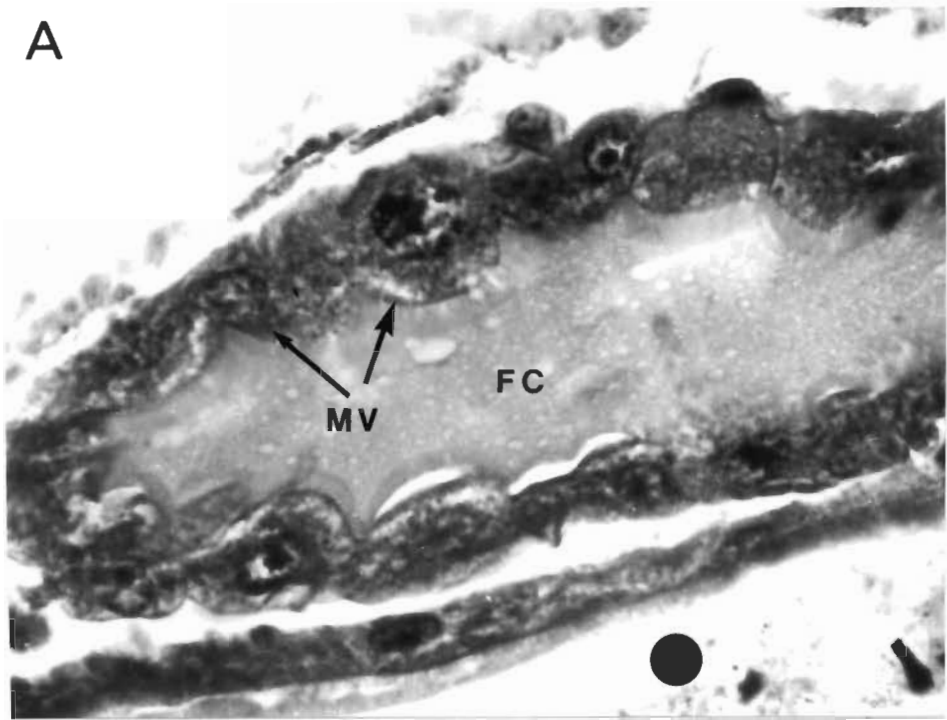
● : lumière intestinale, ► : déformation cellulaire.

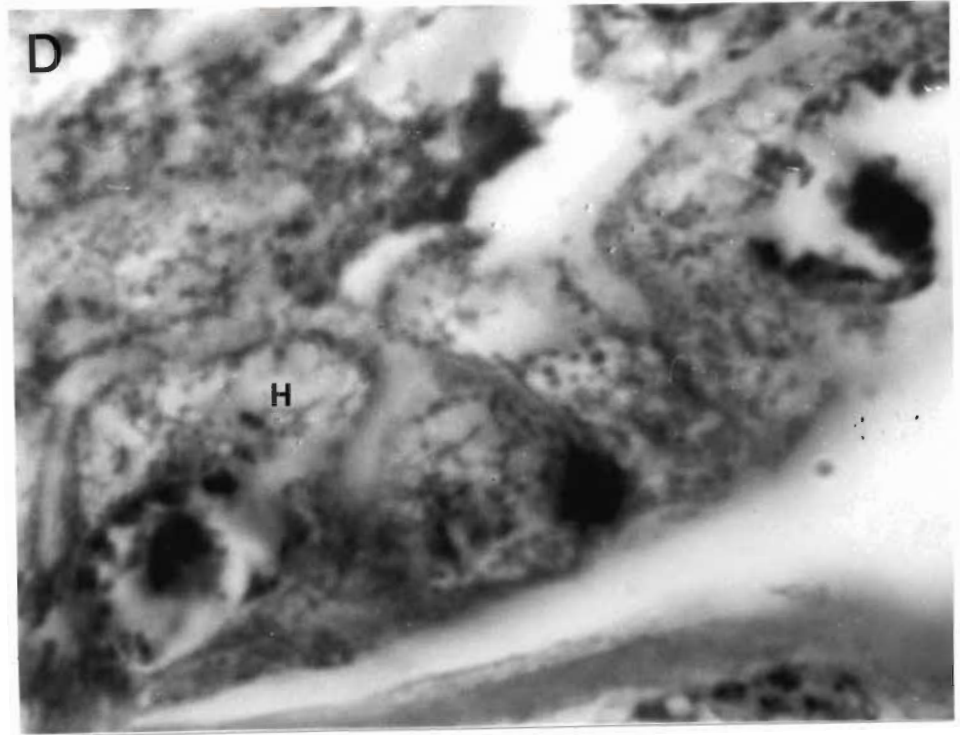
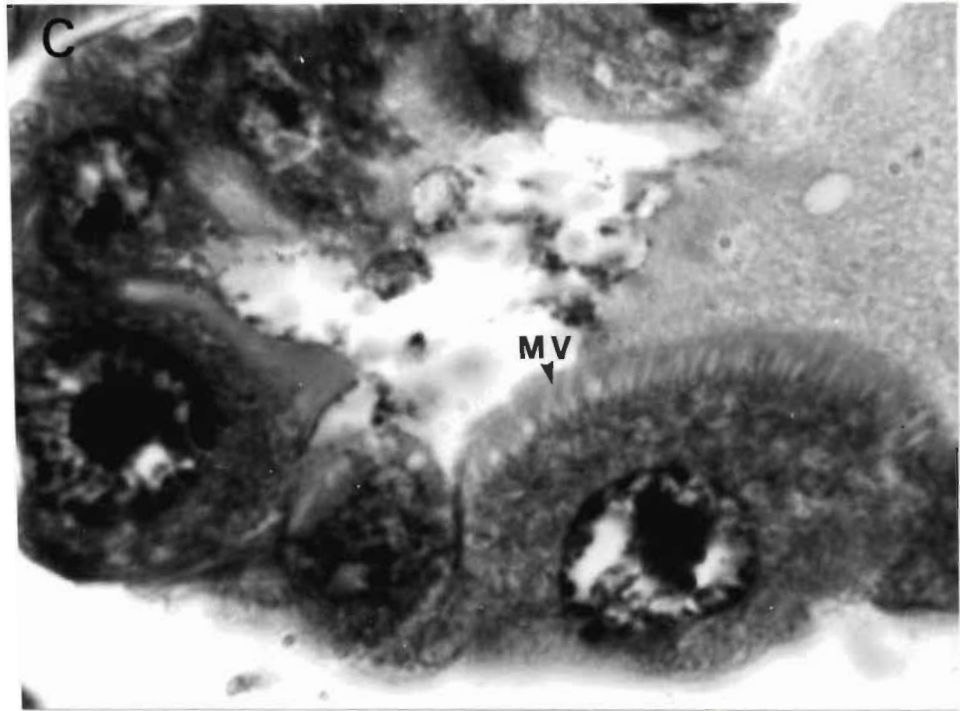
A) Caeca d'une larve témoin. ( X 720 )

B) Caeca après 50 minutes de traitement. ( X 960 )

C) Cellule de caeca de larve témoin. ( X 1200 )

D) Cellule de caeca après 50 minutes de traitement. ( X 1200 )





IV-1.5 Estomac postérieur: Au niveau de l'estomac postérieur, les premiers effets s'observent entre 60 et 70 minutes d'intoxication (figure 26). On assiste à la condensation périphérique de la chromatine nucléaire, suivi d'un gonflement cellulaire accompagné par une altération des microvillosités. Ces dernières sont beaucoup moins denses et leur taille a diminué. Comme dans le cas de l'estomac intermédiaire, ces premiers effets se manifestent en aval du bouchon de Teknar<sup>R</sup>. Puis une lyse cellulaire aboutit à la formation d'une couche granuleuse, où l'on peut observer quelques cellules hypertrophiées n'ayant pas encore été lysées.

IV-2 Influence des facteurs étudiés: Les différentes expériences menées au cours de cette étude et décrites au tableau 5 (Matériel et méthodes page 21) nous a permis de vérifier l'influence de quelques facteurs, sur les effets du Teknar<sup>R</sup>. Ainsi les expériences 1 et 2 nous ont permis de vérifier l'effet de la température chez Simulium venustum\verecundum, et les expériences 5 et 6 chez Simulium corbis. Ces expériences ont également permis de vérifier, s'il existe des différences de réponse entre ces deux espèces larvaires. Les expériences 3 et 4 furent menées afin de vérifier l'influence de l'âge larvaire (larves jeunes ou âgées) chez Simulium venustum\verecundum. Enfin, la comparaison des expériences 2 et 4, permet de vérifier s'il y a différence intraspécifique, puisque l'espèce en cause, Simulium venustum\verecundum, fut récoltée dans deux sites différents.

En ce qui concerne les effets finaux, les différents facteurs étudiés n'ont pas eu d'influence significative. Dans tous les cas, on a observé le relâchement des cardia, la lyse cellulaire au niveau des



Figure 25. Dommages finaux dûs à l'action du Teknar<sup>R</sup> au niveau des caeca gastriques.

