



Journal Homepage: [-www.journalijar.com](http://www.journalijar.com)

## INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH (IJAR)

Article DOI:10.21474/IJAR01/14306

DOI URL: <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/14306>



### RESEARCH ARTICLE

#### ETUDE AU LABORATOIRE DE L'ACTIVITE LARVICIDE DE BACILLUS THURINGIENSIS ISRAELENIS ET DE BACILLUS SPHAERICUS DANS LA PERSPECTIVE D'UN CONTROLE BIOLOGIQUE DES LARVES DE CULEX PIPENS ET D'ANOPHELES GAMBIAE S.LAU NIGER

Mahamane Iro Souleymane<sup>1,2</sup>, Dieudonné Diloma Soma<sup>3</sup>, Abdoul-Aziz Maiga<sup>4</sup>, Mahamadi Kientega<sup>3</sup>,  
Karmadine Hima<sup>1</sup> and Doumma Ali<sup>1</sup>

1. Département De Biologie, Faculté Des Sciences Et Techniques, Université Abdou Moumouni De Niamey, BP 10662 Niamey, Niger.
2. Centre De Recherche Médicale Et Sanitaire (CERMES), Niamey, Niger.
3. Institut De Recherche En Sciences De La Santé/ Centre Muraz, Bobo-Dioulasso/Burkina Faso.
4. Laboratoire d'Entomologie Fondamentale Et Appliquée/ UFR (SVT) / Université Joseph KI-ZERBO, Ouagadougou/Burkina Faso

#### Manuscript Info

##### Manuscript History

Received: 21 December 2021

Final Accepted: 24 January 2022

Published: February 2022

#### Abstract

Une étude transversale a été réalisée dans la ville de Niamey pour tester l'efficacité des deux larvicides sur des populations imaginales sauvages de *Cx pipens* et d'*An. gambiae s.l.* selon la méthode de l'OMS 2005. Les larvicides testés étaient *Bacillus thuringiensis* (Bactivec), *Bacillus sphaericus* (Griselesf) et une combinaison de Bactivec + Griselesf. Les taux de mortalité et les analyses ont été réalisés sur le logiciel R. Les taux de mortalité induits par les doses 5 ppm, 10 ppm, 100 ppm et 1000 ppm de Bactivec ont varié de 98% à 100%, supérieurs au seuil de sensibilité définis par l'OMS. La dose 5 ppm des deux autres formulations (Griselesf et Bactivec + Griselesf) a induit des mortalités inférieures à 90% contrairement à celle de Bactivec. Chez *An. gambiae*, les DL50 et DL95 ont été de 0,67 ppm et 3,00 ppm respectivement contrairement aux deux autres formulations (Griselesf et Bactivec+ Griselesf) qui ont présenté des DL50 comme suit : Griselesf : DL50 = 1,99ppm et Bactivec+ Griselesf : DL50 = 1,35ppm, et DL95 comme suit : Griselesf : DL95 = 13,64ppm et Bactivec+ Griselesf : DL95 = 9,63ppm). La situation a été différente avec les larves de *Culex pipiens* où les DL Bactivec+ Griselesf avec une DL50 de 0,503 ppm et une DL95 de 0,81 ppm. Les deux biolarvicides ont présenté une activité larvicide variant d'une espèce de moustique à une autre. Le Bactivec a été plus efficace chez les larves d'anophèles contrairement au Griselesf qui était plus efficace sur les larves de *Culex sp.* La combinaison des deux biolarvicides (Bactivec+Griselesf) a été plus efficace contre les espèces de *Culex sp.*

Copy Right, IJAR, 2022., All rights reserved.

#### Introduction:-

Les moustiques sont des arthropodes appartenant à la famille des Culicidae. Ce sont en général des vecteurs de plusieurs agents pathogènes humaines et zoonotiques tels que les protozoaires, les bactéries, les virus et les

**Corresponding Author:- Mahamane Iro Souleymane**

Address:- Département De Biologie, Faculté Des Sciences Et Techniques, Université Abdou Moumouni De Niamey, BP 10662 Niamey, Niger.

nématodes [1]. Parmi les multiples espèces de moustiques présentes dans le monde, les genres *Anopheles*, *Culex* et *Aedes* sont ceux ayant un impact majeur sur la santé des populations humaines. Selon l'OMS, les anophèles à eux seuls occasionnent près de 241 millions de cas de paludisme avec malheureusement 627 000 décès dans le monde [2]. Les espèces du genre *Culex* sont les plus répandues et les plus nuisibles dans le monde [3]. Ils transmettent des maladies parasitaires dans certaines contrées du monde. En Afrique, et principalement en Afrique subsaharienne, plusieurs espèces d'anophèles ont été identifiées comme vecteurs du *Plasmodium* parmi lesquels les espèces du complexe *An. gambiae* et du groupe *An. funestus* constituent les vecteurs majeurs. Au Niger, la faune anophélienne est dominée par *An. gambiae* et *An. funestus* qui maintiennent le pays sous une forte endémicité palustre. [4].

