

Évaluation de l'efficacité de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus velezensis* sur *Anopheles gambiae* (Giles, 1902), vecteur majeur du paludisme en Côte d'Ivoire

Zoumana OUATTARA¹, Mahama TOURE¹, Anne Marie Boby OUASSA¹, Eric Yapi YAPI², Fulgence Yao KOFFI³, Armist Aboa TEHUA⁴ et Salifou KONE^{1*}

¹ Université Alassane Ouattara de Bouaké, Centre d'Entomologie Médicale et Vétérinaire, BP V18 Bouaké, Côte d'Ivoire

² Centre National de Recherche Agronomique, Station de recherche technologique, 01 BP 1740 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

³ Université Péléfro Gon Coulibaly, UFR des Sciences Biologiques, Département de Biochimie-Génétique, BP 1328 Korhogo, Côte d'Ivoire

⁴ Université Péléfro Gon Coulibaly, UFR des Sciences Biologiques, Département de Biologie Végétale, BP 1328 Korhogo, Côte d'Ivoire

(Reçu le 09 Juillet 2026 ; Accepté le 24 Août 2026)

* Correspondance, courriel : konesalifou76@yahoo.fr

Résumé

Cette étude avait pour objectif d'évaluer l'efficacité larvicide de trois bactéries, *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, isolées à partir de mangues à Korhogo et *Pseudomonas fluorescens*, isolée à partir de tomates à Abidjan, en Côte d'Ivoire, sur des larves d'*Anopheles gambiae* de stades 3 et 4. L'évaluation s'est faite au laboratoire et à température ambiante au Centre d'entomologie médicale et vétérinaire de Bouaké. Les larves de moustiques soumises aux tests de sensibilité aux larvicides, selon la méthode de l'OMS étaient de la souche de référence sensible *Kisumu* et la souche résistante Yaokoffikro. Au laboratoire, *B. subtilis*, *B. velezensis* et *P. fluorescens* ont induit 100% de mortalité sur *Kisumu* et 89%, 84%, et 77% de mortalité sur la souche Yaokoffikro avec les concentrations respectives de 0,9 mg/l, 2,7mg/l et 1,5 mg/l. En revanche à la température ambiante, *B. subtilis*, *B. velezensis* et *P. fluorescens* n'ont induit que 81% de mortalité sur *Kisumu* et 80%, 78% et 49% de mortalité sur la souche Yaokoffikro avec les mêmes concentrations. Concernant les doses létales, au laboratoire, sur *Kisumu* les DL99 ont été comprises entre 1,068 et 7,261 mg/l et au niveau de la souche Yaokoffikro entre 1,874 mg/l et 90,331 mg/l. Par contre à la température ambiante sur *Kisumu* les DL99 ont été comprises entre 2,349 mg/l et 14,155 mg/l, tandis que sur la souche Yaokoffikro, elles ont été comprises entre 2,463 mg/l et 90,980 mg/l. Les trois biolarvicides ont montré une activité larvicide variant d'une espèce de moustique à une autre avec une possible action inhibitrice de la température et de la lumière. Le *Bacillus subtilis* a été plus efficace contre les larves d'anophèles.

Mots-clés : biopesticides, Activités larvicides, *Anopheles gambiae*, *Kisumu*, Yaokoffikro, Côte d'Ivoire.

Abstract

Evaluation of the effectiveness of *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, and *Bacillus velezensis* on *Anopheles gambiae* (giles, 1902), a major vector of malaria in Côte d'Ivoire

This study aimed to evaluate the larvicidal efficacy of three bacteria, *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis*, isolated from mangoes in Korhogo, and *Pseudomonas fluorescens*, isolated from tomatoes in Abidjan, Côte d'Ivoire, on *Anopheles gambiae* larvae of instars 3 and 4. The evaluation was carried out in the laboratory and at room temperature at the medical and veterinary entomology center in Bouaké. The mosquito larvae subjected to susceptibility testing, according to the WHO method, were of the susceptible reference strain Kisumu and the resistant strain Yaokoffikro. In the laboratory, *B. subtilis*, *B. velezensis*, and *P. fluorescens* induced 100% mortality in Kisumu and 89%, 84%, and 77% mortality in the Yaokoffikro strain at respective concentrations of 0.9 mg/L, 2.7 mg/L, and 1.5 mg/L. In contrast, at room temperature, *B. subtilis*, *B. velezensis*, and *P. fluorescens* induced only 81% mortality on Kisumu and 80%, 78%, and 49% mortality on the Yaokoffikro strain at the same concentrations. Regarding lethal doses, in the laboratory, on Kisumu the LD99 were between 1.068 and 7.261 mg/l and at the level of the Yaokoffikro strain, between 1.874 mg/l and 90.331 mg/l. However, at room temperature on Kisumu the LD99s were between 2.349 mg/l and 14.155 mg/l, while on the Yaokoffikro strain, they were between 2.463 mg/l and 90.980 mg/l. The three biolarvicides showed varying larvicidal activity depending on the mosquito species with a possible inhibitory effect of temperature and light. *B. subtilis* was more effective against *Anopheles* larvae.

Keywords : *Biopesticides, Larvicidal activities, Anopheles gambiae, Kisumu, Yaokoffikro, Côte d'Ivoire.*

1. Introduction

Les moustiques constituent l'un des groupes d'insectes les plus importants. Non seulement, ils causent des nuisances par leurs piqûres, mais ils transmettent également des maladies mortelles tel que le paludisme [1]. Cette maladie contribue significativement à la pauvreté et à la fragilité sociale dans les pays tropicaux, causant des millions de décès chaque année [2, 3]. En 2023, 263 millions de cas cliniques ont été recensés, dont 95 % dans les pays d'Afrique subsaharienne, et l'on estime à 597 000 le nombre de décès dus au paludisme [4]. Cette maladie endémique est l'une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les nourrissons et les jeunes enfants [4]. En Côte d'Ivoire, la prévalence hospitalière est de 33% avec une incidence annuelle de 267,6 cas pour 10 000 enregistrée en 2023 [5]. L'augmentation mondiale des cas de paludisme vers la fin des années 1970, conjuguée aux résultats insuffisants des stratégies d'éradication dans de nombreux pays, notamment tropicaux, a conduit à la recherche concertée de nouvelles méthodes de lutte. Cette évolution est due en grande partie à l'émergence de souches résistantes de *Plasmodium falciparum*, agent pathogène du paludisme à la chloroquine et à la sulfadoxine-pyriméthamine (SP), les traitements de base [6]. En général, la lutte contre les vecteurs du paludisme se fait par l'utilisation de spirale, les pulvérisations d'insecticides chimiques à l'intérieur et à l'extérieur des habitations et surtout l'usage de moustiquaires imprégnées d'insecticides. Ces pratiques pourraient constituer une menace pour les écosystèmes et avoir un impact souvent limité à cause de la résistance développée par les moustiques. Une alternative importante aux insecticides chimiques est donc la lutte biologique, qui consiste à réguler les populations de ravageurs à l'aide d'agents de lutte naturels tels que les prédateurs, les nématodes et les insecticides microbiens [7]. Plusieurs auteurs ont constaté que les organismes utilisés dans les insecticides microbiens sont essentiellement non toxiques et non pathogènes pour les organismes non ciblés [8]. La sécurité offerte par les insecticides microbiens est leur plus grande force, car ils sont sans danger pour les organismes non ciblés, protégeant ainsi l'environnement et la santé. Il a été démontré que les bactéries et