CC: chromatine condensée

A) Caeca en coupe sagittale à la fin de l'intoxication

B) Cellule d'un caeca lysée

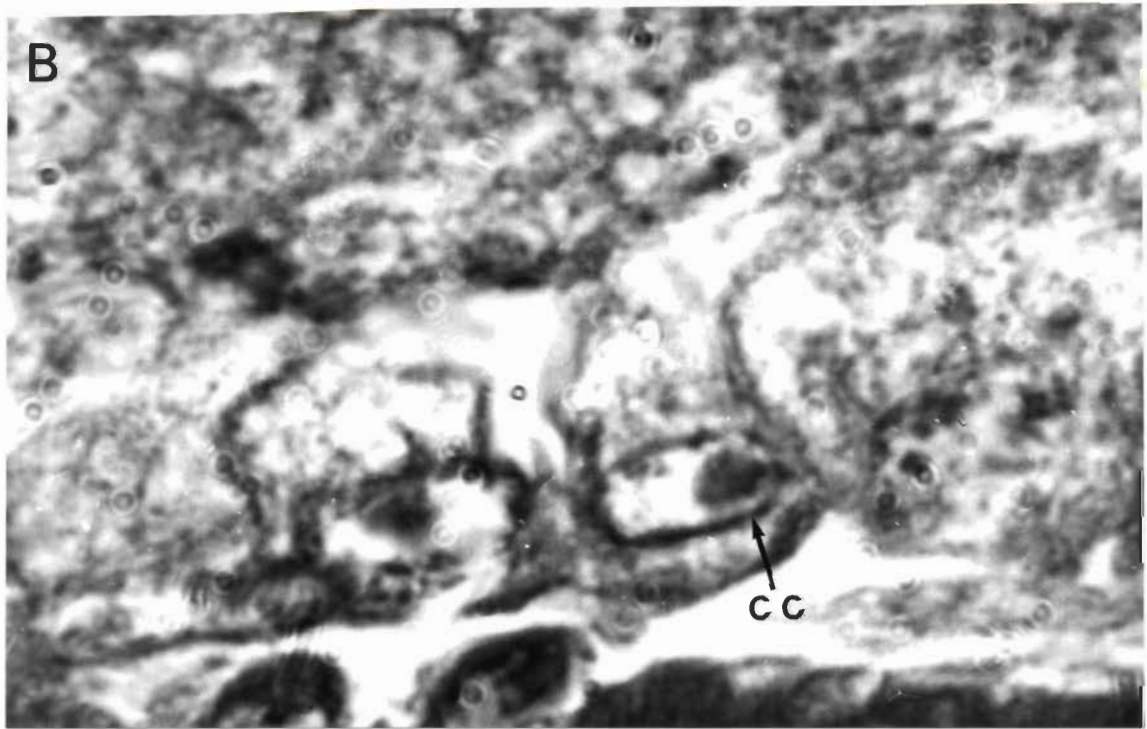


Figure 26. Dommages finaux dû à l'action du Teknar<sup>R</sup> au niveau de l'estomac postérieur.

H: hypertrophie cellulaire, MV: microvillosité, TK: Teknar<sup>R</sup>,

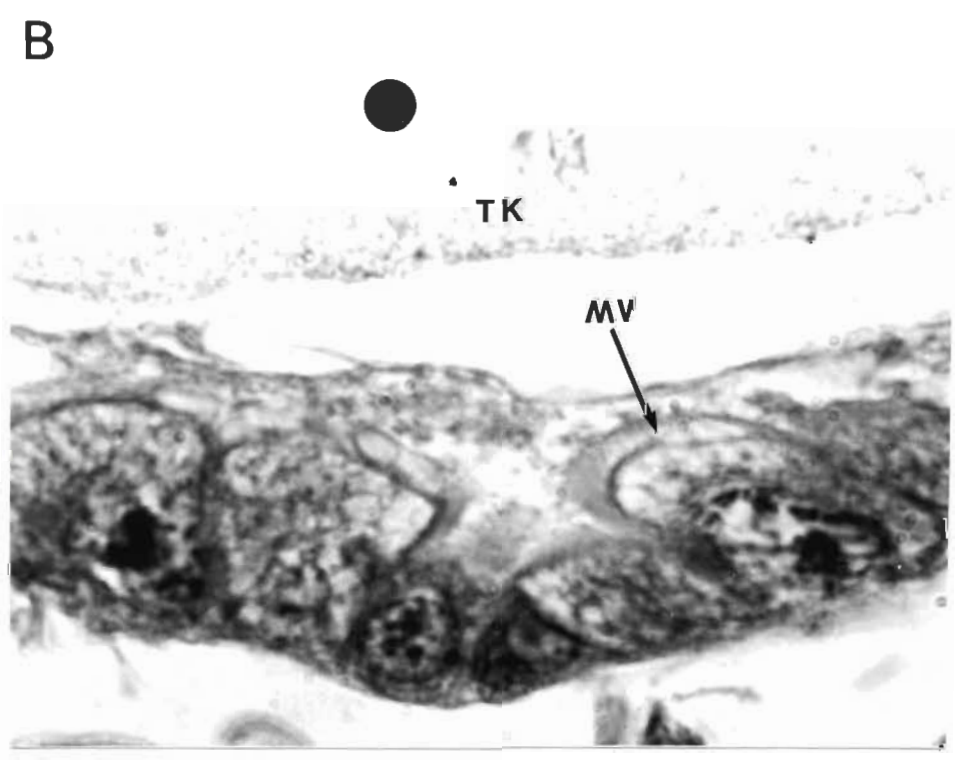
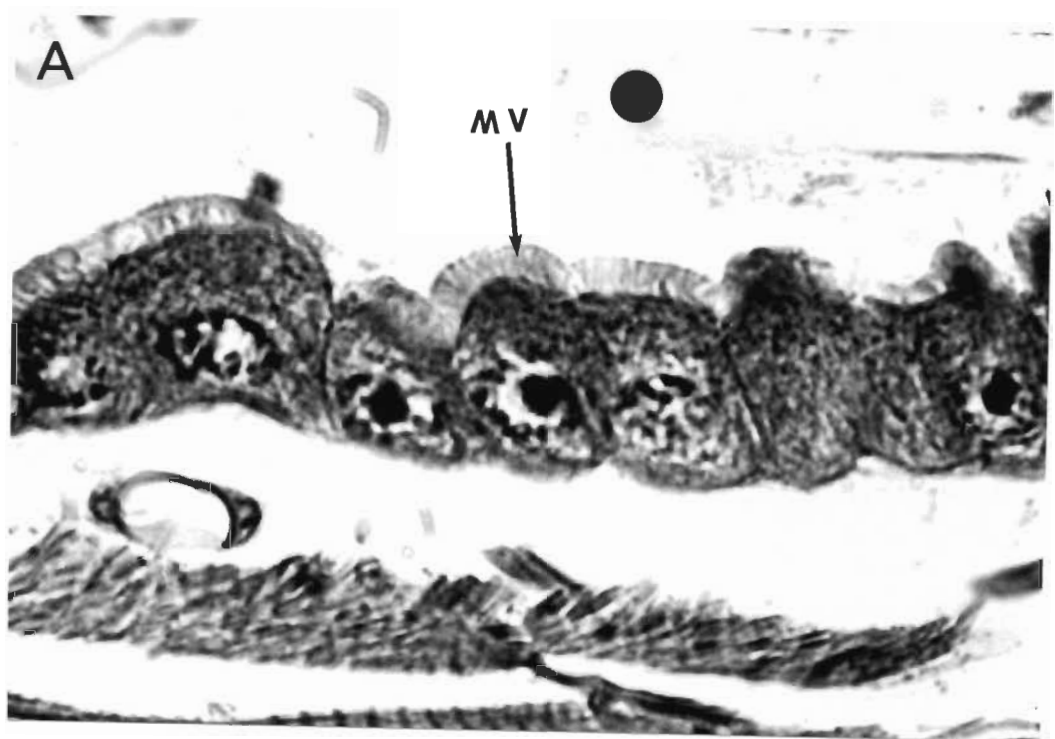
● : lumière intestinale.

