

Les méthodes d'évaluation de l'âge physiologique des moustiques

[DIPT. CULICIDAE]

par

J. HAMON, A. GRJEBINE, J.-P. ADAM, G. CHAUVET, J. COZ et H. GRUCHET

La détermination de l'âge physiologique des moustiques est une technique qui a pris une importance particulière depuis que la lutte contre les vecteurs du paludisme et contre les vecteurs des filarioses à *Wuchereria bancrofti* et à *Brugia malayi* est menée à l'aide d'aspersions d'insecticides à action rémanente dans les habitations.

Autrefois, les campagnes contre les moustiques visaient uniquement à faire disparaître le vecteur, principalement en s'attaquant aux gîtes larvaires contre lesquels on était le mieux armé. Maintenant, on essaye de tuer les femelles avant qu'elles n'atteignent un âge épidémiologiquement dangereux (MACDONALD, 1956 et 1957), c'est-à-dire l'âge minimum auquel les sporozoïtes apparaîtront dans les glandes salivaires, ou les filaires infectantes dans le proboscis, si le premier repas de sang a été pris sur un porteur de gamétocytes ou de microfilaries.

Dans les conditions moyennes de l'Afrique intertropicale, cet âge épidémiologiquement dangereux correspond à une quinzaine de jours dans le cas du paludisme à *Plasmodium falciparum*, et à une dizaine de jours dans le cas de la filariose à *W. bancrofti*, alors que la première ponte du moustique vecteur peut être déposée le quatrième ou le cinquième jour de sa vie. La présence d'un grand nombre de femelles d'une espèce vectrice est donc compatible avec une interruption de la transmission, et il devient utile, pour évaluer correctement l'efficacité des traitements insecticides, de pouvoir déterminer comparativement quelle est la proportion des femelles d'âge épidémiologiquement dangereux dans les régions traitées et non traitées.

L'évaluation de l'âge physiologique, ou plus simplement de la proportion de femelles pares, est également très utile pour étalonner les méthodes de capture. Certaines observations montrent en effet que la fréquence des femelles pares peut varier au cours d'un cycle d'agressivité de vingt-quatre heures, notamment chez *Chrysops silacea* (DUKE, 1960), *Simulium damnosum* (LEWIS, 1956 et 1960), *Simulium ornatum* (DAVIES, 1957), et probablement aussi chez *Anopheles constanti*, et que les abris artificiels du type abri Gillies ou puits de Muirhead-Thomson sont particulièrement attractifs pour les femelles nullipares d'*Anopheles funestus* (HAMON, CHAUVET et THELIN, 1959). Il est donc prudent, lorsque l'on compare des résultats obtenus par des modes de capture différents, de s'assurer que les différents procédés employés fournissent des échantillonnages comparables des populations de vecteurs sur lesquelles on travaille.

Nous allons successivement étudier les différentes méthodes existantes d'évaluation de l'âge physiologique.

1. — ÉVALUATION DE L'INTÉGRITÉ DE LA VESTITURE DE LA FRANGE ET DU CHAMP ALAIRE.

Cette méthode a été suggérée par PERRY en 1912. Elle s'applique plus particulièrement aux Anophèles dont l'âge est évalué en fonction de la disparition des écailles de la frange et du champ alaire.

La classification suivante fut la plus utilisée :

- 1^{re} catégorie : frange de l'aile et taches de l'aile intactes ;
- 2^e catégorie : frange usée, mais taches de l'aile assez apparentes ;
- 3^e catégorie : ailes ternies et frange très usée ;
- 4^e catégorie : ailes élimées.

Ce procédé d'évaluation est très approximatif, car les conditions de vie et le mode de capture peuvent modifier considérablement l'état de cette vestiture. GORDON et coll., en 1932, au Sierra Leone, ont observé que l'indice sporozoïtique croissait régulièrement de la catégorie 1 à la catégorie 4 chez les 3.253 femelles d'*Anophèles* examinées, passant de 4,7 % à 25 %, ce qui indique que la première catégorie contient déjà une proportion appréciable de femelles âgées de quinze jours ou plus. ADAM, dans le Sud Cameroun, n'a observé aucune corrélation entre le degré d'usure des ailes et l'indice sporozoïtique chez 1.500 *Anopheles moucheti*, 1.000 *A. gambiae*, 500 *A. funestus* et 500 *A. nili* et attribue l'échec de la méthode aux conditions de capture et à la conservation plus ou moins longue en tube entre le moment de capture et l'examen de la vestiture.

2. — PRÉSENCE DE SPERMATOZOÏDES DANS LES SPERMATHÈQUES.

Cette méthode est extrêmement simple, mais elle n'est pas très intéressante car l'accouplement peut se faire avant le premier repas de sang et dans la nature il est rare de trouver une femelle présentant une spermathèque vide (BUXTON et LEESON, 1949). GILLIES (1957) signale toutefois que, dans la zone littorale du Tanganyika, 25 % seulement des femelles prégravides (femelles prenant leur premier repas de sang après leur éclosion et qui auront besoin d'effectuer un second repas de sang avant de pouvoir pondre) d'*A. gambiae* sont fécondées. Dans la région de Bobo Dioulasso, Haute-Volta, HAMON a observé que 7 % environ des femelles nullipares sont fécondées ; chez les onze espèces différentes d'anophèles étudiées, le pourcentage variait de 2 à 15 % selon les espèces, le chiffre le plus bas étant observé chez *A. coustani* et le plus élevé chez *A. gambiae*. Le groupe d'âge ainsi délimité par la viduité de la spermathèque est donc en moyenne bien plus jeune que celui des femelles nullipares, bien que ROZEBOOM (1936) ait observé chez *A. albimanus* la disparition des spermatozoïdes après trois ou quatre pontes, les femelles déposant ensuite des œufs non fertilisés. HAMON a également observé en Haute-Volta de rares cas de femelles pares ayant une spermathèque vide chez *A. funestus*, *A. nili* et *A. coustani*.

On peut rattacher à ce procédé la présence dans l'oviducte commun d'un bouchon de fécondation, décrit par GILLIES en 1956 chez *A. gambiae* et *A. funestus* au Tanganyika. Ce bouchon, qui a la forme d'une saucisse courte et est constitué d'une matière translucide amorphe, semble sécrété par le mâle lors de l'insémination. Il persiste 12 à 36 heures après l'accouplement et caractérise des nullipares fraîchement fécondées, si l'on admet que la fécondation n'a lieu qu'une fois dans la vie de la femelle, ce qui est mis en doute, au moins chez certaines espèces d'anophèles, par BUXTON et LEESON (1949). Un tel bouchon de fécondation a été observé chez *A. mascarensis* à Madagascar par COZ, et chez *A. flavicosta* et *A. pharoensis* en Haute-Volta par HAMON, mais il semble difficilement visible chez ces espèces, ainsi d'ailleurs que chez *A. funestus*. Chez *A. gambiae*, les bouchons de fécondation semblent plus fréquents au Tanganyika (GILLIES) et à Madagascar (COZ) qu'en Haute-Volta et en Côte d'Ivoire (HAMON), peut-être par suite d'une plus longue persistance dans l'oviducte commun.

Malgré la possibilité de l'absence de spermatozoïdes ou de la présence d'un bouchon de fécondation chez une femelle pare, d'un point de vue pratique, on peut considérer que les femelles à spermathèque vide ou portant un bouchon de fécondation sont des nullipares, étant donné la rareté de ces phénomènes.

Ces deux techniques exigent une dissection assez soignée, un examen à l'état frais au grossissement moyen du microscope, et caractérisent un groupe d'âge très jeune. Elles ne sont pas utilisables seules et constituent seulement des techniques d'appoint.

3. — MENSURATION DES AMPOULES DES OVIDUCTES PAIRS.

Cette méthode ne s'applique qu'aux anophèles, les autres moustiques n'ayant pas d'ampoules sur les oviductes (cf. les planches 1 et 2).

L'accroissement de la surface des ampoules des oviductes au cours du développement ovarien et de l'oviposition fut d'abord observé par MER (1932 et

1936) chez *A. elutus* (= *sachavori*), en effectuant la dissection des ovaires dans l'eau distillée. En mesurant les ampoules, MER s'estimait capable de distinguer les femelles pares des femelles nullipares.

