ÉLEVAGE DE *CULICOIDES NUBECULOSUS* (DIPTERA: CERATOPOGONIDAE)

KREMER M. & LIENHART E.*

Summary : *CULICOIDES NUBECULOSUS* REARING PROCEDURE

The authors give their own procedure for rearing during 25 years the Diptera Ceratopogonidae *Culicoides nubeculosus*. The only purpose of this technical note is to transmit a method.

KEY WORDS : Ceratopogonidae, *Culicoides nubeculosus*, laboratory rearing.

Résumé :

Les auteurs décrivent de façon pragmatique la façon dont ils ont entretenu pendant 25 ans l'élevage, réputé difficile, de *Culicoides nubeculosus*, diptère, ceratopogonide. La note a pour seul objectif de transmettre un savoir-faire.

MOTS CLÉS : Ceratopogonidae, *Culicoides nubeculosus*, élevage.

L'élevage des *Culicoides* est possible mais n'est pas dépourvu de difficultés. Quelques souches sont entretenues dans le monde notamment aux États-Unis et en Grande-Bretagne. A Strasbourg, nous élevons depuis 25 ans l'espèce *C. nubeculosus*.

Culicoides nubeculosus (Meigen) 1830 est une espèce paléarctique, hématophage, vectrice naturellement ou expérimentalement de nombreux agents pathogènes (notamment des sporozoaires et des filaires des oiseaux et des mammifères). Son élevage a permis à diverses équipes de le découvrir ou de le confirmer en particulier au Muséum National d'Histoire Naturelle. Il nous a également rendu possible des études éthophysiologiques (phéromones, organes sensoriels) (Kremer, 1985; Ismail, 1981).

Le démarrage de l'élevage a été possible grâce à l'aide et aux conseils de J. Boorman (1974). Par la suite, des coups de mains ont été acquis et des détails de la façon de faire se sont modifiés. Il nous a paru utile de dire notre façon de mener cet élevage au moment de son arrêt.

température idéale se situe aux alentours de 27°, ce qui est facilement obtenu avec un chauffage électrique avec thermostat et qui donne beaucoup d'agrément quand on y travaille; d'autant plus que l'humidité relative doit se situer entre 80 et 90 %. Dans nos conditions d'élevage, la présence de nombreux bacs d'eau pour les larves maintient spontanément une humidité correcte, de l'ordre indiqué et souvent au-delà. Dans certains cas, il peut être souhaitable d'installer un système spécial pour maintenir l'humidité, ou plus simplement de mettre des bacs à eau sur les radiateurs. Compte tenu de l'humidité, il faut avoir une installation électrique protégée, adaptée à ce type d'ambiance et un interrupteur général de l'alimentation des moteurs électriques (cf. plus loin) doit être prévu. Il est bon de pouvoir régler les périodes d'éclairage et d'obscurité par un système d'interrupteur automatique. Nous avons adopté un régime de 17 heures d'éclairage et 7 heures d'obscurité. L'éclairage est assuré par des tubes de néon.

LES LOCAUX

Un insectarium est nécessaire pour maîtriser les conditions physiques adéquates. Une porte avec sas est indispensable pour éviter l'introduction d'autres animaux, étrangers à l'élevage, pour éviter les fuites des *Ceratopogonidae* et pour maintenir température et hygrométrie à leurs bons niveaux. La

LES ENCEINTES POUR L'ÉLEVAGE

LES CAGES DES ADULTES

Nous utilisons des pots de carton paraffiné de 12 cl environ (certains pots en carton destinés aux yaourts sont parfaitement adaptés mais il faut des relations pour en obtenir en petite quantité. Cela se vend par dizaines de mille). Un orifice de deux centimètres est découpé au fond du pot. Un tube en verre d'un diamètre identique y est placé. Ce tube rempli de coton et d'eau, l'ouverture recouverte d'une

* Institut de Parasitologie de la Faculté de Médecine, 3, rue Koeberlé, 67000 Strasbourg. Correspondence : M. Kremer.

rondelle de papier filtre, sert alternativement de pondoir et de lieu d'éclosion des adultes. Sur le côté du pot est encore pratiquée une ouverture circulaire de moins de un centimètre de diamètre. Cette ouverture sert à introduire le tube en verre du capteur (type Dutoit, modifié par Hill) et est fermée, sinon, avec un bouchon en liège ou en coton dans un voile de Nylon. Le haut du pot est fermé par un voile de Nylon tendu sur le bord circulaire et maintenu par un ou deux bracolets en caoutchouc.