les champignons tuent les moustiques à des degrés divers [9]. *Bacillus thuringiensis var israeliensis* (BTI) et *Bacillus sphaericus* sont utilisés dans des essais sur le terrain à l'échelle mondiale conçus pour contrôler la population de moustiques [10]. Par ailleurs, l'efficacité des souches bactériennes, *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis* et *Pseudomonas fluorescens*, isolées respectivement à partir de mangues à Korhogo et de tomates à Abidjan en Côte d'Ivoire [11, 12] et éléments potentiels de bio contrôle et de protection des cultures et/ ou des animaux d'élevage n'a jamais été évaluée sur les moustiques en général et les vecteurs du paludisme en particulier. L'objectif général de ce travail est d'évaluer l'efficacité de *B. subtilis*, *B. velezensis* et *P. fluorescens*, sur *Anopheles gambiae*, vecteur majeur du paludisme en Côte d'Ivoire.

2. Méthodologie

2-1. Zone d'étude

Cette étude a été réalisée au sein du laboratoire d'entomologie du Centre d'Entomologie Médicale et Vétérinaire (CEMV) de l'Université Alassane Ouattara de Bouaké (**Figure 1**) d'avril à septembre 2023. Chef-lieu de la région du Gbèkè, la ville de Bouaké (7° 41' 00" N, 5° 01' 59" O) est située au centre de la Côte d'Ivoire à environ 347 km d'Abidjan ; la capitale économique du pays. C'est la deuxième ville la plus peuplée de la Côte d'Ivoire [13]. Bouaké bénéficie d'un climat de type tropical avec deux grandes saisons dont une pluvieuse allant de mars à octobre et une sèche comprise entre novembre et février. La pluviométrie varie de 1 000 mm à 1 700 mm avec une température moyenne généralement comprise entre 25°C et 38°C avec [14].

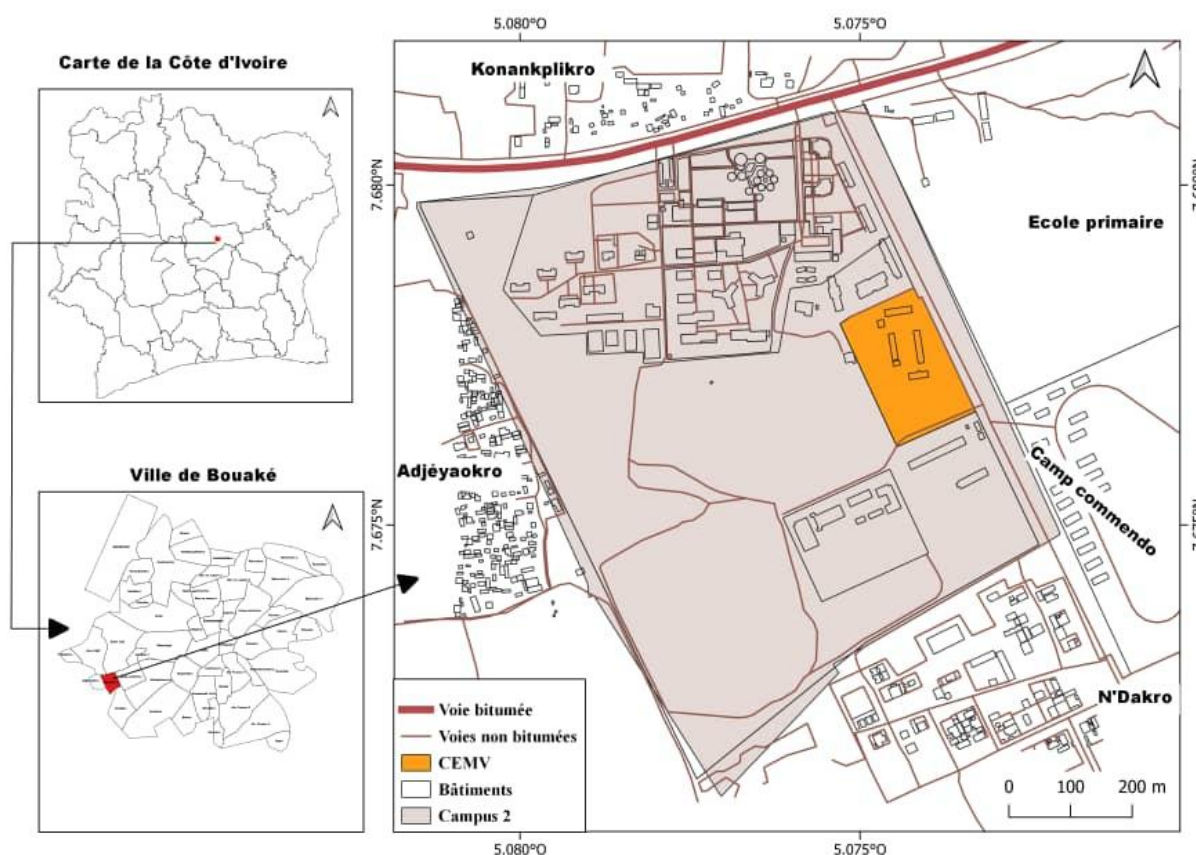


Figure 1 : Carte de la Côte d'Ivoire situant la ville de Bouaké où se trouve le Centre d'Entomologie Médicale et Vétérinaire (CEMV)

2-2. Matériel biologique

Le matériel biologique est composé d'une part de larves d'*An. gambiae* issues de la souche de référence sensible *Kisumu*, de la souche Yaokoffikro (résistante aux insecticides chimiques), et d'autre part, des extraits liquides de bactéries *P. fluorescens*, *B. subtilis* et *B. Velezensis* (**Figure 2**) sans oublier le BTI (*Bacillus thuringiensis israelensis*) VectoBac 374 WG.



Figure 2 : Matériel Biologique à l'insectarium

A : Bac contenant des larves d'Anopheles gambiae de la souche sensible Kisumu

B : Assiette à fond blanc contenant des larves d'Anopheles gambiae s.l. issues de Yaokoffikro.

2-3. Matériel technique

Le matériel technique comprend le matériel de laboratoire et le matériel de prospection larvaire. Il est notamment constitué de Pilulier, louches, plateaux émaillés, scotchs en papier, pipettes, micropipettes 100 ml et 200 ml, pipette 10 ml, tubes en plastique de 12 ml avec bouchons ou sans bouchons, gobelets en plastique de 120 ml, erlenmeyer, éprouvette graduée, gants, cônes jaunes et bleus, marqueurs, stylos, centrifugeuse, étuve.

