

POUR COPIE CONFORME

**Le 18 Novembre 2024**

**CESSION PARTIELLE DE DROITS SUR  
BREVET D'INVENTION PAR :**

Mme Esther L. M. DEGUENON

**AU PROFIT DE :**

Mr T. Victorien DOUGNON, Mr Karl W.  
ANDERSON et Mme Nana M. MAMAN  
épse CHABERT

**PARDEVANT** Maître Marie Joséphine N'GOH, Notaire à COTONOU  
(République du Bénin) soussigné,

**ONT COMPARU :**

**1/ Madame Esther Laurelle Mehouwèssin DEGUENON**, Enseignant-Chercheur, demeurant à ABOMEY-CALAVI lot numéro 53 quartier SEME ;  
Née à ABOMEY-CALAVI (République du Bénin) le seize mars mille neuf cent quatre-vingt-onze ;

Titulaire du passeport numéro 22 PP 56846 délivré à COTONOU le vingt-quatre septembre deux mille vingt-deux, et expirant le vingt-trois septembre deux mille vingt-huit ;

De nationalité béninoise ;

**Ci-après dénommée « la cédante » ;**

**D'UNE PART ;**

**2/ Monsieur Tamegnon Victorien DOUGNON**, Enseignant-Chercheur, demeurant à ABOMEY-CALAVI carré sans borne quartier TOKPA ZOUNGO SUD, maison DOUGNON ;

Né à COTONOU (République du Bénin) le vingt-trois mars mille neuf cent quatre-vingt-huit ;

Titulaire du passeport numéro B 0721661 délivré à COTONOU le vingt-sept août deux mille dix-neuf, et expirant le vingt-sept août deux mille vingt-cinq ;

De nationalité béninoise ;

Agissant tant en son nom personnel, qu'au nom et pour le compte de :

**3/ Monsieur Karl William ANDERSON**, Enseignant-Chercheur, demeurant dans le MINNESOTA (Etats-Unis d'Amérique) ;

Né à NORTH DAKOTA (Etats-Unis d'Amérique) le douze juin mille neuf cent quatre-vingt-cinq ;

Titulaire du passeport numéro 528687608 délivré le sept avril deux mille quinze, et expirant le six avril deux mille vingt-cinq ;

De nationalité américaine ;

En vertu des pouvoirs qui lui ont été conférés à l'effet des présentes, aux termes d'une procuration sous seing privé en date à l'université du MINNESOTA du dix novembre deux mille vingt-quatre ;

**4/ Madame Nana Mariama MAMAN épouse CHABERT**, Enseignant-Chercheur, demeurant à 24 Rue de la FON D'OR 81200 Mazamet (France) ;

Née à NIAMEY (République du Niger) le dix-huit juillet mille neuf cent soixante-quatorze ;

Titulaire du passeport numéro 24CK44939 délivré le dix-neuf mars deux mille vingt-quatre, et expirant le dix-huit mars deux mille trente-quatre ;

De nationalité française ;

En vertu des pouvoirs qui lui ont été conférés à l'effet des présentes, aux termes d'une procuration sous seing privé en date à Mazamet du dix octobre deux mille vingt-quatre ;

**Ci-après dénommée « les cessionnaires » ;**

**D'AUTRE PART ;**


**LESQUELS, noms et ès-noms**, préalablement à la cession partielle de droits sur le brevet d'invention, objet des présentes, ont exposé ce qui suit :

**EXPOSE**

**Madame Esther Laurelle Mehouwèssin DEGUENON, Monsieur DOUGNON Tamégnon Victorien, Monsieur ANDERSON Karl William et Madame MAMAN Mariama Nana nom et ès-noms**, exposent :

Qu'ils ont tous travaillé ensemble à l'invention d'un produit consistant en un « Biopesticide et son procédé de fabrication dans la lutte contre les larves de moustiques » ;

Que **Madame Esther Laurelle Mehouwèssin DEGUENON** a été chargée d'effectuer les formalités nécessaires auprès de l'Organisation Africaine de la Propriété Intellectuelle pour obtenir le brevet relatif à l'invention ci-dessus citée ;



Que c'est pour cette raison que le brevet d'invention, déposé le sept juillet deux mille vingt-trois sous le procès-verbal numéro 1202300273 a été délivré au nom de **Madame Esther Laurelle Mehouwessin DEGUENON** le trente-et-un janvier deux mille vingt-quatre ;

Que c'est pour régulariser cette situation et rétablir **Monsieur DOUGNON Tamégnon Victorien, Monsieur ANDERSON Karl William et Madame MAMAN Mariama Nana** dans leurs droits, que **Madame Esther Laurelle Mehouwessin DEGUENON**, a décidé de procéder à la signature par devant le notaire soussigné d'un acte de cession partielle de ses droits sur ledit brevet.

Ceci exposé, ils sont passés aux conventions objet des présentes.