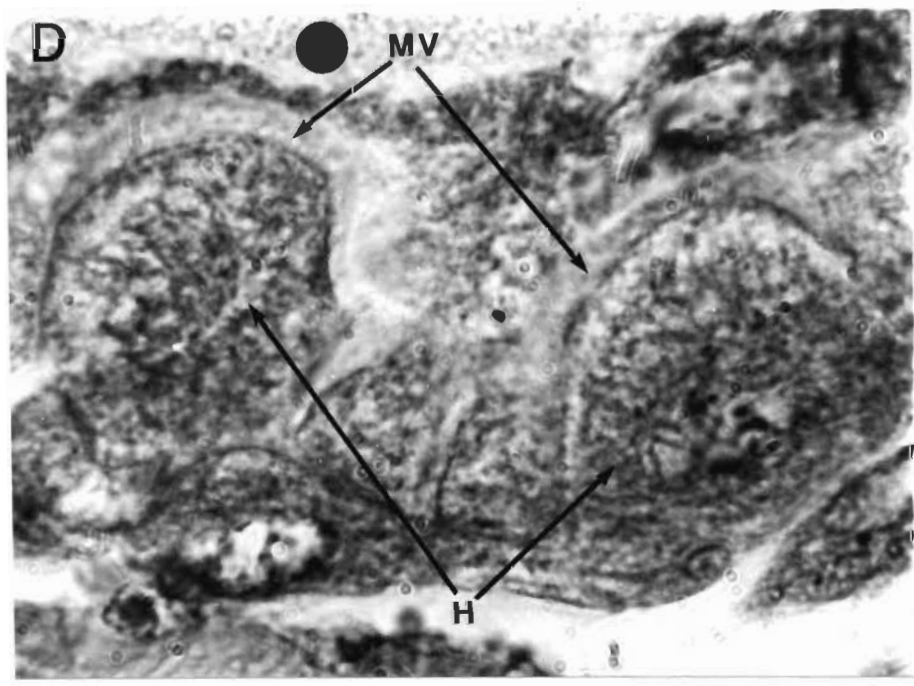
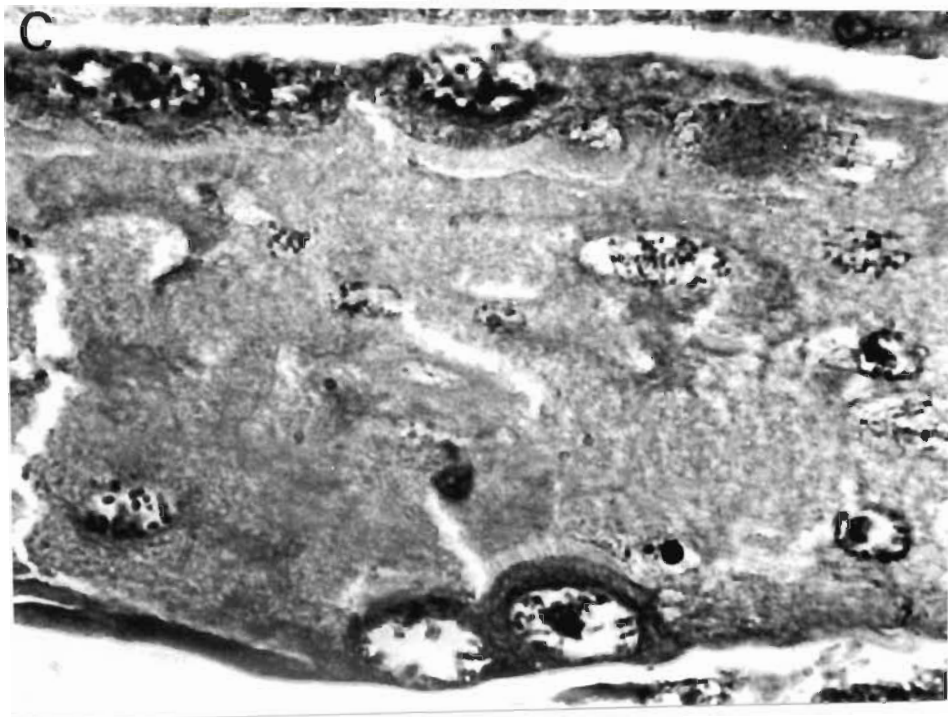
A) Estomac postérieur d'une larve témoin. ( X 800 )

B) Estomac postérieur après 60 minutes de traitement. ( X 800 )

C) Epithélium de l'estomac postérieur à la fin du traitement en coupe sagittale. ( X 425 )

D) Epithélium de l'estomac postérieur à la fin du traitement en coupe longitudinale. ( X 425 )





estomacs intermédiaire et postérieur et une hypertrophie cellulaire pour l'estomac antérieur. En fait, l'influence de certains facteurs s'est faite sentir essentiellement au niveau de la vitesse d'apparition de ces effets.

Une température plus élevée a occasionné une mortalité finale de 100%, qui est beaucoup plus rapide tant chez Simulium venustum\verecundum (85 minutes à 4,5 °C vs 60 minutes à 10,5 °C) que pour Simulium corbis (90 minutes à 6,0 °C vs 65 minutes à 10,0 °C). On observe le même résultat lorsqu'on traite de jeunes larves, comparativement à des larves âgées. Pour les jeunes larves, on obtient une mortalité finale de 100% après 70 minutes, tandis que pour les larves âgées on doit attendre jusqu'à 105 minutes.

Même si les effets finaux sont les mêmes indépendamment des facteurs étudiés, on ne peut distinguer aussi clairement les diverses étapes de l'intoxication cellulaire, pour les différentes régions mésentériques affectées. Ceci est dû à un chevauchement de l'ordre d'apparition des effets, qui se manifestent plus rapidement par rapport à ce qui a été décrit précédemment. De façon générale, le cardia demeure toujours la première structure affectée. Viennent ensuite, une disparition des microvillosités, suivie d'une granulation cytoplasmique et d'une rupture de l'épithélium dans l'estomac intermédiaire. Par la suite, et de façon presque simultanée, on observe les effets au niveau des caeca gastriques et des estomacs antérieur et postérieur. Le gonflement cellulaire, qui est facilement observable à basse température chez les larves âgées, ne l'est pratiquement plus chez les larves traitées à plus haute température. Le gonflement est également plus

difficile à observer chez les jeunes larves, que chez les larves âgées. De plus, on ne peut pas observer l'étape de vacuolisation au niveau de l'estomac intermédiaire.

Enfin, lorsqu'elles sont traitées à température et âge égaux, les larves des deux espèces ne montrent aucune différence de réponse significative. Ceci est également vrai pour des larves de la même espèce, mais ne provenant pas du même site d'échantillonnage.

IV-3 Influence de l'arrêt de la prise de nourriture: Au cours de l'étude, nous avons remarqué qu'une certaine proportion de larves cessait de se nourrir, après un certain temps. Cet arrêt de la prise de nourriture est facilement observable en coupe mince, puisqu'il suffit de comparer la position du bouchon de Teknar<sup>R</sup> ingéré par les larves. Ce phénomène, bien que rare (5 à 10%, selon le cas), s'observe de façon constante avec des temps d'exposition élevés (figure 27 A et B). Ainsi de 0 à 75 minutes l'arrêt de la prise de nourriture n'est pas observé. Ensuite, plus l'exposition se prolonge, plus cet arrêt s'observe mais sans jamais dépasser la fréquence d'une larve sur dix. Certaines larves ont donc ingéré une quantité moindre de Teknar<sup>R</sup> par rapport à d'autres n'ayant pas cessé de se nourrir. Cependant, au niveau des modifications histologiques, on n'observe aucune différence (figure 27 C et D). Toutes les larves ont subi d'importantes lésions au niveau du mésentéron. On observe donc une lyse cellulaire au niveau des caeca gastriques et des estomacs antérieur, intermédiaire et postérieur. Le cardia montre également un relâchement, caractéristique de l'ingestion de Teknar<sup>R</sup> par la larve.

Figure 27. Effets dûs à l'arrêt de la prise de nourriture.

EA: estomac antérieur, EI: estomac intermédiaire, EP: estomac postérieur,  
H: hypertrophie cellulaire, TK: Teknar<sup>R</sup>.

A) Larve n'ayant pas cessé de se nourrir. (110 minutes de traitement)

( X 65 )

B) Larve ayant cessé de se nourrir. (110 minutes de traitement)

( X 50 )

C) Effets histologiques au niveau de l'estomac antérieur et de l'estomac intermédiaire chez la larve ayant cessé de se nourrir.

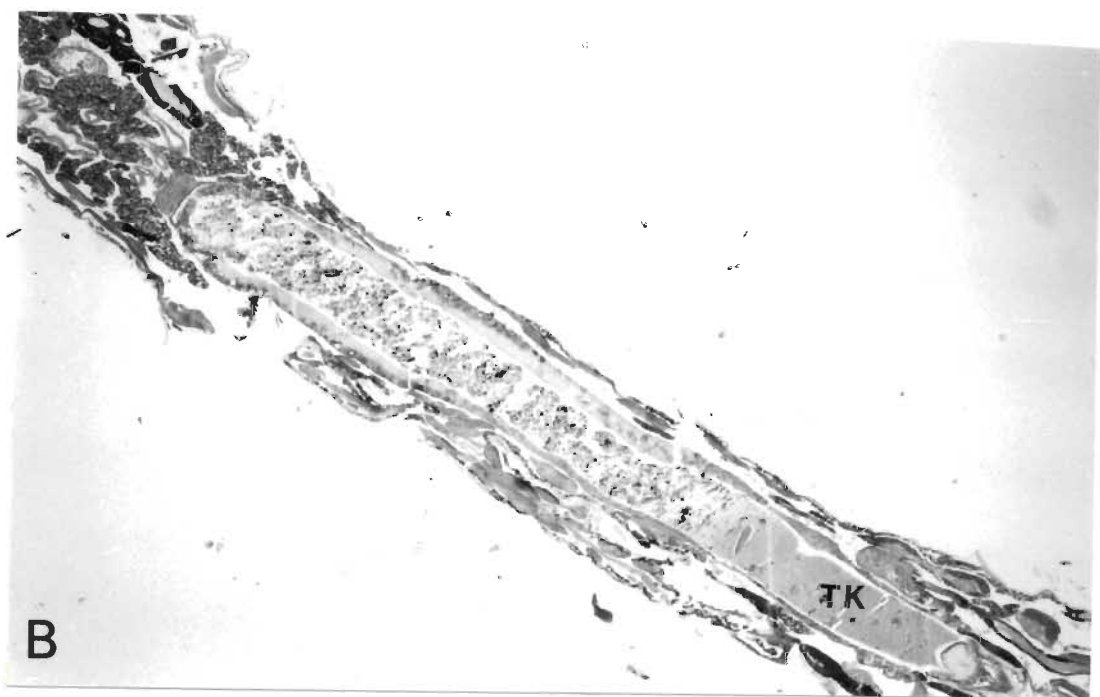
D) Effets histologiques au niveau de l'estomac postérieur chez la larve ayant cessé de se nourrir.