Le contrôle des moustiques est généralement réalisé à travers la lutte chimique par le biais des insecticides conventionnels (organochlorés, organophosphorés, carbamates, pyréthrinoides) et bactérienne (*Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus*) et dans une moindre la lutte physique à travers l'aménagement du territoire et la lutte biologique. Les insecticides d'origine bactérienne sont des bacilles Gram positif, aérobies et sporulés qui se retrouvent dans pratiquement tous les sols, dans l'eau, l'air et le feuillage des végétaux. Les plus utilisés sont *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus* [5]. Ces bacilles ont la capacité de synthétiser et d'excréter des cristaux protéiques toxiques par ingestion pour une gamme variée d'insectes dont certains lépidoptères, coléoptères et diptères. Ils constituent des biolarvicides contre les anophèles mais sans danger pour la faune non cible dont les sujets humains [3,6].

La variété *israelensis* du *B. thuringiensis* (*Bti*) est très active contre les larves de certains moustiques dont les anophèles et sa découverte a ouvert de nouveaux marchés. Malgré une rémanence faible, les bactéries sporulées peuvent être utilisées vivantes ou mortes contre les larves des moustiques. Une fois ingérées par les larves, les enzymes de digestion dégradent le cristal de la spore et libère la toxine qui tue la larve en quelques heures [7]. Les travaux antérieurs réalisés dans la sous-région, notamment au Burkina Faso [8] et au Ghana [9] ont montré une efficacité du *Bti* sur les vecteurs majeurs du paludisme résistants aux insecticides conventionnels. Sur le plan opérationnel le *Bti* est souvent utilisé en rotation ou en combinaison avec les insecticides conventionnels généralement dans les zones de résistance [10,11]. Étant donné les progrès engrangés par certains pays d'Afrique subsaharienne dans la lutte contre le paludisme, le traitement larvicide, en particulier avec des larvicides bactériens, doit être inclus dans la liste des options viables en vue d'optimiser l'efficacité des outils conventionnels (Moustiquaire Imprégnées d'insecticides à Longue Durée d'Action et Pulvérisation IntraDomiciliaire) et par conséquent accélérer les campagnes d'élimination. Pour se faire, la capitalisation des informations sur l'efficacité et la faisabilité de l'application de larvicides bactériens contre les moustiques sont importantes pour une implémentation des opérations de contrôle des larves en complémentarité avec les interventions conventionnelles visant les moustiques adultes [12–14].

Dans ce contexte le Niger a adopté un projet de lutte anti larvaire à base de ces biolarvicides comme stratégie de lutte complémentaire aux MILDA. Les Bactivec à base du *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sérotype H-14 à 0,6% et le Griselesf à base du *Bacillus sphaericus* souche 2362 à 0,5% sont les deux produits biologiques utilisés à cet effet pour lutter contre les stades pré-imaginaux des *Culex* et des *Anophèles*. La présente étude vise à évaluer l'efficacité des deux formulations commerciales à savoir le *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bactivec) et le *Bacillus sphaericus* (Griselesf) dans une étude expérimentale au laboratoire sur les larves de *Culex pipens* d'*Anopheles gambiae* s.l.

## **Materiel et Methodes:-**

### **Sites d'étude**

Cette étude a été réalisée à Saga, un quartier périurbain localisé dans le 4e Arrondissement communal de la Ville de Niamey (Figure 1). Niamey (Longitude : 2°06'35"E, Latitude : 13°30'49"N) est la capitale du Niger, située sur le fleuve Niger dans l'extrême ouest du pays. Le quartier de Saga est caractérisé par la présence de nombreux retenus d'eaux permanentes et semi-permanentes. La présence du fleuve Niger a permis l'installation d'un aménagement hydro agricole à vocation rizicole et le développement des cultures irriguées. On y dénombre également de nombreux cours d'eau temporaires ou permanents. Il existe également plusieurs canaux de collecte d'eau et une multitude d'autres gîtes créés par les activités humaines (carrières, etc.) et qui constituent des gîtes importants de reproduction de moustiques.



