

## Évaluation de l'activité larvicide de *Bacillus thuringiensis* vis à vis des larves du 4<sup>ème</sup> stade de moustique domestique *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae)

Fatma SAHIR-HALOUANE<sup>1\*</sup>, Sonia HAMID<sup>1,2</sup>, Rafik OULEDTALEB<sup>1</sup>, Zahia OUKALI<sup>1</sup>  
et Farida BENZINA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université M'hamed Bougara de Boumerdes, Faculté des Sciences, Laboratoire Valorisation et Conservation de Bioressources « VALCORE », 35000 Boumerdes, Algérie

<sup>2</sup> Université Akli Mohand Oulhadj, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre, de Bouira, Algérie

\* Correspondance, courriel : [fatmahalouane@yahoo.fr](mailto:fatmahalouane@yahoo.fr)

### Résumé

Dans la recherche de méthodes alternatives à la lutte chimique, pour diminuer l'incidence et les préjudices des arthropodes parasites et déprédateurs, l'utilisation des biopesticides est de plus en plus développée. Par rapport aux pesticides chimiques conventionnels, ces biopesticides sont plus spécifiques aux ravageurs cibles, efficaces en petites quantités et rapidement décomposable sans laisser de résidus toxiques (1). Utilisée mondialement en tant qu'insecticide biologique, la bactérie *Bacillus thuringiensis* est caractérisée par la formation d'un cristal protéique composé de plusieurs toxines à effet entomocide. C'est dans cette perspective que s'insère la problématique de notre travail, dont l'objectif est de déterminer l'activité larvicide des spores et des toxines extraites d'une souche locale de l'entomopathogène *Bacillus thuringiensis*, vis-à-vis des larves de 4<sup>ème</sup> stade de *Cx.pipiens*. Trois concentrations sont retenues, pour chaque variante (pour les spores D1 = 10<sup>8</sup> spores /mL, D2 = 10<sup>7</sup> spores /mL et D3=10<sup>6</sup> spores/ml - pour les toxines D1 = 5 µg/100 mL, D2 = 2.5 µg/100 mL et D3 = 1.25 µg/100 mL). L'essai est réalisé avec 3 répétitions comportant chacune 15 larves. Les pourcentages des mortalités obtenues sont corrigés et soumis à une analyse de Probits. Les concentrations létales 50 sont obtenues, à partir des équations de droites de régression, exprimant les pourcentages de mortalités corrigées en fonction des Logarithmes décimaux des doses. Les coupes histologiques au niveau de tube digestif sont réalisées selon la technique de Martoja et Martoja. Les résultats révèlent qu'aux fortes concentrations en inoculum, les mortalités étaient beaucoup plus élevées que pour les faibles concentrations. Pour l'ensemble des résultats, les 100 % de mortalités sont enregistrées au 7<sup>ème</sup> jour pour les spores et toxines. Le tableau symptomatologique qui suit l'infection, fait apparaitre des malformations morphologiques, un arrêt de prise de nourriture, une diminution des mouvements et un blocage de l'exuviation nymphale, chez les larves traitées comparativement aux larves témoins de même âge. L'étude histologique, réalisée après 24 h d'exposition aux toxines extraites de *Bt*(CI<sub>50</sub>) a fait ressortir, une forte altération dans la structure de tube digestif des larves infectées, comparativement aux larves saines.

**Mots-clés :** *Bacillus thuringiensis*, spores, toxines, *Culex pipiens*, L4, mortalité, histologie, biopesticide.

## Abstract

### Evaluation of the larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* against the larvae of the 4th instar of the domestic mosquito *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae)

In the search for an alternative method to chemical control, the use of biopesticides is increasingly developed. Compared to conventional chemical pesticides, these biopesticides are more specific to the target pests, effective in small quantities and quickly decomposable without leaving toxic residues [1]. Used worldwide as a biological insecticide, the bacterium *Bacillus thuringiensis* is characterized by the formation of a protein crystal composed of several toxins with entomocidal effect. It is in this perspective that the problem of our work is inserted, the objective of which is to determine the larvicidal activity of a local strain of the entomopathogen *Bacillus thuringiensis*, vis-à-vis 4th stage larvae. *Cx.pipiens*, by examining the mortalities caused following the application of the spores and toxins extracted from this bacterium. Three concentrations are retained for each variant (for the spores D1 =  $10^8$  spores / mL, D2 =  $10^7$  spores / mL D3 =  $10^6$  spores / ml and for the toxins D1 = 5 µg/100 mL, D2 = 2.5 µg/100 mL et D3 = 1.25 µg/100 mL). The test is carried out with 3 replicates each comprising 15 larvae. The percentages of mortalities obtained are corrected and subjected to a Probit analysis. The lethal concentrations 50 are obtained from the regression line equations and the histological sections at the level of the digestive tract are carried out according to the technique of Martoja and Martoja. The results show that at high inoculum concentrations, mortalities were much higher than at low concentrations. For all results, 100 % mortalities are recorded on day 7 for spores and toxins. The symptomatology which follows the infection, shows morphological malformations, a stop of food intake, a decrease in movements and a blockage of pupal exuviation, in the treated larvae compared to the control larvae of the same age. The histological study, carried out after 24 hours of exposure to toxins extracted from *Bt*(CI50), revealed a strong alteration in the structure of the digestive tract of infected larvae, compared to healthy larvae.