ALMAZOVA (1935), puis POLOVODOVA (1941) confirmèrent cette découverte avec plusieurs des formes paléarctiques du groupe *maculipennis*, ainsi qu'avec *A. claviger* et *A. superpictus*, en utilisant le sérum physiologique comme milieu de dissection. POLOVODOVA observa en outre qu'il y a une relation nette entre la taille de la femelle et celle des ampoules, de jeunes nullipares de grande taille pouvant avoir des ampoules aussi grandes que des multipares de petite taille. Elle constata en même temps que l'accroissement de la taille des ampoules n'est pas dû au passage des œufs, mais à l'accumulation d'une sécrétion des cellules épithéliales pendant la période précédant la ponte. Cet accroissement se produit donc en même temps que la maturation des œufs. La décharge de cette sécrétion a lieu pendant la ponte et les ampoules, après la ponte, ont un diamètre inférieur à celui qu'elles avaient immédiatement avant la ponte, sans toutefois atteindre leur taille initiale du début du cycle gonotrophique. Dans son travail, POLOVODOVA considère qu'il ne se produit plus d'accroissement sensible des dimensions des ampoules après le troisième cycle gonotrophique.

VINCKE (1946) vérifia l'augmentation de surface des ampoules sur les principaux vecteurs africains du paludisme, ainsi que sur des espèces non vectrices. Il opérait lui aussi dans du sérum physiologique. Il observa que les ampoules étaient proportionnellement plus petites chez les espèces non vectrices que chez les espèces vectrices, et en conclut que la durée de leur vie était probablement insuffisante pour leur permettre de s'infecter et de transmettre le paludisme. Dans le cas des espèces vectrices, *A. gambiae*, *A. funestus* et *A. durenti*, il observa une relation numérique à peu près constante, de l'ordre de 2,5, entre la surface des ampoules des plus jeunes femelles porteuses de sporozoïtes et la surface des ampoules des femelles venant d'éclore. VINCKE admet qu'il se produit une augmentation continue de la surface des ampoules au cours des pontes successives. Cette méthode est très séduisante car elle permet, lors d'un étalonnage préalable, de déterminer la surface minima des ampoules des femelles présentant des infections salivaires, puis de déterminer, dans la pratique courante, quel est le pourcentage de femelles ayant des ampoules de surface égale ou supérieure à cette surface minima, dans différentes situations, ce pourcentage étant celui des femelles épidémiologiquement dangereuses.

WANSON, WOLFS et LEBIED (1947) employèrent la technique originale de MER, dans l'eau distillée, et purent montrer que la différence entre les taux d'infection d'*A. moucheti* et d'*A. gambiae* au Congo (ex belge) était due à une différence de longévité, *A. moucheti* semblant déposer rarement plus d'une ou deux pontes. Ils admirèrent que la méthode est quelque peu imprécise, 15 % environ des femelles âgées d'*A. gambiae* ayant de petites ampoules normalement classées d'après leur dimension dans la catégorie des nullipares (diamètre moyen inférieur à 146 microns). Ils observèrent que la taille de l'adulte avait peu d'influence sur la dimension de l'ampoule et que, chez *A. gambiae*, si l'accroissement de taille le plus important des ampoules se produit au cours du premier cycle gonotrophique, les pontes ultérieures continuent à dilater les ampoules de plus en plus.

VAN THIEL (1953), à Java, pour évaluer l'effet des traitements au DDT sur la

longévité d'*A. sundaicus* et d'*A. subpictus*, a employé la mensuration de l'ampoule dans de l'eau distillée additionnée de formol et de glycérine. Il corrigea ses mensurations en fonction de la longueur de l'aile des femelles pour compenser, si possible, les variations liées à la taille des différents spécimens. Il rangea les femelles en 18 classes, en fonction du diamètre moyen des ampoules, et étalonna la méthode en déterminant la plus petite classe contenant des femelles avec reliques de ponte dans les ovaires (classe 4) et la plus petite classe contenant des femelles avec sporozoïtes (classe 8). Ses observations viennent à l'appui de celles de VINCKE et de VANSON et coll. qui ont conclu à une croissance lente, mais continue, des ampoules d'un cycle gonotrophique à l'autre. Les répercussions du traitement au DDT sur l'âge physiologique ne furent étudiées que sur *A. subpictus*, localement zoophile et non vecteur, car *A. sundaicus*, anthropophile et vecteur, avait été presque complètement éliminé par le traitement. *A. subpictus* n'a pas présenté de modifications sensibles de l'âge physiologique moyen : le pourcentage des femelles pures est passé de 74 % avant le traitement à 71 % après, tandis que le pourcentage de femelles épidémiologiquement dangereuses passait de 39 % à 43 %. Ce phénomène est assez normal car *A. subpictus*, de par sa biologie, était probablement peu en contact avec les parois traitées au DDT. En outre, VAN THIEL a étudié aussi *A. tessellatus* et *A. vagus*, tous deux non vecteurs du paludisme humain et zoophiles, et a trouvé qu'ils avaient de petites ampoules (dimensions corrigées), ce qui confirme les vues de VINCKE selon lesquelles il est possible, par la seule mensuration des ampoules, de séparer les espèces qui peuvent être vectrices de paludisme, de celles qui ne peuvent pas l'être, du fait de leur vie trop brève. VAN THIEL insiste sur le fait que cette méthode donne seulement une approximation de la composition en groupes d'âges de la population anophélienne.

DAVIDSON (1955) a repris les travaux de POLOVODOVA sur les facteurs influençant la taille des ampoules, en travaillant sur *A. gambiae*, tant chez des femelles d'élevage que chez des femelles récoltées dans la nature. Il a observé que la dissection du tractus ovarien dans le sérum physiologique rend les mensurations difficiles car les oviductes ont des pulsations, fait déjà signalé par VAN THIEL. Il a donc opéré soit dans de l'eau distillée, qui entraîne une nette dilatation des ampoules et donc augmente l'intervalle de taille entre les différents groupes, soit dans une solution à 1 % d'acide osmique, qui n'entraîne qu'une légère augmentation des dimensions des ampoules et rend la présence ou l'absence de grains de vitellus très visible dans les oocytes. DAVIDSON a confirmé que le plus grand accroissement du diamètre a bien lieu lors du premier cycle gonotrophique, au fur et à mesure du développement des ovaires. Après la seconde ponte, le diamètre des ampoules est un peu plus grand qu'après la première ponte, et les cycles gonotrophiques ultérieurs continuent à produire de légers accroissements, mais ceux-ci sont trop minimes pour que l'on puisse, en pratique, faire une distinction entre des femelles ayant pondu une ou plusieurs fois. Le diamètre de l'ampoule est légèrement influencé par la taille de la femelle, mais sans que cela affecte la valeur de la méthode. Du fait de l'accroissement de taille de l'ampoule au cours du cycle gonotrophique, il est nécessaire de faire les mensurations, chez les anophèles d'une espèce déterminée, en les groupant en fonction de leur stade ovarien. Même ainsi on observe un chevauchement important des mensurations faites sur des femelles d'un même stade ovarien, les unes pures, les autres nullipares. Le plus petit diamètre observé

pour un stade ovarien donné, chez des femelles ayant pondu une seule fois, est cependant très rarement inférieur au diamètre médian observé chez les femelles nullipares au même stade ovarien. Ce diamètre médian est de 240 μ chez les femelles nullipares d'*A. gambiae* au stade 3. DAVIDSON considère donc comme justifié, quand on travaille avec des moustiques capturés dans la nature et d'un stade ovarien déterminé, de prendre ceux qui présentent des ampoules d'un diamètre moindre que la valeur médiane enregistrée chez des femelles nullipares de même stade ovarien et de considérer qu'ils représentent la moitié des femelles nullipares.

DAVIDSON propose de calculer le taux quotidien de survie p de la manière suivante : soient M la proportion de femelles paires, Z le nombre moyen de jours s'écoulant entre l'éclosion de la femelle et sa première ponte, on a la relation $p = Z \sqrt{M}$ lorsque M est calculé sur l'ensemble de la population. Si M est calculé sur un stade ovarien déterminé, p est la racine carrée ou cubique de M selon que la durée du cycle gonotrophique est de deux ou de trois jours pour l'espèce et la région considérées. On peut ensuite déduire, des conditions locales, l'âge en jours auquel une femelle risque d'être porteuse de sporozoïtes et calculer quelle fraction de la population atteint ou dépasse cet âge.

Cette technique est apparemment très simple. En fait, elle exige beaucoup de soin dans l'extraction des ovaires, car une manipulation tant soit peu brutale déforme les ampoules et fausse les mensurations. Il faut en outre effectuer au préalable l'étude analytique, sur un élevage, des dimensions médianes de l'ampoule, au moins chez des femelles nullipares, aux stades ovariens sur lesquels on a l'intention de travailler, et de déterminer la durée du cycle gonotrophique initial et des cycles ultérieurs. Cela limite la méthode aux espèces dont l'élevage, y compris la fécondation et la ponte, est possible, ce qui réduit beaucoup ses possibilités d'application. Telle qu'elle est suggérée par DAVIDSON, elle a été employée par DAVIDSON lui-même au Kenya et par PETERS et STANDFAST (1960) en Nouvelle-Guinée. La variante employée par VINCKE et par VAN THIEL est d'application plus simple, son étalonnage ne nécessitant aucun élevage, mais les bases mêmes de cette variante sont en contradiction profonde avec les études détaillées de POLOVODOVA et de DAVIDSON. Cela peut évidemment tenir à des différences entre les espèces anophéliennes, ou pour une même espèce à des conditions climatiques différentes. Cette contradiction incite toutefois à la prudence quant à l'emploi de la variante de VINCKE. Il serait intéressant de reprendre ces travaux sur différents vecteurs, bien que les méthodes dont nous allons parler maintenant se prêtent mieux à un emploi systématique sur le terrain.

