

ENTOMOLOGIE MÉDICALE

Histopathologie d'*Anopheles gambiae* s.l.* Giles, 1902 (Diptera, Culicidae) soumis à l'activité larvicide de l'extrait aqueux de *Persea americana* Miller, 1768 (Lauraceae).

H. K. Koua (1), S. H. Han (2) & M.-A. d'Almeida (3)

(1) Université de Cocody, UFR de biosciences, Laboratoire de zoologie-biologie animale, 22 BP 1611, Abidjan 22, Côte d'Ivoire. Tél : (225) 43 91 84

(2) Laboratoire d'écophysiologie des invertébrés, Université Paris XII Val de Marne, Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil cedex, France

(3) Faculté des sciences et techniques, Université de Cocody, Laboratoire de biologie cellulaire, 22 BP 582, Abidjan 22, Côte d'Ivoire. Tél: (225) 42 71 70

Manuscrit n°1868. "Entomologie médicale". Accepté le 5 mars 1998.

Summary: Histopathology of *Anopheles gambiae* s.l. Giles (Diptera, Culicidae) Treated with an Aqueous Extract of *Persea americana* Miller, 1768 (Lauraceae).

Key-words: Histopathology - Larvae - Larvicide - Vegetal extracts - *Anopheles gambiae* - *Persea americana*

Larvae of Anopheles gambiae treated with an aqueous extract of Persea americana suffer important damages of the midgut. The first epithelial cells to be affected are those at the posterior part of the midgut which become hypertrophic after only 30 min. After one hour most of the cells in this part lyse. The cytoplasmic material is then rejected towards the lumen gut, between the peritrophic membrane and the midgut epithelium. Subsequently, an almost total cell degeneration is observed. Cells of gastric caeca and cells at the intermediary and anterior parts of the midgut undergo the same histopathology, albeit after a longer period.

Résumé :

Des larves d'Anopheles gambiae soumises à un extrait aqueux de Persea americana présentent d'importantes lésions au niveau de leur intestin moyen. Les premières cellules épithéliales à être atteintes sont celles de la partie postérieure de l'estomac qui, après seulement 30 minutes, s'hypertrophient. Après une heure, la majorité des cellules de cette même zone est dégénérée. Leur matériel cytoplasmique est alors rejeté dans la lumière intestinale, entre la membrane péritrophique et l'épithélium intestinal. Par la suite, il est constaté une lyse presque totale de ces cellules. Les cellules des caeca gastriques, des parties intermédiaire et antérieure de l'estomac subissent la même histopathologie après un délai plus long.

Mots-clés : Histopathologie - Larves - Larvicide - Extraits végétaux - *Anopheles gambiae* - *Persea americana*

Introduction

Les problèmes liés à l'utilisation des produits chimiques de synthèse pour lutter contre les insectes nuisibles dans les pays en développement sont nombreux. En effet, outre le coût extrêmement élevé de ces pesticides, les résistances observées chez les insectes cibles constituent un frein à leur utilisation. N'utilisant que 20 % des pesticides chimiques produits dans le monde, ces pays déplorent la majorité des intoxications provoquées par les pesticides (4). Une nouvelle orientation s'impose donc pour ces régions.

L'utilisation des substances naturelles et leurs dérivés est une alternative qui doit pouvoir servir de base pour la mise au point de nouvelles molécules (14).

Les plantes contiennent parfois des molécules ayant des propriétés insecticides. Selon FOURNIER (7), l'un des insecticides connus depuis des siècles est le pyrèthre, poudre obtenue à partir de *Chrysanthemum roseum* et *Chrysanthemum cinerariae* - *folium*.

De nombreux travaux ont été menés à partir d'extraits végétaux. C'est notamment le cas des investigations sur des extraits d'huile

d'*Azadirachta indica* (2) et sur une fraction extraite du fruit de *Melia volkensi* (13). Plus récemment, des extraits de plantes utilisés par GAKURU et FOUA-BI (8) sur la bruche du niébé (*Callosobruchus maculatus* Fab.) et le charançon du riz (*Sitona philus oryzae* L.) ont donné des résultats satisfaisants. Malheureusement, ces travaux ne font pas mention d'investigations histologiques pouvant permettre d'apprécier le mécanisme de leur toxicité sur les insectes nuisibles.