Ces cages sont posées sur des portoirs en bois spécialement construits à cet effet, ménageant un espace pour le tube inférieur (fig.1 et fig. 2A).

LES BACS DES LARVES

Les larves vivent dans des milieux très humides et supportent très bien de nager en eau libre. Pour obtenir ces conditions, nous nous servons de bacs en plastique de $32 \times 24 \times 4$ cm au fond desquels est placé un support fibreux constitué de fibres de verre. Les fibres de verre constituent un îlot d'environ 26×18 cm et sont fixées au centre du bac par du papier collant («Auto-clave tape»). L'eau devra affleurer leur surface.

Le bac qui sera rempli d'eau et d'éléments nutritifs constitue un milieu hautement favorable au pullulement bactérien. Celui-ci forme rapidement un film en surface qu'il est souhaitable d'éviter. Pour ce faire, l'eau est agitée par un système de pales, mues par une tige en verre qui tourne et qui est située au-dessus du bac ou des séries de bacs. Des moteurs électriques à mouvement lent (environ 10 à 15 tours minute) actionnent les tiges de verre (fig. 1 et fig. 2B).

Fig. 1. – Schéma général des procédures de l'élevage de *C. nubeculosus*. (in M.T. Ismail, dessin J.C. Delecolle, 1981).

Fig. 2 – Schéma des pots d'élevage des imagos et des bacs à larves de *C. nubeculosus*. (in M.T. Ismail, dessin J.C. Delecolle, 1981).

LE MATÉRIEL

POUR LES ADULTES

- . Nesdonal® ou Nembutal® ou équivalent.
- . Souris : pour nourrir les imagos, on utilise des souris de préférence jeunes et n'ayant évidemment servi à aucune autre expérimentation au préalable. Les souris sont endormies au Nembutal® (au 1/10 en eau physiologique) ou au Nesdonal® (au 1/5 en eau physiologique). On pratique une 1ère injection de 0,2 ml en intra-péritonéal, puis cinq minutes après une 2^e injection. Selon l'humeur de la souris, il faut parfois une 3^e injection de 0,1 ml.
- . Eau sucrée à 10 % dispensée dans des biberons ou du coton imbibé.

POUR LES LARVES

- . Fibres synthétiques (ex. : Filtermasse-Ehrin) ou fibre de verre (laine de verre pour isolation).
- . Starter : une noisette de bouse de vache (on fait comme on peut pour en trouver). La bouse peut être conservée à 4° pendant de très nombreux mois. Trois millilitres de solution nutritive (Type Oxoid, cf. plus loin). 100 ml d'eau (celle du robinet suffit si elle n'est pas trop javellisée).

Laisser incubé 48 heures à 27° puis conserver au réfrigérateur. Peut être conservé pendant quelques mois (dates de péremption données sous toutes réserves). Le starter sert à introduire dans les bacs des bactéries et des protozoaires qui constituent la nourriture des larves.

. Solution nutritive : soit Oxoid Nutrition Broth n°2 (en moyenne 80 g de poudre pour 100 ml d'eau distillée ; soit Standart I Nähr bouillon Merck (Art 7882).

Ces produits contiennent des peptones, des extraits de levures, du NaCl et du glucose.

. Herbes et céréales séchées : soit du Cerophyl (n'est plus commercialisé chez nous mais peut encore être trouvé) ; soit du foin passé au mixer additionné d'une quantité équivalente de germe de blé moulu (ex. : Céréral) (le foin alsacien convient bien).

LA PROCÉDURE D'UTILISATION DES PRODUITS

Pour mettre un bac à larves en activité, il faut y introduire environ deux litres d'eau du robinet, cinq millilitres de starter, trois millilitres de solution nutritive et une cuillère à café d'herbes séchées. Cette recette assure après agitation et 48 heures d'incubation à 27°, un milieu riche en micro-organismes, une composition minérale et des constantes physiques d'une précision sûrement remarquable mais que nous avons eu la sagesse de ne pas analyser et une odeur très particulière et bien compacte que nous renonçons à décrire. On peut également suivre la procédure qu'employait J. Linley (1979).