2-4. Préparation des biolarvicides

La poudre de *BTI* (VectoBac 374 WG), 3000 ITU/mg a été utilisée comme poudre de référence. Pour préparer des stocks de produit de référence, 100 mg de produit solide ont été pesés dans un récipient, auquel il a été ajouté 1000 ml d'eau distillée produisant ainsi une solution de 1% ou 10 mg/L. Les insecticides testés sont d'origine bactérienne. Il s'agit de *B. subtilis*, *B. velezensis*, et *P. fluorescens*, des bactéries isolées respectivement à partir de mangues à Korhogo et de tomates à Abidjan en Côte d'Ivoire [11, 12]. La préparation s'est faite en deux étapes. La préculture a été réalisée en préparant 150 mL de milieu YPG (Yeast extract-peptone-glucose) repartit dans des erlenmeyers stériles en raison de 50 mL par erlenmeyer. Ensuite, ces différents milieux ont été inoculés chacun avec une colonie âgée de 24h des trois agents de biocontrôle bactérien (*Pseudomonas* sp, *B. subtilis* et *B. velezensis*) préalablement isolés sur milieu solide [15]. La préculture est ensuite incubée à 30°C pendant 8 heures sous une agitation de 155 rpm. Cette préculture a servi à préparer le surnageant bactérien. La culture bactérienne a été réalisée dans des bouteilles stériles de 300 mL contenant 200 mL de milieu YPG. Ces milieux ont été respectivement inoculés avec 50 mL de préculture de chaque agent de biocontrôle bactérien, ils ont par la suite été mis sous agitation à 155 rpm à 30°C pendant 72 heures. L'oxygène dissous était fixé à 30 % et le flux d'air ajusté entre 2 et 2,5 litres après 72 heures. La culture bactérienne obtenue a été centrifugée à 6000 rpm à 4°C pendant 10 minutes à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée (de marque ACM-CFG-54251, Inde). Le surnageant a été recueilli dans des bidons stériles de 300 mL et conservés à 4°C [15]. Les tests ont été réalisés avec les concentrations croissantes de chaque insecticide (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Concentration des larvicides testés

Insecticides	Concentrations (mg/l)
<i>BTI</i>	0,005 ; 0,008 ; 0,01 ; 0,02 ; 0,03 ; 0,04 ; 0,05 ; 0,06 ; 0,07
<i>B. subtilis</i>	0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,25 ; 0,30 ; 0,50 ; 0,70 ; 0,90 ; 1,0
<i>B. velezensis</i>	0,5 ; 1,5 ; 2 ; 2,2 ; 2,3 ; 2,4 ; 2,5 ; 2,6 ; 2,7 ; 2,8 ; 2,9 ; 3,0 ; 3,1
<i>P. fluorescens</i>	0,02 ; 0,06 ; 0,1 ; 0,3 ; 0,5 ; 0,7 ; 0,9 ; 1,1 ; 1,3 ; 1,5 ; 1,7

2-5. Collecte et élevage des larves

Les larves de la souche Yaokoffikro ont été prélevées à la louche (méthode du Dipping ou coup de louche) ou directement à la pipette dans la localité de Yaokoffikro. Yaokoffikro (7°11' N, 5°1' O) est un village disposant de périmètres rizicoles situé dans la zone périurbaine de Bouaké. C'est un site expérimental où sont construites des cases par l'Institut Pierre Richet (IPR) pour l'évaluation des insecticides. Il s'agit d'une zone de forte résistance d'*An. gambiae* aux pyréthrinoides. Les larves collectées ont été transvasées dans des bacs en plastique contenant de l'eau de leurs gîtes respectifs. Ces bocaux ont subi un traitement préalable sur le terrain consistant à les débarrasser des différents débris. Les bacs ont été par la suite marqués puis ramenés au laboratoire du Centre d'Entomologie Médicale et Vétérinaire (CEMV) de l'Université Alassane Ouattara (UAO) de Bouaké, au niveau duquel elles ont été triées et réparties par stade larvaire (stade 3 et 4). Pour les œufs de moustiques de souches *Kisumu*, après acquisition, la mise en eau a été faite au laboratoire (T : 26 – 30°C ; HR : 70 à 80%). Les larves de stades 3 ont été obtenues au bout d'une durée d'environ six jours après cette mise en eau.

2-6. Conduite des bioessais

Les bioessais ont été réalisés sur les larves de la souche de référence sensible *Kisumu* et celles de la souche sauvage Yaokoffikro d'*An. gambiae* s.l. Quatre lots de 25 larves de stades 3 ou 4 ont été utilisés pour les tests (**Figure 3**) selon la méthode de l'OMS [16, 17]. Les récipients d'essai sont maintenus à une température de 25 à 28 °C et de préférence soumis à une photopériode de 12 h de lumière suivies de 12 h d'obscurité. Brièvement, les larves triées ont été essorées à l'aide d'une passoire avant d'être introduites dans des gobelets tests contenant les différentes solutions de biopesticides. Tous les résultats des tests larvaires ont été lus après 24 d'exposition pour les trois biopesticides (*B. subtilis*, *B. velezensis*, et *P. fluorescens*). A chaque lecture, le nombre de larves mortes et celles nymphosées pour chaque concentration ont été dénombrées et reportées sur des fiches (Figure 3B). Toute larve nymphosée est retirée du test. L'essai est à reprendre quand plus de 10% de larves ont nymphosées dans les lots témoins ou si la mortalité de celles-ci est supérieure ou égale à 20%. Si la mortalité des témoins est comprise entre 5 et 20%, le taux de mortalité est corrigé par la formule d'Abbott [18]. Au-delà de 20 % de mortalité des témoins, le test n'est pas validé.



Figure 3 : Exposition des larves d'anophèles aux différentes concentrations des biolarvicides

2-7. Analyse des données

Les données ont été saisies à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2016. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Polo Plus, version 1.0 [19] avec un intervalle de confiance statistique à 95 % et une valeur $p < 0,05$ considérée comme significative [20]. Les taux de mortalité ont été analysés selon les seuils de sensibilité définis par l'OMS [21]. Les analyses LC probit ont été réalisées pour déterminer les doses létales (DL50 et DL99) des différents larvicides. Polo plus est un progiciel regroupant quatre modules statistiques. Le test du khi-deux (ou chi-carré, χ^2) a été utilisé pour analyser les données et déterminer s'il existe une association ou une différence significative entre les DL.

3. Résultats

3-1. Sensibilité des larves d'*An. gambiae* souche *Kisumu* et souche Yaokoffikro aux larvicides

- **Avec la souche sensible Kisumu**

Les résultats des bioessais ont montré des taux de mortalité allant de 1% à 100% sur les larves d'*An. gambiae* souche *Kisumu*. Au laboratoire, la dose de 0,9 mg/l de *B. subtilis* a induit un taux de mortalité de 100%, supérieur au seuil de sensibilité défini par l'OMS. Cependant, à température ambiante ce taux est de 81% avec la même dose (**Figure 4**). Pour les deux autres larvicides (*B. velezensis* et *P. fluorescens*), les doses nécessaires pour avoir un taux de mortalité de 98% sont plus élevées. La dose de 2,7 mg/l de *B. velezensis* a induit un taux de mortalité de 100% au laboratoire, supérieur au seuil de sensibilité de l'OMS, et 81% à température ambiante (**Figure 5**). Avec *P. fluorescens*, 1,5 mg/l ont été utilisés pour obtenir un taux de mortalité au laboratoire supérieur à 98% (seuil de sensibilité de l'OMS) et 81% à température ambiante (**Figure 6**).