**Figure 1:-** Carte de la région de Niamey montrant la localisation du site de collecte des larves à Saga.

### Collecte des larves et élevage des moustiques

Les larves ont été collectées dans leurs gîtes naturels, au niveau d'un bras du fleuve Niger situé à la rive droite (commune V) sur une période allant de Septembre à Octobre 2018 (Figure 2A). La collecte a été faite à l'aide d'une longue louche et les larves collectées ont été transvasées dans des bacs en plastique contenant de l'eau de leurs gîtes respectifs. Ces bacs ont subi un traitement préalable sur le terrain consistant à les débarrasser des différents débris (Figure 2B).

Les bacs ont été par la suite marqués puis ramenés au laboratoire d'Entomologie Appliquée de la Faculté des Sciences et Techniques l'Université Abdou Moumouni de Niamey au niveau duquel elles ont été triées et réparties par genre (*Anopheles* ou *Culex*) puis par stade larvaire (stade II et III).

Pour de raisons d'ordre pratique, seulement les larves de stades IV et nymphes ont été prélevés à l'aide d'une pipette compte-goutte, et introduites dans des cages pour élevage (30 cm<sup>3</sup>) jusqu'à émergence en stades adultes. L'identification de l'*Anopheles gambiae s.l.* a été faite à l'aide d'une clé d'identification de Gillies et Coetzee [15] qui ont largement contribué à la connaissance des Anophèles d'Afrique. Pour l'espèce *Culex pipens*, étant généralement la seule espèce présente dans le milieu, l'identification a été rapide, facilitant la réalisation des Bio essais.



**Figure 2:-** Séance de collecte des larves de moustique ; A : méthode de deeping ; B : traitement des larves collectées sur le terrain pour éliminer les prédateurs.

Evaluation de l'efficacité Bactivec (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) et Griselesf (*Bacillus sphaericus*)

#### Insecticides testés

Les insecticides testés ont été Bactivec et Griselesf qui sont tous les deux des insecticides d'origine bactérienne. Bactivec et Griselesf sont formulés respectivement à base de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* et *Bacillus sphaericus*. Les tests ont été réalisés avec des concentrations croissantes de chaque insecticide et un mélange des deux insecticides. Le mélange Bactivec + Griselesf a été obtenu à partir de d'une solution mère composée de 50 volumes de Bactivec et 50 volumes de Griselesf. Les solutions ont été préparées à partir d'une solution initiale pure à 1000 ppm de matière active des deux Biolarvicides a été utilisée. Cette solution S1 a servi à la préparation des autres solutions S2 (100 ppm), S3 (10 ppm), S4 (5 ppm) et S5 (1 ppm). Celles-ci sont obtenues par dilution successive avec l'ajout de 1,0 ml de la solution S1 (1000 ppm) à respectivement 9ml, 99ml, 199ml et 999ml d'eau distillée. Le tableau I présente les différentes concentrations testées

**Tableau I:-** Les concentrations des bio larvicides testés.

Insecticides	Concentrations testés (ppm*)
Bactivec	1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 100 ppm, et 1000 ppm
Griselesf	1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 100 ppm, et 1000 ppm
Bactivec + Griselesf	1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 100 ppm, et 1000 ppm

\*1 ppm = mg/Litre

Les tests larvaires ont été réalisés sur les larves d'*An. Gambiae s.l.* et de *Culex spp.* Quatre lots de 25 larves de stades 2 ou 3 d'*Anophèles* et de *Culex* ont été utilisés pour les tests (Figure 3A) selon la méthode de l'OMS [13]. Un lot de 25 autres larves a été utilisé comme témoin. Les larves triées ont été essorées à l'aide d'une passoire avant d'être introduites dans des gobelets tests contenant les solutions S1 (1000 ppm), S2 (100 ppm), S3 (10 ppm), S4 (5 ppm), S5 (1 ppm) et S6 (0,5 ppm). Tous les résultats des tests larvaires ont été lus après 24 d'exposition (Figure 3B) pour les trois produits (Bactivec, Griselesf et Bactivec + Griselesf).