**Keywords :** *Bacillus thuringiensis*, spores, toxins, *Culex pipiens*, L4, mortality, histology, biopesticide.

## 1. Introduction

Dans le monde, Il existe environ 3450 espèces de moustiques. Les Culicidae constituent une très grande famille et comportent les principaux vecteurs : *Anopheles*, *Aedes* et *Culex*. Ces genres sont des agents nuisibles responsables de problèmes sanitaires graves, car ils sont vecteurs de nombreuses maladies affectant l'homme. Certains *Anopheles* transmettent la malaria, les *Aedes* sont vecteurs de la dengue et de chikungunya. Le genre *Culex* transmet, la filariose, le West Nile virus, la fièvre hémorragique de la Vallée du Rift (*flavivirus*) [1] et l'encéphalite [2, 3]. En raison de sa grande distribution et sa grande abondance, *Culex pipiens* représente l'espèce, la plus répandue en Algérie aux côtés de *Culex longiareolata*. La fièvre West Nile, a fait son apparition en Algérie, en 1994 et a été responsable de 8 décès [4]. Les traitements préventifs et curatifs sont rares pour les maladies vectorielles, la lutte repose essentiellement sur le contrôle du vecteur. La meilleure prévention, consiste à utiliser des produits répulsifs ou insecticides. Toutefois, au cours des dernières décennies, *Cx. pipiens* a développé des résistances à une grande variété d'insecticides : DDT, pyrèthroïdes, carbamates, organophosphorés, etc. [5]. La résistance aux composés chimiques toxiques, non biodégradables, le manque de spécificité et l'impact négatif sur les écosystèmes, incitent à réviser continuellement les moyens de lutte. Pour réduire le recours aux pesticides chimiques, la lutte biologique, qui consiste à utiliser des organismes vivants ou leurs produits pour contrôler d'autres organismes nuisibles, offre une alternative pour assurer une protection performante. Plus d'une centaine de bactéries ont été identifiées comme ayant un potentiel d'utilisation en lutte biologique [6]. Ces bactéries entomopathogènes, appartiennent surtout à trois grandes familles : Les *Bacillaceae*, les *Enterobacteriaceae* et les

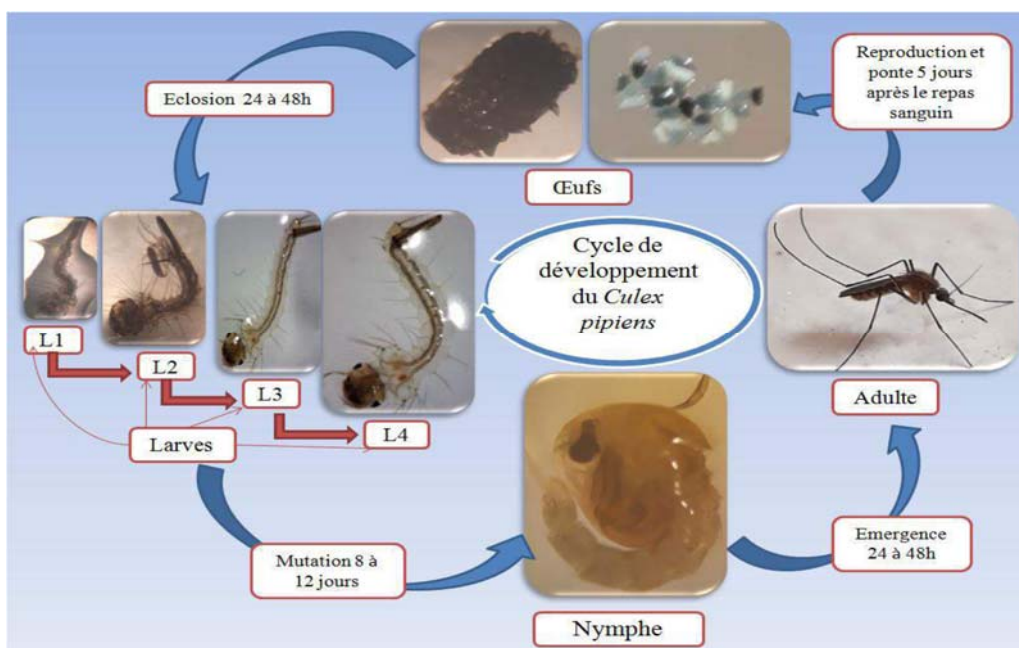
*Pseudomonaceae*. Parmi les bactéries entomopathogènes, *Bacillus thuringiensis* et *B. sphaericus* sont à la fois, les espèces les plus utilisées et celles qui offrent les potentialités insecticides les plus intéressantes contre les arthropodes nuisibles [7]. Leurs propriétés insecticides s'étendent à un large éventail d'insectes, grâce à la production de différentes protéines Cry au cours de la sporulation. A l'heure actuelle, le bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) est le plus efficace, ses effets insecticides sont certains et les nombreuses approches scientifiques réalisées, attestent de son pouvoir sans retombées environnementales. Le présent travail fait partie, d'un programme de lutte biologique entrepris par notre laboratoire de recherche VALCORE, contre les bioagresseurs des cultures et les arthropodes nuisibles, en utilisant des microorganismes locaux et leurs produits bioactifs [8, 9]. En effet, cette contribution consiste à évaluer l'effet larvicide des spores et des toxines, d'une souche locale de l'entomopathogène *Bacillus thuringiensis* sur les larves de 4<sup>ème</sup> stade du moustique *Cx. pipiens*, en examinant, les mortalités, les modifications morphologique (symptomatologie) et l'impact de l'infection, sur l'histologie de tube digestif.