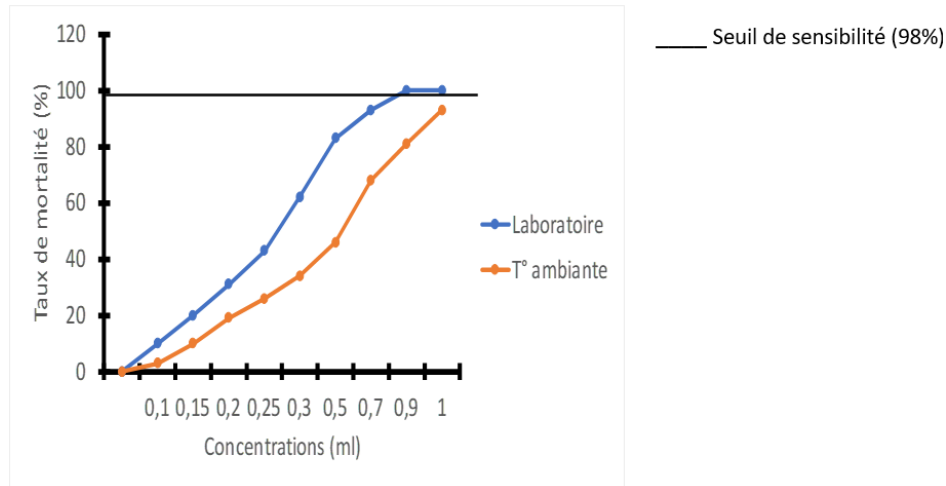


Figure 4 : Évolution des taux de mortalité d'*An. gambiae*, souche Kisumu induit par *B. subtilis* au laboratoire et à température ambiante

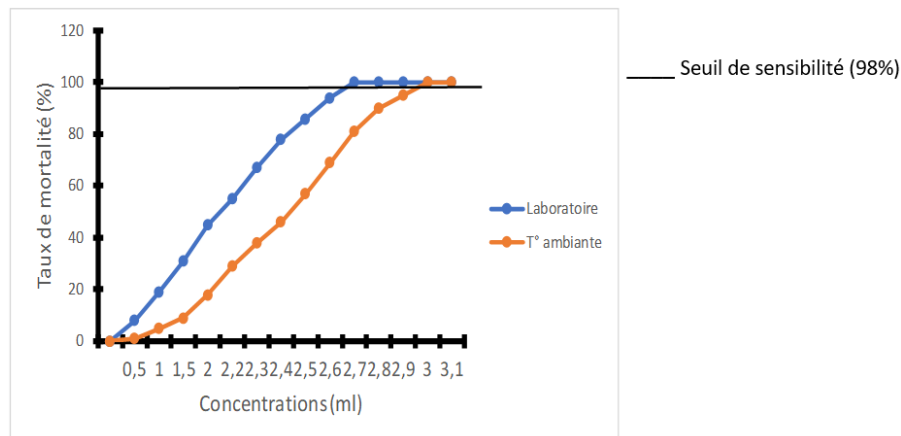


Figure 5 : Évolution des taux de mortalité d'*An. gambiae*, souche Kisumu induite par *B. velezensis* au laboratoire et à température ambiante

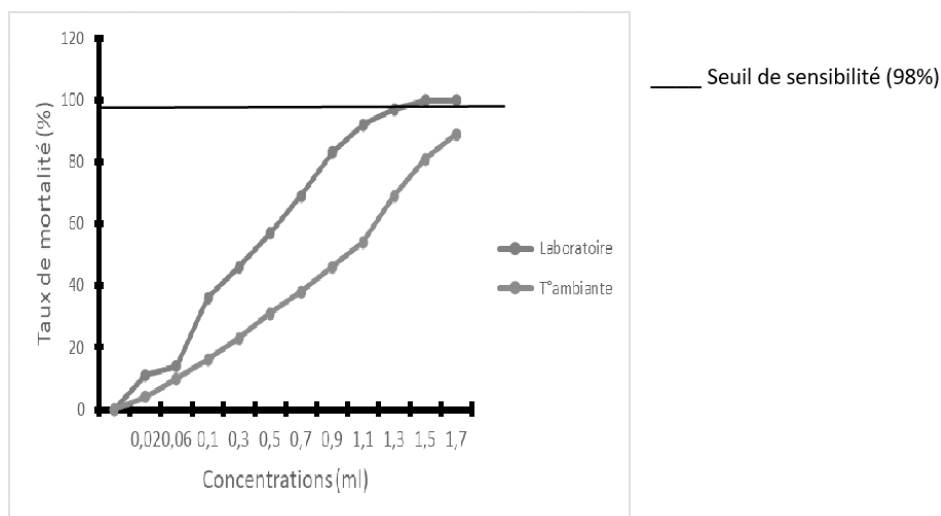


Figure 6 : Évolution des taux de mortalité d'*An. gambiae*, souche Kisumu induit par *P. fluorescens* au laboratoire et à température ambiante

• **Avec la souche de Yaokoffikro**

Avec la souche d'*An. gambiae* Yaokoffikro les taux de mortalité des larves varient de 2,00% à 98%. Ces taux de mortalité sont inférieurs à ceux obtenus avec la souche de référence *Kisumu*. Au laboratoire, la dose de 1,0 mg/l de *B. subtilis* a induit un taux de mortalité de 98%. Par contre à température ambiante le taux de mortalité a été de 91% avec la même dose (**Figure 7**). Pour *B. velezensis*, la dose nécessaire pour avoir un taux de mortalité de 98% est plus élevée. La dose de 3,1 mg/l de *B. velezensis* a induit un taux de mortalité de 98% au laboratoire, équivalent au seuil de sensibilité de l'OMS, et 96% à température ambiante (**Figure 8**). Avec *P. fluorescens*, la dose de 2,3 mg/l a provoqué un taux de mortalité de 100% au laboratoire, taux supérieur au seuil de sensibilité de l'OMS, et 93% à température ambiante la (**Figure 9**).