A chaque lecture, le nombre de larves mortes ou moribondes et celles nymphosées pour chaque concentration (témoins et répliques) ont été dénombrés et reportés sur des fiche (Figure 2 : A). Les larves moribondes sont celles qui montre une incoordination des mouvements ou qui ont des difficultés pour regagner la surface au bout d'une période normale. Toute larve nymphosée est retirée du test. L'essai est à reprendre quand plus de 10% de larves sont transformées 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.

$$\text{Mortalité corrigée (\%)} = \frac{\% \text{ mortalité lors du test} - \% \text{ mortalité chez les témoins}}{100 - \% \text{ mortalité des témoins}} \times 100$$



**Figure 3:-** Détermination de la sensibilité des larves de moustiques aux insecticides ; A : Exposition des larves de *culex etanophèles* aux différentes concentrations des Biolarvicides et B : Lecture des résultats du test après 24h d'exposition.

#### Analyses des données

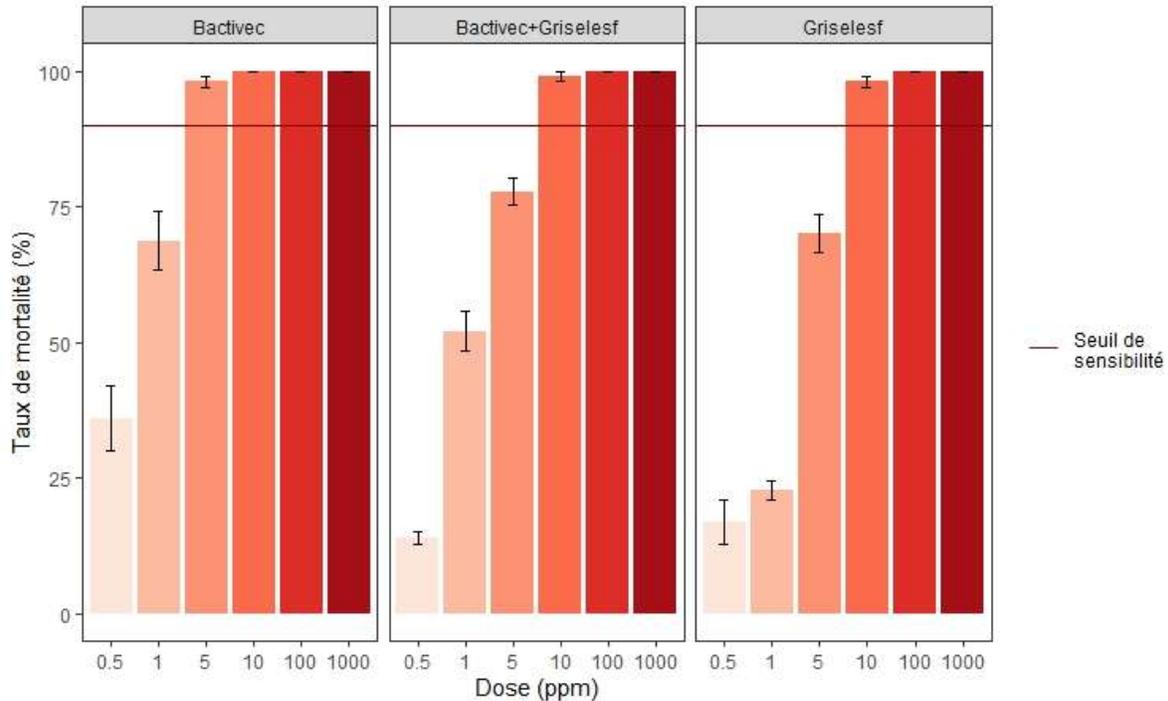
Les données ont été saisies à l'aide du logiciel Microsoft Excel 2016. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R 4.0[16]. Les taux de mortalité ont été analysés selon les seuils de sensibilité définis par l'OMS [17]. Les analyses LC<sub>probit</sub> ont été réalisées pour évaluer et déterminer les doses létales (DL50 et DL95) des différents larvicides en utilisant le package ecotox[18] sur le logiciel R 4.0 à l'aide du package ecotox 1.4.2.