Nous avons, pour notre part, montré l'activité larvicide de l'extrait aqueux de feuilles de *Persea americana* sur les larves d'*Anopheles gambiae* (11). *Persea americana* est une plante originaire d'Amérique tropicale dont les feuilles sont utilisées comme béchique, cholagogue et diurétique (10). Le fruit, l'avocat, est consommé sous diverses préparations. En Côte d'Ivoire, elle est cultivée dans toute la région forestière et, en savane, on la trouve jusqu'au niveau de la ville de Katiola (1). L'étude histopathologique que nous présentons dans cet article a pour objet de préciser les étapes de l'intoxication des cellules mésentériques des larves par cet extrait foliaire.

* *Anopheles gambiae* s.l. (sensu lato) désigne l'ensemble des espèces du complexe *Anopheles gambiae*

Matériel et méthodes

L'extrait aqueux de *Persea americana* est obtenu à partir de feuilles séchées soit à l'air libre ($28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$), soit à l'étuve (30°C). Les feuilles sèches ont été broyées à l'aide d'un mixeur jusqu'à leur réduction en poudre. Par la suite, 50 g de cette poudre végétale ont été mélangés avec 2 l d'eau bidistillée à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 48 h. Ce mélange, filtré sur BÜCHNER à l'aide de papier WATHMAN (3 MM), a été évaporé à pression réduite à la température de 50°C par un évaporateur rotatif BUCHI. L'évaporat obtenu, soluble dans l'eau, a été utilisé pour préparer les différentes concentrations de l'extrait aqueux de *Persea americana*.

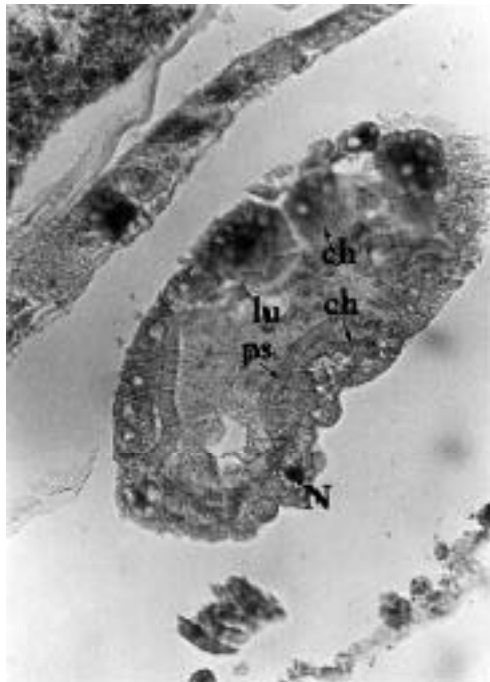
L'étude a porté sur des larves de stade 4 d'*Anopheles gambiae* s.l. élevées dans les conditions suivantes en insectarium : 26°C , 80 % H.R., 12 h de jour, à la faculté des sciences et techniques de l'université de Cocody (Côte d'Ivoire).

Les larves ont été mises en contact avec l'extrait aqueux à la concentration de 850 $\mu\text{g/ml}$ (concentration létale après 24 h quel que soit le stade de développement larvaire) dans des boîtes en plexiglas de 5 cm de hauteur et de 8 cm de diamètre. Elles ont été systématiquement pré-

levées après des temps donnés : 30 min., 1 h, 2 h, 4 h et 16 h et ont été immédiatement fixées dans du BOUIN alcoolique pendant 72 h. Des larves témoins, placées dans l'eau distillée, ont été prélevées à ces mêmes temps et ont également été fixées. Après déshydratation dans des bains d'éthanol de titre croissant 70° , 90° , 100° , à raison d'une heure pour chaque bain, les pièces ont été placées dans du butanol pendant 24 h, puis ont été imprégnées et incluses dans de la paraffine. Les coupes d'une épaisseur de 5 μm colorées selon la technique de l'Azan de HAIDENHAIN (12), permettent de suivre les modifications histopathologiques au niveau des cellules de l'estomac au cours du temps.

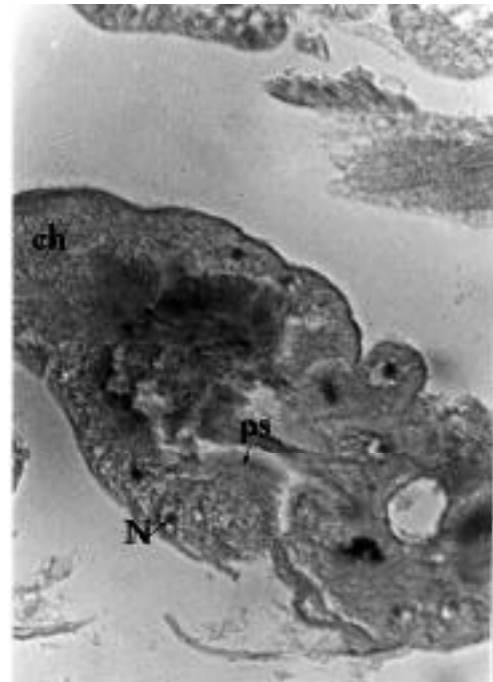
1b. Coupe longitudinale d'un caecum gastrique de larve après 1 h d'exposition à l'extrait de *Persea americana*.