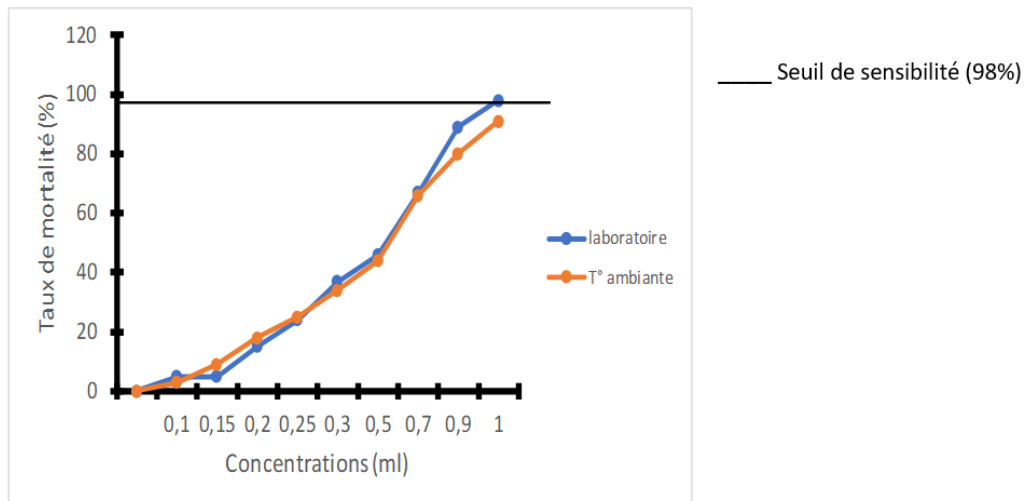


Figure 7 : Évolution des taux de mortalité d'*An. gambiae*, souche Yaokoffikro induite par *B. subtilis* au laboratoire et à température ambiante

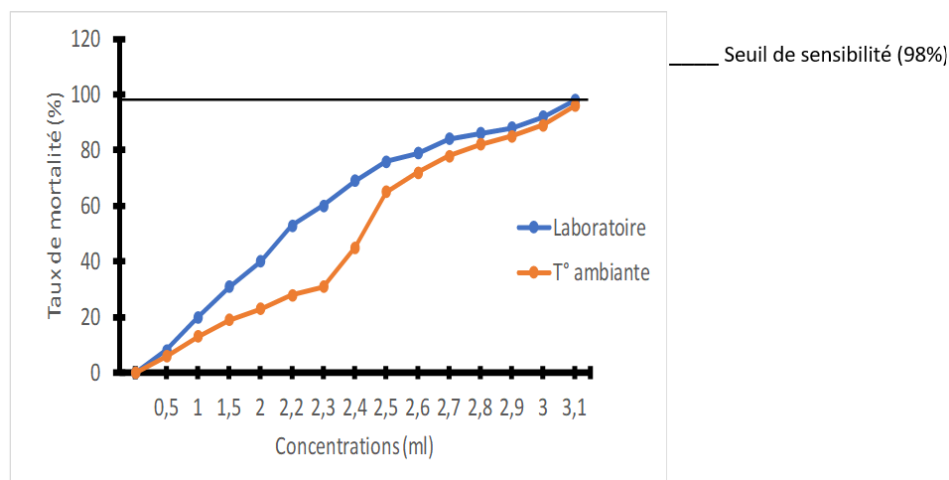


Figure 8 : Évolution des taux de mortalité d'*An. gambiae*, souche Yaokoffikro induite par *B. velezensis* au laboratoire et à température ambiante

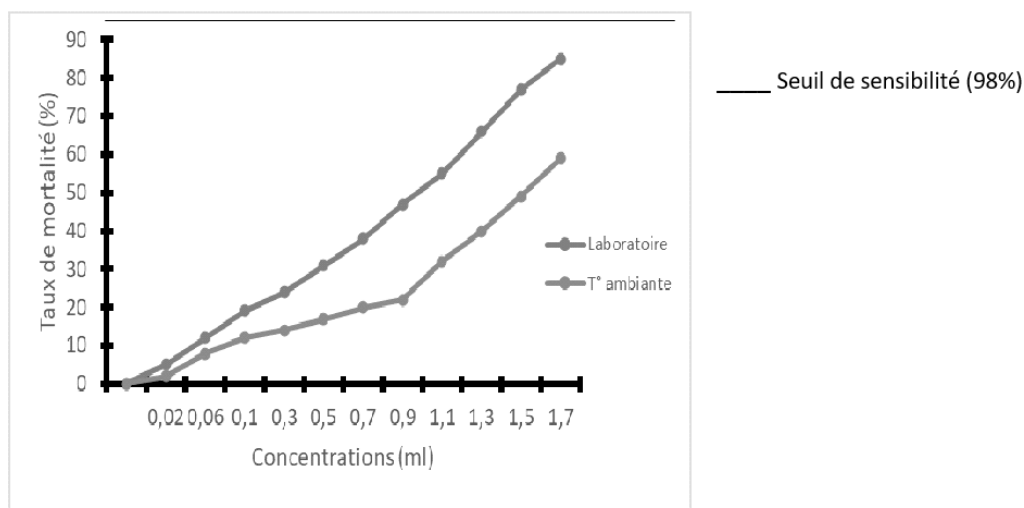


Figure 9 : Évolution des taux de mortalité d'*An. gambiae*, souche Yaokoffikro induite par *P. fluorescens* au laboratoire et à température ambiante

3-2. Détermination des doses létales

• Détermination des doses létales au laboratoire

Le **Tableau 2** présente les doses létales à 50% (DL50) et à 99% (DL99) des différents larvicides. Chez *An. gambiae* souche *Kisumu*, 0,257 mg/l et 1,068 mg/l de *B. subtilis* ont suffi pour tuer respectivement 50% et 99% de larves. Tandis que les autres larvicides, *B. velezensis* et *P. fluorescens* ont présenté des DL (50) et DL (99) différentes et plus élevées que celles de *B. subtilis*. D'une part, les valeurs de la DL (50) ont été de : 1,580 mg/l pour *B. velezensis* et de 0,203 mg/l pour *P. fluorescens*, et d'autre part pour la DL (99) elles ont été de 4,483 mg/l pour *B. velezensis* et de 7,261 pour *P. fluorescens*. Pour chacun des larvicides, les DL (50) et DL (99) observées chez la souche Yaokoffikro sont plus élevées que celles observées chez la souche *Kisumu*. En outre, les plus faibles DL ont été observées avec *B. subtilis* : DL (50) = 0,401 mg/l et DL (99) = 1,874 mg/l, tout comme chez la souche *Kisumu*.

Tableau 2 : DL 50 et DL 99 d'*An. gambiae* souche *Kisumu* et souche Yaokoffikro au laboratoire

Larvicides	<i>An. gambiae</i> (<i>Kisumu</i>)		<i>An. gambiae</i> (Yaokoffikro)	
	DL 50 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 99 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 50 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 99 (IC _{95%}) (mg/l)
<i>BTI</i>	0,006 (0,004-0,008)	0,051 (0,037-0,092)	0,006(0,004-0,008)	0,051 (0,037-0,092)
<i>B. subtilis</i>	0,257 (0,240-0,274)	1,068 (0,925-1,272)	0,401 (0,366-0,439)	1,874 (1,532-2,425)
<i>B. velezensis</i>	1,580 (1,392-1,736)	4,483 (3,813-5,747)	1,712 (1,582-1,829)	6,428 (5,468-8,021)
<i>P.fluorescens</i>	0,203 (0,166-0,245)	7,261 (4,764-12,583)	0,814 (0,681-0,997)	90,331 (44,53-234,861)