## 2. Matériel et méthodes

### 2-1. Matériel biologique

#### 2-1-1. *Culex pipiens*

Les larves et les nymphes de *Cx. pipiens* ont été récoltées, dans des gîtes situés au niveau des caves de la cité des grands vents de la commune d'Ouled fayet (wilaya d'Alger). L'élevage de masse a été réalisé à l'Institut Pasteur de Delly Brahim durant les mois d'avril, mai, juin sous une température ambiante comprise entre 20°C et 25°C et une photopériode journalière de 14/10 heures. Les larves (L1, L2, L3, L4) ont été placées dans des bacs contenant de l'eau minérale et des paillettes permettant un apport en protéines, en glucides et en vitamines [10]. Le cycle de développement de l'arthropode dans les conditions précitées apparait dans la **Figure 1**. Les essais ont été conduits sur les larves de 4<sup>ème</sup> stade (**Figure 2**).



**Figure 1** : Cycle de développement du *Culex pipiens* aux conditions du laboratoire

(T: 20°C - 25°C et une photopériode journalière de 14/10 heures)



**Figure 2 :** Larve de 4<sup>ème</sup> stade de *Cx. pipiens*

### 2-1-2. *Bacillus thuringiensis*

L'essai larvicide a été conduit sur un membre du genre *Bacillus*, *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), une souche bactérienne locale isolée à partir du sol de la wilaya de Boumerdes en Mars 2017. Elle nous a été fournie, par le laboratoire VALCORE en microtube. Avant son utilisation la souche entomopathogène a subi une revivification sur gélose nutritive. La pureté de la souche a été confirmée par des analyses phénotypiques classiques (examens macroscopique et microscopique, coloration de Gram et coloration de la spore au vert de malachite).

### 2-2. Traitement

Le traitement est réalisé sur des larves du quatrième stade nouvellement exuviées. Afin de dégager l'effet larvicide de la bactérie, nous avons choisi deux variantes : spores et toxines. Les concentrations en spores, sont évaluées par comptage sur cellule de Mallasez : D1 =  $10^8$  spores /mL D2 =  $10^7$  spores /mL D3 =  $10^6$  spores/mL. Le choix des doses est justifié, par les résultats des tests préliminaires réalisés sur les larves. L'extraction des toxines, est faite selon la méthode d'Auger modifiée [11]. Les toxines extraites sont diluées dans de l'eau distillée stérilisée (100 mL) et comptent trois concentrations : D1 = 5  $\mu$ g/100 mL, D2 = 2.5  $\mu$ g/100 mL et D3 = 1.25  $\mu$ g/100 mL. Le titrage biologique du *Bt* a été effectué par immersion des insectes durant un quart d'heure dans des suspensions de spores et de toxines de concentrations connues. Les expérimentations sont conduites selon un protocole de type bloc complet en triplicata. Pour chaque variante trois lots de 15 larves de stade IV sont contaminés. Elles sont placées dans des gobelets contenant 20 ml de suspension (bouillon nutritif + spores et eau distillée+toxines). Un lot témoin est prévu dans l'essai expérimental, il compte le même nombre de larves, immergées cette fois ci, dans une solution de bouillon nutritive (témoin spores) et dans de l'eau distillée stérile (témoin toxines). Le comptage des individus morts est réalisé quotidiennement. La symptomatologie des larves mortes est notée simultanément.

### 2-3. Calcul des $CL_{50}$

Les pourcentages des mortalités larvaires obtenus sont corrigés [12] et soumis à une analyse des probits. Après 24 heures qui suivent le traitement, les concentrations létales 50 sont déterminées à partir des équations de droites de régression (probits des % de mortalité corrigés, en fonction des logarithmes décimaux des doses).

### 2-4. Étude histologique

L'effet de la  $CL_{50}$ , sur la structure de tube digestif des larves L4, après 24h d'exposition aux toxines de *Bt* a été entrepris. L'étude histologique est conduite au niveau du CHU Nfissa Hamoud de Hus dey. Pour ce faire,

les abdomens des larves témoins et traitées par le *Bt* sont disséqués et fixés dans du Bouin alcoolique. L'inclusion en paraffine suit trois étapes : une déshydratation des échantillons dans des bains d'alcool et du butanol ; une imprégnation dans la paraffine liquide et la constitution des blocs pour les coupes. Ces dernières sont réalisées sur un microtome de type *Leica* à rotation manuelle munis d'un réglage de l'épaisseur des coupes qui est environ de 5 à 7  $\mu\text{m}$ . La coloration des coupes se fait par l'HE (hématoxyline-éosine), selon la méthode de [13]. Après un montage à l'Eukitt, des photos sont prises, à l'aide d'un appareil photo numérique, couplé à un microscope photonique.