1b. Longitudinal section of gastric caecum of larva after 1 hour of exposure to *Persea americana* extract.



1c. Coupe longitudinale d'un caecum gastrique de larve après 2 h d'exposition à l'extrait de *Persea americana*.

1c. Longitudinal section of gastric caecum of larva after 2 hours of exposure to *Persea americana* extract.



cc : cellules du caecum gastrique ; lu : lumière du caecum gastrique ; N : noyau ; ps : plateau strié ; ch : cellules hypertrophiées

Résultats

L'histologie des caeca gastriques et de trois régions de l'estomac (antérieure, intermédiaire et postérieure) est présentée, car ces zones ont montré de profonds changements. Les cellules du cardia n'ont présenté aucune altération décelable.

Témoins

L'histologie des caeca gastriques montre qu'ils sont constitués d'une couche de cellules de forme variable. Ces cellules possèdent une bordure en brosse très développée (fig. 1a).

Figures 1 [a-c].

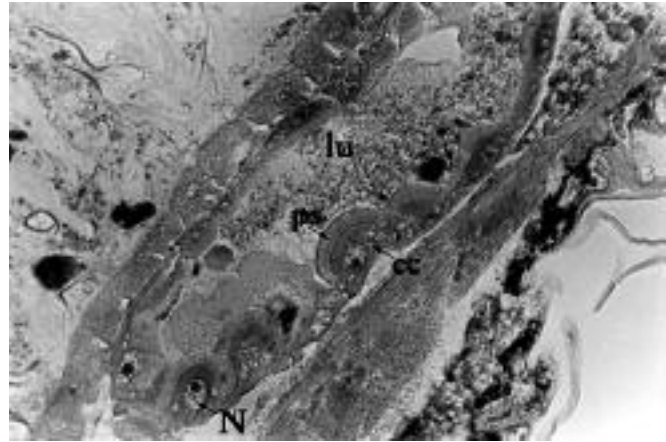
Histologie des caeca gastriques de larve de stade 4 d'*Anopheles gambiae* s.l.

Histology of gastric caeca of larvae at stage 4 of *Anopheles gambiae* s.l.

Coloration : Azan de HAIDENHAIN ; grossissement : x 1000

1a. Coupe longitudinale d'un caecum gastrique de larve témoin.

1a. Longitudinal section of gastric caecum of control larva.



Les parties antérieure, intermédiaire et postérieure de l'estomac sont constituées de tissus épithéliaux unistratifiés à noyau en position centrale.

- Les cellules de la partie antérieure sont cubiques ($1,0 \times 1,0 \mu\text{m}$) (fig. 2a).

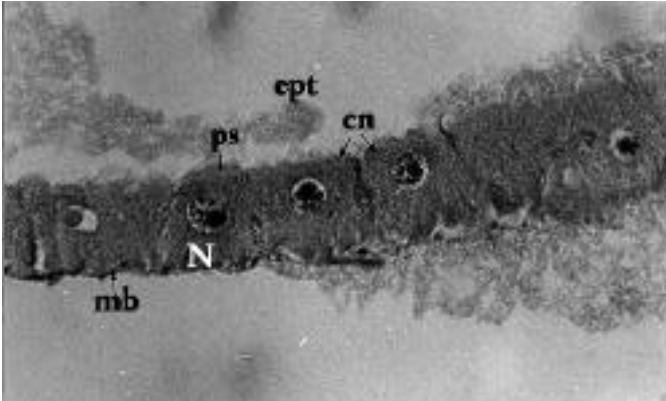
- Dans la partie intermédiaire de l'estomac, les cellules sont pavimenteuses (cellules plus larges ($1,8 \mu\text{m}$) que hautes ($0,7 \mu\text{m}$)) (fig. 3a).

- Les cellules de la partie postérieure de l'estomac sont prismatiques ($1,2 \mu\text{m}$ de hauteur et $0,5 \mu\text{m}$ de largeur). La partie apicale des cellules est constituée d'un important plateau strié (fig. 4a).

Figure 2 [a-c].