• Détermination des doses létales à température ambiante

Les doses létales à 50% (DL50) et à 99% (DL99) des différents larvicides à température ambiante sont relativement plus élevées que celles observées au laboratoire. Pendant que chez *An. gambiae* souche *Kisumu*, 0,257 mg/l et 1,068 mg/l de *B. subtilis* ont suffi pour tuer respectivement 50% et 99% de larves au laboratoire, à température ambiante il faut une DL50 de 0,416 mg/l et une DL99 de 2,349 mg/l (**Tableau 3**). Ensuite avec *B. velezensis*, 1, 580 mg/l et 4,483 mg/l ont permis d'éliminer au laboratoire de façon respective 50% et 99% de larves au laboratoire, quand il a fallu 0,416 mg/l et 2,369 mg/l pour les mêmes résultats à température ambiante. Enfin avec *P.fluorescens* ; 50% et 99% des larves ont été éliminés

respectivement par 0,203 mg/l et 7,261 mg/l au laboratoire contre 0,586 mg/l et 14,155 mg/l à température ambiante. Concernant la souche Yaokoffikro, les doses nécessaires au laboratoire avec *B. subtilis* ont été de 0,401 mg/l pour la DL50 et 1,874 mg/l pour la DL99 ; à température ambiante, ces doses se sont élevées à 0,429 mg/l et 2,463 mg/l. Lorsque pour *B. velezensis* 1,712 mg/l et 6,428 mg/l ont permis d'éliminer respectivement 50% et 99% de larves au laboratoire contre 2,118 mg/l et 7,008 mg/l à température ambiante. Enfin, pour *P. fluorescens*, les valeurs au laboratoire sont de 0,814 mg/l pour la DL50 et 90,331 mg/l pour la DL99, alors qu'à température ambiante, elles ont atteint respectivement 1,480 mg/l et 90,980 mg/l.

Tableau 3 : DL 50 et DL 99 d'*An. gambiae* souche Kisumu et souche Yaokoffikro à température ambiante

Larvicides	<i>An. gambiae</i> (Kisumu)		<i>An. gambiae</i> (Yaokoffikro)	
	DL 50 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 99 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 50 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 99 (IC _{95%}) (mg/l)
<i>BTI</i>	0.006 (0,004-0,008)	0,051 (0,037-0,092)	0.006(0,004-0,008)	0,051 (0,037-0,092)
<i>B. subtilis</i>	0,416 (0,388-0,447)	2,349 (1,975-2,896)	0,429 (0,400-0,461)	2,463 (2,064-3,050)
<i>B. velezensis</i>	0,416 (0,388-0,447)	2,369 (2,069-2,762)	2,118 (1,909-2,313)	7,008 (5,389-11,209)
<i>P. fluorescens</i>	0,586 (0,482-0,702)	14,155(8,767-27,727)	1,480 (1,161-2,016)	90,980 (36,289-397,636)

• **Détermination des doses létales chez les larves d'*An. gambiae* souche Kisumu en fonction de la température au laboratoire**

Les doses létales à 50% (DL50) et à 99% (DL99) des différents larvicides observés à 25°C, sont les plus faibles qui induisent des taux de mortalité chez *Anopheles gambiae* souche Kisumu (**Tableau 4**). A 25°C, 0,338 mg/l (DL50) et 0,931 mg/l (DL99) de *Bacillus subtilis* suffisent pour tuer les larves d'*Anopheles gambiae* souche Kisumu, alors qu'à 30°C il faut 0,548 mg/l (DL50) et 1,708 mg/l (DL99), et à 35°C il faut 0,567 mg/l (DL50) et 1,873 mg/l (DL99). Avec *Bacillus velezensis*, 2,260 mg/l (DL50) et 2,727 mg/l (DL99) tuent les larves de Kisumu à 25°C. A 30°C il faut 2,429 mg/l (DL50) et 3,194 mg/l (DL99), et à 35°C il faut 2,448 mg/l (DL50) et 3,253 mg/l (DL99). Pour *Pseudomonas fluorescens*, à 25°C 0,663 mg/l (DL50) et 1,415 mg/l (DL99), sont nécessaires pour tuer les larves de Kisumu. à 30°C il faut 0,934 mg/l (DL50) et 3,365 mg/l (DL99), et à 35°C il faut 0,989 mg/l (DL50) et 3,595 mg/l (DL99).

Tableau 4 : DL 50 et DL 99 d'*Anopheles gambiae* souche Kisumu à différentes températures au laboratoire

Larvicides	<i>An. gambiae</i> (Kisumu) 25°C		<i>An. gambiae</i> (Kisumu) 30°C		<i>An. gambiae</i> (Kisumu) 35°C	
	DL 50 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 99 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 50 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 99 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 50 (IC _{95%}) (mg/l)	DL 99 (IC _{95%}) (mg/l)
<i>BTI</i>	0.006 (0,004 - 0,008)	0,051 (0,037 - 0,092)	0.006 (0,004 - 0,008)	0,051 (0,037 - 0,092)	0.006 (0,004 - 0,008)	0,051 (0,037 - 0,092)
<i>B. subtilis</i>	0.338 (0.225 - 0.407)	0.931 (0.803 - 1.275)	0.548 (0.488 - 0.594)	1.708 (1.415 - 2.329)	0.567 (0.506 - 0.615)	1.873 (1.521 - 2.652)
<i>B. velezensis</i>	2.260 (2.118 - 2.328)	2.727 (2.649 - 2.906)	2.429 (2.357 - 2.472)	3.194 (3.003 - 3.629)	2.448 (2.381 - 2.490)	3.253 (3.042 - 3.751)
<i>P. fluorescens</i>	0.663 (0.470 - 0.766)	1.415 (1.266 - 1.829)	0.934 (0.797 - 1.017)	3.365 (2.493 - 9.505)	0.989 (0.868 - 1.069)	3.595 (2.625 - 7.140)

Dans l'ensemble, les analyses statistiques ont montré une différence significative entre les taux de mortalité observés avec les différentes souches de larves pour chacun des biolarvicides. La comparaison entre les taux de mortalité induite au laboratoire par *B. subtilis* sur la souche Kisumu et la souche Yaokoffikro a montré une différence significative ($\chi^2 = 91,11$, $df = 2$ et $p < 0,05$). Cette comparaison a également montré une différence significative entre ces deux souches de larves avec *B. velezensis*

($\chi^2 = 34,03$, $df = 2$, $p < 0,05$) et avec *P. fluorescens* ($\chi^2 = 167$, $df = 2$ et $p < 0,05$). A la température ambiante, la comparaison entre les mortalités enregistrées sur la souche *Kisumu* et la souche Yaokoffikro avec *B. subtilis* n'a montré aucune différence significative ($\chi^2 = 0,38$, $df = 2$, $p > 0,05$). Par contre cette comparaison a montré une différence significative respectivement avec les mortalités induites par *B. velezensis* ($\chi^2 = 61,50$, $df = 2$, $p < 0,05$) et celles observées avec *P. fluorescens* ($\chi^2 = 113$, $df = 2$, $p < 0,05$).