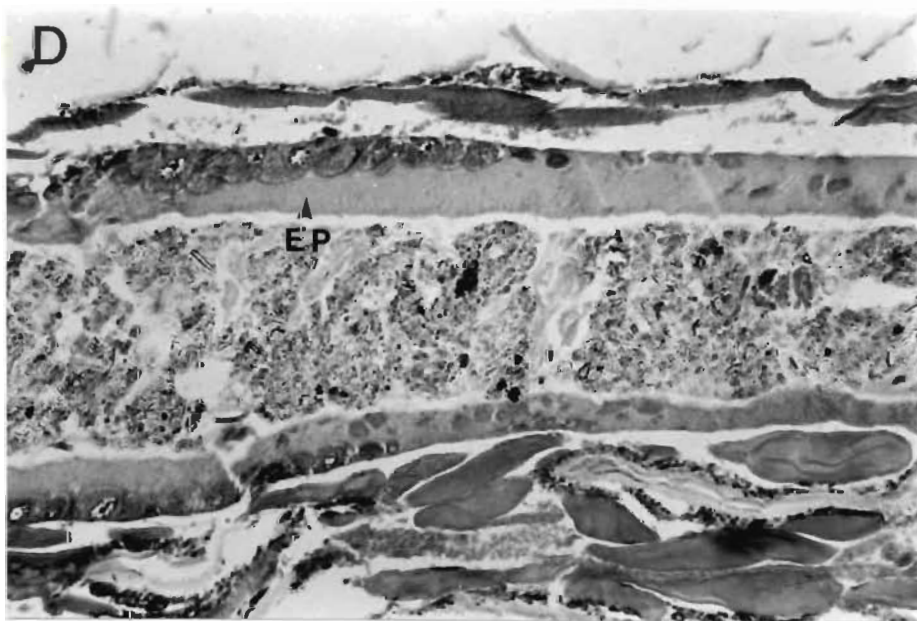


A



B





IV-4 Détection de la toxine: Les essais de détection de la toxine furent menés sur les larves prélevées lors des expériences 1 et 4 et fixées dans l'éthanol 70% . Il s'agit de deux expériences effectuées avec Simulium venustum\verecundum et à basses températures (4,5 °C et 6,0 °C respectivement).

Les larves témoins n'ayant pas été traitées ne montrent aucune fluorescence particulière au niveau du contenu intestinal et des cellules épithéliales (figure 28 A). Aucune fluorescence n'est observée chez les autres témoins. Il s'agit de coupes de larves intoxiquées pour lesquelles on a remplacé l'antisérum dirigé contre les cristaux par un anti-sérum non spécifique (antiérum dirigé contre un virus d'insecte). L'anticorps de mouton anti-IgG de lapin, couplé à l'isocyanate de fluorescéine, ne présente pas d'affinité non-spécifique pour les coupes de larves témoins et de larves intoxiqués.

On peut distinguer de façon aisée et précise l'évolution du bouchon de Teknar<sup>R</sup>, bien visible car plus fluorescent par rapport au reste du contenu intestinal. On observe une fluorescence en aval du bouchon d'insecticide chez les larves traitées depuis un certain temps (à partir de 15 minutes de contact) (figure 29). Cette fluorescence est concentrée au niveau des parties apicales des cellules des estomacs intermédiaire et postérieur et dans le contenu intestinal.

Du début à la fin de l'expérience, aucune fluorescence n'a été observée au niveau du cardia. A la fin de l'expérience, on peut distinguer la désorganisation cellulaire des épithéliums stomacaux. On remarque une structure composée de matériel flou et non organisé (MC)

(figure 30). Mentionnons que l'on ne retrouve aucune trace de fluorescence dans ces épithéliums détruits.

Figure 28. Localisation du bouchon de Teknar<sup>R</sup> par immunofluorescence.

TK: Teknar<sup>R</sup>

A) Larve témoin. ( objectif 2,5 X )

B) Larve traitée pendant 110 minutes. ( objectif 2,5 X )

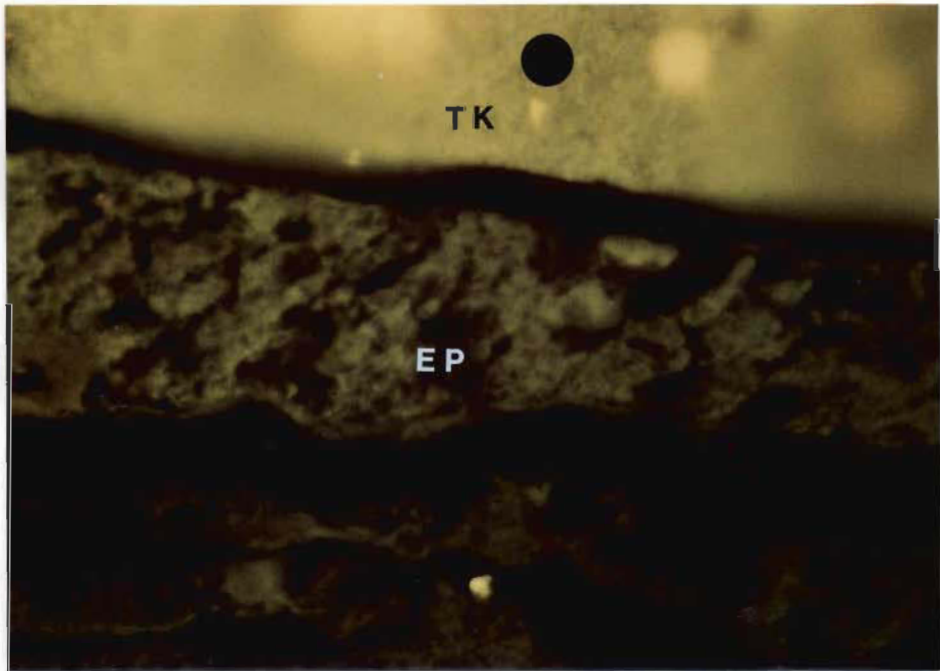
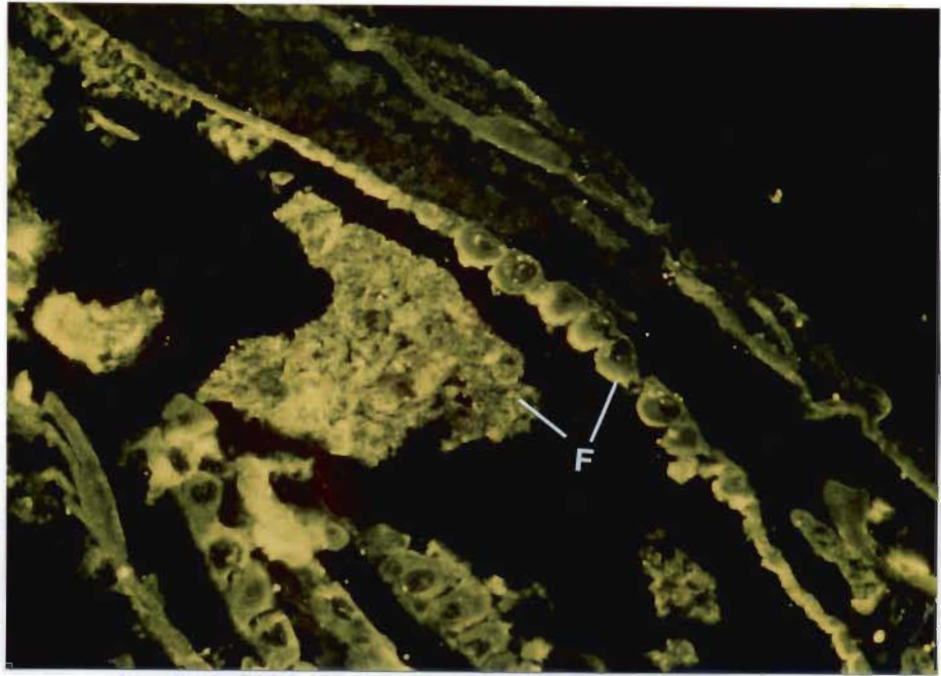


Figure 29. Localisation de l'antigénicité au niveau des cellules en aval du bouchon de Teknar<sup>R</sup> après 40 minutes de traitement. ( objectif 25 X )

F: fluorescence

Figure 30. Effet lytique par le Teknar<sup>R</sup> vu par immunofluorescence après 120 minutes de traitement. ( objectif 40 X )

EP: épithélium, TK: Teknar<sup>R</sup>, ● : lumière intestinale.