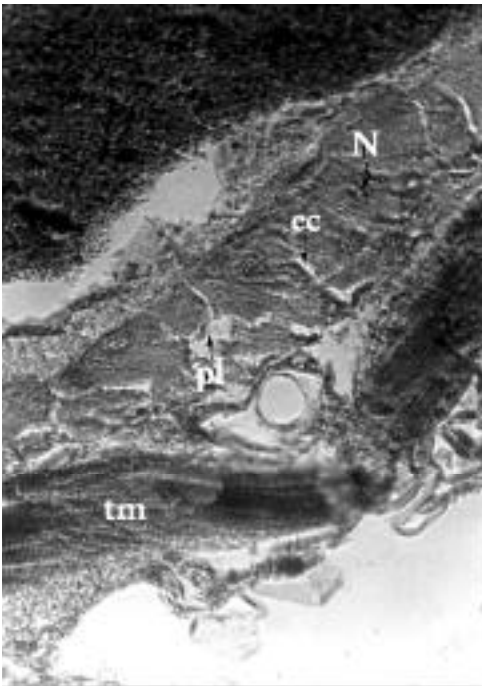
Histologie de la partie antérieure de l'estomac de larve de stade 4 d'*Anopheles gambiae* s.l.
Histology of anterior part of larva's stomach at stage 4 of Anopheles gambiae s. l.
 Coloration : Azan de HEIDENHAIN ; grossissement : x 1000

2a. Coupe longitudinale de la partie antérieure de l'estomac de larve témoin.
 2a. Longitudinal section of anterior part of stomach control larva.



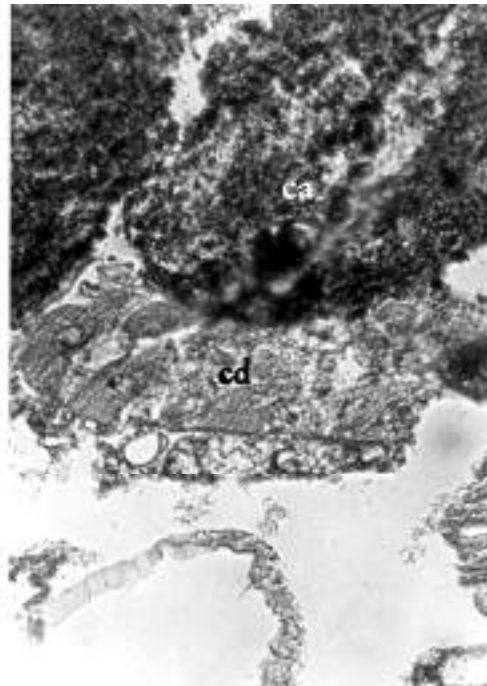
2b. Coupe longitudinale de la partie antérieure de l'estomac de larve après 4 h d'exposition à l'extrait de *Persea americana*.

2b. Longitudinal section of anterior part of larva's stomach after 4 hours of exposure to *Persea americana* extract.



2c. Coupe longitudinale de la partie antérieure de l'estomac de larve après 16 h d'exposition à l'extrait de *Persea americana*.

2c. Longitudinal section of anterior part of larva's stomach after 16 hours of exposure to *Persea americana* extract.



cn : cellules de la partie antérieure ; ept : espace péritrophique ; mb : membrane basale ; N : noyau ; ps : plateau strié ; ca : colonne alimentaire ; ec : espace intercellulaire ; pl : plages de lyse ; tm : tissu musculaire, cd : cellules détruites

Échantillons traités

Cellules des caeca gastriques

Une hypertrophie cellulaire est observée après 1 h d'exposition à l'extrait (fig. 1b). Après 2 h de traitement, les formes cellulaires ne sont presque plus perceptibles. Des rejets de débris cytoplasmiques sont présents dans la lumière des caeca qui est à peine visible du fait de l'hypertrophie des cellules. Le plateau strié est morphologiquement modifié (fig. 1c). Après 4 h d'exposition à l'extrait aqueux de *Persea americana*, une lyse des cellules des caeca gastriques est constatée.

Partie antérieure de l'estomac

La première modification observée après 2 h de traitement des larves avec l'extrait aqueux de *Persea americana* est une légère hypertrophie cellulaire. Après 4 h, les cellules de cette

portion présentent des plages de lyse intracellulaire et des espaces intercellulaires élargis, désorganisant ainsi l'épithélium intestinal (fig. 2b). L'épithélium de la partie antérieure est détruit après 16 h de traitement (fig. 2c).