#### Résultats:

##### -Sensibilité des larves de *Culex pipiens* et d'*An. gambiae s.l* aux insecticides

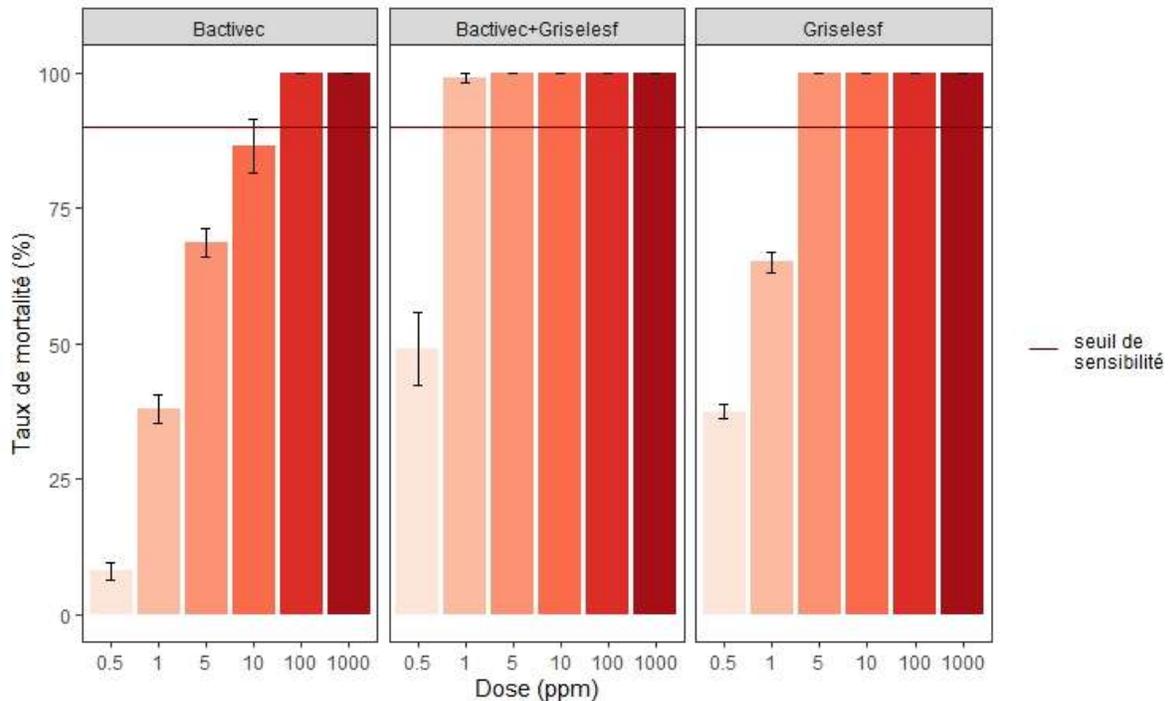
Les résultats des bioessais ont montré des taux de mortalité allant de 14,00 % à 100% sur les larves d'*An. gambiae*. Les doses 5 ppm, 10 ppm, 100 ppm et 1000 ppm de Bactivec ont induits des taux de mortalité allant de 98% à 100%, supérieurs au seuil de sensibilité définis par l'OMS.

Pour les deux autres formulations (Bactivec+Griselesf et Griselesf) seulement trois doses à savoir 10 ppm, 100 ppm et 1000 ppm ont induits des mortalités supérieures à 90%. La dose 5 ppm de ces deux formulations a induit des mortalités inférieures à 90% contrairement à celle de Bactivec(Figure 4). La différence entre les mortalités induites par Bactivec et les autres formulations a été statistiquement significative (Tukey test :  $p < 0,001$ ). Les formulations Bactivec+Griselesf et Griselesf ont entraîné des mortalités statistiquement similaires (Tukey test :  $p = 0,0599$ ).



**Figure 4:-** Taux de mortalité (%) induits par les différents larvicides sur les larves d'*An. gambiae s.l*

Chez les populations de *Culex pipiens*, les taux de mortalité induits par Bactivec ont varié de 8% à 100% et seules les doses 100 ppm et 1000 ppm ont produit des mortalités supérieures au seuil de sensibilité de l'OMS. A part la dose 0.5 ppm et 1 ppm, toutes les doses de la combinaison Bactivec+Griselesf et de Griselesf ont induits des mortalités supérieures à 90% (Figure 5). Les analyses statistiques ont montré une différence statistiquement significative entre ces trois traitements (Tukey test :  $p < 0,001$ ).