## CHAPITRE V

### DISCUSSION

La méthodologie employée lors de cette étude nous a permis de déterminer de façon précise l'ordre d'apparition des différentes modifications selon le type cellulaire mésentérique attaqué. L'ordre est le suivant: (a) cardia; (b) estomac intermédiaire; (c) estomac antérieur; (d) caeca gastriques; (e) estomac postérieur.

A la suite de l'ingestion de Teknar<sup>R</sup> par des larves de mouches noires, on peut distinguer deux types de modifications cellulaires: un effet d'ordre histologique observé au niveau de tout le tube stomacal, et un second d'ordre physiologique que l'on retrouve au niveau des cardia, seulement.

Le résultat final de l'action de la  $\delta$ -endotoxine de B.t.i. sur l'épithélium stomacal se traduit par une lyse cellulaire quasi complète des caeca gastriques et des estomacs antérieur et postérieur. Au niveau de ces structures, on peut retrouver quelques cellules hypertrophiées mais non lysées, qui sont incluses dans un matériel granulaire. Au niveau de l'estomac antérieur, on retrouvera plutôt une hypertrophie généralisée des cellules, quelques-unes d'entre elles étant lysées. Cependant, chaque région mésentérique subit une série de modifications avant d'en arriver à ce résultat final. Ces différentes étapes d'intoxication, décrites pour chacune des régions affectées, sont similaires à celles

observées chez les moustiques. Ainsi on a pu observer un gonflement cellulaire, une perte des microvillosités, une vacuolisation et une lyse cellulaire, décrits pour la première fois sur Aedes aegypti par Charles et de Barjac (1981 b) et qui furent redécrites par Habib (1983) sur Culex declarator et par Lahkim-Tsrer et al. (1983) également sur Aedes aegypti. La seule différence, mineure par rapport aux résultats des autres auteurs, se situe au niveau de la lyse finale. Le matériel découlant de la lyse ne se répand pas dans la lumière intestinale ou dans l'hémolymphe. Ce matériel s'agglomère en une structure granuleuse se localisant entre la lame basale et la membrane péritrophique (MC). Le mode d'action supposé de B.t.i. étant de créer des pores (0,6 à 1,0  $\mu\text{m}$  de diamètre) dans les membranes plasmiques cellulaires (Ellar et al., 1986), on peut supposer que beaucoup de matériel cellulaire peut sortir des cellules intoxiquées et s'accumulé entre les vestiges de cellule et la membrane péritrophique. L'épaississement du MC observé lors de l'intoxication serait dû à l'accroissement des dégâts au niveau des cellules stomacales qui relargueraient leur contenu vers la lumière de l'intestin.

Les expériences à basses températures nous ont permis une détermination précise, des séquences d'apparition des effets histologiques. En effet, à basse température le métabolisme larvaire est plus lent qu'à haute température. Etant donné que le mode d'action du B.t.i. nécessite une intervention enzymatique dans le tractus intestinal pour l'activation de la toxine (Bulla et al. 1985), un métabolisme plus lent fera en sorte que l'hydrolyse intestinale sera ralentie, et la

toxine, de nature protéique, agira moins vite. Ceci est confirmé par les expériences menées à de plus hautes températures. Dans ces expériences, on a observé une mortalité finale de 100%, qui survient beaucoup plus rapidement qu'à basses températures, ce qui ne peut être dû qu'à une activation plus rapide de la toxine, au niveau stomacal. Un autre facteur en faveur d'une activation par hydrolyse intestinale, sont les résultats au niveau de l'intestin intermédiaire. A ce niveau, on remarque que les effets dûs au Teknar<sup>R</sup> se manifestent bien avant que celui-ci n'ait atteint cette région. Ceci démontre que la  $\delta$ -endotoxine diffuse en aval du bouchon de Teknar<sup>R</sup>, dans lequel elle se retrouvait initialement. Cette diffusion est causée par une hydrolyse du cristal protéique en molécules plus petites, diffusant plus rapidement que ne progresse le contenu intestinal. Cette diffusion est d'ailleurs observée lors des études de détection de la toxine par fluorescence, où après un certain temps d'intoxication, on remarque que la fraction antigénique du cristal se retrouve en aval du bouchon de Teknar<sup>R</sup> et se concentre sur les bordure apicales des cellules. Un dernier point en faveur d'une activation accélérée de la toxine à hautes températures, est le fait que l'on ne peut observer toutes les étapes de l'intoxication cellulaire. Ceci serait dû, non pas au fait que ces effets ne se produisent plus, mais plutôt qu'ils ne persistent qu'un laps de temps très court, ce qui nous aurait empêché de les observer. Ce délai moindre entre certains effets serait dû à l'activation plus rapide de la toxine, qui agit alors plus vite sur les cellules.

Pour des traitements à basses températures, le phénomène d'arrêt de la prise de nourriture a été observé lors des longues expositions. Bien

que ce phénomène n'influe pas sur le résultat final du traitement (les larves étant toutes mortes), il diffère des observations de Charles et de Barjac (1981 a). Ces auteurs mentionnent qu'aucune inhibition de la prise de nourriture n'est observée lors de l'ingestion de fortes doses de cristaux de B.t.i. par des larves de Aedes aegypti. Cependant, cette contradiction apparente s'explique par la température élevée à laquelle ces auteurs ont travaillé, de 25 °C. Cette température et les concentrations de cristaux utilisées entraînent un temps d'exposition à l'agent toxique très court (30 à 35 minutes), alors que dans notre cas on observe cet arrêt de la prise de nourriture, après une longue exposition au Teknar<sup>R</sup>.

On peut tenter d'expliquer, pourquoi ce phénomène s'observe dans nos expériences. Même s'il y a arrêt de la prise de nourriture, le métabolisme larvaire lui, n'est pas arrêté. Les larves ayant à ce moment ingéré une certaine quantité de Teknar<sup>R</sup>, l'action de la toxine se manifesterá. Ceci nous indiquerait donc, que ce n'est pas seulement la quantité de Teknar<sup>R</sup> ingérée qui est importante, mais le temps de contact avec celui-ci. Ainsi, dès qu'un minimum de cristaux nécessaires à l'action lytique est ingéré, il ne reste qu'à attendre un certain temps, avant que la toxine ne soit activée et manifeste ses effets. Ce temps avant l'apparition des premiers effets, sera fonction de divers paramètres, dont la température et l'âge larvaire.

Pour expliquer les raisons d'un tel arrêt de la prise de nourriture, on peut émettre certaines hypothèses, même si aucune expérience ne fut faite en ce sens. La première hypothèse serait qu'il s'agisse d'un phénomène naturel et qu'aléatoirement une proportion de la population

larvaire cesse de se nourrir après un certain temps. La deuxième hypothèse serait que certaines larves cesseraient de se nourrir en réponse à la mise en contact avec le Teknar<sup>R</sup>. Une troisième option met en cause, non pas les larves, mais plutôt le bassin d'expérimentation. Ce bassin fut conçu de manière à mimer le plus possible, le milieu naturel des larves. Ainsi la turbulence de l'eau est assurée par les bulles provenant de l'aération continue dans les béchers. Cette aération doit assurer une dispersion de l'insecticide et éviter une sédimentation trop rapide de ce dernier. Il se peut qu'une proportion des larves dans les béchers se trouvent fixées à des endroits où l'accès au Teknar<sup>R</sup> est plus difficile (larves se trouvant dans la partie supérieure du bécher, ou celles placées dans des zones de moindre turbulence). Ces larves n'auraient pas la possibilité de capter autant de Teknar<sup>R</sup> que les autres larves. Dans ce cas, il ne s'agirait pas d'un véritable arrêt de la prise de nourriture, mais plutôt d'un phénomène d'accessibilité à l'insecticide.

Un élément nouveau et particulier à cette étude, est l'effet physiologique observé au niveau du cardia et qui serait induit par la toxine de B.t.i., bien que nos résultats en fluorescence ne montrent qu'à aucun moment de l'intoxication, on ne peut observer de fluorescence au niveau du cardia. C'est à notre connaissance, la première fois qu'un tel effet est observé chez des larves, tant de moustiques que de mouches noires, traitées au B.t.i. Comme il s'agit d'un effet observé dans les tous premiers instants de l'intoxication, et qu'on remarque certaines modifications telles que les espaces cytoplasmiques plus grands et la modification de la sécrétion de la membrane péritrophique, il s'agit

d'une étape importante dans le processus d'intoxication cellulaire du tube stomacal. Malgré ces modifications, la larve continue de se nourrir et d'ingérer le Teknar<sup>R</sup>. D'autre part, le transit intestinal entraîne la membrane péritrophique qui protège l'épithélium stomacal. Ainsi à partir du moment où la sécrétion de la membrane péritrophique est modifiée, l'entraînement de celle-ci par le transit intestinal provoquera des pressions à ce niveau. Bien que de composition rigide, la membrane péritrophique, sous l'effet de ces pressions, pourra subir des modifications telles que changement de sa structure et rupture. Une telle hypothèse pourrait expliquer le fait que les premières cellules affectées soient celles de l'estomac intermédiaire. Si un fractionnement ou un changement de perméabilité se produit à ce niveau, la toxine activée aura plus facilement accès aux cellules et manifestera son action à ce niveau.