4. — OBSERVATION DES CHANGEMENTS QUALITATIFS DU TRACTUS GÉNITAL FEMELLE.

Basée comme la précédente sur l'examen des ampoules des oviductes pairs, cette méthode n'est valable que pour les anophèles.

POLOVODOVA (1941) fut une des premières à donner des critères qualitatifs pour distinguer les femelles nullipares des femelles paires. On peut résumer ces caractères comme suit :

— *femelles venant d'éclore* : les ampoules sont transparentes et leurs parois diffèrent de celles des oviductes pairs seulement par la présence de plis transverses. A la fin du premier cycle gonotrophique, les parois des ampoules prennent une teinte légèrement brunâtre et les plis apparaissent accrus.

— *femelles paucipares* : les plis des ampoules sont plus épaissis, mais conservent souvent une disposition transverse régulière.

— *femelles multipares*, ayant pondu trois fois ou plus : les plis des ampoules sont épaissis et disposés d'une façon irrégulière.

Ces changements qualitatifs ont été étudiés aussi par WANSON et coll. (1947) sur *A. gambiae* et *A. moucheti* au Congo (ex Belge) et par GILLIES (1954 à 1958) sur *A. gambiae* et *A. funestus* au Tanganyika. WANSON, puis GILLIES ont proposé l'ensemble des caractères suivants :

— *Femelles nullipares* : ampoules indistinctement séparées l'une de l'autre, mais distinctement séparées de l'oviducte commun, et ayant une couleur crème légèrement translucide, seulement un peu plus sombre que les oviductes ; striations transversales légères ou absentes. Oviductes pairs à tubes étroits, dont la jonction avec les ampoules est nettement marquée. Extrémité supérieure des oviductes pairs étroite jusqu'à la jonction avec l'ovaire.

— *Femelles pares* : Ampoules nettement séparées l'une de l'autre, moins distinctes de l'oviducte commun, ayant une couleur jaune ou brunâtre, beaucoup plus sombres et opaques que les oviductes pairs. L'épithélium des ampoules est épaissi, avec des striations transversales. Les oviductes pairs sont larges, souvent à aspect aplati, et leur extrémité supérieure est élargie en forme d'éventail à la jonction avec l'ovaire.

L'ensemble de ces caractères n'est pas présent dans chaque spécimen, mais dans la majorité des cas suffisamment d'entre eux peuvent être observés pour permettre de faire une distinction nettement tranchée.

Cette méthode fait appel à des caractères dont l'appréciation est aisée, mais assez subjective, et pour cette raison elle est actuellement abandonnée en U.R.S.S. (BEKLEMISHEV et coll., 1959). GRJEBINE l'a employée en République Centrafricaine (ex Oubangui-Chari) (GRJEBINE, 1952) et au Congo (ex Moyen Congo) (in HAMON, ADAM et GRJEBINE, 1956) chez *A. gambiae* et *A. funestus* et a observé au Congo une discordance considérable entre le pourcentage de femelles pares et les indices sporozoïtiques. HAMON, CHAUVET et THELIN (1959), en Haute-Volta, ont signalé que cette méthode entraînait un pourcentage appréciable d'erreurs, des femelles pares étant classées comme nullipares et réciproquement. Les observations les plus précises sont celles de Coz, rapportées pour la première fois ici, dans la région de Morombé, à Madagascar. Coz a déterminé, de juillet à septembre 1960, le pourcentage de femelles nullipares reconnues par l'aspect des ampoules et des oviductes, puis, sur les mêmes spécimens, il a fait le diagnostic par la méthode des trachéoles, dont nous parlons ci-dessous, et a constaté que la méthode basée sur l'aspect des ampoules et des oviductes donnait un déficit de nullipares. Ce déficit était de l'ordre de 1 % chez *A. mascarensis*, de 10 % chez *A. gambiae*, de 20 % chez *A. squamosus*, de près de 30 % chez *A. coustani* et atteignait 75 % chez *A. fuscicolar*. Coz attribue principalement ces erreurs à la grande largeur des oviductes pairs chez les femelles nullipares de certaines espèces, alors que les autres caractères ne suffisent pas à corriger le diagnostic.

Cette méthode ne peut donc être employée seule sans entraîner des erreurs importantes, au moins chez certaines espèces, et comporte une grande part d'appréciation personnelle.

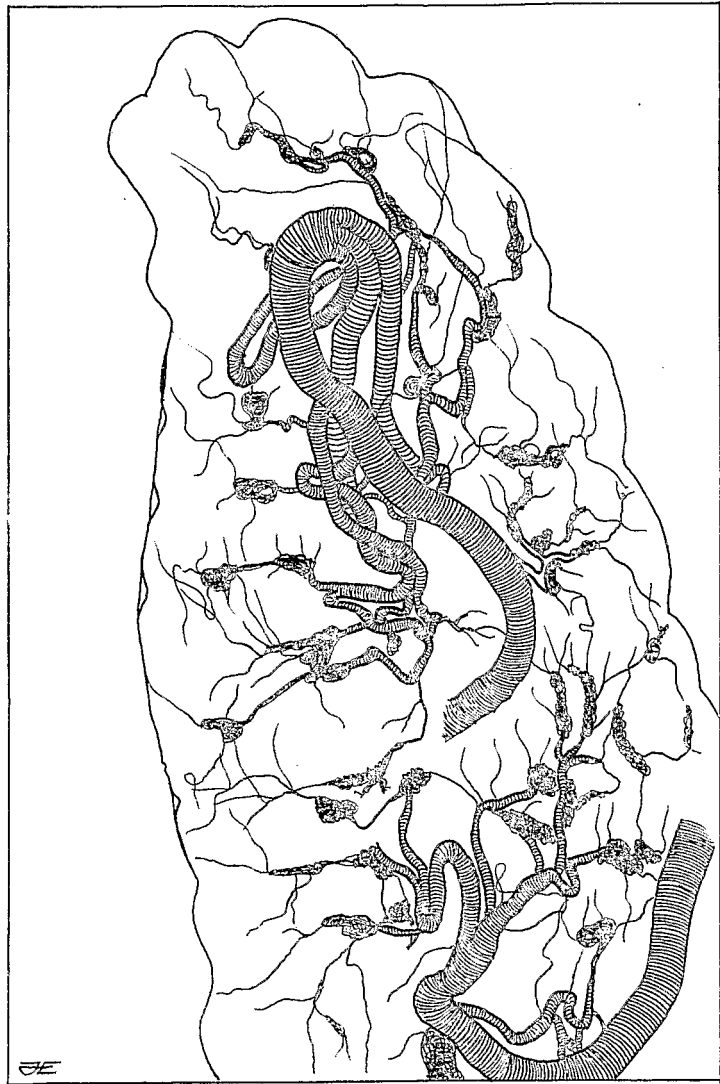


Planche 1. — Ovaire desséché sur lame d'une femelle nullipare d'*Anopheles funestus* au stade ovarien 2 moyen. On distingue parfaitement les deux troncs trachéens principaux, les trachées et les pelotons des trachéoles.

5. — OBSERVATION DE LA FORME DES TRACHÉOLES DE L'ESTOMAC ET DES OVAIRES.

Cette méthode est théoriquement applicable à tous les genres de moustiques et a été employée avec succès sur les *Anophelini* et sur les genres *Culex*, *Aedes*, *Mansonia* et *Eretmapodites*.

DETINOVA (1945) a signalé que chez les femelles nullipares les trachéoles des ovaires forment, dans leur partie subterminale, des pelotons serrés très caractéristiques.