#### CESSION PARTIELLE DE DROITS SUR BREVET D'INVENTION

Madame Esther Laurelle Mehouwessin DEGUENON en s'obligeant à toutes les garanties ordinaires et de droit les plus étendues en pareille matière cède à :

- Monsieur DOUGNON Tamégnon Victorien** ici présent et qui accepte,
- Monsieur ANDERSON Karl William,**
- Madame MAMAN Mariama Nana,**

ici représentés par **Monsieur DOUGNON Tamégnon Victorien** et qui acceptent en leurs noms et pour leurs comptes,

**Respectivement et à chacun, vingt-cinq pour cent (25%), soit un total de soixante-quinze pour cent (75%) des droits** qu'elle détient sur le brevet d'invention délivré par l'Organisation Africaine de la Propriété Intellectuelle (OAPI) suivant décision en date du trente-et-un janvier deux-mille vingt-quatre, de sorte qu'il ne lui reste en propre que **vingt-cinq pour cent (25%)** de droits sur ledit brevet.

Il est ci-après plus amplement désigné.

#### ARTICLE 1 : DESIGNATION

Les droits mobiliers partiellement cédés portent sur le brevet d'invention déposé le sept juillet deux-mille vingt-trois sous le procès-verbal numéro 1202300273 intitulé « **BIOPESTICIDE ET SON PROCEDE DE FABRICATION DANS LA LUTTE CONTRE LES LARVES DE MOUSTIQUES** » délivré par l'Organisation Africaine de la Propriété Intellectuelle (OAPI) suivant décision en date du trente-et-un janvier deux-mille vingt-quatre. La mention de la délivrance est faite au Bulletin Officiel de la Propriété Industrielle (BOPI) sous le numéro 01BR/2024.

Le présent contrat exprime la totalité des accords des parties. Il annule et remplace toutes lettres, propositions et conventions antérieures.

#### ARTICLE 2 : PRIX

La présente cession partielle est consentie et acceptée moyennant le prix principal de cinq cent mille (500.000) francs cfa que **Monsieur DOUGNON Tamégnon Victorien, Monsieur ANDERSON Karl William, et Madame MAMAN Mariama Nana** ont payé comptant, en dehors de la comptabilité du Notaire soussigné, à la cédante ici présente qui le reconnaît et consent aux cessionnaires, bonne et valable quittance sans réserve.

DONT QUITTANCE ;

#### ARTICLE 3 : TRANSFERT DE PROPRIETE

Le contrat de cession partielle de droits de propriété intellectuelle entraîne le transfert des droits au profit des cessionnaires et la naissance d'obligations à la charge des parties.

**Monsieur DOUGNON Tamégnon Victorien, Monsieur ANDERSON Karl William et Madame MAMAN Mariama Nana** deviennent ainsi copropriétaires du brevet et auront les mêmes droits de propriété intellectuelle et de jouissance que **Madame Esther Laurelle Mehouwessin DEGUENON**.

**ARTICLE 4 : CHARGES ET CONDITIONS**

La présente cession partielle de droits sur le brevet d'invention, est faite sous les charges et conditions ordinaires et de droit en pareille matière notamment la loi numéro 2005-30 du cinq avril deux mille six, relative à la protection du droit d'auteur et des droits voisins en République du Bénin.

**ARTICLE 5 : CONTESTATIONS**

Conformément aux dispositions des articles 86 et suivants de la loi numéro 2005-30 du cinq avril deux mille six, relative à la protection du droit d'auteur et des droits voisins en République du Bénin, toute contestation qui pourrait naître de l'exécution du présent contrat sera soumise à l'Organisme de gestion collective pour tentative de conciliation.

En cas d'échec de ladite conciliation, les parties ont la faculté de saisir le tribunal compétent soit directement, soit par l'entremise de l'organisme de gestion collective.

**ARTICLE 6 : ENREGISTREMENT**

Les présentes seront enregistrées conformément au Code Général des Impôts.

**ARTICLE 7 : FRAIS**

Tous les frais, droits et honoraires des présentes et ceux qui en seront la suite ou la conséquence seront supportés par **Monsieur DOUGNON Tamégnon Victorien, Monsieur ANDERSON Karl William et Madame MAMAN Mariama Nana** qui s'obligent à leur paiement.

**ARTICLE 8 : MENTION**

Mention des présentes est consentie partout où besoin sera.

**DONT ACTE ;**

Fait et passé à COTONOU, Lot numéro 1868 « L » quartier FIFADJI ;

En l'Étude de Maître Marie Joséphine N'GOH, Notaire soussigné ;

L'AN DEUX MILLE VINGT-QUATRE

Le dix-huit novembre

Et après lecture prise par les comparants noms et ès-noms, ceux-ci ont signé avec le Notaire soussigné.

Suivent les signatures.....

Ensuite se trouve cette mention.....