Plutôt que d'un effet direct sur cette dernière, le B.t.i agirait sur le contrôle de la sécrétion de celle-ci. Afin d'établir de façon précise le dérèglement de cette sécrétion, il faudrait orienter de nouveaux travaux vers une détection spécifique de la membrane péritrophique et de son rôle exact. Ceci permettrait de suivre l'évolution de cette dernière durant tout le temps de l'intoxication. Une caractérisation du matériel colorable serait également souhaitable afin d'identifier les modifications subies lors de l'intoxication. Enfin des études ultrastructurales des cellules du cardia, responsables de sa sécrétion devraient être entreprises afin de vérifier si des organites cellulaires subissent des changements, ce qui pourraient expliquer la modification de la sécrétion de la membrane péritrophique.

Une dernière indication concernant le mode d'action de la toxine du B.t.l. peut être tirée de nos résultats en fluorescence. Au début de l'intoxication, on observe une fluorescence au niveau du contenu intestinal et des faces apicales des cellules épithéliales se trouvant en aval du bouchon de Teknar<sup>R</sup>. Ces cellules subissent par la suite des modifications, et finissent complètement lysées. Cependant, au niveau des débris cellulaires provenant de cette lyse, on ne retrouve aucune fluorescence. Deux hypothèses sont avancées pour expliquer ceci. La première serait que le site antigénique du cristal, mais non la fraction toxique, est détruit lors des diverses étapes menant à la lyse cellulaire, ce qui empêcherait toute détection à ce moment. La deuxième hypothèse est que la toxine ne ferait qu'induire les mécanismes conduisant à la lyse cellulaire et qu'elle est détruite par la suite et éliminée d'une façon quelconque.

## BIBLIOGRAPHIE

Aly, C., Mulla, M. S., et Federici, B. A. Sporulation and toxin production by Bacillus thuringiensis var. israelensis in cadavers of mosquito larvae (Diptera:Culicidae). J. Invertebr. Pathol., 1985, 46, 251-258.

Ang, B. J., et Nickerson, K. W. Purification of the protein from Bacillus thuringiensis by zonal gradient centrifugation. Appl. Environ. Microbiol., 1978. 36, 625-626.

Armstrong, J. L., Rohrmann, G. F., et Beaudreau, G. S. Delta endotoxin of Bacillus thuringiensis subs israelensis. J. Bacteriol., 1985, 161, 39-46.

Barbosa, P. Manual of basic techniques in insect histology. USA: Autum Publisher, 1974.

de Barjac, H. Une nouvelle variété de Bacillus thuringiensis très toxique pour les moustiques: B. thuringiensis var. israelensis sérotype 14. C. R. Acad. Sci., 1978 a, 286 D, 797-800.

de Barjac, H. Un nouveau candidat à la lutte biologique contre les moustiques: B.t. var. israelensis. Entomophaga, 1978 b, 23, 309-319.



de Barjac, H., et Bonnefoi, A. Essai de classification biochimique et sérologique de 24 souches de Bacillus du type Bacillus thuringiensis., Entomophaga, 1962, 7, 5-31.

de Barjac, H., et Coz, J. Sensibilité comparée de six espèces différentes de moustique à Bacillus thuringiensis var. israelensis. Bull. O. M. S., 1979, 57, 139-141.

Berliner, E. Ueber die Schlauffsucht der Mehlmotterraupe (Ephestia Kühniella, Zell.) und ihren Erreger Bacillus thuringiensis. Z. Angew Entomol., 1915, 2, 29-56.

Bonnefoi, A., et de Barjac, H. Classification des souches du groupe Bacillus thuringiensis par la détermination de l'antigène flagellaire. Entomophaga, 1963, 8, 223-229.

Bulla, L. A. Jr., Faust, R. M., Andrews, R., et Goodman, N. Insecticidal bacilli. Dans: Academic Press Inc. (Eds), The molecular biology of the bacilli (Vol. II). New York: Harcourt Brace Jovanovich Publishers, 1985, pp. 185-209.

Carleton, B. C. et Gonzalez, J. M. Jr. The genetics and molecular biology of Bacillus thuringiensis. Dans: Academic Press Inc. (Eds), The molecular biology of the bacilli (Vol. II). New York: Brace Jovanovich Publishers, 1985, pp. 211-249.

Charles, J.-F. Action de la  $\delta$ -endotoxine de Bacillus thuringiensis var. israelensis sur cultures de cellules de Aedes aegypti L. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1983, 134 A, 365-381.

Charles, J.-F., et de Barjac, H. Variation du pH de l'intestin moyen d'Aedes aegypti en relation avec l'intoxication par les cristaux de Bacillus thuringiensis var. israelensis (sérotypage H14). Bull. Soc. Path. Exot., 1981 a, 74, 91-95.

Charles, J.-F., et de Barjac, H. Histopathologie de l'action de la  $\delta$ -endotoxine de Bacillus thuringiensis var. israelensis sur les larves d'Aedes aegypti (Dip.: Culicidae). Entomophaga, 1981 b, 26, 203-212.

Charles, J.-F., et de Barjac, H. Action des cristaux de Bacillus thuringiensis var. israelensis sur l'intestin moyen de Aedes aegypti L., en microscopie électronique. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1983, 134 A, 197-218.

Charpentier, G. Etude sur les possibilités d'infection d'animaux par un virus d'invertébré. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal, 1975.

Cheung, P. Y. K., et Hammock, B. D. Separation of three biologically distinct activities from parasporal crystal of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Current Microbiol., 1985, 12, 121-126.

Colbo, M. H., et Undeen, A. H. Effect of Bacillus thuringiensis var. israelensis on nontarget insects in stream trials for control of Simuliidae. Mosq. News, 1980, 40, 368-371.

Conseil National de la Recherche du Canada. Biting flies in Canada: Health effects and economics consequences (NRCC-19248). Ottawa, Canada, 1982.

Cooksey, K. E., Donniger, C., Norris, J. R., et Shankland, D. Nerve-blocking effect of Bacillus thuringiensis protein toxin. J. Invertebr. Pathol., 1969, 13, 461-462.

Couch, T. L., et Ross, D. A. Production and utilisation of Bacillus thuringiensis. Biotechnol. Bioeng., 1980, 22, 1297-1304.

Dart, L., et Turner, T. R. Fluorescence microscopy in exfoliative cytology. Lab. Invest., 1959, 8, 1513-1522.

Dejoux, C. Recherches préliminaires concernant l'action de Bacillus thuringiensis israelensis de Barjac sur la faune d'invertébrés d'un cours d'eau tropical. document O. M. S., 1979, VBC/79.721, 11 p.

Dupont, C. et Boisvert, J. Persistence of Bacillus thuringiensis serovar. israelensis toxic activity in the environment and interaction with natural substrates. Water Air and Soil Pollution, 1986, 29, 425-438.

Ebersold, H.-R., Lüthy, P., et Huber H. E. Membrane damaging effect of the  $\delta$ -endotoxin of Bacillus thuringiensis. Experientia, 1980, 36, 495-496.

Ellar, D. J., Knowles, B. H., Drobniowski, F. A. et Haider, M. Z. The insecticidal specificity and toxicity of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxins may be determined respectively by an initial binding to membrane-specific receptors followed by a common mechanism of cytolysis. IV<sup>th</sup> Intern. Coll. Invertebr. Pathol., Veldhoven, août 1986.

Endo, Y., et Nishiitsutsuji-Uwo, J. Mode of action of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin: Histopathological changes in the silkworm midgut. J. Invertebr. Pathol., 1980, 36, 90-103.

Endo, Y., et Nishiitsutsuji-Uwo, J. Mode of action of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin: Ultrastructural changes of midgut epithelium of Pieris, Lymantria and Ephestia larvae. Appl. Ent. Zool., 1981, 16, 231-241.

Fast, P. G., et Angus, T. A. Effect of parasporal inclusion of Bacillus thuringiensis var. sotto Ishiwata on the permeability of the gut wall of Bombyx mori (Linneaus) larvae. J. Invertebr. Pathol., 1965, 7, 29-32.

Fast, P. G., et Morrison, I. K. The  $\delta$ -endotoxin of Bacillus thuringiensis IV. The effect of  $\delta$ -endotoxin on ion regulation by midgut tissue of Bombyx mori larvae. J. Invertebr. Pathol., 1972, 20, 208-211.

Feldman, G., Druet, P., Bignon, J., et Auameas, S. Immunoenzymatic techniques. Netherlands: North-Holland Publishing Co., 1976.

Frommer, R. L., Hembree, S. C., Nelson, J. H., Remington, M., et Gibbs, P. H. The susceptibility of Simulium vittatum larvae (Diptera:Simuliidae) to Bacillus thuringiensis var. israelensis in the laboratory. Mosq. News, 1980, 40, 577-584.