## 2-5. Analyse statistique

Les résultats de l'essai insecticide, ont fait l'objet d'une analyse de la variance, à 2 critères de classification (Evolution des mortalités en fonction des doses et du temps) et sont représentées, sous forme de moyenne ( $\pm$  l'écart-type) via le logiciel Excel stat.

## 3. Résultats

### 3-1. Confirmation des caractères phénotypiques de la souche bactérienne *Bt*

L'examen macroscopique montre une colonie de taille 0.2 à 0.5 cm, de forme circulaire, plate, opaque à contour irrégulier (*Figure 3a*). L'examen microscopique à l'état frais, la coloration du Gram et la coloration de spores montrent des cellules bactériennes de forme bacillaire à extrémité arrondies de 1  $\mu\text{m}$  de largeur et de 5  $\mu\text{m}$  de longueur, regroupées en chaînette, mobiles et sporulantes (spore centrale) à G+ (*Figure 3b*). Rappelant ainsi, les observations décrites par [14] sur *B. thuringiensis*.

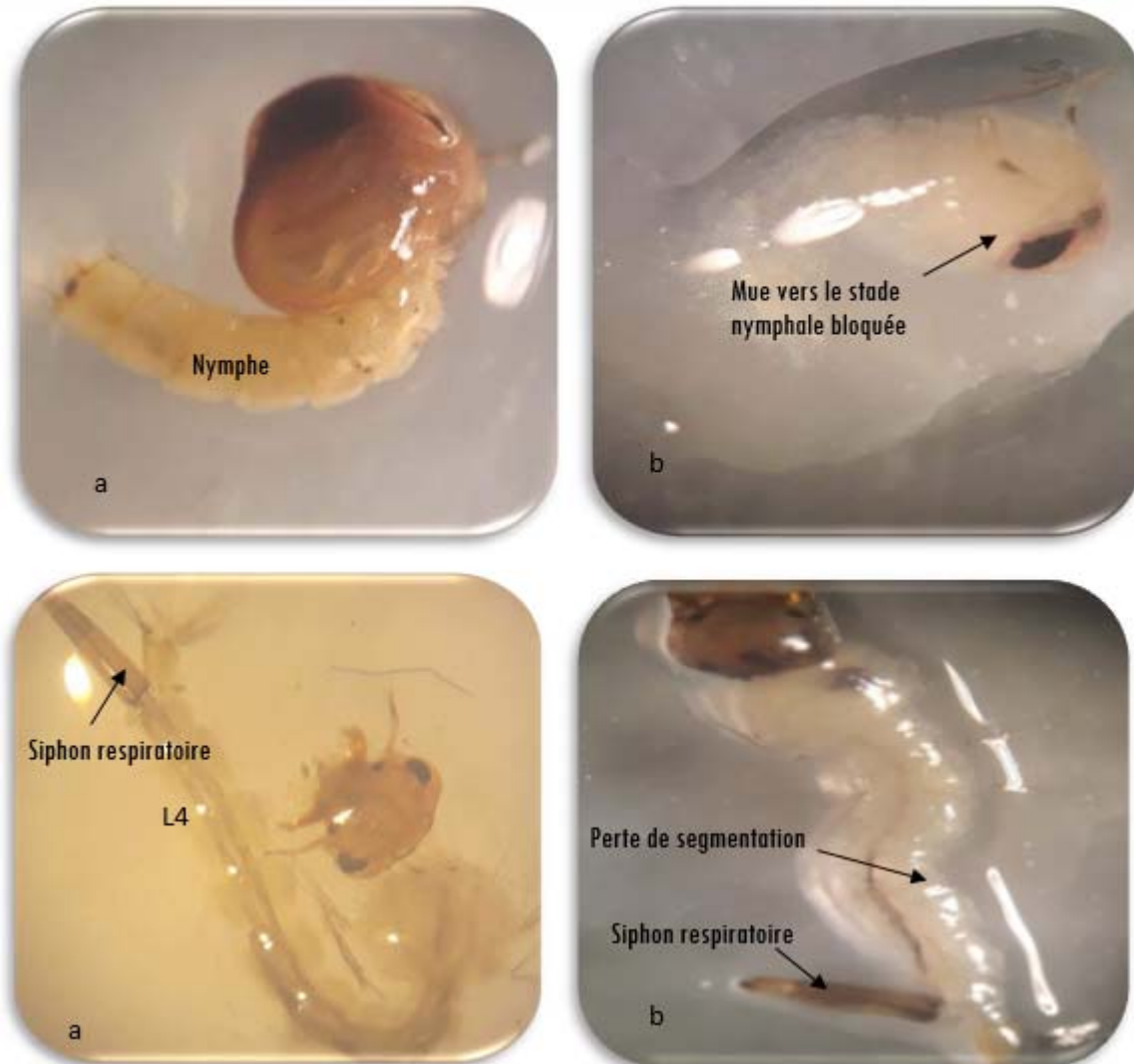


**Figure 3 :** Aspects macroscopique (a) et microscopique (coloration de Gram) (b) de la souche *Bt* utilisée dans l'essai larvicide vis-à-vis des L4 de *C.pipiens*