Par la suite, il faudra entretenir cette biocénose très spéciale en ajoutant tous les deux jours, un millilitre de solution nutritive et une cuillère à café de poudre d'herbe. Ce sont les conseils de Boorman. Selon notre expérience, un ajout hebdomadaire est suffisant. Cela se fait un peu au jugé.

Nous sommes parfaitement conscients de l'aspect recette de cuisine de notre description. Mais cela marche et la cuisine est aussi une science.

L'ENTRETIEN DU CYCLE

LES STADES IMMATURES

Nous commençons notre cycle par l'oeuf. Les œufs sont recueillis avec la rondelle de papier filtre des pondoires (cf. suite). Les rondelles chargées d'œufs sont déposées à la surface des fibres du bac à raison d'environ 3 000 à 5 000 œufs par bac. Le nombre d'œufs par rondelle de papier est extrêmement variable. L'appréciation du nombre d'œufs est très peu précise et souvent « on fait avec ce qu'on a ». Les bacs sont évidemment incubés au préalable depuis 48 heures et les moteurs des pales sont mis en marche. Les œufs éclosent. Les larves minuscules au début se nourrissent allégrement, nagent souvent puis se reposent, parfois en groupes dans les fibres et muent quatre fois

pour devenir des nymphes après le 4^e stade. Il faut savoir que le 4^e stade peut mesurer près de 7 à 10 mm de long. Les nymphes sont sombres car chitinisées et nagent ou plutôt se laissent porter en surface. Souvent elles sont posées sur les fibres de verre, plus ou moins en profondeur. Pour les en séparer, on dépose sur les fibres des baguettes de verre ou tout objet non hydrosoluble de façon à enfoncer les fibres sous l'eau. Les nymphes s'en détachent et viennent en surface. Cette étape est atteinte environ trois semaines (plus ou moins beaucoup de jours) après l'introduction des œufs dans les bacs. Les nymphes flottantes sont recueillies tous les jours ou tous les deux jours avec une pipette à une poire type Pasteur et placées dans un tube Borrel ou un petit récipient en verre.

LES STADES ADULTES

Les cages sont prêtes à accueillir les nymphes. Les ouvertures du haut et des côtés sont fermées, le tube en verre du fond est retiré, rempli d'eau (le coton à saturation) et une rondelle de papier filtre recouvre l'ouverture. Les nymphes sont transférées du Borrel sur la rondelle à l'aide d'un pinceau souple à raison de quelques centaines par pot. Le tube est introduit dans le fond de la cage (que nous appelons... pot de yaourt). Les nymphes éclosent entre 48 heures et trois jours. La rondelle de papier, recouverte d'exuvies est retirée et remplacée par une rondelle neuve, baptisée maintenant pondoire. A moins qu'on ne souhaite augmenter le nombre d'habitants de la cage par une deuxième fournée de nymphes. Ne pas nourrir les adultes dans cette hypothèse.

La nutrition des adultes mâles et femelles peut être assurée par des biberons d'eau sucrée passant par le trou latéral du pot. Il est plus simple, en fait, mais moins élégant et moins durable de mettre du coton imbibé d'eau sucrée (à 5 ou 10 %) sur le Nylon fermant le haut du tube. Mâles et femelles absorbent cette eau sucrée. Mais ceci ne permet pas aux femelles de pondre. Pour notre souche de *C. nubeculosus*, (bien que des articles le disent éventuellement autogène) il faut donner un repas sanguin pour chaque ponte que l'on veut obtenir. Ce repas peut être donné par des souris endormies ou sur des appareils permettant la nutrition à travers des membranes artificielles. Nous ne donnons pas la technique avec membranes artificielles car elle ne fait pas partie de notre recette. Entre nos mains, elle a permis d'obtenir un taux de nutrition plus élevé que sur souris, mais le nombre d'œufs obtenus est paradoxalement moins important. Beaucoup se nourrissent mais peu mangent bien.