Enregistré à COTONOU le vingt janvier deux mille vingt-cinq, Folio 38, Case 451, Reçu : vingt-cinq mille francs. L'Inspecteur de l'Enregistrement signé : Deo-Gratias U. SABI MOUKA.

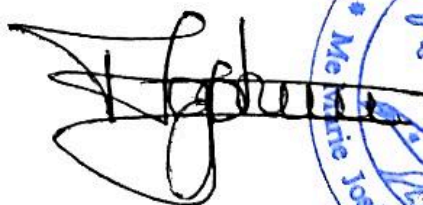
**TENEUR LITTERALE DES ANNEXES 1 et 2 (Voir photocopies ci-jointes) .....**

Lesdites annexes portent elles-mêmes la mention suivante :.....

Annexé à la minute d'un acte reçu par le Notaire soussigné le dix-huit novembre deux mille vingt-quatre.

**POUR COPIE ;**

Sur trois pages, sans renvoi ni mot nul, délivrée et certifiée conforme à l'original par le Notaire soussigné.




# UNIVERSITY OF MINNESOTA

Crookston Campus

Math, Science, and Technology Department

2900 University Avenue  
Crookston, MN 56716-5001  
Phone: 218-281-8380  
Fax: 218-281-8080  
www.umcrookston.edu/mst

10/11/2024

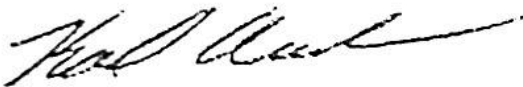
## POWER OF ATTORNEY

I, the undersigned, M. ANDERSON KARL WILLIAM, born on June 12, 1985, in United States of America, hereby grant power of attorney to:

- Mr. DOUGNON T. Victorien, born on March 23, 1988, residing in Abomey-Calavi

This person is authorized to sign, on my behalf, any forms and documents related to the patent and to request any necessary documents on my behalf.

This power of attorney is granted to Mr. DOUGNON T. Victorien for an indefinite period. I reserve the right to revoke it at any time.



Karl Anderson, MS

Annexé à la minute d'un acte  
reçu par le Notaire soussigné  
le 18 novembre 2024



Teaching Specialist/Researcher, University of Minnesota Crookston

ASM Young Leaders Committee

ASM Ambassador of Science (2018-2020)

Research Assistant, United States Department of Agriculture

MAMAN Nana Mariama  
24 Rue de la FON D'OR,  
81200 Mazamet  
France

Annexé à la demande d'acte  
reçu par le notaire soussigné  
le 18 novembre 2024



Mazamet le 10 octobre 2024

Objet : Procuration

### PROCURATION

Je soussigné Madame MAMAN Nana Mariama, née le 18 juillet 1974 à Niamey (Niger), donne par la présente pouvoir à :

- Monsieur DOUGNON T. Victorien, né le 23 mars 1988 à demeurant à Abomey-Calavi
- Afin que cette personne puisse signer en mon nom tout formulaire et document concernant le brevet et puisse requérir pour moi tout document nécessaire.

Cette procuration est donnée à Mr DOUGNON T. Victorien pour une durée indéterminée. Je me réserve la possibilité d'y mettre un terme à tout moment.



MAMAN Nana Mariama

## FASCICULE DE BREVET D'INVENTION

21 Numéro de dépôt : 1202300273

22 Date de dépôt : 07/07/2023

30 Priorité(s) :

24 Délivré le : 31/01/2024

45 Publié le : 10.05.2024

73 Titulaire(s) :

DEGUENON Esther Laurelle Mehouwessin,  
03 B.P. 2819, Jerico,  
COTONOU (BJ)

72 Inventeur(s) :

DEGUENON Esther Laurelle Mehouwessin (BJ)

74 Mandataire :

54 Titre : Biopesticide et son procédé de fabrication dans la lutte contre les larves de moustiques

57 Abrégé :

La présente invention concerne généralement le domaine des compositions et des procédés pour contrôler les organismes et les populations de parasites qui sont connus pour avoir un effet néfaste sur la vie humaine et les activités humaines. Elle concerne particulièrement un biopélicide obtenu à partir d'extraits de tubercules de préférence le manioc, la patate douce et l'igname et de souches de *Bacillus thuringiensis* pour la lutte contre les larves de moustiques. L'invention concerne en outre le procédé de fabrication du biopesticide et son utilisation.

Le produit ainsi obtenu se présente sous forme de solution à pulvériser dans les environnements infestés par les moustiques et les larves de moustiques (fosses septiques, flaque d'eaux ménagers et autres endroits). Le produit présente des avantages du point de vue de son efficacité, de sa facilité d'usage, de sa disponibilité et son odeur très agréable. En effet, il est d'un coût accessible pour les populations, éco-responsable et ne présente aucun danger sur le plan sanitaire. Son temps d'action dans l'environnement est relativement long environ 90 jours et constitue un produit purement biologique et non chimique.