### 3-2. Effet du traitement sur l'aspect morphologique des larves L4

L'entomopathogène administré aux larves du quatrième stade de *Cx.pipiens* nouvellement exuviées, affecte leur apparence et leur comportement. Une diminution des mouvements et un arrêt d'alimentation conduisant à la mortalité ont été rapportés suite au traitement. Il a été aussi relevé, l'apparition d'une

couche blanchâtre à la surface du corps, qui semble avoir perdu sa segmentation et des déformations morphologiques notoires, suite au blocage de la mue nymphale (**Figure 4b**). Les larves témoins ont montré un comportement normal, leur morphologie est maintenue et ont toutes atteint le stade nymphal sans difficulté (**Figure 4a**).



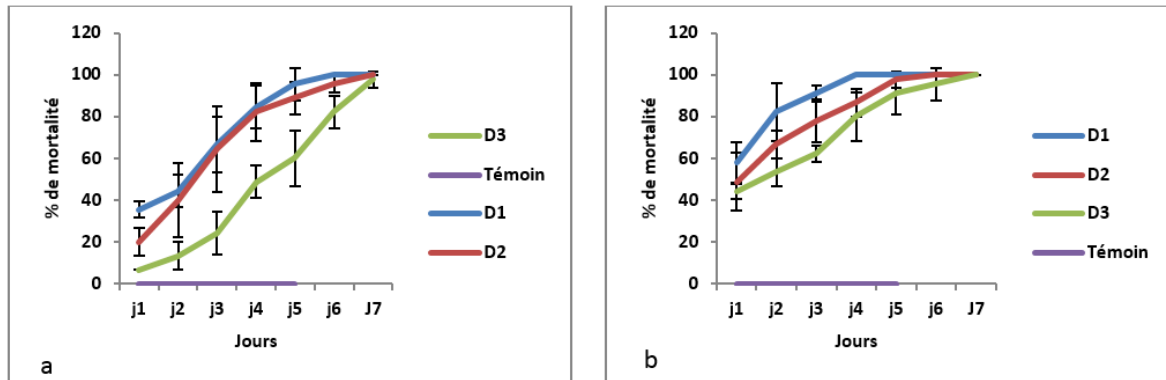
**Figure 4 :** Aspect morphologique des nymphes et larves L4 saines (a) et infectées par le Bt (b)

*Vu sous une loupe binoculaire*

### 3-3. Activité insecticide sur les larves de 4<sup>ème</sup> stade de *C. pipiens*

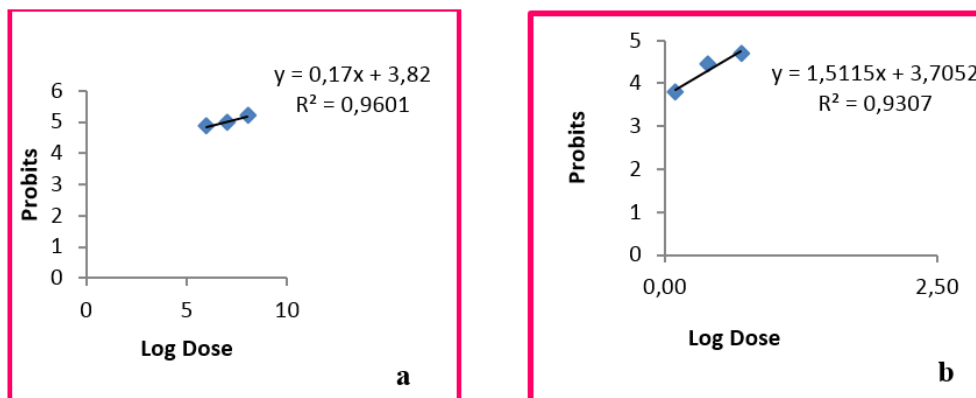
L'entomopathogène appliqué sous forme de spores et de toxines, sur les larves du quatrième stade nouvellement exuviées de *Cx. pipiens*, présente une toxicité avec une relation dose- réponse. La mortalité se manifeste par une action directe, sur les larves exposées aux différentes concentrations de Bt (spores et toxines) en inhibant l'exuviation nymphale (**Figure 5**). Dès le premier jour qui suit le traitement, les résultats des mortalités occasionnées avec les toxines extraites de Bts' affichent plus importantes et plus cumulatives, comparativement à celles notées avec les spores (**Figure 5b**). Mais, elles s'échelonnent jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour pour les deux variantes. Les résultats statistiques font ressortir des différences significatives pour les facteurs doses et temps ( $P < 0.05$ ), sauf pour les doses D1 et D2 concernant la variante spores ( $P > 0.05$ )

où les taux de mortalité enregistrés, sont plus au moins identiques. Parallèlement et durant la même période, aucune mortalité n'est enregistrée chez les individus témoins émergés dans le bouillon nutritif ou dans de l'eau distillée stérile.