Frommer, R. L., Hembree, S. C., Nelson, J. H., Remington, M., et Gibbs, P. H. The evaluation of Bacillus thuringiensis var. israelensis in reducing Simulium vittatum (Diptera:Simuliidae) larvae in their natural habitat with no extensive aquatic vegetative growth. Mosq. News, 1981, 41, 339-347.

Ganter, P., et Jollés, G. Histochimie normale et pathologique (tome I). Paris: Gauthier Villas, 1969 a.

Ganter, P., et Jolles, G. Histochimie normale et pathologique (tome II). Paris: Gauthier Villas, 1969 b.

Gaugler, R., et Molloy, D. Feeding inhibition in black fly larvae (Diptera:Simuliidae) and its effects on the pathogenicity of Bacillus thuringiensis var. israelensis. Environ. Entomol., 1980, 9, 704-708.

Goldberg, L. J., et Margalit, J. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univattus, Aedes aegypti and Culex pipiens. Mosq. News, 1977, 37, 355-358.

Gonzalez, J. M. Jr., et Carlton, B. C. A large transmissible plasmid is required for crystal toxin production in Bacillus thuringiensis variety israelensis. Plasmid, 1984, 11, 28-38.

Griego, V. M., Moffett, D., et Spence, K. D. Inhibition of active K<sup>+</sup> transport in the tobacco hornworm, (Manduca sexta), midgut after ingestion of Bacillus thuringiensis endotoxin. J. Insect Physiol., 1979, 25, 283-288.

Griego, V. M., Fancher, L. J. et Spence, K. D. Scanning electron microscopy of the disruption of tobacco hornworm, Manduca sexta, midgut by Bacillus thuringiensis endotoxin. J. Invertebr. Pathol., 1980, 35, 186-189.

Guillet, P., et de Barjac, H. Toxicité de Bacillus thuringiensis var. israelensis pour les larves de simulies vectrices de l'onchocercose. C. R. Acad. Sci., 1979, 289 D, 549-552.

Gupta, B. L., Dow, J. A. T., Hall, T. A., et Harvey, W. R. Electron probe X-ray microanalysis of the effects of *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* crystal protein insecticide on ions in an electrogenic  $K^+$ -transporting epithelium of the larval midgut in the lepidopteran, *Manduca sexta*, in vitro. J. Cell. Sci., 1985, 74, 137-152.

Habib, M. E. M. Potency of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (H-14) against some aquatic dipterous insects. Z. Ang. Ent., 1983, 95, 368-376.

Himeno, M., Koyama, N., Funato, T., et Komano, T. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal delta-endotoxin on insect cells in vitro. Agric. Biol. Chem., 1985, 49, 1461-1468.

Hukuhara, T., Midorikawa, M. et Iwahana, H. The effect of  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* on the gut movements of the silkworm, *Bombyx mori*. Appl. Ent. Zool., 1984, 19, 221-226.

Ignoffo, C. M., Garcia, C., Kroha, M. J., Fukuda, T., et Couch, T. L. Laboratory tests to evaluate the potential efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for use against mosquitoes. Mosq. News., 1981, 41, 85-93.

Insell, J. P., et Fitz-James, P. C. Composition and toxicity of the inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50, 56-62.

Ishiwata, S. (en japonais). Kyoto Sangyo, Ko Hijo, Sanji Hokoku, 2, 1905, 346-347.

Johnson, D. E. Toxicity of Bacillus thuringiensis entomocidal protein toward cultured insect tissue. J. Invertebr. Pathol., 1981, 38, 94-101.

Johnson, D. E. Selection for resistance to Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin in an insect cell line (Choristoneura fumiferana). Experientia, 1984, 40, 274-275.

Lacey, L. A., et Undeen, A. H. Effect of formulation concentration, and application time on the efficacy of Bacillus thuringiensis (H-14) against black fly (Diptera:Simuliidae) larvae under natural conditions. J. Econ. Entomol., 1984, 77, 412-418.

Lacey, L. A., Urbina, M. J., et Heitzman, C. M. Sustained release formulation of Bacillus sphaericus and Bacillus thuringiensis (H-14) for control of container-breeding Culex quinquefasciatus. Mosq. News, 1984, 44, 26-32.

Lahkim-Tsrer, L., Pascar-Gluzman, C., Margalit, J., et Barak, Z. Larvicidal activity of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis, serovar H14 in Aedes aegypti: Histopathological studies. J. Invertebr. Pathol., 1983, 41, 104-116.

Larget, I. Etude de la rémanence de Bacillus thuringiensis var. israelensis. Rev. Gén. Bot., 1981, 88, 33-42.

Laurent, P., et Charles, J.-F. Action comparée des cristaux solubilisés des sérotypes H-14 et H-1 de Bacillus thuringiensis sur cultures de cellules de Aedes aegypti. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1984, 135 A, 473-484.

de Lello, E. Hanton, W. K., Bishoff, S. T., et Misch, D. W. Histopathological effects of Bacillus thuringiensis on the midgut of tobacco hornworm larvae (Manduca sexta): Low doses compared with fasting. J. Invertebr. Pathol., 1983, 41, 169-181.

Louloudes, S.J., et Heimpel, A. M. Mode of action of Bacillus thuringiensis toxic crystal in larvae of the silkworm, Bombyx mori. J. Invertebr. Pathol., 1969, 18, 135-138.

Lüthy, P. Self-digestion of the gut epithelium: A possible explanation for the mode of action of the endotoxin of Bacillus thuringiensis. J. Invertebr. Pathol., 1973, 22, 139-140.

Lüthy, P. et Ebersold, R. The entomological toxins of Bacillus thuringiensis. Pharmac. Theor., 1981, 13, 257-283.

Melby, E. C. Jr., et Altman, N. H. Handbook of laboratory animal science (vol. II). USA: CRC Press, 1974.

Miura, T., Takahashi, R. M., et Mulligan, F. S. Effects of the bacterial mosquito larvicide, Bacillus thuringiensis serotype H-14 on selected aquatic organisms. Mosq. News, 1980, 40, 619-622.

Molloy, D., Gaugler, R., et Jamnback, H. Factors influencing efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis serotype H-14 on selected aquatic organisms. J. Econ. Entomol., 1981, 74, 61-64.

Molloy, D., et Jamnback, H. Field evaluation of Bacillus thuringiensis var. israelensis as a black fly biocontrol agent and its effects on nontarget stream insects. J. Econ. Entomol., 1981, 74, 314-318.



Mulla, M. S., Federici, B. A., Darwazeh, H. A., et Ede, L. Field evaluation of the insecticide Bacillus thuringiensis serotype H-14 against floodwater mosquitoes. Appl. Environ. Microbiol., 1982, 43, 1288-1293.

Murphy, D. W., Sohi, S. S., et Fast, P. G. Bacillus thuringiensis enzyme-digested delta endotoxin: Effect on cultured insect cells. Science, 1976, 194, 954-956.

Nishiitsutsuji-Uwo, J., Endo, Y., et Himeno, M. Mode of action of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin: Effect on TN-368 cells. J. Invertebr. Pathol., 1979, 34, 267-275.

Nishiitsutsuji-Uwo, J., Endo, Y., et Himeno, M. Effects of Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin on insect and mammalian cells in vitro. Appl. Ent. Zool., 1980, 15, 133-139.

Percy, J., et Fast, P. G. Bacillus thuringiensis crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. J. Invertebr. Pathol., 1983, 41, 86-98.

Peters, W. Investigation on the peritrophic membranes of diptera. In H. R. Hepburn (Eds), The insect integument. U.S.A.: Elsevier Scientific Co., 1976, pp. 515-543.

Peters, W. The fine structure of peritrophic membranes of mosquito and black fly larvae of the genera Aedes, Anopheles, Culex and Odagmia (Diptera: Culicidae/Simuliidae). Entomologia Generalis, 1979, 5, 289-299.

Peterson, B. V. Simuliidae. In Agriculture Canada (Eds), Manual of nearctic diptera (vol. 1). Canada: Ministère de l'approvisionnement et service Canada, 1981, pp. 355-391.

Puri, I. M. On the life history and structure of the early stages of simuliidae (Diptera, Nematocera). Part I. Parasitology, 1925, 17, 295-334.

Ramoska, W. A., Watts, S., et Rodriguez, R. E. Influence of suspended particulates on the activity of Bacillus thuringiensis serotype H-14 against mosquit larvae. J. Econ. Entomol., 1982, 75, 1-4.

Retnakaran, A., Lauzon, H., et Fast, P. Bacillus thuringiensis induced anorexia in the spruce budworm, Choristoneura fumiferana. Ent. Exp. Appl., 1983, 34, 233-239.

Richards, A. G. et Richards, P. A. The peritrophic membranes of insects. Ann. Rev. Entomol., 1977, 22, 219-240.

Rupp, R. A., et Spence, K. D. Protein alterations in Manduca sexta midgut and haemolymph following treatment with a sublethal dose of Bacillus thuringiensis crystal endotoxin. Insect Biochem., 1985, 15, 147-154.