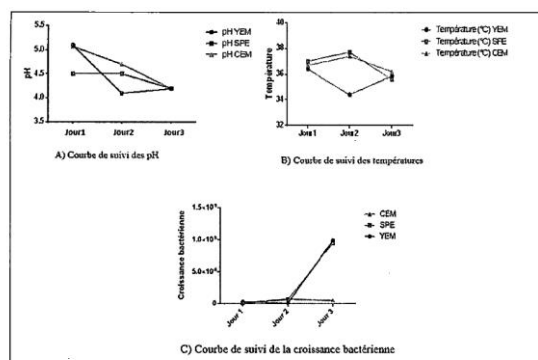


Figure 1 : Courbes de suivi des températures, du potentiel hydrogène et de la croissance bactérienne

Planche I / II Figure 1

## Biopesticide et son procédé de fabrication dans la lutte contre les larves de moustiques

La présente invention concerne généralement le domaine des compositions et des procédés pour contrôler les organismes et les populations de parasites qui sont connus pour avoir un effet néfaste sur la vie humaine et les activités humaines. Elle concerne particulièrement un biopesticide obtenu à partir d'extraits de tubercules de préférence le manioc, la patate douce et l'igname et de souches de *Bacillus thuringiensis* pour la lutte contre les larves de moustiques. L'invention concerne en outre le procédé de fabrication du biopesticide et son utilisation.

Les maladies transmises par des vecteurs tels que les insectes ou les tiques représentent un problème de santé publique majeur pour l'être humain et les animaux en Afrique de l'Ouest comme dans les autres régions tropicales et subtropicales. Elles menacent par ailleurs constamment l'économie. La lutte contre les organismes nuisibles (porteurs de maladie ou détruisant les cultures) se fonde en règle générale sur l'utilisation de pesticides de synthèse, dont le mode d'action principal est d'attaquer les tissus nerveux des insectes. Le problème aujourd'hui est que ces pesticides sont de moins en moins efficaces, car les insectes développent toujours plus de résistances. Ce phénomène se produit lorsqu'une petite partie d'une population d'insectes est capable de survivre à un insecticide à action rapide avant de se multiplier et de transmettre sa résistance à sa descendance. De plus, des études montrent que l'utilisation massive d'insecticides dans la lutte contre les vecteurs de maladies et les nuisibles a des conséquences négatives sur la santé de l'être humain et des animaux, et porte atteinte à l'environnement du fait de l'augmentation des résidus de pesticides et de l'accumulation de produits chimiques toxiques.

Le domaine de procédés alternatifs et respectueux de l'environnement pour lutter contre les nuisibles est encouragé.

Il existe dans l'état de la technique des solutions écologiques capables de s'adapter efficacement aux différents écosystèmes locaux et d'agir conjointement sur les vecteurs pertinents pour l'être humain et les animaux. De telles approches cherchent à réduire, d'une part, la quantité d'insecticides utilisés et, d'autre part, les conséquences potentiellement nocives sur l'être humain, les animaux et l'environnement. L'idée est d'employer un produit antiparasitaire qui soit efficace en petite quantité et contre lequel les insectes visés ne peuvent pas, ou seulement difficilement, développer de résistance. Par exemple les champignons entomopathogènes sont de plus en plus souvent considérés comme une solution prometteuse et un élément central d'une stratégie intégrée qui comprend également d'autres mesures. Lorsqu'ils parasitent leurs hôtes, ils produisent différentes toxines mortelles pour les insectes visés. Le champignon infecte par exemple les moustiques en faisant germer des spores dans la cuticule (couche externe) de ses hôtes. Une fois qu'il s'est fixé, le champignon se développe sur son hôte en produisant des protéines spécifiques à l'espèce infectée afin de digérer la cuticule et de la décomposer. Il supprime ensuite la réponse immunitaire de son hôte et prolifère rapidement à l'intérieur, ce qui finit par tuer l'hôte.

Des études montrent que ces biopesticides fongiques sont sûrs et qu'ils représentent un risque minimal pour l'être humain, d'autres vertébrés et l'environnement mais présentent des limites. En effet, les effets des champignons sont relativement lents, car leurs toxines n'agissent pas immédiatement. Ainsi, on ne peut pas observer tout de suite l'impact des champignons sur les moustiques. Comme il s'agit d'un moyen de lutte biologique à action lente, celui-ci fonctionne à l'échelle d'une population de vecteurs uniquement dans la mesure où il est appliqué régulièrement pendant une longue durée et sur une large surface. Bien que sa production soit relativement aisée, son coût est élevé car il faut trouver des moyens économiques pour continuer à améliorer l'efficacité et la durabilité de cette solution, réduire la sensibilité aux changements de température.

La lutte biologique contre les moustiques en Afrique et notamment au Bénin peut être efficace avec une meilleure valorisation des produits issus de l'agriculture et cela par la production de biopesticides efficaces, à moindre coût et accessibles aux populations.