**Figure 5 :** Taux de mortalité journalier chez les larves L4 de moustique domestique *Cx.pipiens* exposées aux différentes concentrations de spores (a) et de toxines extraites (b) de *Bt*. (T 28°C-HR 65 %)

De pareilles constatations sont formulées, en examinant les droites de régression de la **Figure 6**, indiquant clairement l'existence d'une liaison étroite, entre les différentes doses et les taux de mortalité occasionnés après 24h d'exposition aux toxines du *Bt* ( $0 \leq R \leq 1$ ).



**Figure 6 :** Droites de régressions exprimant les probits des pourcentages de mortalités corrigées MC % et les logarithmes décimaux de doses chez les larves L4 de *Culex pipiens* exposées aux spores (a) et aux toxines (b) de *Bacillus thuringiensis*

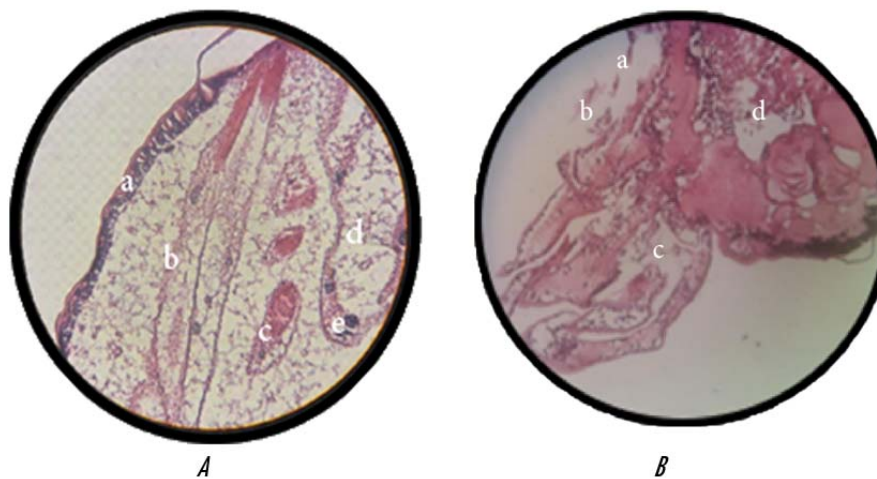
A partir des équations des droites de régression, nous avons calculé les valeurs des  $Cl_{50}$  relatives à l'application du *Bt* aux larves L4 de *Cx.pipiens* (**Tableau 1**).

**Tableau 1 :** Concentrations létales 50 relatives à l'application de *Bt* aux larves de 4ème stade de *Cx.pipiens*

Variantes	Spores	Toxines
Equations de régression	$y = 0,17x + 3,82$ $R^2 = 0,960$	$1,511x + 3,705$ $R^2 = 0,930$
$Cl_{50}$	$8,73 \times 10^6$ spores/mL	$7,57 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$

#### 4. Discussion

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude des concentrations létales occasionnées par l'application des bactéries entomopathogènes aux moustiques. Dans ce sens, citons les travaux effectués avec *Bacillus sphaericus* et *B.thuringiensis par* [15] et l'application d'une formulation de biopesticide sur les larves de *Culex pipiens* [16, 17]. L'examen des résultats trouvés, laisse prétendre que notre souche de *Bt* présente une activité insecticide intéressante vis à vis des larves L4 de *Cx.pipiens*. L'activité larvicide est meilleure avec les toxines qu'avec les spores. A plusieurs reprises, tel que rapportée par la littérature, l'effet insecticide de *Bt* est totalement absent pour certains isolats, comme le confirment les travaux réalisés sur une population larvaire de *C.pipiens* où seulement 3 isolats de *Bt* sur 14, ont affiché une activité larvicide [18]. D'autres travaux ont souligné que parmi 23 isolats de *Bt* étudiés, seulement un seul isolat, possédait une activité larvicide marquée contre *Aedes aegypti* [19]. Ceci peut être expliqué, par la spécificité génétique des toxines (gène plasmidal) à un groupe d'insectes et pas à d'autres. C'est ainsi, que certaines toxines de *Bt* ciblent les larves de lépidoptères (mites, papillons), d'autres sont propres, soit aux coléoptères (scarabées, charançons), soit aux hyménoptères (abeilles, guêpes), soit aux diptères (mouches, moustiques) ou encore aux nématodes [20]. Compte tenu de l'importance de l'utilisation de ces toxines en tant que biopesticides, plusieurs travaux ont été effectués dans le but de comprendre leur mode d'action au niveau de l'intestin des larves [21]. En effet, malgré la faible concentration de toxines administrées aux larves L4 ( $CL_{50} = 7,57 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ ), des modifications assez prononcées sur la structure de tube digestif ont eu lieu (**Figure 7**).