**Figure 5:-** Taux de mortalité (%) induits par les différents larvicides sur les larves de *Culex pipiens*.

Globalement les analyses statistiques ont montré un effet significatif du traitement sur les taux de mortalité induits (Test de Chi2 :  $\chi^2 = 43,626$ ,  $df = 2$ ,  $p < 0,001$ ) et une variation des mortalités en fonction des espèces de moustiques (Test de Chi2 :  $\chi^2 = 47,485$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$ ). Ces données montrent une sensibilité des larves d'*An. gambiae s.l.* à des faibles doses (~5 ppm) de Bactivec et contrairement à la combinaison Bactivec+Griselesf et Griselesf qui agissent à faible dose sur les populations de *Culex pipiens* (Test de Chi2 :  $\chi^2 = 140,545$ ,  $df = 1$ ,  $p < 0,001$ ).

### Détermination de la dose létale

Le tableau II présente les doses létales à 50% (DL50) et à 95% (DL95) des différentes formulations de larvicides. Chez *An. gambiae*, 0,67 ppm et 3,00 ppm de Bactivec ont suffi pour tuer respectivement 50% et 95% des larves. Les autres formulations (Griselesf et Bactivec+ Griselesf) ont présenté des DL50 (Griselesf : DL50 = 1,99ppm et Bactivec+ Griselesf : DL50 = 1,35ppm) et DL95 (Griselesf : DL95 = 13,64ppm et Bactivec+ Griselesf : DL95 = 9,63ppm) statistiquement différentes et plus élevées de celle de Bactivec (Tukey test :  $p < 0,001$ ).

Chez les populations de *Culex pipiens*, la situation a été différente. Les faibles DL ont été observées avec le mélange Bactivec+ Griselesf avec une DL50 de 0,503 ppm et une DL95 de 0,81 ppm. Les autres formulations ont produit des doses létales statistiquement différentes et supérieures à celle du mélange Bactivec+ Griselesf (Tukey test :  $p < 0,001$ ).

**Tableau II:-** Doses létales des différentes formulations de larvicides testés.

Traitements	<i>An gambiaesl</i>		<i>Culex pipiens</i>	
	DL50 [95%CI]	DL95 [95%CI]	DL50 [95%CI]	DL95 [95%CI]
Bactivec	0,67 [0,561 ; 0,786]	3,00 [2,26 ; 4,63]	2,21 [1,82 ; 2,68]	20,88 [14,81 ; 32,82]
Griselesf	1,99 [1,67 ; 2,37]	13,64 [10,15 ; 20,01]	0,67 [0,58 ; 0,77]	2,48 [1,89 ; 3,87]
Bactivec+Griselesf	1,35 [1,12 ; 1,31]	9,63 [7,15 ; 14,25]	0,503 [0,46 ; 0,539]	0,81 [0,72 ; 1,02]

### Discussion:-

L'élimination des maladies à transmission vectorielle constitue un défi majeur en Afrique subsaharienne. La lutte antivectorielle à base des insecticides constitue à cet effet l'élément principal pour l'élimination des maladies à transmission vectorielle. Cependant les récentes données font état d'une expansion des résistances aux insecticides, des changements globaux du comportement du vecteur et une diversité du système vectoriel en Afrique [14,19–21]. Cela indique clairement que les outils actuels à bases des insecticides ne peuvent à eux seuls atteindre l'élimination des maladies vectorielles. Face à ces problèmes récurrents, la recherche de stratégies et moyens de lutte alternative devient une grande priorité. Parmi ces différentes stratégies, les bio larvicides occupent une place de choix et pourront constituer une bonne alternative aux larvicides chimiques du fait de leur impact faible pour l'environnement [3].

La présente étude a testé l'efficacité de deux bio-larvicides Bactivec et Griselesf respectivement formulés à base de *Bacillus thuringiensis var. israelensis* sérotype H-14 à 0,6% et de *Bacillus sphaericus* souche 2362 à 0,5%. Ces deux larvicides microbiens ont été testés sur les larves sauvages d'*Anopheles sp* et de *Culex sp*. Les résultats des tests au laboratoire ont montré que le Bactivec et le Griselesf utilisés individuellement ainsi que le mélange des deux produits ont présenté une bonne efficacité sur les larves d'*Anophèles gambiae s.l.* et du *Culex pipiens*. Des résultats similaires ont été rapportés dans certaines régions africaines montrant ainsi la grande sensibilité de ces espèces de moustiques face aux larvicides microbiens [8,12,22]. Ces résultats montrent également que les deux Biolarvicides (Bactivec et Griselesf) utilisés seul ou mélangés n'ont pas la même efficacité vis-à-vis des deux espèces de larves.