Partie intermédiaire de l'estomac

Les modifications ne sont perceptibles qu'après 2 h de traitement. Après ce délai, nous observons une légère hypertrophie des cellules de cette partie. Les observations faites après 4 h de traitement montrent que les espaces intercellulaires sont plus larges. Une lyse apicale est également observée par endroits (fig. 3b). Les cellules sont détruites après 16 h de traitement (fig. 3c).

Partie postérieure de l'estomac

Après 30 mn d'exposition à l'extrait aqueux de *Persea americana*, les cellules de la partie postérieure de l'estomac des larves traitées sont hypertrophiées. Après 2 h, ces cellules présentent une lyse apicale avec rejet de leur matériel cytoplasmique dans la lumière intestinale entre la membrane péritrophique et l'épithélium intestinal (fig. 4b). Les observations faites après 4 h de traitement montrent que les cellules présentent de nombreuses plages de lyse intracellulaire (fig. 4c). Après 16 h, toutes les cellules de cette portion sont détruites (fig. 4d).

Discussion

Le mésentéron a présenté de profondes modifications à la suite de l'intoxication des larves par l'extrait aqueux de *Persea americana*. Cela s'explique par le fait que cette portion est la partie réellement "digestive" chez les insectes (15). En effet, le mésentéron sécrète les enzymes digestifs et intervient dans les phénomènes d'absorption (3). CHAPMAN (5), puis RACCAUD (15), ont constaté que chaque région du mésentéron absorbe des substances de nature diverse. WIGGLESWORTH in WATERHOUSE & DAY (16) a dans ce sens montré que quelques heures suffisent pour qu'il apparaisse un dépôt massif de glycogène à l'intérieur de la partie postérieure de l'estomac chez des larves de moustiques nourries avec du fructose et du glucose ou avec de l'amidon. Par contre, les cellules de la moitié antérieure de l'estomac chez les moustiques absorbent majoritairement les graisses (16). Les cellules de la partie postérieure de l'estomac, ayant été les premières endommagées, laissent supposer qu'elles sont le site majeur de l'absorption de l'élément toxique contenu dans l'extrait de *Persea americana*.

CHARLES et DE BARIAC (6) ont constaté, lors de l'étude histopathologique de l'action de la α -endotoxine de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sur les larves d'*Aedes aegypti*, que les premières modifications histo-cytologiques du mésentéron sont décelables environ 10 minutes après l'ingestion des

cristaux de *Bacillus thuringiensis* et concernent tout d'abord les caeca gastriques et l'estomac postérieur. KARCH et COZ (9), étudiant l'histopathologie des larves de *Culex quinquefasciatus* soumises à l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus*, ont également constaté que les premières cellules qui subissent des transformations morphologiques sont celles de la partie postérieure de l'estomac.

Chronologiquement, dans notre étude, les cellules des caeca gastriques subissent des modifications pathologiques après celles de la partie postérieure de l'estomac. Ce constat peut s'expliquer par le fait que, bien que les cellules des caeca gastriques et de l'estomac postérieur possèdent une bordure en brosse particulièrement développée, les dernières posséderaient des

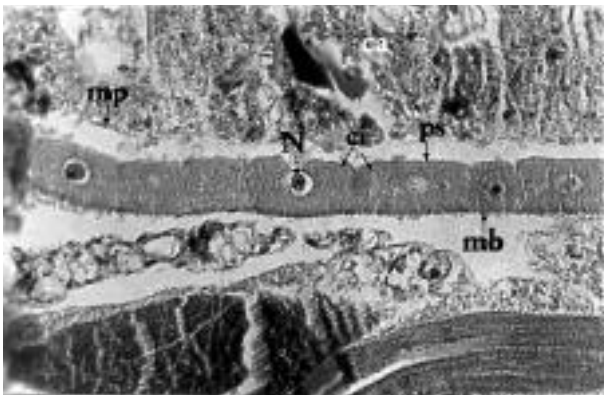
Figure 3. [a-c].

Histologie de la partie intermédiaire de l'estomac de larve de stade 4 d'*Anopheles gambiae* s.l.

Histology of middle part of larva's stomach at stage 4 of *Anopheles gambiae* s.l.