**Figure 7** : Structure de tube digestif chez les larves de 4ème stade de *C.pipiens* témoins (A) et traitées (B) par la  $CL_{50}$  de la solution de toxines de *Bt*

*a* : épiderme, *b* : lame conjonctive et musculature, *c* : épithélium intestinal, *d* : membrane périthrophique, *e* : vaisseau sanguin

Chez les arthropodes, les cellules épithéliales intestinales (épithélium intestinal) qui recouvrent les cavités internes de la muqueuse intestinale et définissent la frontière, entre les tissus de l'intestin et l'environnement extérieur, agissent comme une barrière physique et fournissent la défense immunitaire innée, qui empêche la pénétration des microbes. La membrane périthrophique qui tapisse le tube digestif des invertébrés et entoure le bol alimentaire dans l'intestin d'un organisme joue également un rôle crucial comme barrière à l'infection par des agents pathogènes [22]. Après vingt-quatre heures d'exposition à la  $CL_{50}$  des toxines de *Bt*, l'épithélium et la membrane péri trophique apparaissent déjà fortement dégradés à absents dans certaines endroits, ceci est également enregistré pour l'épiderme (**Figure 7B**). Parallèlement, les larves témoins ont



préservé la structure habituelle de leur tube digestif (**Figure 7A**). Chez les larves infectées, la cause essentielle de la mortalité est probablement due à la destruction de l'épithélium, sous l'effet abrasif des toxines. En effet, comme l'a rapporté la littérature, les toxines ingérées par les larves d'insectes sont d'abord solubilisées dans la cavité intestinale de la larve, puis la fraction active est libérée par les protéases intestinales des insectes sensibles. Ces deux étapes sont indispensables pour conférer à *Bt* son activité insecticide ou, seules les toxines Cry activées peuvent traverser la membrane péritrophique. Après leur ingestion, ces toxines entraînent une paralysie des pièces buccales ainsi qu'une lyse des tissus épithéliaux du système digestif et font éclater les membranes de l'intestin en provoquant une perforation du tube digestif de la larve puis sa mort [22, 23]. Cette étude a confirmé, la possibilité d'appliquer un bio insecticide naturel à base de spores ou de toxines, synthétisées par notre souche de *Bt* qui s'est montrée virulente contre la forme aquatique de *Cx.pipiens* testée.

## 5. Conclusion

La présente étude, a pour but de proposer et d'encourager l'utilisation de formulations à base de souches locales du *Bacillus thuringiensis*, pour lutter contre les moustiques vecteurs, afin de réduire leur rôle tout en respectant l'environnement. A l'issue des résultats trouvés, il ressort, que la souche locale de *Bt* testée occasionne une activité larvicide intéressante vis à vis de la forme aquatique L4 de culicidae. Sous forme de spores ou de toxines extraites, l'effet létal été plus rapide aux fortes doses ( $10^8$  spores/mL et 5 µg/100 mL respectivement) et mieux exprimé pour la variante toxines extraites. L'impact de l'exposition au *Bt*, s'est extériorisé à travers une symptomatologie indiquant, une diminution puis un arrêt complet de l'alimentation, suivi d'un blocage de l'exuviation nymphale. Après 24 h, qui suit l'application de la  $CL_{50}$  (rapportée aux toxines de *Bt*) aux L4 de moustique, il s'est produit de fortes perturbations dans la structure de tube digestif, plus précisément au niveau de l'épithélium intestinal. Les larves non traitées ont conservé par contre, la structure habituelle de leur tube digestif. De ce qui précède, on recommande notre souche comme candidate potentielle dans la lutte biologique contre les larves de *Cx. pipiens*. En perspective, il ya lieu de cribler et d'identifier les toxines impliquées dans la toxicité et de préciser leur effet cytotoxique.

## Remerciements

*On tient, à remercier vivement nos étudiants : Mr AIT AMER MEZIANE M'barek, Melle HADDAH Fadhila et Melle OMARI Nesrine pour leur pertinente contribution (Elevage des moustiques et essais microbiologiques).*

## Références

- [1] - W. S. ABBOTT, "A method for computing the effectiveness of an insecticide". *Journal of Economic Entomology*, 18 (1925) 265 - 267
- [2] - A. ALVAREZ, E. G. VIRLA, L. M. PERA et MD. BAIGORI, "Characterization of native *Bacillus thuringiensis* strains and selection of an isolate active against *Spodoptera frugiperda* and *Peridroma saucia*". *Biotechnology Letters*, (2009) ISSN : 0141 - 5492
- [3] - J. ANDREAN, L. GILBERT et F. REGINE, Dictionnaire de biochimie alimentaire et de nutrition technique
- [4] - P. AUGER, "Activité anti-cancéreuse d'une parasporine de *Bacillus thuringiensis* 4R2". Mém. Uni. et documentation", Paris Cedex 08, (1981) 21 p.
- [5] - F. BENZINA, S. HAMID, H. MOHAND-KACI, F. BISSAAD et F. HALOUANE, Histological changes in the larvae of the domestic mosquito *Culex pipiens* treated with the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Scientific Research and Essays*, Vol. 13 (1) (2018) 1 - 10 p.