Salama, H. S., Sharaby, A., et Ragaei, M. Chemical changes in the haemolymph of Spodoptera littoralis [Lep.: Noctuidae] as affected by Bacillus thuringiensis. Entomophaga, 1983, 28, 331-337.

Spies, A. G., et Spence, K. D. Effect of sublethal Bacillus thuringiensis crystal endotoxin treatment on the larval midgut of a moth, Manduca: Sem study. Tissue Cell, 1985, 17, 379-394.

Thomas, W. E., et Ellar, D. J. Bacillus thuringiensis var israelensis crystal  $\delta$ -endotoxin: Effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. J. Cell Sci., 1983, 60, 181-197.

Toumanoff, C., et Vago, C. Etudes histopathologiques des vers à soie atteints de Bacillus thuringiensis var. alesti. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 1953, 84, 376-386.

Travers, R. S., Faust, R. M., et Reichelderfer, C. F. Effects of Bacillus thuringiensis var. kurstaki  $\delta$ -endotoxin on isolated lepidopteran mitochondria. J. Invertebr. Pathol., 1976, 28, 351-356.

Undeen, A. H., et Berl, D. Laboratory studies on the effectiveness of Bacillus thuringiensis var. israelensis de Barjac against Simulium vittatum (Diptera:Simuliidae) larvae. Mosq. News, 1979, 39, 742-745.

Undeen, A. H., et Colbo, M. H. The efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis against blackfly larvae (Diptera:Simuliidae) in their natural habitat. Mosq. News, 1980, 40, 181-184.

Undeen, A. H., et Nagel, W. L. The effect of Bacillus thuringiensis ONR-60A strain (Goldberg) on Simulium larvae in the laboratory. Mosq. News, 1978, 38, 524-527.

Van Essen, F. W., et Hembree, S. C. Laboratory bioassay of Bacillus thuringiensis israelensis against all instars of Aedes aegypti and Aedes taeniorhynchus larvae. Mosq. News, 1980, 40, 424-431.

Van Essen, F. W., et Hembree, S. C. Simulated field studies with four formulations of Bacillus thuringiensis var. israelensis against

mosquitoes: residual activity and effect of soil constituents. Mosq. News, 1982, 42, 66-72.

Ward, E. S., et Ellar, D. J. Assignment of the  $\delta$ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis var. israelensis to a specific plasmid by curing analysis. FEBS, 1983, 158, 45-49.

Wood, D. M., Petewsen, B. V., Davies D. M., et Gyorkos, H. The black flies (Diptera:Simuliidae) of Ontario. Part II: Larval identification with description and illustration, Proc . Entomol. Soc. Ont., 1962, 93, 99-129.

Wraight, S. P., Molloy, D., Jamnback, H., et Mc Coy, P. Effects of temperature and instar on the efficacy of Bacillus thuringiensis var. israelensis and Bacillus sphaericus strain 1593 against Aedes stimulans larvae. J. Invertebr. Pathol., 1981, 38, 78-87.

ANNEXE A

Composition du fixateur de Bouin

|                  |       |
|------------------|-------|
| Acide picrique   | 15 ml |
| Formaldéhyde 37% | 5 ml  |
| Acide acétique   | 1 ml  |

L'acide acétique n'est ajoutée qu'au moment de l'emploi

Tiré de: Ganter et Jollés, 1969 b.

ANNEXE B

Protocole d'éclaircissement et de déshydratation après fixation par le  
Bouin

|             |                      |        |
|-------------|----------------------|--------|
| Ethanol 95% | 6,0                  | heures |
| Ethanol 95% | 6,0                  | heures |
| Ethanol 95% | 6,0                  | heures |
| Ethanol 95% | 6,0                  | heures |
| Butanol     | 12,0                 | heures |
| Butanol     | 12,0                 | heures |
| Butanol     | conservation (4,0°C) |        |

Tiré de: Ganter et Jollés, 1969 b.

ANNEXE C

Protocole d'éclaircissement et de déshydratation après fixation par

l'éthanol 70%

|             |                      |        |
|-------------|----------------------|--------|
| Ethanol 95% | 6,0                  | heures |
| Ethanol 95% | 6,0                  | heures |
| Butanol     | 12,0                 | heures |
| Butanol     | 12,0                 | heures |
| Butanol     | conservation (4,0°C) |        |

ANNEXE D

Protocole d'enrobage des larves\*

|                         |      |        |
|-------------------------|------|--------|
| Butanol:Paraplast (2:1) | 1,5  | heure  |
| Butanol:Paraplast (1:2) | 1,5  | heure  |
| Paraplast               | 1,5  | heure  |
| Paraplast               | 1,5  | heure  |
| Paraplast               | 2,0  | heures |
| Paraplast               | 16,0 | heures |

\*: La température des différents bains d'enrobage est de  $61,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ .



ANNEXE E

Protocole de déparaffinage des lames

|               |    |   |         |
|---------------|----|---|---------|
| Xylènes       | 2X | 1 | min.    |
| Ethanol 95%   | 2X | 1 | min.    |
| Ethanol 80%   |    | 1 | min.    |
| Ethanol 70%   |    | 1 | min.    |
| Ethanol 50%   |    | 1 | min.    |
| Ethanol 30%   |    | 1 | min.    |
| Eau distillée |    | 1 | min.    |
| Eau distillée |    |   | attente |

Tiré de: Charpentier, 1975.

ANNEXE F

Coloration à l'hématoxyline-éosine sur coupes

|                             |    |                     |      |
|-----------------------------|----|---------------------|------|
| Hématoxyline <sup>1</sup>   |    | 4                   | min. |
| Eau courante                |    | 4                   | min. |
| Solution Scott <sup>2</sup> |    | 3                   | min. |
| Eosine <sup>3</sup>         |    | 4                   | min. |
| Ethanol 70%                 |    | rincer (3 X 5 sec.) |      |
| Ethanol 95%                 | 2X | rincer (3 X 5 sec.) |      |
| Ethanol:Xylènes (1:1)       |    | rincer (3 X 5 sec.) |      |
| Xylènes                     | 2X | 3                   | min. |

|    |                                     |    |    |
|----|-------------------------------------|----|----|
| 1: | Hématoxyline selon Harris (Harleco) | 25 | ml |
|    | Acide acétique                      | 1  | ml |
|    | N.B. filtrer avant usage            |    |    |

|    |                                      |           |
|----|--------------------------------------|-----------|
| 2: | MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O | 2,0%      |
|    | NaHCO <sub>3</sub>                   | 0,2%      |
| 3: | Eosine (BDH, C.I. 45400)             | 0,05%     |
|    | Acide acétique                       | 0,25% v/v |
|    | Solvant: Ethanol 70%                 |           |

Tiré de: Charpentier, 1975.

ANNEXE G

Coloration à l'orangé d'acridine sur coupes

|                                       |                      |      |
|---------------------------------------|----------------------|------|
| Acide citrique 1,0%                   | 1                    | min. |
| Eau distillée                         | rincer (3 X 15 sec.) |      |
| Tampon McIlvaine <sup>1</sup> pH 3,80 | 3                    | min. |
| Orangé d'acridine <sup>2</sup>        | 5                    | min. |
| Tampon McIlvaine pH 3,80              | 2X 3                 | min. |
| 1: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>   | 0,2                  | M    |
| Acide citrique                        | 0,1                  | M    |
| 2: Orangé d'acridine (Sigma)          | 0,11%                |      |
| Tween 80 (Sigma)                      | 0,20%                | v/v  |

Tiré de: Dart et Turner, 1959.

## ANNEXE H

Composition du milieu glucose - peptone - sels

|   |          |
|---|----------|
| Glucose   | 1,0 g.   |
| Peptone   | 2,0 g.   |
| MnSO <sub>4</sub>                               | 0,05 g.  |
| ZnSO <sub>4</sub>                               | 0,005 g. |
| CaSO <sub>4</sub>                               | 0,005 g. |
| FeSO <sub>4</sub>                               | 0,005 g. |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 2,0 g.   |
| MgSO <sub>4</sub>                               | 6,3 g.   |
| CaCl <sub>2</sub>                               | 0,08 g.  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                 | 0,5 g.   |
| eau distillée                                   | 1000 ml. |

ANNEXE I

Protocole de marquage en immunofluorescence

|  |         |    |    |        |
|--|---------|----|----|--------|
| Sérum de lapin anti-cristaux de <u>B.t.i.</u> 20,0% v/v  |         |    | 1  | heure  |
| PBS <sup>1</sup>   | pH 7,40 |    |    | lavage |
| PBS  | pH 7,40 | 2X | 15 | min.   |
| Sérum FITC anti anti-corps de lapin (Miles-Yeda) 40% v/v |         |    | 1  | heure  |
| PBS  | pH 7,40 | 2X | 15 | min.   |
| Observation immédiate                                    |         |    |    |        |

|    |                                      |       |
|----|--------------------------------------|-------|
| 1: | NaCl                                 | 0,80% |
|    | KCl                                  | 0,02% |
|    | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>     | 0,12% |
|    | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,02% |
|    | MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O | 0,01% |
|    | CaCl <sub>2</sub>                    | 0,01% |