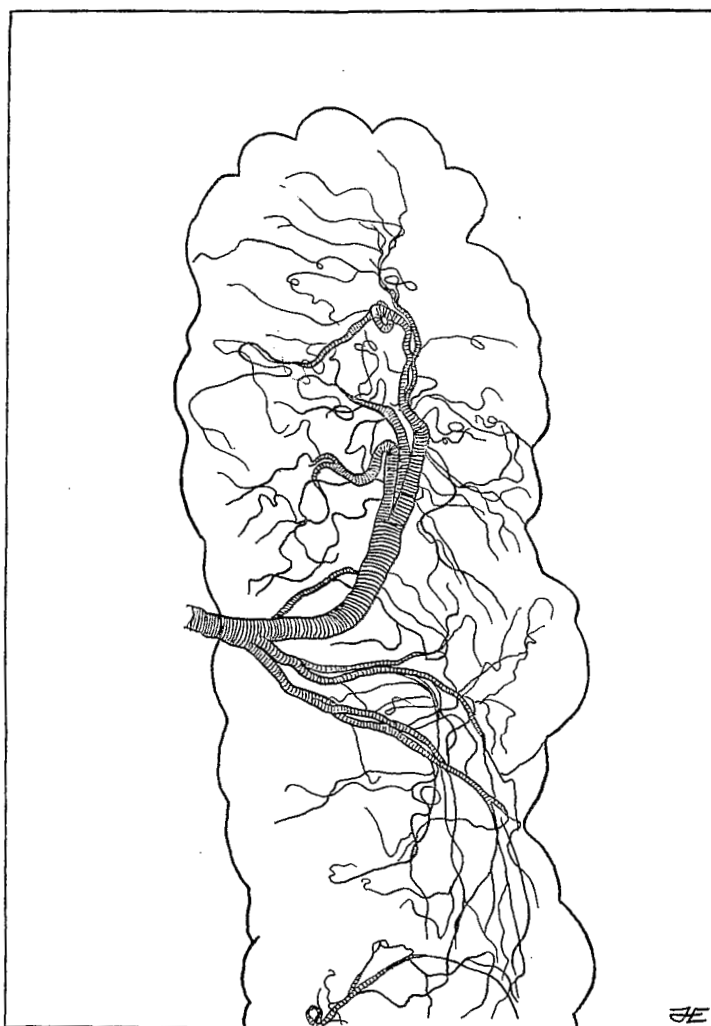


Planche 2. — Ovaire desséché sur lame d'une femelle pare d'*Anopheles funestus* au stade ovarien 2 moyen. On distingue parfaitement un tronc trachéen principal, les trachées et les trachéoles déroulées.

téristiques (pl. 1). Ces pelotons se déroulent progressivement au cours du premier cycle gonotrophique, au fur et à mesure de l'augmentation de taille des ovaires. Ce déroulement est irréversible, les pelotons ne réapparaissant pas après la ponte (pl. 2). Le même phénomène se produit avec les trachéoles de l'estomac, mais leur déroulement se produit lors de la première réplétion stomacale, ce qui en réduit l'intérêt, la classe d'âge qu'il caractérise étant très jeune.

La technique consiste à extraire les ovaires dans une goutte d'eau distillée et à les laisser sécher. Les trachéoles se remplissent alors d'air lors de la dessiccation de l'ovaire et deviennent très visibles, en noir sur fond clair, lorsqu'on

examine la lame, à sec, par transparence, au faible grossissement du microscope. Les ovaires secs collent à la lame de verre, ne sont pas fragiles, et peuvent être examinés plusieurs heures, plusieurs jours, voire plusieurs mois après la dissection, sous réserve d'être conservés à l'abri de la poussière et des insectes détritiphages : psoques, blattes, etc. C'est un grand avantage par rapport à toutes les autres méthodes qui exigent une lecture immédiate, dès la dissection. Par contre, dès que les ovules contiennent beaucoup de vitellus, les ovaires cessent d'être transparents après dessiccation, et il est difficile d'observer les trachées. En outre, chez la majorité des espèces anophéliennes d'Afrique tropicale, les pelotons ne sont plus nettement distincts au-delà du stade ovarien 2 âgé (classification de CHRISTOPHERS, 1911, modifiée par MACAN, 1950) ou du stade 3 début. Seules les espèces de grande taille, ayant de nombreuses trachéoles, peuvent être examinées en toute sécurité jusqu'au milieu du stade 3. En climat très sec, les ovaires se recroquevillent tellement qu'on ne peut plus distinguer nettement les trachéoles, mais il suffit de les recouvrir d'une goutte d'eau distillée au moment de l'examen pour les rendre à nouveau transparents.

Etant en pratique limitée aux femelles dont les ovaires n'ont pas atteint le stade 3, cette méthode ne s'applique guère aux moustiques capturés le jour, au repos, dans les habitations, mais elle convient très bien pour ceux capturés de nuit sur appât humain, soit directement, soit à l'aide de certains types de moustiquaires-pièges, car leurs ovaires ont rarement dépassé le stade 2.

CORBET (1959) a signalé qu'il employait couramment une modification de la technique précédente. Après extraction des ovaires dans le sérum physiologique, il les place entre lame et lamelle, dans une faible quantité de sérum physiologique, légèrement comprimés par la lamelle, et fait l'examen en lumière bleue, une seule lamelle pouvant recouvrir un grand nombre d'ovaires. Les observations de CORBET portent principalement sur *Mansonia pseudoconopas* et *M. fuscopennata*. Nous avons essayé cette méthode sur *A. gambiae*, *Culex pipiens fatigans*, *Aedes aegypti*, *M. africana* et *M. uniformis*. Il nous a semblé impossible de voir régulièrement les pelotons chez les femelles nullipares d'*A. gambiae* ou d'*Ae. aegypti*, et ils n'ont été visibles que chez un faible pourcentage de femelles nullipares de *C. p. fatigans*, les pelotons n'apparaissant guère chez ces espèces que lors de la dessiccation, si l'examen est fait au microscope ordinaire. Au moins chez *C. p. fatigans*, l'examen des trachéoles est possible avant dessiccation, sous réserve d'utiliser un microscope à contraste de phase. Par contre, chez *M. uniformis* et *M. africana*, les pelotons sont visibles entre lame et lamelle dans le sérum physiologique, bien que moins nettement qu'à l'état sec. Les limitations d'application liées au stade ovarien sont les mêmes que celles de la méthode originale de DETINOVA, qui est d'application plus simple et plus sûre.

Chez les espèces qui possèdent de nombreuses trachées sur les ovaires, celles-ci, après la première ponte, ne reconstituent pas de pelotons, mais s'emmêlent au hasard, certains des amas ressemblant beaucoup à des pelotons en cours de déroulement. Il importe donc de limiter l'emploi de cette technique aux stades ovariens 1 à 2 âgé de façon à ne pas avoir à décider s'il s'agit d'un peloton en voie de déroulement avancé chez une femelle nullipare, ou d'un artéfact chez une femelle pare.

MARKOVITCH (1951) a observé chez *A. claviger* la présence de pelotons dans les ovaires de femelles pares, du fait de la dégénérescence d'un nombre consi-

dérable de follicules, peu après le début du premier cycle gonotrophique, alors que les pelotons correspondants ne s'étaient pas encore déroulés. L'un de nous (J. H.) a observé ce phénomène à Bobo-Dioulasso chez *A. coustani*; l'énorme majorité des pelotons étaient présents, bien qu'un des ovaires contint un œuf résiduel de ponte. C'est un phénomène assez rare, mais qui peut entraîner des erreurs de diagnostic si l'on n'en tient pas compte.

6. — PRÉSENCE DE GRANULATIONS PIGMENTÉES DANS LES OVAIRES.

De nombreux auteurs ont observé la présence de granulations colorées, souvent en jaune, dans les ovaires d'insectes, et certains ont montré que ces granulations sont formées par les débris des cellules nourricières de l'œuf restant dans les ovarioles après la ponte (WIGGLESWORTH, 1939). BEKLEMISCHEV (1944) montra que cette présence de granulations jaunâtres pouvait être utilisée chez *A. maculipennis* pour distinguer les femelles paires des nullipares et ce procédé fut employé avec succès en U.R.S.S., notamment par YAGUZHINSKAYA (1945) chez *A. sacharovi* et *A. superpictus* dans la région de Samarcande.

LEWIS (1957) a observé la présence de granulations pigmentées dans les ovaires de femelles paires de *Simulium damnosum* en Afrique, et a utilisé ces granulations pour distinguer les femelles paires. Ce caractère a aussi été observé par LEBIED (1959) chez *S. damnosum*, *Ae. aegypti* et *Chrysops* sp.

COLLESS (1958) a étendu ce procédé à de nombreuses espèces de moustiques de Malaisie, dont *C. p. fatigans*, *C. tritaeniorhynchus*, *C. gelidus* et *Ae. albopictus*. Pour opérer, il extrait les ovaires, les aplatit entre lame et lamelle dans le sérum physiologique et les examine en lumière bleu pâle à un grossissement de 200 diamètres. Chez les femelles paires, il observe des granulations pigmentées dans les espaces intraovariens. Ces granulations varient de taille, de forme et de couleur avec les espèces de moustiques. Elles sont par exemple brunes chez *C. tritaeniorhynchus* et vert pâle chez *C. p. fatigans*. Chaque ovariole n'en possède pas, et le nombre des granulations varie d'un ovaire à l'autre, mais on peut toujours en observer quelques-unes et, selon COLLESS, obtenir une précision de 100 %. La technique serait rapide, un observateur entraîné pouvant disséquer et examiner 200 moustiques par jour. L'auteur ne signale pas de limitation en fonction du stade ovarien, mais en fait il n'est pas possible d'aplatir les ovaires sans écraser les ovules si ceux-ci ont dépassé le stade 2 âgé, et les limitations doivent être à peu près les mêmes que celles de la méthode des trachéoles.