4. Discussion

4-1. Sensibilité des larves d'*An. gambiae* souche *Kisumu* et souche Yaokoffikro aux larvicides

La lutte antilarvaire réalisée en complément des Moustiquaires Imprégnées à Longue Durée d'Action et de la Pulvérisation Intra domiciliaire pourrait fortement contribuer à la réduction de la transmission du paludisme [22, 23]. L'étude de la sensibilité des larves d'*Anopheles gambiae* aux larvicides biologiques constitue donc un élément essentiel pour l'évaluation des stratégies de lutte antivectorielle basées sur la gestion des stades larvaires. Dans cette étude, l'efficacité de trois biolarvicides a été testée. Il s'agit de *B. subtilis*, *B. velezensis* et *P. fluorescens*, isolés respectivement à partir de mangues à Korhogo et de tomates à Abidjan en Côte d'Ivoire [11, 12]. Ces trois larvicides microbiens ont été testés au laboratoire et à température ambiante sur les larves d'*An. gambiae* souche *Kisumu* et souche Yaokoffikro. Les résultats des tests ont montré que ces biolarvicides ont induit des mortalités élevées en conditions de laboratoire, souvent supérieures ou proches du seuil de sensibilité de 98 % défini par l'OMS, surtout avec *B. subtilis* qui a présenté une bonne efficacité aussi bien sur les larves d'*An. gambiae* souche *Kisumu* que sur celles de la souche Yaokoffikro. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés dans certaines régions africaines montrant la sensibilité des stades larvaires d'*Anopheles* face aux larvicides microbiens tels que *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) et *Bacillus sphaericus* (Bs) [22, 24 - 27]. Les résultats obtenus au laboratoire au cours de la présente étude indiquent également que *B. velezensis* et *P. fluorescens*, bien qu'ayant conservé une certaine efficacité, se sont révélés moins actifs que *B. subtilis* sur les deux souches larvaires testées. Cette tendance corrobore les conclusions de plusieurs travaux antérieurs, qui ont placé *B. subtilis* en tête de plusieurs agents larvicides microbiens. Ainsi, une étude menée au Nigeria [28] a montré sa supériorité face à *Pseudomonas aeruginosa* et à *Bacillus polymyxa*. Par ailleurs, un rapport de l'Anses sur les insecticides potentiels pour la lutte antivectorielle conforte cette position avec le classement de *B. subtilis* en bonne place selon l'échelle SIRIS de toxicité/écotoxicité, parmi 129 substances évaluées [29]. Ces éléments placent *B. subtilis* comme un candidat larvicide biologique prometteur, méritant des recherches approfondies en vue d'une possible intégration dans l'arsenal des outils complémentaires de lutte antivectorielle pour l'élimination du paludisme.

4-2. Détermination des doses létales à température ambiante et chez les larves d'*An. gambiae* souche *Kisumu* en fonction de la température au laboratoire

Au niveau des doses létales (DL50 et DL99), les analyses ont révélé que chez la souche sensible *Kisumu* en laboratoire, *B. subtilis* a présenté les plus faibles doses létales (DL) pour provoquer respectivement 50 % et 99 % de mortalité, ce qui témoigne d'une bonne efficacité de ce biolarvicide en milieu contrôlé. Par contre *B. velezensis* et *P. fluorescens* ont requis des concentrations plus élevées, ce qui illustre des profils d'efficacité variables selon la nature du biolarvicide, comme cela a été observé dans des études comparatives de larvicides microbiens [22]. Par ailleurs, il faut souligner que tous les biolarvicides testés sont relativement plus efficaces au laboratoire qu'à température ambiante. De plus les doses létales

(DL50 et DL99) ont augmenté chez la souche *kisumu* avec l'augmentation de la température au laboratoire. Cela montre que certains facteurs environnementaux tels que la température et la lumière peuvent impacter l'efficacité de ces biolarvicides. Les résultats obtenus au laboratoire orientent sur ce constat et suggèrent d'envisager des formulations protégeant les principes actifs contre les variations de températures pour un usage opérationnel. D'autres études ont fait le même constat, avec la mise en évidence d'une diminution de l'activité toxique de *B. sphaericus*, poudre Stauffer à 70°C et la perte totale de cette activité à 100°C sur les larves de stade 4 d'*An. stephensi* ST15 [30]. Par ailleurs un essai biologique standard en laboratoire a permis d'évaluer la perte d'activités larvicides de diverses formulations après avoir été exposé à différentes températures de stockage et de manipulation. De plus, le transport de produits dans des conditions extérieures pendant une période prolongée a entraîné une perte d'activité plus importante que dans d'autres conditions [31].

5. Conclusion

Les travaux effectués ont montré que des doses relativement faibles de larvicides microbiens *B. subtilis*, *B. velezensis* et *P.fluorescens* peuvent réduire, voire éliminer les larves d'*An. gambiae*. Les larves d'*An. gambiae* souches *Kisumu* et Yaokoffikro ont été mieux contrôlées par *B. subtilis* comparativement aux deux autres larvicides. Toutefois il faut approfondir les études sur d'éventuelles résistances des moustiques à ces biolarvicides, leur rémanence et leur utilisation en conditions naturelles en prenant en compte l'impact de certaines composantes telles que la température et la lumière afin de valider leur efficacité. Après quoi, ceux-ci pourraient constituer un outil complémentaire de lutte contre le paludisme et fortement contribuer à l'atteinte des objectifs d'élimination de cette maladie dans les pays endémiques.

Remerciements

Nous tenons à remercier la Direction du Centre d'Entomologie Médicale et Vétérinaire (CEMV) de Bouaké et tous les techniciens entomologistes qui ont participé aux travaux et contribué à l'obtention des résultats présentés dans ce manuscrit.

Références

- [1] - N. BECKER, D. PETRIC, M. ZGOMBA, C. BOASE, M. MADON, C. DAHL and A. KAISER, *Mosquitoes and Their Control*, Second edition. Springer, (2010) 609 p.
- [2] - R. CHRISTOPHERS, *Aedes aegypti* (L.), *The yellow fever mosquito: Its life history, bionomics and structure*, Cambridge University Press, London, (1960) 739 p.
- [3] - K. L. KNIGHT and A. STONE, *A catalog of the mosquitoes of the world* (Diptera: Culicidae). 2nd edition. Entomological Society of America, (1977) 611 p.
- [4] - OMS, Rapport 2023 sur le paludisme dans le monde Principaux messages, (2024) 23 p.
- [5] - DIIS (2022), Rapport annuel de la situation sanitaire (RASS), Ministère de la Santé, de l'Hygiène Publique et de la Couverture Maladie Universelle de Côte d'Ivoire, édition juin 2025, (2024) 214 p.
- [6] - J. F. TRAPE, G. PISON, M. P. PREZIOSI, C. ENEL, DU LOU A. DESGREES, V. DELAUNAY, B. SAM, E. LAGARDE, J. F. MOLEZ and F. SIMONDON, "Impact of chloroquine resistance on malaria mortality", *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Série III, Sciences de la vie*, Vol 321, N° 8 (1998) 689 - 697