L'objet de la présente invention est de répondre à cette préoccupation en proposant un biopesticide naturel obtenu à partir de déchets agricoles tels que les pelures d'igname, de manioc et de patate douce en combinaison avec des souches de bactérie du genre *Bacillus thuringiensis* de préférence le Bt 189, le Bt 492, le Bt 493. L'inventeur a réalisé de manière surprenante que *Bacillus thuringiensis* est une bactérie naturellement retrouvée dans les sols et qui a un fort potentiel létal sur les larves de moustiques. Cette bactérie étant très difficile à cultiver mais très efficace pour une lutte biologique contrôlée, son application avec des pelures d'igname ou de patate douce ou de manioc a permis de fabriquer un milieu viable et avec des possibilités de croissance de ladite bactérie.

Un autre objet de l'invention est de fournir un biopesticide pour la lutte contre les larves de moustiques.

Un autre objet de l'invention est de fournir un composé qui soit naturel, non nuisible pour l'homme et les autres organismes environnement et agit de manière ciblée sur les larves de moustique. Ce composé possède une longue durée d'action de trois mois et ne laisse pas de résidus indésirables dans l'environnement après son temps d'action.

Un autre objet de l'invention est de proposer une solution sous forme liquide ou de gaz destinée à être pulvérisée dans les environnements infestés par les moustiques et les larves de moustiques présentes dans les fosses septiques, les flaques d'eaux ménagers.

Les buts ci-dessus et d'autres de l'invention sont atteints en fournissant un biopesticide à base de souches de *Bacillus thuringiensis* et de déchets organiques tels que les pelures d'igname, de patate douce et de manioc. Le produit est susceptible d'être obtenu dans un premier temps en épluchant les tubercules ci-dessus énumérés qui sont ensuite mixés avec de l'eau distillée et par centrifugation du mélange, est extrait de bouillon de culture auquel est introduit l'inoculum des souches bactériennes de *Bacillus thuringiensis*. Par des intervalles de temps donné et des températures données pendant au moins trois jours, une solution est obtenue pour servir de biopesticide.

Le produit qui vient résoudre ces différents problèmes énumérés dans l'état de la technique se veut pour lutter contre les larves de moustiques. La formulation a été validée après les tests *in vitro* et *in vivo* effectués.

5 Le processus d'obtention du biopesticide peut être illustré à travers le design expérimental qui se veut à titre d'exemple sans être limitatif.

#### a- Croissance bactérienne sur les géloses formulées à base de déchets agricoles

10 Les meilleures croissances bactériennes ont été obtenues avec la souche 189 de *Bacillus thuringiensis* sur le milieu de culture formulé à base de déchets agricoles de manioc (CEM) et qui s'est montré très peu favorable à la croissance des autres souches bactériennes. Le plus faible dénombrement a été obtenu avec la souche 493 de *Bacillus thuringiensis* sur le milieu de culture formulé à base de déchets agricole de manioc (YEM). Le tableau 1 représente les résultats du dénombrement (UFC/mL) obtenus pour chaque souche de *Bacillus thuringiensis* sur les géloses produites à base de déchets agricoles.

**Tableau 1:** Résultats en UFC/mL du dénombrement obtenus pour chaque souche

Souche	YEM	SPE	CEM	MH
<i>Bt 189</i>	$3,8.10^7$	$8.6.10^6$	$12,5.10^4$	$4.10^7$
<i>Bt 492</i>	$5,9.10^7$	$8,6.10^8$	$3.10^8$	$11.10^8$
<i>Bt 493</i>	$2.10^7$	$8,6.10^8$	$2,3.10^6$	$1,8.10^7$

15

#### b- Variation de la croissance bactérienne en fonction du potentiel hydrogène et de la température des biopesticides

20 La souche 492 de *Bacillus thuringiensis* a montré une meilleure adaptation aux milieux de culture formulés. Elle a été utilisée pour une production des trois biopesticides à tester sur les larves de moustique. Les paramètres physicochimiques à savoir la température et le potentiel Hydrogène ont été relevés toutes les heures sur 12 heures et pendant 3 jours au niveau des futs de production des trois biopesticides.

25 La figure 1 représente respectivement les courbes de suivi de température, du pH et de la croissance bactérienne dans les futs de maturation des biopesticides. L'analyse des résultats montre que la variation des paramètres physicochimiques dans les futs impacte sur la croissance bactérienne. Un abaissement de la température et une élévation du pH entraîne une croissance exponentielle des bactéries. Le biopesticides produit à base de déchets agricoles de manioc a été encore très peu favorable à la croissance des bactéries.

**c- Impact de la concentration bactérienne sur l'activité larvicide des biopesticides (larves de moustiques *Anopheles gambiae*)**

L'activité des biopesticides produits avec la souche 492 de *Bacillus thuringiensis* a été évaluée *in vitro* sur les larves de moustique *Anopheles gambiae*.