Nous avons essayé cette méthode en Haute-Volta sur les anophèles et au Congo sur *C. p. fatigans*. Les granulations sont généralement bien visibles chez *A. gambiae* et *A. flavicosta*, mais très difficile à observer dans la plupart des autres espèces, dont *A. funestus*. En outre, de telles granulations se produisent lors de la dégénérescence des ovules, et si cette dégénérescence a lieu lors du premier cycle gonotrophique, une femelle nullipare sera prise pour une paire. Chez *S. damnosum*, OVAZZA (communication personnelle) considère ce caractère comme inconstant ou très difficile à mettre en évidence. La méthode des trachéoles nous paraît donc plus précise, en ce qui concerne les moustiques, car elle laisse moins de place à l'appréciation personnelle, surtout chez les espèces dont les granulations sont faiblement pigmentées.

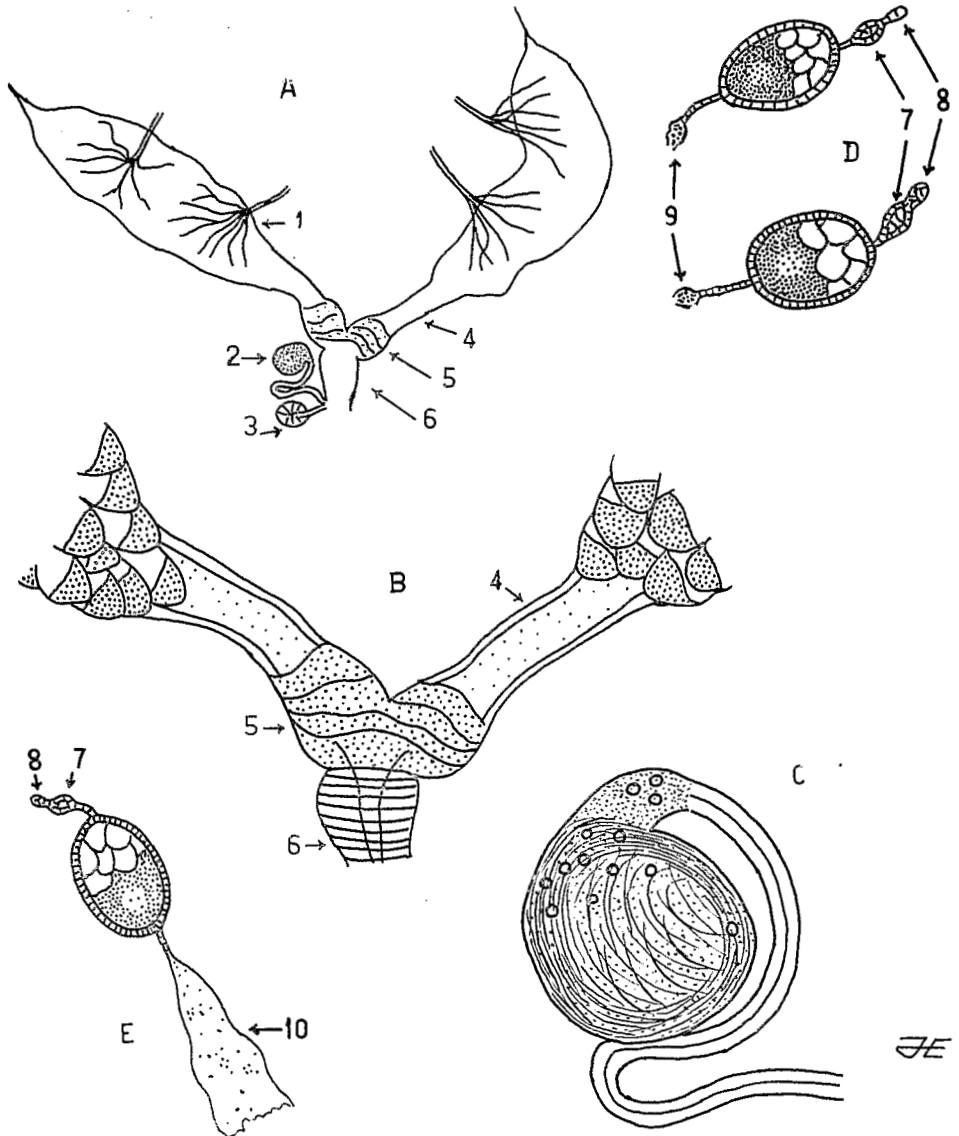
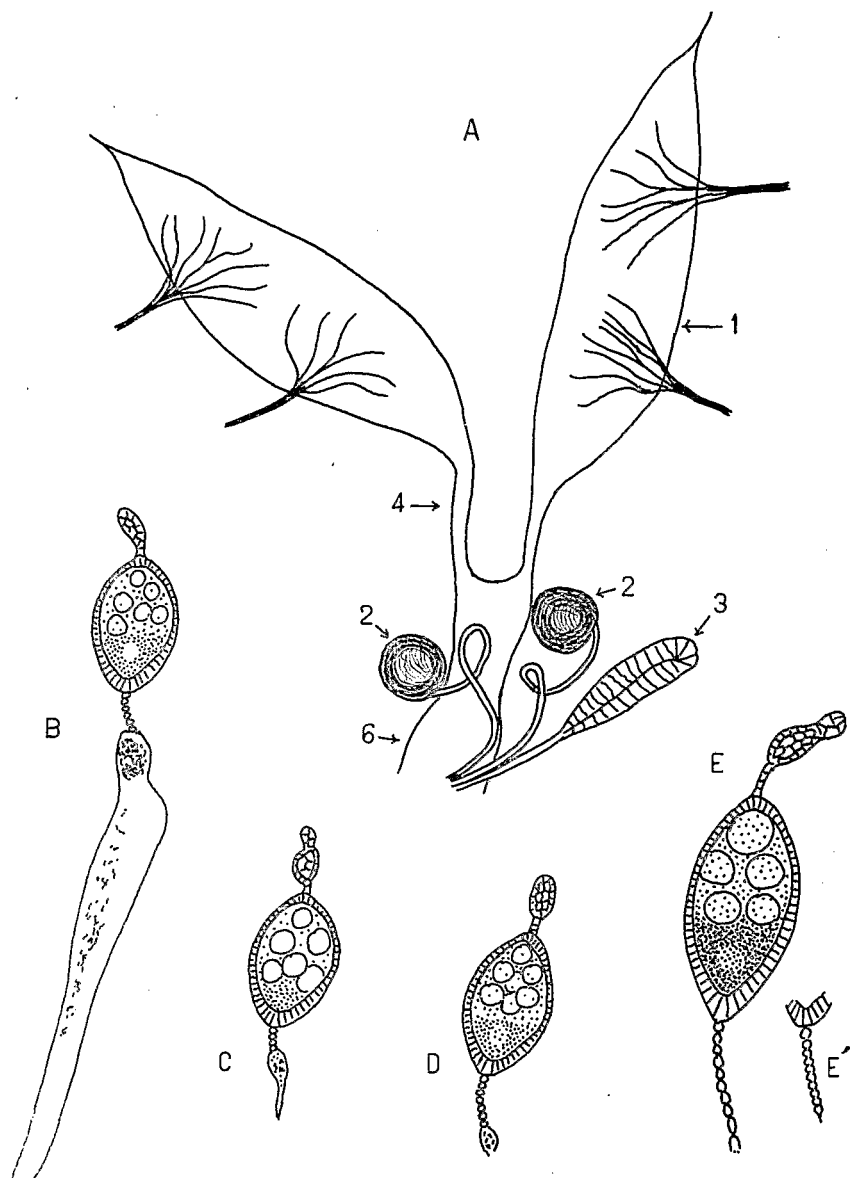


Planche 3. — Femelle pare d'*Anopheles funestus*. — A. Vue d'ensemble de l'appareil reproducteur (remarquer la présence de deux ampoules et d'une seule spermathèque). — 1, Ovaire avec les deux troncs trachéens et les trachées secondaires. — 2, Spermathèque. — 3, Glande accessoire. — 4, Oviducte pair. — 5, Ampoule. — 6, Oviducte commun ou impair. — B. Vue détaillée des oviductes et des ampoules. — C, Spermathèque, avec les spermatozoïdes enroulés à l'intérieur. — D, Ovules au stade 2 âgé avec l'oocyte devant donner la ponte ultérieure (7), le germarium (8) et une dilatation (9). — E, Ovule au stade 2 âgé avec l'oocyte devant donner la ponte ultérieure (7), le germarium (8) et un sac résiduel de ponte (10).