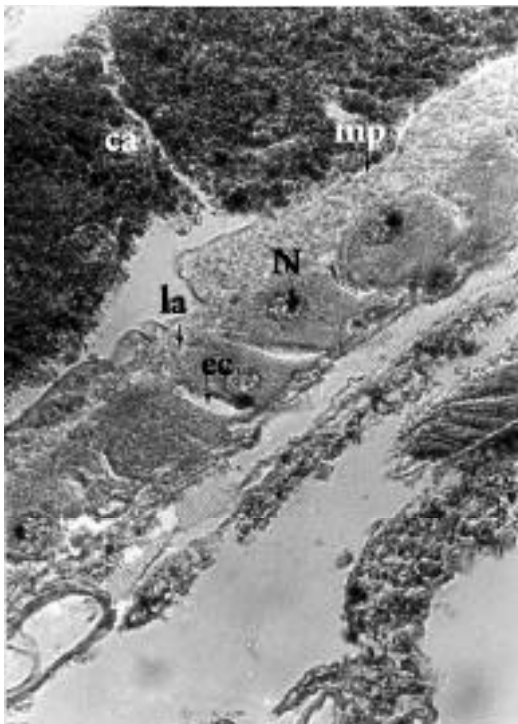
Coloration : Azan de HEIDENHAIN ; grossissement : x 1000

3a. Coupe longitudinale de la partie intermédiaire de l'estomac de larve témoin.
3a. Longitudinal section of middle part of stomach control larva.



3b. Coupe longitudinale de la partie intermédiaire de l'estomac de larve après 4 h d'exposition à l'extrait de *Persea americana*.

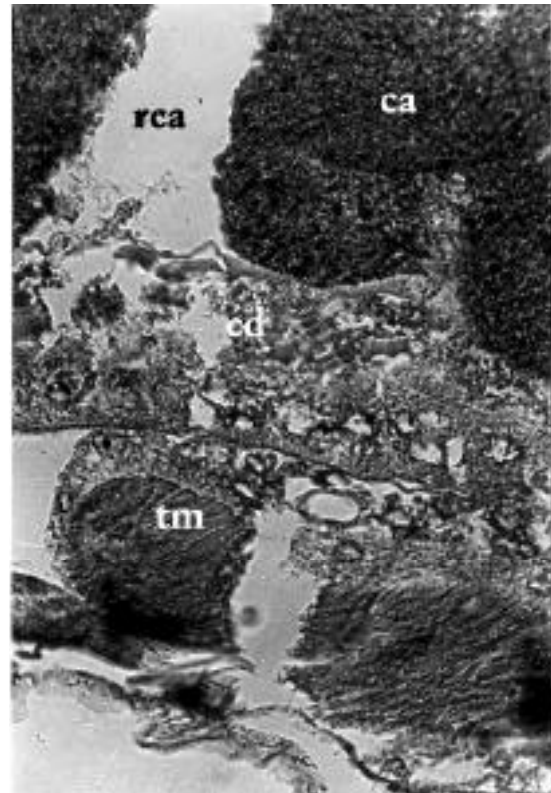
3b. Longitudinal section of middle part of larva's stomach after 4 hours of exposure to *Persea americana* extract.



ca : colonne alimentaire ; ci : cellules de la partie intermédiaire ; mb : membrane basale ; mp : membrane péritrophique ; N : noyau ; ps : plateau strié ; ec : espace intercellulaire ; la : lyse apicale ; cd : cellules détruites ; rca : rupture de la colonne alimentaire ; tm : tissu musculaire

3c. Coupe longitudinale de la partie intermédiaire de l'estomac de larve après 16 h d'exposition à l'extrait de *Persea americana*.

3c. Longitudinal section of middle part of larva's stomach after 16 hours of exposure to *Persea americana* extract.



sites ayant une plus grande affinité à l'absorption de l'élément toxique contenu dans l'extrait de *Persea americana*.

Les symptômes gagnent par la suite les cellules des portions intermédiaire et antérieure de l'estomac avec le même schéma histopathologique. Le retard observé au niveau de l'établissement des modifications dans les deux dernières portions citées peut s'expliquer par le fait que les cellules des portions antérieure et intermédiaire absorberaient naturellement très peu d'éléments toxiques. Le seuil de détérioration des cellules de ces portions serait donc atteint bien plus tard que celles de la partie postérieure de l'estomac.

L'ensemble des dommages observés entraîne, après 16 heures, la destruction des différents types cellulaires, puis la mort des larves.

Conclusion

L'extrait aqueux de *Persea americana* agit après ingestion au niveau cellulaire, d'abord par une hypertrophie, puis une détérioration et enfin une lyse des cellules du mésentéron. L'uniformité de l'histopathologie au niveau des différentes régions du mésentéron présage de l'existence d'un mode d'action similaire dans les différents types cellulaires observés. Cependant la différence dans la vitesse de réaction de ces parties montre que la différence morphologique des cellules est doublée d'une différence physiologique.