- 5 Les trois biopesticides ont présenté diverses activités selon les concentrations testées sur les larves de moustique. La vitalité observée entre 2h et 24h a varié selon un biopesticide à un autre. Les résultats obtenus ressortent une meilleure activité du biopesticide produit à base du milieu CEM sur les larves en fonction de la concentration bactérienne. Le biopesticide à base du milieu CEM a été le moins favorable pour la croissance bactérienne des souches de *Bt* mais a présenté la meilleure activité larvicide. La figure 2 représente l'impact de la concentration bactérienne sur l'activité larvicide des biopesticides.

Sur la base des résultats précédents, les étapes de fabrication du biopesticide peuvent énumérées ainsi qu'il suit :

*Etape 1 : Préparation de l'extrait des tubercules*

- 15 La préparation de l'extrait a été réalisée en plusieurs étapes. Les épluchures de tubercules d'igname, de patate douce et de manioc sont choisies puis mélangées avec de l'eau distillée avec le même volume que le poids des tubercules. Après la centrifugation du mélange à 8 000 tours pendant au moins 10 minutes, le surnageant est enlevé, mis de côté et considéré comme l'extrait.

20 *Etape 2 : Préparation des milieux de culture à base des différents extraits des tubercules*

- Pour un flacon d'un 0,5 litre à 1,5 litre de milieu de culture à base d'extrait, 10 à 25 millilitres d'extrait sont mélangés à 30 à 75 grammes de Chlorure de Sodium (NaCl), vingt à quarante-cinq grammes d'agar et 5 à vingt grammes de glucose puis le volume est porté jusqu'à la quantité du récipient avec de l'eau stérile. Le milieu de culture est ensuite mis à l'autoclave à une température comprise entre 80 et 130°C pendant un intervalle de temps compris 30 minutes et 1 heure. Après la stérilisation, le milieu de culture est ramené à une température comprise entre 42-45 °C avant d'être coulé dans les boîtes de pétri.

*Étape 3 : Culture de Bacillus thuringiensis spp*

- 30 Trois souches *Bacillus thuringiensis* spp, notamment *Bt* 189, *Bt* 492 et *Bt* 493 sontensemencées sur les milieux de culture et Muller Hillton. Un inoculum de *Bacillus thuringiensis* est apprêté pour la mise en culture.

*Etape 4 : Mise en contact de la souche de bactérie avec le bouillon de culture*

- 35 Les souches de *Bacillus thuringiensis* sont mises en culture chacune dans du bouillon nutritif pendant au moins 24 heures. Le bouillon nutritif est centrifugé et après préparation de l'inoculum, 0,5 à 2 ml dudit inoculum de chacune des souches bactériennes de *Bacillus thuringiensis* spp, *Bt* 189, *Bt* 492 et *Bt* 493, est déposé dans un bidon de 5 litres contenant le bouillon de culture obtenu à partir des extraits de déchets de tubercules puis agités manuellement. La température et la PH de départ dans les bidons sont enregistrées après

l'ensemencement. Les bidons sont ensuite placés à la température ambiante de 27 degré pour mettre les bactéries en bonne condition de croissance. Toutes les heures, la température et le PH sont mesurés après homogénéisation du contenu des bidons pendant au moins trois jours.

5 Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, il est prélevé dans chaque bidon tous les 4 heures un échantillon pour faire les dilutions sérielles utilisées pour faire le dénombrement bactérien. Pendant au moins trois jours, la croissance bactérienne est évaluée au microscope entre lame et lamelle. L'évaluation de l'activité des biopesticides in vitro sur les larves de moustiques *Anophèles gambiae* suivant des dilutions successives au demi est faite à partir des concentrations initiales sur 16 larves chacune. La vitalité est observée toutes les 2 heures de 8  
10 heures du matin à 20 heures du même jour et le lendemain à 8h ce qui fait 24h de contact des larves avec les biopesticides.

Le produit ainsi obtenu se présente sous forme de solution à pulvériser dans les environnements infestés par les moustiques et les larves de moustiques (fosses septiques, flaques d'eaux ménagères et autres endroits). Le produit présente des avantages du point de vue de son efficacité, de sa facilité d'usage, de sa disponibilité et son odeur très agréable. En effet,  
15 il est d'un coût accessible pour les populations, éco-responsable et ne présente aucun danger sur le plan sanitaire. Son temps d'action dans l'environnement est relativement long environ 90 jours et constitue un produit purement biologique et non chimique.

## REVENDEICATIONS

1. Biopesticide pour la lutte contre les larves de moustiques, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir d'extraits de tubercules de préférence le manioc, la patate douce et l'igname et de souches de *Bacillus thuringiensis*.