JE

Planche 4. — Femelle de *Mansonia uniformis*. — A, vue d'ensemble de l'appareil reproducteur (noter l'absence d'ampoules et la présence de deux spermathèques). — 1, Ovaire avec les deux troncs trachéens et les trachées secondaires. — 2, Spermathèques. — 3, Glande accessoire. — 4, Oviducte pair. — 5, Oviducte commun, ou impair. — B, Ovule au stade 2 âgé, avec germarium, oocyte devant donner la ponte ultérieure, funicule et sac résiduel de ponte. — C et D, Ovules au stade 2 moyen (C) et 2 âgé (D), avec germarium, oocyte devant donner la ponte ultérieure, funicule et dilatation. — E, Ovule au stade 2 âgé, avec germarium, oocyte devant donner la ponte ultérieure, et funicule de nullipare (nulliparité confirmée par l'examen des trachéoles). — E', Funicule de nullipare.

7. — NUMÉRATION DES DILATATIONS DES FUNICULES DES OVARIOLES.

POLOVODOVA (1947, 1949) découvrit que, chez les Anophèles du groupe *maculipennis*, chaque ponte entraîne l'apparition, sur le funicule de chaque ovariole, d'une dilatation qui persiste durant toute la vie de l'insecte (pl. 3, fig. D ; pl. 4, fig. C et D ; pl. 5, fig. G, H, K et L). DETINOVA (1949) a étudié le phénomène en détail. Le funicule de chaque ovariole est dilaté lors de la croissance de l'ovule. Aussitôt après la ponte, il se présente comme un vaste sac (pl. 3, fig. E ; pl. 4, fig. B ; pl. 5, fig. E, F, G et J), rétréci au niveau de l'oviducte interne et au niveau de l'ovule devant donner la ponte suivante. Ce sac diminue de volume pendant les vingt-quatre heures suivant la ponte, pour ne plus donner qu'une simple dilatation du funicule, contenant généralement les granulations pigmentées dont nous avons parlé plus haut. Chaque nouveau cycle gonotrophique entraîne la formation d'une dilatation supplémentaire (pl. 3, fig. G et H). Dans le cas où un ovule dégénère, il laisse lui aussi une dilatation, généralement beaucoup plus fortement pigmentée qu'une dilatation consécutive de ponte. Il suffit de compter ces dilatations pour connaître combien de fois la femelle a pondu, tout en faisant attention au fait que, dans des ovaires au stade 3, 4 ou 5, une petite dilatation très colorée accompagnée d'un ovule stade 2 correspond à un ovule dégénéré dans le même cycle gonotrophique et doit donc être décomptée. L'aspect de la dilatation la plus proche de l'ovule sur le funicule permet de savoir si la ponte a eu lieu récemment (sac résiduel de ponte, pl. 3, fig. E ; pl. 4, fig. C et D ; pl. 5, fig. E, F, G et J), ou si elle a eu lieu plus de 24 heures auparavant (dilatation proprement dite, pl. 3, fig. D ; pl. 4, fig. C et D ; pl. 5, fig. H, K et L), ce qui est une information utile pour préciser le laps de temps s'écoulant entre deux repas de sang consécutifs.

En pratique, après l'extraction des ovaires dans du sérum physiologique, il faut enlever la membrane qui entoure chaque ovaire, ce qui s'obtient en partie en arrachant les trachées. On maintient ensuite l'ovaire avec une aiguille tandis qu'avec une seconde aiguille on étire un ovariole pour allonger le funicule et compter les dilatations, l'opération étant répétée sur 10 à 20 ovarioles pour confirmer le diagnostic. L'examen doit se faire au plus fort grossissement d'une loupe binoculaire, ou au grossissement moyen d'un microscope. L'opération nécessite une grande dextérité et un long entraînement mais semble possible sur de nombreuses espèces, la manipulation sur les stades 4 et 5 étant particulièrement difficile et basée sur l'examen des follicules dégénérés.

DETINOVA a fait à Londres, en 1959, sous l'égide de la Division de l'Eradication du Paludisme de l'O.M.S., des démonstrations très concluantes sur *A. gambiae*, *A. stephensi*, *A. labranchiae atroparvus*, *C. p. fatigans* et *Ae. taqoi*. Certaines espèces semblent se prêter beaucoup mieux que d'autres à l'application de cette méthode, qui est très lente et n'est employable que par un personnel très qualifié. Son énorme avantage, en contrepartie, est de donner un tableau exact de la composition de la population de moustiques sur laquelle on opère, classée d'après le nombre de pontes effectuées. Connaissant les conditions locales de la transmission, il est alors facile de définir le pourcentage exact de femelles épidémiologiquement dangereuses, sans avoir à user d'artifices mathématiques parfois discutables. Cette méthode est actuellement la seule employée en U.R.S.S. pour étudier l'âge physiologique des populations anophéliennes (DETINOVA, 1959), mais elle semble trop délicate et trop lente pour pouvoir être utilisée dans des

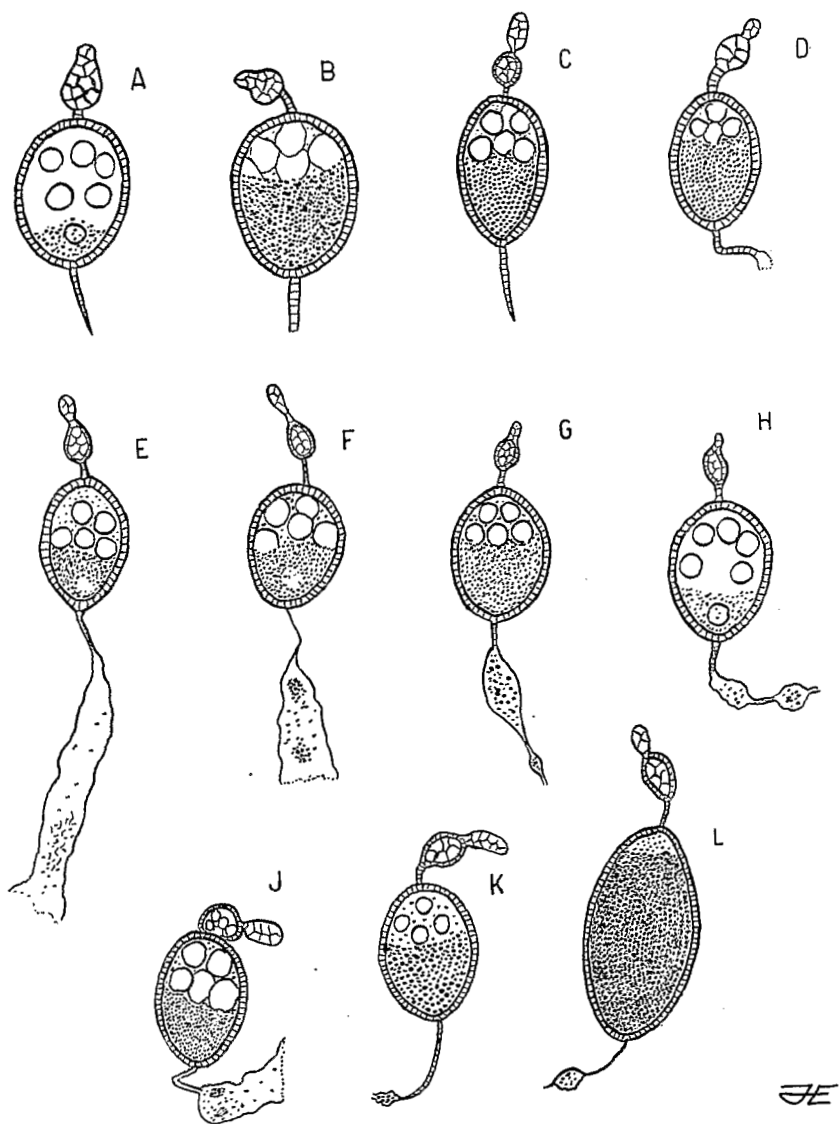


Planche 5. — Ovules d'anophèles, avec oocyte devant donner la ponte ultérieure, germarium et funicule. Le contrôle de la parité ou de la nulliparité a été fait sur les trachéoles, sauf dans le cas du stade 4 de la figure L. — A, *pharoensis* nullipare, stade 2 moyen. — B, *funestus* nullipare, stade 3. — C, *pharoensis* nullipare, stade 3. — D, *funestus* nullipare, stade 3, dont le funicule évasé à son point de rupture simule une dilatation. — E et F, *gambiae* pare, stade 2 âgé, avec sac résiduel de ponte. — G, *funestus* pare, stade 3, avec sac et dilatation. — H, *pharoensis* pare, stade 2 moyen, avec deux dilations. — J, *gambiae* pare, stade 3, avec sac. — K, *nili* pare, stade 3, avec dilatation. — L, *pharoensis* pare, stade 4, avec dilatation.

campagnes de masse là où, comme en Afrique, les Entomologistes médicaux sont trop peu nombreux.