- [7] - R. W. MERRITT, J. L. LESSARD, K. J. WESSELL, O. HERNANDEZ, M. B. BERG, J. R. WALLACE, J. A. NOVAK, J. RYAN and B. W. MERRITT, "Lack of effects of *Bacillus sphaericus* (VectoLex) on non-target organisms in a mosquito-control program in southeastern Wisconsin: A 3-year study," *Journal of the American Mosquito Control Association*, Vol 21, N°2 (2005) 201 - 212
- [8] - R. WEINZIERL, T. HENN, P. G. KOEHLER and C. L. TUCKER, "Microbial Insecticides Entomology and Nematology Series", *Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida*, ENY-275 IN081, (2005) 1 - 13
- [9] - X. SU, F. ZOU, Q. GUO, J. HUANG and T. X. CHEN, "A report on a mosquito-killing fungus, *Pythium carolinianum*", *Fungal Diversity*, Vol. 7, (2001) 129 - 133
- [10] - R. S. PHILIP, "Current status of malaria and potential for control," *Clinical microbiology reviews*, Vol. 14, N°1 (2001) 208 - 226
- [11] - Y. F. KOFFI, Identification phénotypique et moléculaire des germes d'altérations de l'ananas (*Ananas comosus* L.) et test de conservation à l'aide de biopesticides bactériens. Thèse unique de Doctorat. Université Nangui Abrogoua (Côte d'Ivoire), (2018) 162 p.
- [12] - L. M. KOUAMÉ, K. F. N'GUESSAN, W. M. ALLOUÉ-BORAUD, Z. R. RATHOD, R. K. SHAH, M. AMITA, J. RITIKA, S. SHARMA and S. MEENU, Screening of hydrolytic enzymes produced by bacteria isolated from mango trees rhizosphere and mango fruits (*Mangifera indica*), *Bioscience biotechnology research communications*, Vol. 13, N°1 (2020) 111 - 115
- [13] - INS, Résultats globaux du recensement général de la population et de l'habitat, Ministère du Plan et du Développement, Abidjan (Côte d'Ivoire), (2022) 37 p.
- [14] - A. E. ASSEMIAN, D. B. SORO and N. Soro, Caractérisation morphologique du paysage du département de Bouaké, centre de la Côte d'Ivoire, *Geotrop*, N°01 (2023) 5 - 20
- [15] - A. A. TEHUA, A. M. N. KOUMAN, K. F. YAO, N. A. SORO, A. M. A-B. WAZE and D. KONE, "Efficacy of microbial biopesticide formulations in the control of *Xanthomonas citri* pv. *Mangiferaeindicae* in cashew (*Anacardium occidentale* L.) in Côte d'Ivoire,". *International Journal of Agronomy and Agricultural Research*, Vol. 21, N°4 (2022) 18 - 25
- [16] - P. T. WANDERLI and D. S. M. ROCHELLY, Protocol for larvicide bioassays, *protocols.io*. <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.9kch4sw>, (2020)
- [17] - WHO, Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides, Geneva: World Health Organization. Dept. of Communicable Disease Prevention, Control and Eradication WHO Pesticide Evaluation Scheme, (2005) 41 p.
- [18] - W. S. ABBOTT, "Méthode de calcul de l'efficacité d'un insecticide", *Journal of Economic Entomology*, Vol 1, N°2 (1925) 265 - 267
- [19] - J. ROBERTSON, H. PREISLER and R. RUSSEL, Analyse probit et logit Poloplus. Parme (MO), États-Unis : LeOra Software LLC, (2003) 36 p.
- [20] - D. J. FINNEY, *Analyse Probit*, Cambridge University Press, Cambridge, (1971) 333 p.
- [21] - WHO, Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes Second edition. Geneva : World Health Organization, (2016) 56 p.
- [22] - S. MAJAMBERE, S. W. LINDSAY, C. GREEN, B. KANDEH and U. FILLINGER, "Microbial larvicides for malaria control in The Gambia", *Malaria Journal*, Vol. 6, N°1 (2007) 1 - 14 p.
- [23] - S. C. KAHINDI, S. MURIU, Y. A. DERUA, X. WANG, G. ZHOU, MING-CHIEH. LEE, J. MWANGANGI, H. ATIELI, A. K. GITHEKO and G. YAN, "Efficacy and persistence of long-lasting microbial larvicides against malaria vectors in western Kenya highlands", *Parasites & Vectors*, Vol. 1, N°1 (2018) 438 - 447
- [24] - S. S. IMBAHALE, A. GITHEKO, W. R. MUKABANA and W. TAKKEN, "Integrated mosquito larval source management reduces larval numbers in two highland villages in western Kenya", *BMC Public Health*, Vol. 12, N°1 (2012) 10 p.

- [25] - P. DAMBACH, V. R. LOUIS, A. KAISER, S. OUEDRAOGO, A. SIÉ, R. SAUERBORN and BECKER N, "Efficacy of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso," *Parasites & Vectors*, Vol 2, N° 341 (2014) 8 p.
- [26] - S. M. DIÉDHIYOU, L. KONATÉ, S. DOUCOURÉ, B. SAMB, E. A. NIANG, O. SY, O. THIAW, A. KONATÉ, A. N. WOTODJO, M. DIALLO, L. GADIAGA, C. SOKHNA and O. FAYE, "Efficacité de trois larvicides d'origine biologique et d'un régulateur de croissance contre *Anopheles arabiensis* au Sénégal," *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, Vol 110, N°2 (2017) 102 - 115
- [27] - Y. A. DERUA, E. J. KWEKA, W. N. KISINZA, A. K. GITHEKO and F. W. MOSHA, "Bacterial larvicides used for malaria vector control in sub-Saharan Africa: review of their effectiveness and operational feasibility," *Parasites and Vectors*, Vol 12, N°426 (2019) 18 p.
- [28] - F. O. OMOYA and F. A. AKINYOSOYE, Evaluation of the potency of some entomopathogenic bacteria isolated from insect cadavers on *Anopheles arabiensis* Giles (Order : Diptera; Family: Culicidae) mosquito larvae in Nigeria, *African Journal of Microbiology Research*, DOI: 10.5897/AJMR12.1926, (2013)
- [29] - ANSES, Recherche d'insecticides potentiellement utilisables en lutte antivectorielle : avis de l'ANSES, rapport d'expertise collective (Saisine n° 2009-SA- 0338). <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIOC2009sa0338Ra.pdf>, (2011) 141 p.
- [30] - M. DAGNOGO and J. COZ, "Un insecticide biologique : *Bacillus sphaericus* 2. Influence de la température et du temps de contact Sur l'activité larvicide de *B. sphaericus*," *Cahiers O.R.S.T.O.M, série Entomologie médicale et Parasitologie*, Vol. XX, N° 2 (1982) 139 - 144
- [31] - S. TIANYUN, T. JENNIFER, O. CHRIS, B. MATTHEW and C. MIN-LEE, "Resistance to *Lysinibacillus sphaericus* and Other Commonly Used Pesticides in *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae) from Chico, California", *Journal of Medical Entomology*, Vol 55, N°2 (2017) 423 - 428