2. Procédé de production du biopesticide selon la revendication 1, caractérisé par les étapes suivantes :

a) mise en contact de souches de *Bacillus thuringiensis* avec le milieu de culture extrait des tubercules de manioc, de la patate douce et de l'igname pendant au moins 24 heures ;

b) centrifugation du bouillon nutritif suivie d'une préparation de l'inoculum de chacune des souches de *Bacillus thuringiensis* (*Bt 189*, *Bt 492* et *Bt 493*);

c) dépôt de 0,5 à 2 ml de l'inoculum de chacune desdites souches de *Bacillus thuringiensis* dans un bidon de 5 litres contenant ledit bouillon de culture puis agitation manuelle du bidon et prise de température après ensemencement ;

d) bidons placés à une température ambiante de 27 degrés pour permettre la croissance des bactéries en bonne condition ;

e) mesure chaque heure et de façon continue de la température et du PH après homogénéisation du contenu des bidons pendant au moins trois jours ;

f) prélèvement dans chaque bidon toutes les 4 heures de l'échantillon pour faire des dilutions sérielles pour le dénombrement bactérien ;

g) évaluation de la croissance bactérienne au microscope pendant au moins trois jours

h) évaluation de l'activité des biopesticides in vitro sur les larves de moustiques *Anophèles gambiae* suivant des dilutions successives au demi à partir des concentrations initiales sur 16 larves chacune ;

i) observance toutes les 2 heures le contact des larves avec les biopesticides.

3. Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que ledit bouillon de culture est extrait des épluchures de tubercules d'igname, de patate douce et de manioc, lesdites épluchures étant mixées avec de l'eau distillée pour former un mélange, puis après centrifugation dudit mélange à 8000 tours pendant au moins 10 minutes, le surnageant servant d'extrait.

4. Procédé selon les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que ledit milieu de culture est préparé selon les étapes suivantes :

- mélange du Chlorure de Sodium, d'agar et de glucose, dans des proportions respectives de 30 à 75 g, 20 à 45 g et 5 à 20 g, à 10 à 25 ml d'extrait du milieu de culture, le tout complété à de l'eau stérile dans un flacon dont le volume est compris entre 0,5 et 1,5l ;

- mise à l'octave du milieu de culture à une température comprise entre 80 et 130°C dans un intervalle de temps compris 30 minutes et 1 heure.

- Après la stérilisation, mise du milieu de culture à une température comprise entre 42-45 °C, puis coulage dans des boites de pétri.

5. Procédé de fabrication selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que le biopesticide produit avec la souche 492 de *Bacillus thuringiensis* évaluée *in vitro* sur les larves de moustique *Anopheles gambiae* donne une meilleure activité dudit biopesticide sur lesdites larves en fonction de la concentration bactérienne.

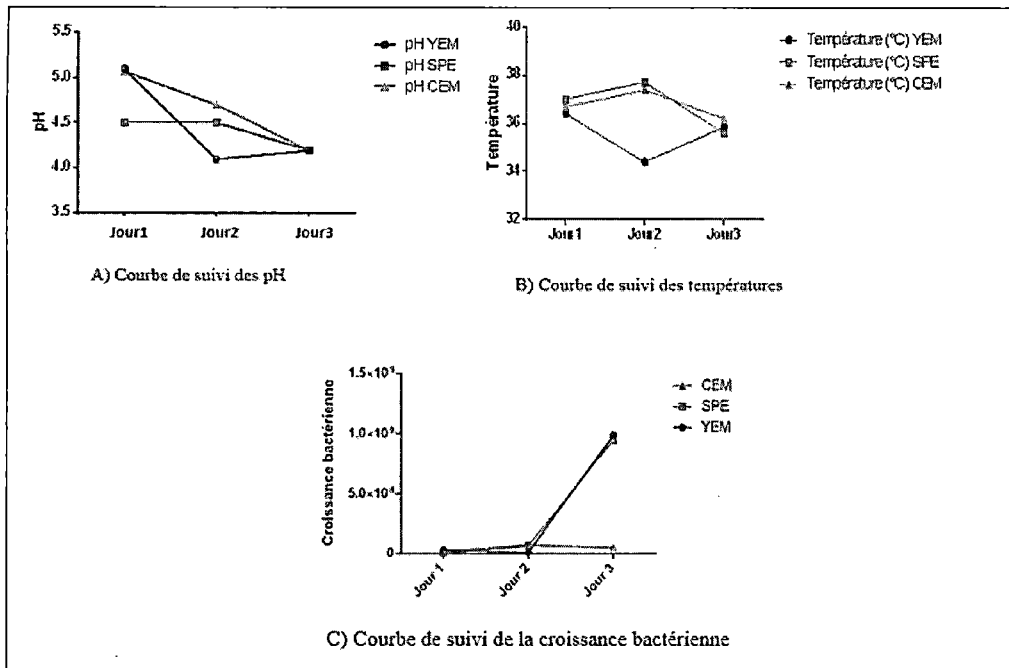
6. Procédé de fabrication selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que ledit biopesticide à base du milieu CEM est le moins favorable pour la croissance bactérienne des souches de *Bt* mais présente la meilleure activité larvicide.