Une simplification a été proposée par BERTRAM et SAMARAWICKREMA (1958). Travaillant sur *M. uniformis*, ils isolent les ovarioles les uns des autres, par dissection de l'ovaire, ce qui permet de compter les dilatations du funicule sous le microscope, en prenant son temps, au lieu de faire l'observation sous la loupe binoculaire au cours de la dissection, comme l'impose la technique DETI-NOVA, ce qui est assez malaisé. Seulement, lors de l'isolement des ovarioles, la rupture du funicule se produit au hasard, tantôt au point d'insertion du funicule sur l'ovule, tantôt au point d'insertion sur l'oviducte interne, tantôt en une position intermédiaire. Il faut donc compter le nombre de dilatations sur le plus grand nombre possible de funicules et prendre le chiffre le plus élevé de dilatations, tout en faisant éventuellement une correction dans le cas d'ovules dégénérés. Il est impossible d'être certain d'avoir vu le nombre maximum de dilatations, mais, en pratique, des essais faits sur des populations de *M. uniformis* d'âge connu ont été très encourageants. Si la ponte est récente, ou si les ovaires sont au stade 5, l'examen doit porter sur les follicules qui ont dégénéré au cours du dernier cycle gonotrophique. Cette technique est d'un emploi délicat et n'est pas beaucoup plus rapide que la méthode originale. Un essai d'utilisation sur les Anophèles de Haute-Volta (HAMON, CHAUVET et THELIN, 1959) n'a pas été très fructueux, les centaines de spécimens examinés semblant tous se classer en nullipares et unipares, à l'exception d'un *A. coustani* avec trois dilatations et d'un *A. flavicosta* avec quatre dilatations, alors que les indices sporozoïtiques rencontrés à la même époque chez *A. gambiae* et *A. funestus* démontraient la présence, au moins chez ces espèces, d'une proportion importante de femelles multipares.

Une autre simplification, considérable celle-là, a été suggérée par LEWIS (1958). Il individualise sommairement les ovarioles dans le sérum physiologique, puis recherche au microscope la présence de sacs ou de dilatations. S'il y en a, la femelle est pare. S'il n'y en a pas, la femelle est nullipare. LEWIS a eu de bons résultats expérimentalement avec *A. gambiae*. La méthode est simple mais nécessite quelques précautions de lecture de la dissection. Il faut s'assurer que l'on n'a pas brisé tous les funicules trop près des ovules, ce qui rend le diagnostic impossible, et que les fragments de sacs ou de dilatations contiennent bien des granulations plus ou moins pigmentées, excluant la possibilité qu'il s'agisse d'un fragment de l'oviducte interne ou d'une distorsion du funicule au point de rupture simulant une dilatation (pl. 5, fig. D). Sous réserve d'entraînement avec du matériel de parité connue, ce qui est facile en couplant cette technique avec celle des trachéoles, chacune étant appliquée sur un ovaire du même moustique, cette méthode peut s'appliquer aisément, sur le terrain, aux femelles dont les ovaires sont au stade 1, 2 et 3, et dans certains cas 4. Certaines espèces, telles que *A. funestus*, *A. coustani*, *A. flavicosta* et *A. gambiae*, ont des funicules assez robustes qui se prêtent bien à cette technique, tandis qu'il faut effectuer les individualisations d'ovarioles avec beaucoup plus de soin chez *A. nili* ou *A. wellcomei* dont les funicules semblent particulièrement fragiles. Le diagnostic ne doit être porté qu'après avoir examiné 10 à 20 funicules suffisamment longs pour que l'absence de sac ou de dilatation soit une preuve de nulliparité (pl. 4, fig. E et E'; pl. 5, fig. A, B, C et D). L'examen est beaucoup plus bref si les sacs ou les dilatations sont très évidentes. La cadence de dissection et d'exa-

men ne semble pas pouvoir dépasser 15 à 30 spécimens à l'heure selon les espèces de moustiques et la dextérité de l'opérateur. Les fausses dilatations, artéfacts de dissection, sont relativement rares chez les anophèles et les *Mansonia*, mais sont très fréquentes chez les *Culex*. Le grand avantage du procédé est que la dissection peut être confiée à un assistant adroit, seul l'examen microscopique requérant un spécialiste qualifié. Cette variante permet simplement de reconnaître les femelles pares et d'établir dans leur cas si la ponte a eu lieu ou non très récemment, suivant que l'on rencontre un sac ou une dilatation. Etant utilisable sur les stades ovariens 3, elle peut s'appliquer aux femelles capturées le jour au repos dans les habitations ou dans des refuges extérieurs.

8. — PRÉSENCE DE GRAISSES OU DE SUBSTANCES COLORÉES CHEZ LES FEMELLES NULLIPARES.

La présence de graisses colorées dans la cavité générale des moustiques nullipares a été observée par WANSON, WOLFS et LEBIED (1947) chez *A. moucheti* au Congo (ex belge). Cette espèce possède dans la musculature thoracique et autour des glandes salivaires des gouttelettes graisseuses bleutées, d'importance variable, présentes chez 100 % des femelles nullipares. La coloration bleue est très intense chez les femelles venant d'éclore, s'atténue au cours du premier cycle gonotrophique, et devient difficile à observer après la première ponte.

CORBET (in BAILLY-CHOUMARA, 1960) a fait des observations similaires chez les *Mansonia* appartenant au sous-genre *Coquillettidia*, en Uganda. Les femelles venant d'éclore possèdent une graisse verdâtre dans la cavité générale, et le tégument lui-même a une teinte verdâtre. Ces colorations se modifient un certain nombre d'heures après l'éclosion de la femelle, et constituent un bon signe de nulliparité, mais toutes les femelles nullipares ne présentent pas cette coloration verdâtre.

Ces colorations semblent pouvoir aider à poser un diagnostic dans certains cas, mais ne sont pas d'un emploi général.

9. — PRÉSENCE D'HYDRACARIENS.

Certaines espèces d'hydracariens se fixent sur les moustiques lorsque ceux-ci sont au contact de l'eau des gîtes larvaires, l'infestation la plus massive se produisant lors de l'éclosion. La présence d'hydracariens attachés au corps des femelles de moustiques est donc une présomption de nulliparité qui a été proposée par GILLET (1957) pour estimer la proportion de femelles nullipares chez *M. africana* qui est généralement fortement infesté d'hydracariens. Des infestations importantes se rencontrent fréquemment en Haute-Volta chez *M. uniformis*, *M. africana*, *A. coustani* et *A. pharoensis*, mais d'autres espèces, et notamment *A. gambiae*, en portent beaucoup plus rarement. La même remarque a été faite par GILLIES (1958) au Tanganyika chez *A. gambiae* et *A. funestus*. En outre, les variations saisonnières des gîtes modifient certainement les possibilités d'infestation par les hydracariens et, d'après DETINOVA (1959), il n'y a pas de relation stricte entre la nulliparité et la présence d'hydracariens.

CORBET (in BAILLY-CHOUMARA, 1960) a fait une étude de ces hydracariens sur des moustiques conservés en captivité. Ils se fixent sur le moustique lors de son émergence de la nymphe, grossissent et changent de teinte au cours du premier cycle gonotrophique du moustique-hôte, et séjournent d'une semaine à un mois

sur le moustique, d'où ils se laissent tomber après s'être enkystés. Lorsque des hydracariens passent sur des femelles, à l'occasion des pontes, il s'agit généralement d'espèces différentes, n'ayant pas la même forme, la même couleur, ni la même localisation sur l'hôte. Ces caractères doivent donc être étudiés minutieusement, pour une espèce donnée, dans une région donnée, pour pouvoir fournir des renseignements utilisables.

C'est en définitive une méthode beaucoup moins simple que ne le laissent penser les observations de GILLET, et d'un intérêt très limité, inutilisable seule.

10. — FRÉQUENCE DES FEMELLES PRÉGRAVIDES.