Une étude cytotologique semble nécessaire pour nous éclairer davantage sur le mécanisme d'action de l'extrait aqueux de *Persea americana*.

Remerciements

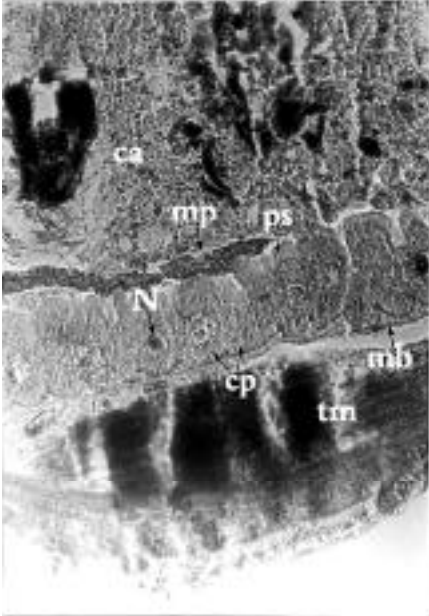
Nous remercions le professeur FOUA-BI Kouahou, président de la Société entomologique de Côte d'Ivoire et chef du laboratoire de zoologie de l'Université de Cocody, pour son aide dans la rédaction de ce manuscrit.

Figure 4 [a-d]

Histologie de la partie postérieure de l'estomac de larve de stade 4 d'*Anopheles gambiae* s.l.
*Histology of posterior part of larva's stomach at stage 4 of *Anopheles gambiae* s.l.*
 Coloration : Azan de HEIDENHAIN ; grossissement : x 1000

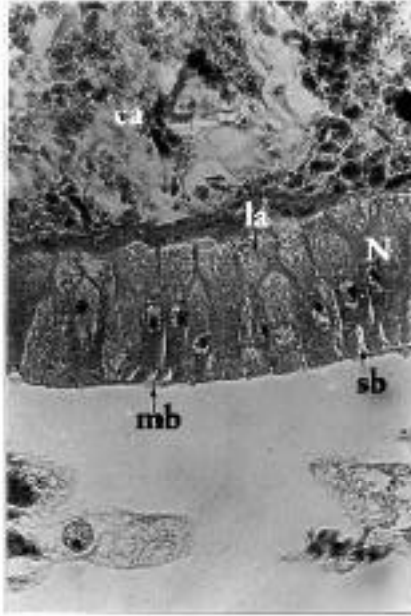
4a. Coupe longitudinale de la partie postérieure de l'estomac de larve témoin.

4a. Longitudinal section of posterior part of stomach control larva.



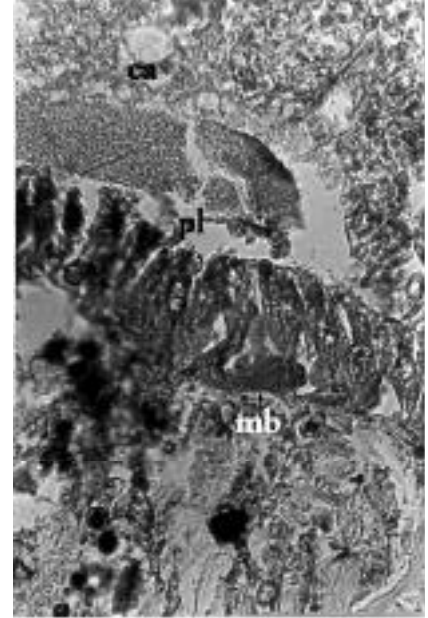
4b. Coupe longitudinale de la partie postérieure de l'estomac de larve après 2 h d'exposition à l'extrait aqueux de *Persea americana*.

*4b. Longitudinal section of posterior part of larva's stomach after 2 hours of exposure to *Persea americana* extract.*



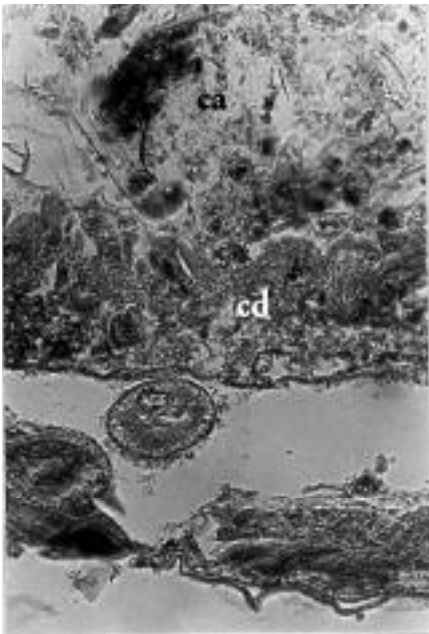
4c. Coupe longitudinale de la partie postérieure de l'estomac de larve après 4 h d'exposition à l'extrait aqueux de *Persea americana*.