Pour des nombreux auteurs [10,23–26], les moustiques du genre *Culex* sont plus sensibles au *Bacillus sphaericus* comparativement aux autres genres. Cependant, il y a certaines espèces de *Culex* qui demeurent insensibles au *Bacillus sphaericus*. C'est le cas de *Culex cinereus*, un prédateur de *Culex quinquefasciatus*. Celui-ci est toutefois très sensible au *Bacillus sphaericus* [27]. La lutte contre les moustiques est une pratique vitale et essentielle pour la santé publique dans le monde entier et particulièrement dans les régions tropicales où beaucoup de maladies, transmissibles par les moustiques, sont en émergence.

Dans les programmes actuels de lutte contre ces vecteurs, en raison de l'émergence rapide des résistances et de la pollution environnementale, l'utilisation des insecticides chimiques pour le contrôle de moustique n'est plus encouragée. La recherche s'oriente vers l'utilisation de moyens alternative efficace contre les vecteurs et conservatrice de l'environnement. Dans cette logique l'utilisation de ces biolarvicides serait une alternative aux

larvicides chimiques dans le contrôle des formes immatures des moustiques. Cependant ces larvicides devraient faire l'objet d'autres essais dans certaines contrées de l'Afrique afin de valider leur efficacité au niveau continentale.

### Conclusion:-

Les travaux effectués révèlent que de très faibles doses de larvicides microbiens (Bactivec, Griselesf et mélange de Bactivec + Griselesf) suffisent pour réduire, voire éliminer les stades immatures de larves de *Culex* et d'*Anophèles*. Les larves sauvages d'*An. Gambiae* sont mieux contrôlées par le Bactivec et le Griselesf contrôle mieux les larves sauvages de *Culex sp.* Le mélange des deux produits demeure encore plus efficace sur le *Culex* que si le Griselesf est utilisé seul. Cette étude de Bioessai réalisée au laboratoire d'entomologie appliquée de la faculté des Sciences et Techniques de l'Université Abdou Moumouni de Niamey devrait permettre au Programme National de lutte contre le Paludisme d'adapter les campagnes de traitement des gîtes larvaires selon les espèces et genres de moustiques rencontrés dans les gîtes.

### Conflit d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflit d'intérêts.

### Contributions des auteurs

Iro M et Doumma A ont conçu l'étude, Iro M a conduit l'étude et rédigé le premier draft du manuscrit ; Diloma Dieudonné Soma, Mahamadi Kientega et Iro Mont analysé les données ; Abdoul-Aziz Maiga, Karmadine Hima Doumma ont lu et corrigé le manuscrit ; tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

### Remerciements:-

Ce travail a été rendu possible par la disponibilité des Biolarvicides Bactivec et Griselesf fournis par le Programme National de Lutte contre le Paludisme (PNLP) du Niger. Nous remercions Dr Elhadj Amadou Niang Université Cheik Anta Diop de Dakar pour la correction de ce document.

### References:-

1. Hemingway J, Ranson H. (2000). Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.*
2. WHO. (2021). World malaria report 2021 [Internet]. Geneva; 2021. Available from: <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme>
3. Duvallet G, Fontenille D, Robert V, editors. (2017). Entomologie médicale et vétérinaire [Internet]. IRD Éditions; 2017. Available from: <http://books.openedition.org/irdeditions/21923>
4. PNLN Niger. (2016). Plan National de Gestion et de Surveillance de la Résistance aux Insecticides 2016-2020. NIAMEY; 2016.
5. Tamilselvan S, Jambulingam P, Manoharan V, Shanmugasundaram R, Vivekanandan G, Manonmani AM. (2015). Fly ash based *Bacillus thuringiensis var. israelensis* formulation for use against *Culex quinquefasciatus*, the vector of filariasis in natural ecosystems. *J Vector Borne Dis.*
6. Achille GN, Christophe HS, Yilian L. (2010). Effect of *Bacillus thuringiensis var. israelensis (H-14)* on *Culex*, *Aedes* and *Anopheles* larvae (Cotonou; Benin). *Stem Cell.* 1:60–7.
7. Tetreau G. (2012). Devenir du Bioinsecticide Bti dans l'environnement et impact sur le développement de résistances chez le moustique. Université de Grenoble.; 2012.
8. Dambach P, Louis VR, Kaiser A, Ouedraogo S, Sié A, Sauerborn R, et al. (2014). Efficacy of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* against malaria mosquitoes in northwestern Burkina Faso. *Parasit Vectors.* 7:371. Available from: <http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-371>
9. Nartey R, Owusu-Dabo E, Kruppa T, Baffour-Awuah S, Annan A, Oppong S, et al. (2013). Use of *Bacillus thuringiensis var israelensis* as a viable option in an Integrated Malaria Vector Control Programme in the Kumasi Metropolis, Ghana. *Parasites and Vectors.*
10. Zahir NS, Federici BA, Mulla MS. (2004). Laboratory and simulated field evaluation of a new recombinant of *Bacillus thuringiensis ssp. israelensis* and *Bacillus sphaericus* against *Culex* mosquito larvae (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.*
11. Kahindi SC, Muriu S, Derua YA, Wang X, Zhou G, Lee MC, et al. (2018). Efficacy and persistence of long-lasting microbial larvicides against malaria vectors in western Kenya highlands. *Parasites and Vectors.*
12. Derua YA, Kweka EJ, Kisinza WN, Githeko AK, Moshia FW. (2019). Bacterial larvicides used for malaria vector control in sub-Saharan Africa: review of their effectiveness and operational feasibility. *Parasit Vectors.* 12:426. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3683-5>