- [6] - D. DAMIENS, G. MARTIN, P. DESWATTINES et T. HANCE, "Toxicité et rémanence d'une nouvelle formulation du *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis* sur les larves de *Culex pipiens L.* et *Aedes geniculatus* (Oliver) (Diptera : Culicidae) en eaux usées" Entomologie faunistique - Faunistic Entomology, 63 (3) (2011) 157 - 163
- [7] - E. DAUDE, A. VAGUET et R. PAUL, La dengue, maladie complexe Natures Sciences Sociétés, 23 (2015) 331 - 342, © NSS-Dialogues, EDP Sciences 2016 DOI: 10.1051
- [8] - D. J. GREATHEAD, C. KOOYMAN, M. H. LAUNOIS-LUONG et G. B. POPOV, Les ennemis naturels des criquets du Sahel. Collection acridologie opérationnelle N CILSS/DFPV, Niamey, Niger, (1994)/Bp 12625
- [9] - S. HAMID, F. HALOUANE, F. Z. BISSAAD et F. BENZINA, Study about the effect of beauveria bassiana (vuillemin in 1912) on the aquatic stages of culex pipiens (LINNÉ, 1758. *International Journal of Bio-Technology and Research (IJBTR)*, ISSN 2249-6858, Vol. 3, Issue 3 (2013)
- [10] - F. HALOUANE, F. Z. BISSAAD, B. DOUMANDJI-MITICHE, F. BENZINA, N. CHAHBAR et S. HAMID, Study of the effect of Beauveria bassiana (Vuil.) on the biochemistry and structure of the cuticle of Schistocerca gregaria (Forsk.)., *Ann. Biol. Res*, 4 (12) (2013) 68 - 74
- [11] - G. KRIDA, L. DIANCOURT, A. BOUATTOUR, A. RHIM, B. CHERMITI et A. B. FAILLOUX, Assessment of the risk of introduction to Tunisia of the Rift Valley fever virus by the mosquito *Culex pipiens*. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 104 (4) (2011) 250 - 259
- [12] - B. LE GUENNO, A. BOUGERMOUH, T. AZZAM et R. BOUAKAZ, West Nile : a deadly virus? «The Lancet», Vol. 348, Iss.9037 (1996) 1315 p.
- [13] - P. LEOPOLDO, M. DELIA, B. COLIN, J. MURILLO et C. PRIMITIVO, *Bacillus thuringiensis* Toxins : An Overview of Their Biocidal Activity". *Journal toxins*, 6 (2014) 3296 - 3325; doi:10.3390
- [14] - B. ESWARAPRIYA, B. GOPALSAMY, B. KAMESWARI, R. MEERA, P. DEVI, Insecticidal Activity of *Bacillus thuringiensis* IBT- 15 Strain against *Plutella xylostella*, *International Journal of PharmTech Research*, Vol. 2, N°3 (2010) 2048 - 2053 p.
- [15] - R. MARTOJA et M. MARTOJA-PIERSON, Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris : Masson et Cie Ed. Masson et Cie. Paris, (1967) 345 p.
- [16] - L. MEJIAS, M. ESTRADA, R. BARRENA et T. GEA, A novel two-stage aeration strategy for *Bacillus thuringiensis* biopesticide production from biowaste digestate through solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, Elsevier, (2020)
- [17] - G. SANAHUJ, R. BANAKAR, R. M. TWYMAN and P. CHRISTOU, *Bacillus thuringiensis* : a century of research, development and commercial applications. *Plant Biotechnology Journal*, (9) (2011) 283 - 300 p.
- [18] - S. SILAPANANTAKUL, S. PANTUWATANA and A. BHUMIRATANA, The stability of toxicity of *Bacillus sphaericus* strain 1593 and *Bacillus thuringiensis* H 14 in different kinds of water against mosquito larvae". Proceedings of second Southeast Asian Symposium on Biological Control, *National Biological Control Research Center*; Bangkok, (1982) 22 - 24 p.
- [19] - R. L. STARNES, C. L. LIU And P. G. MARONE, History, use and future of microbial insecticides". Québec, (2015) 95 p. *Biotechnol. Lett.*, 31 (2015) 77 - 82 p.
- [20] - N. TABTI, Etude comparée de l'effet de *Bacillus thuringiensis* sur les populations purifiées et des populations des gîtes artificiels de *Culex pipiens* (Diptera - Culicidae) dans la ville de Tlemcen. These doc. Université de Tlemcen, Algérie, (2017) 164 p.
- [21] - G. TETREAU, Devenir du bioinsecticide *Bti* dans l'environnement et impact sur le développement de résistances chez le moustique. Thèse Doctorat. Université Grenoble. Biodiversité, Écologie, Environnement, (2012) 350 p.
- [22] - S. VINCENT, Paroles d'experts. *Rev. Jardins de France*, 639 (2016) 1 - 10 p.
- [23] - M. WEILL, O. DURON, P. LABBE, A. BERTHOMIEU et M. RAYMOND, La résistance du moustique *Culex pipiens* aux insecticides / Molecular clues to the insecticide. *Médecine Sciences*, Vol. 19, N° 12 (2003) 1190 - 1192