*4c. Longitudinal section of posterior part of larva's stomach after 4 hours of exposure to *Persea americana* extract.*



4d. Coupe longitudinale de la partie postérieure de l'estomac de larve après 16 h d'exposition à l'extrait de *Persea americana*.

*4d. Longitudinal section of posterior part of larva's stomach after 16 hours of exposure to *Persea americana* extract.*



ca : colonne alimentaire ;
 cp : cellules de la partie postérieure ;
 mb : membrane basale ;
 mp = membrane péritrophique ;
 N : noyau ; ps : plateau strié ;
 tm : tissu musculaire ; la : lyse apicale ;
 sb : séparation à la base des cellules ;
 pl : plages de lyse ; cd : cellules détruites

Références bibliographiques

1. AKE - ASSI L - Famille des Lauraceae. In: *Flore de Côte d'Ivoire : étude descriptive et biogéographique, avec quelques notes ethnobotaniques*. Doct. d'état, Université nationale de Côte d'Ivoire, IB, Fac. science tech. 1984, 329-332.
2. ATTRI BS & PRASAD GR - Neem oil extractive-an effective mosquito larvicide. *Indian J Entomol*, 1980, **42**, 371-374.
3. BEAUMONT A & CASSIER P - Tube digestif, Régimes alimentaires, Digestion chez les insectes. In : *Biologie animale. Des Protozoaires aux Métazoaires épithéliens*. Ed. Dunod, 1994, Tome 2, 662-672.
4. BOUGUERA ML & PHILOGENE B - Les pesticides synthétiques et les pesticides naturels. In : *Environnement en milieu tropical*. Ed. Scient. Tech. et Méd., 1994, 175-180.
5. CHAPMAN RF - Digestion and absorption. In: *The insects. Structure and fonction*. The English Universities Press LTD., 1969, Chap. IV: 26-69.
6. CHARLES JF & de BARJAC H - Histopathologie de l'action de la α -endotoxine de *Bacillus thuringiensis* Var. *israelensis* sur les larves d'*Aedes aegypti* (Dip. : Culicidae). *Entomophaga*, 1981, **26**, 203-212.
7. FOURNIER J - Insecticides. In: *Chimie des Pesticides*. Ed. des trois Moutiers, Vienne., 1988, 235-320.
8. GAKURU S & FOUA-BI K - Effet de plantes sur la bruche du niébé (*Callosobruchus maculatus* Fab.) et le charançon du riz (*Sitophilus oryzae* L.). *Cahiers d'études et de recherches francophones : Agricul-tures*. Ed. John LIBBEY Eurotext, 1996, vol. 5, 39-42.
9. KARCH S & COZ J - Histopathologie de *Culex pipiens* Linné (Diptera : Culicidae) soumis à l'activité larvicide de *Bacillus sphaericus* 1593-4. *Cah. ORSTOM, sér Entom Méd et Parasitol*, 1983, **XXI**, 225-230.
10. KERHARO J & ADAM JG - Famille des Lauracées. In: *La pharmacopée sénégalaise traditionnelle, plantes médicinales et toxiques*. Ed. Vigot frères, 1971, Paris, 494-498.
11. KOUA KH - Mise en évidence de l'activité larvicide de *Persea americana* sur *Anopheles gambiae* s.l., un moustique d'im-portance médicale. Thèse Doctorat 3ème cycle, Univ. Cocody Abidjan (Côte-d'Ivoire), 1994, 123 p.
12. MARTOJA R & MARTOJA M - Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson & Cie éd., Paris, 1967, 345 p.
13. MWANGI RW & MUKIAMA TK - Evaluation of *Media volkensi* extract fractions as Mosquito larvicides. *J of the American Mosquito control Ass*, 1988, **4**, 442-447.
14. PHILOGENE BJR - L'utilisation des produits naturels dans la lutte contre les insectes : problèmes et perspectives. In: *La lutte anti-acridienne*. Ed. AUPELF/UREF, John LIBBEY Eurotext, Paris, 1991, 269-278.
15. RACCAUD JS - *Les insectes, physiologie, développement*. Masson, Paris, 1980, 276 p.
16. WATERHOUSE DF & DAY MF - Function of the gut in absorption, excretion and intermediary metabolism. In: *Insect Physiology*. Ed. Kenneth DOEDER, 1958, 331-349.