7. Procédé de fabrication selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que les variations des paramètres physicochimiques à savoir la température et le potentiel Hydrogène relevés toutes les heures sur 12 et pendant 3 jours au niveau des futs de production des trois biopesticides, impacte sur la croissance bactérienne, un abaissement de la température et une élévation du PH entraînant une croissance exponentielle des bactéries.

8. Procédé de fabrication selon l'une quelconque des revendications, caractérisé en ce que ledit biopesticide ne présente aucun danger sur le plan sanitaire, son temps d'action dans l'environnement étant relativement long d'environ 90 jours et constituant un produit purement biologique et non chimique.

9. Utilisation du biopesticide sous forme de solution à pulvériser dans les environnements infestés par les moustiques et les larves de moustiques (fosses septiques, flaques d'eaux ménagères et autres endroits).

S/R



**Figure 1 :** Courbes de suivi des températures, du potentiel hydrogène et de la croissance bactérienne

II/II

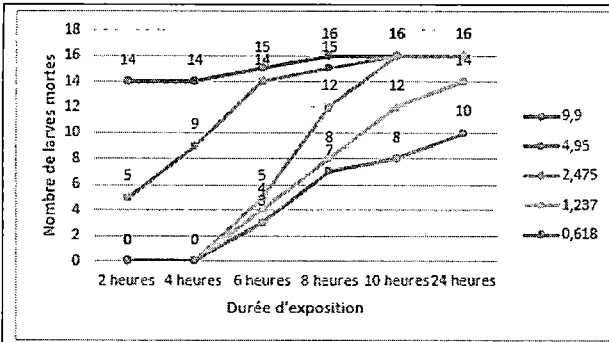


Figure a : Evolution du nombre de larves mortes selon la concentration en bactérie ( $10^8$ ) en fonction de la durée de la durée d'exposition sur le milieu YEM

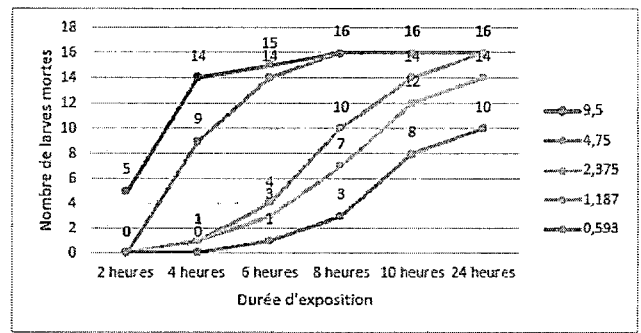


Figure b : Evolution du nombre de larves mortes selon la concentration en bactérie ( $10^8$ ) en fonction de la durée de la durée d'exposition sur le milieu SPE

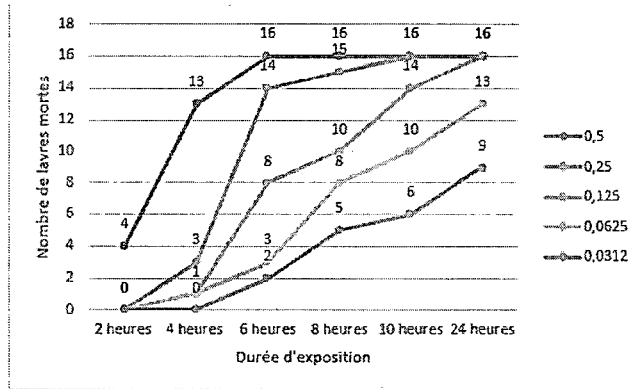


Figure c : Evolution du nombre de larves mortes selon la concentration en bactérie ( $10^8$ ) en fonction de la durée de la durée d'exposition sur le milieu CEM

Figure 2 : Impact de la concentration bactérienne sur l'activité larvicide des biopesticides

### ABREGE DESCRIPTIF

La présente invention concerne généralement le domaine des compositions et des procédés pour contrôler les organismes et les populations de parasites qui sont connus pour avoir un effet néfaste sur la vie humaine et les activités humaines. Elle concerne particulièrement un  
5 biopesticide obtenu à partir d'extraits de tubercules de préférence le manioc, la patate douce et l'igname et de souches de *Bacillus thuringiensis* pour la lutte contre les larves de moustiques. L'invention concerne en outre le procédé de fabrication du biopesticide et son utilisation.

Le produit ainsi obtenu se présente sous forme de solution à pulvériser dans les  
10 environnements infestés par les moustiques et les larves de moustiques (fosses septiques, flaque d'eaux ménagers et autres endroits. Le produit présente des avantages du point de vue de son efficacité, de sa facilité d'usage, de sa disponibilité et son odeur très agréable. En effet, il est d'un coût accessible pour les populations, éco-responsable et ne présente aucun danger sur le plan sanitaire. Son temps d'action dans l'environnement est relativement long environ 90 jours et constitue un produit purement biologique et non chimique.

15