On rase le ventre des souris endormies. Les souris sont placées le ventre sur le Nylon fermant le haut des pots. Elles sont laissées en place, si elles ne se réveillent pas avant, pendant une heure sur un pot encore jamais

nourri et une demi-heure sur un pot dont on a déjà nourri les occupants. Les femelles piquent à travers le Nylon. Il faut que la souris soit bien à plat sur celui-ci et il ne faut pas qu'elle bouge, sinon les pièces buccales des *Culicoides* risquent d'être traumatisées.

Un repas sanguin est proposé en principe trois fois par semaine surtout en début d'élevage. Les adultes commencent à pondre 48 heures après le premier repas et les pontes peuvent durer deux semaines si la survie d'un nombre suffisant d'adultes le permet. Les rondelles de papier filtre se couvrent régulièrement d'œufs que l'on transfère dans les bacs à larves. Et le cycle recommence.

LES COUPS DE MAIN

En nous excusant de ces termes peu protocolaires, nous pensons utile de donner quelques indications supplémentaires pour pallier certaines difficultés.

COMMENT SAUVEGARDER L'ÉLEVAGE

Lors de difficultés à entretenir l'élevage, celui-ci peut être mis en sauvegarde par réfrigération.

Les bacs avec des larves surtout de 3^e et 4^e stades peuvent être mis au réfrigérateur à + 4°. Les bacs supportant le mieux ce traitement sont ceux qui évoluent depuis trois semaines environ. Nous avons constaté que les larves restaient vivantes dans les bacs réfrigérés pendant au moins trois mois. Il est prudent de couvrir les bacs d'une gaze pour éviter des éclosions inattendues. Les œufs, pondus sur les rondelles de papier filtre, bien humidifiées et déposées sur des couches de papier filtre humide, en boîte de Petri, peuvent être conservés comme les larves pendant plusieurs mois à 4°.

Les bacs à larves peuvent être envahis par des larves d'autres insectes (notamment des psychodidés ou des moustiques). Il faut enlever toutes les larves exogènes à la pince ou à la pipette. Il faut être attentif également aux attaques des fourmis qui peuvent détruire très rapidement un élevage. Elles sont à éradiquer avec des poisons spéciaux qu'elles ingèrent.

COMMENT INTENSIFIER LA PRODUCTION OU PALLIER UNE BAISSÉ

Le choix des souris est très important. Les souches inadéquates peuvent avoir un effet catastrophique sur la production d'œuf. Nous utilisons des souris SWISS. Les souris Balb, par exemple, ne conviennent pas pour l'élevage. En augmentant le nombre de repas des insectes, on arrive souvent à relancer un élevage un peu déclinant.

COMMENT MANIPULER LES ADULTES

Bien que cela sorte du sujet, nous précisons que les adultes peuvent être manipulés après anesthésie au

Fig. 3 – Schéma des extrémités postérieures des nymphes des mâles et des femelles de *C. nubeculosus*. (in M.T. Ismail, 1981).

CO₂, ou après réfrigération. Ceci permet des transferts. La séparation des mâles des femelles, souvent nécessaire dans diverses études, se fait au stade nymphal. Le dimorphisme du dernier article de l'abdomen est suffisant pour permettre le tri (fig. 3).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient M.F. Stegel et C. Fix pour leur contribution au maintien de l'élevage et surtout J. Boorman grâce à qui il a été possible.

BIBLIOGRAPHIE

- BOORMAN J. The maintenance of laboratory colonies of *Culicoides variipennis* (Coq.), *C. nubeculosus* (Mg.) and *riethi* (Kieff.) (Diptera: Ceratopogonidae). *Bulletin of Entomological Research*, 1974, 64, 371-377.
- ISMAIL M.T. Mise en évidence d'une phéromone sexuelle volatile chez la femelle de *Culicoides nubeculosus* (Diptera: Ceratopogonidae). Thèse d'État, Sciences, Strasbourg, 1981.
- KREMER M. Contribution à la connaissance des *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) des régions paléarctiques (Synthèse des travaux réalisés de 1960 à 1984). Thèse d'État, Sciences. USTL, Montpellier, 1985.
- LINLEY J.R. Nutrient agar mixtures for culture of food organisms for predaceous *Culicoides* larvae (Diptera Ceratopogonidae). *Journal of Medical Entomology*, 1979, 16, 171-172.

Reçu le 20 mars 1998

Accepté le 6 juillet 1998