13. WHO. (2014). Entomologie du paludisme et lutte antivectorielle [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2014. p. 200. Available from: <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241505819/fr/>
14. Benelli G, Beier JC. (2017). Current vector control challenges in the fight against malaria. *Acta Trop.* 174:91–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X17306988>
15. Gillies MT, Coetzee M. (1987). A supplement to the anophelinae of Africa south of the sahara (Afrotropical region). South African Inst. Med. Res. Johannesburg; 1987.
16. R Core Team. (2021). R: The R Project for Statistical Computing [Internet]. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.; 2021. Available from: <https://www.r-project.org/>
17. WHO. (2016). Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes Second edition [Internet]. Geneva; 2016. p. 1–55. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/250677>
18. Wheeler MW, Park RM, Bailer AJ. (2006). Comparing median lethal concentration values using confidence interval overlap or ratio tests. *Environ Toxicol Chem.* 25:1441–4.
19. Bamou R, Mbakop LR, Kopya E, Ndo C, Awono-Ambene P, Tchuinkam T, et al. (2018). Changes in malaria vector bionomics and transmission patterns in the equatorial forest region of Cameroon between 2000 and 2017. *Parasit Vectors.* 11:464. Available from: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-3049-4>
20. Sougoufara S, Doucouré S, Sembéne PMB, Harry M, Sokhna C. (2017). Challenges for malaria vector control in sub-Saharan Africa: Resistance and behavioral adaptations in *Anopheles* populations. *J Vector Borne Dis.* 54:4–15.
21. Braack L, Hunt R, Koekemoer LL, Gericke A, Munhenga G, Haddow AD, et al. (2015). Biting behaviour of African malaria vectors: 1. where do the main vector species bite on the human body? *Parasit Vectors.* 8:76. Available from: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/76>
22. Diédhiou SM, Konaté L, Doucouré S, Samb B, Niang EA, Sy O, et al. (2017). Efficacité de trois larvicides d'origine biologique et d'un régulateur de croissance contre *Anopheles arabiensis* au Sénégal. *Bull la Société Pathol Exot.* 110:102–15. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13149-016-0531-4>
23. Dagnogo M. CJ. (1982). Un insecticide biologique : *Bacillus sphaericus* : 1. Activité larvicide de *B. sphaericus* sur quelques espèces et souches de moustiques. *Cah ORSTOMSérie Entomol Médicale Parasitol.* 20:133–8. Available from: <https://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:02303>
24. Davidson EW. (1989). Variation in binding of *Bacillus sphaericus* toxin and wheat germ agglutinin to larval midgut cells of six species of mosquitoes. *J Invertebr Pathol.* 53:251–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022201189900153>
25. Federici BA, Park H-W, Bideshi DK, Wirth MC, Johnson JJ. (2003). Recombinant bacteria for mosquito control. *J Exp Biol.* 206:3877–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506223>
26. Poopathi S, Tyagi BK. (2004). Mosquitocidal toxins of spore forming bacteria: Recent advancement. *African J. Biotechnol.* 2004.
27. Davidson EW. (1989). The present status of *Bacillus sphaericus*. *Isr J Entomol.* XXIII:9–15. Available from: <http://www.entomology.org.il/sites/default/files/pdfs/IJE-1989-davidson.pdf>.