GILLIES (1954 et 1955) a signalé qu'*A. gambiae* et *A. funestus*, dans la zone côtière du Tanganyika, ont besoin de deux repas de sang pour effectuer leur premier cycle gonotrophique. En conservant vingt-quatre heures les femelles gorgées récoltées dans la nature, il est possible d'établir le pourcentage de celles qui ne mûrissent pas leurs ovaires. Ce sont ces femelles nullipares ayant pris un seul repas de sang que GILLIES qualifie de prégravidés. De cette fréquence de femelles prégravidés, on peut déduire la proportion de femelles nullipares. Malheureusement, certaines femelles paires ont besoin elles aussi de deux repas de sang pour mûrir leurs œufs, ce qui diminue la précision de la méthode. En outre, la présence d'une phase prégravidé obligatoire ne semble pas exister chez *A. gambiae* ni chez *A. funestus* dans le Tanganyika central, ni en Haute-Volta, et n'existe pas non plus chez *A. mouchei* dans le Sud Cameroun (MOUCHET et GARIOU, 1957), ni au Congo (ex belge) (WANSON, WOLFS et LEBIED, 1947). L'application de cette méthode est donc limitée pour l'instant à deux espèces anophéliennes, dans une petite région d'Afrique orientale.

11. — PRÉSENCE D'ŒUFS RÉSIDUELS.

La présence dans les ovaires d'œufs résiduels d'une ponte précédente indique évidemment que l'on se trouve en présence d'une femelle paire. HADDOW et GILLET (1958) admettent que la fréquence des œufs résiduels est constante chez les femelles paires et, ayant déterminé le pourcentage de femelles avec œufs résiduels lors de pontes en captivité, en déduisent le pourcentage de femelles paires parmi des femelles de *M. fuscopennata* attaquant à différentes périodes de la nuit, étant connue la fréquence des œufs résiduels chez ces femelles, prises sur appât humain.

La présence d'œufs résiduels dans les ovaires étant due à un fonctionnement défectueux du système ovarien, il est probable que la fréquence des œufs résiduels est plus grande chez les femelles âgées que chez les femelles jeunes, et il est très possible qu'elle varie en fonction d'autres facteurs. GRJEBINE a observé, au Congo (ex Moyen Congo) et à Madagascar, que le pourcentage de femelles paires avec œufs résiduels variait considérablement d'une saison à l'autre chez *A. gambiae*. Des observations similaires ont été faites en Haute-Volta par HAMON le pourcentage de femelles paires avec œufs résiduels variant selon les mois de 4,5 à 20 % chez *A. gambiae* et de 3 à 11 % chez *A. coustani*. Ce pourcentage varie aussi d'une espèce à l'autre et, en Haute-Volta, est maximum chez *A. pharoensis* avec une valeur moyenne de 12 % et est minimum chez *A. flavicosta* avec une valeur moyenne de 2,2 %.

Ce caractère ne saurait donc être utilisé que comme un caractère d'appoint.

12. — MÉTHODES MATHÉMATIQUES.

Toutes ces méthodes postulent que le taux quotidien moyen de survie est relativement constant au cours de la vie du moustique, et que les populations de moustiques sur lesquelles on travaille sont en équilibre, les naissances compensant les décès. L'épidémiologie du paludisme étant mieux connue que celle des filarioses, ces méthodes mathématiques s'appliquent exclusivement aux anophèles et ne sont utilisables que si l'on trouve assez fréquemment des spécimens infestés et, s'il n'y a pas plusieurs espèces plasmodiales, très fréquentes.

D'après les observations des chercheurs russes, rapportées par DETINOVA (1959), le taux quotidien de mortalité s'accroît de façon nette chez les femelles âgées. Cependant MACDONALD (communication personnelle), en partant de ces mêmes observations, a conclu que le taux de survie quotidien moyen était indépendant de l'âge des femelles. GILIES (*in* BAILLY-CHOUMARA, 1960) a montré que dans la zone côtière du Tanganyika la mortalité journalière d'*A. gambiae* est constante et n'augmente pas avec l'âge, en se basant sur le lâcher de 132.000 moustiques marqués par les radioisotopes, dont 0,77 % ont été recapturés. Ces observations ne sont pas incompatibles, les premières portant sur des périodes de plusieurs mois et les dernières seulement sur plusieurs semaines. Dans les conditions moyennes de l'Afrique tropicale où l'âge épidémiologiquement dangereux des Anophèles est relativement faible, on peut admettre que la mortalité quotidienne moyenne est indépendante de l'âge.

La première méthode, suggérée par DAVIDSON (1953) est basée sur la comparaison de l'indice sporozoïtique immédiat et de l'indice sporozoïtique différé. Une partie des femelles capturées est disséquée le jour même de la capture, pour établir l'indice sporozoïtique immédiat, et les femelles restantes ne sont disséquées que n jours plus tard, après avoir été conservées en cage, n étant inférieur ou égal à la durée du cycle extrinsèque du *Plasmodium* le plus fréquent. Le taux quotidien moyen de survie p est la racine n^{me} du rapport : indice sporozoïtique immédiat/indice sporozoïtique retardé. Cette méthode est d'application simple, mais exige la dissection d'un grand nombre de femelles pour établir de façon précise les deux indices sporozoïtiques et impose la conservation en cage pendant 8 à 10 jours d'une partie des femelles récoltées, ce qui n'est pas partout réalisable.

La seconde méthode, proposée par MACDONALD (1957) est basée sur la comparaison de l'indice sporozoïtique et de l'indice d'infection totale, sporozoïtes plus oocystes. MACDONALD admet dans cette méthode que les oocystes sont rarement visibles avant qu'ils aient trois jours. Si la durée du cycle extrinsèque du *Plasmodium* dominant est de n jours, le taux quotidien moyen de survie p est la racine $(n-3)^{\text{me}}$ du rapport indice sporozoïtique/indice d'infection totale. Ce procédé a l'avantage de n'exiger aucune conservation des anophèles et nécessite un nombre de dissections plus réduit que la méthode précédente, puisque les mêmes femelles fournissent les deux indices.

La troisième méthode, utilisée par METSELAAR (1957) en Nouvelle-Guinée et par CHOUMARA et coll. (1959) en Haute-Volta, est basée sur l'étude théorique des composantes de l'indice sporozoïtique faite par MACDONALD (1952) dans le cas d'un paludisme en équilibre. Le taux de survie quotidien moyen est déduit de l'indice sporozoïtique, à l'aide d'une abaque, une fois connus l'indice gamétocytaire moyen de la population, la fréquence des repas de sang humain de

l'anophèle étudié, et la durée moyenne du cycle extrinsèque du *Plasmodium* dominant. Ce dernier procédé ne vise pas à la perfection, mais donne un ordre de grandeur tout à fait satisfaisant, sous réserve que les données de base soient exactes.

13. — MÉTHODES MIXTES.

Comme nous l'avons vu, beaucoup de méthodes existantes ont des limitations d'emploi et des inconvénients. Certaines améliorations importantes peuvent être obtenues par la combinaison de plusieurs de ces méthodes.

De nombreuses combinaisons ont été proposées successivement par GILLIES, pour les anophèles seulement, tendant à une perfection de plus en plus grande et à une plus grande maniabilité sur le terrain. Les dernières en date (1958), s'appliquant uniquement à *A. gambiae*, sont les suivantes :

A. - On élimine d'abord, après extraction des ovaires dans le sérum physiologique, les femelles à spermathèques vides ou présentant un bouchon de fécondation ou des ovaires aux stades 1 ou 2 jeune, qui sont classées comme nullipares. Les autres sont triées en nullipares et pares à l'aide des critères qualitatifs de POLOVONOVA. Les ovaires de celles qui ne peuvent être classées avec certitude sont transférés dans l'eau distillée et on fait la mensuration des ampoules. Si les ampoules ont un diamètre supérieur à 260 μ , les femelles sont pares ; si ce diamètre est inférieur à 211 μ , les femelles sont nullipares. Les ampoules comprises entre 211 et 260 μ correspondent à des femelles que l'on ne peut pas classer. Le taux quotidien moyen de survie p peut alors être calculé comme dans la méthode de DAVIDSON, basée sur la mensuration des ampoules, en incorporant les femelles « douteuses » d'abord dans les pares, puis dans les nullipares, pour déterminer l'intervalle dans lequel se situe p . GILLIES considère toutefois que les postulats sur lesquels repose ce calcul mathématique sont insuffisamment prouvés, et qu'il est plus sage de s'en tenir au pourcentage de femelles pares, qui constitue en lui-même une information très valable.

B. - On opère comme précédemment mais, au lieu de mesurer les ampoules des femelles non classées par la méthode de POLOVONOVA, on dilacère les ovaires pour individualiser les ovarioles et déterminer la parité conformément à la méthode de LEWIS.

La variante A doit pouvoir s'appliquer à des femelles à n'importe quel stade ovarien, bien que la mensuration des ampoules devienne délicate chez les femelles dont les ovaires sont au stade 4 ou 5. La variante B ne peut s'appliquer qu'aux femelles n'ayant pas dépassé le stade 3, car l'examen du funicule des ovarioles donne des résultats douteux pour les stades 4 et 5. D'après des essais faits en saison chaude dans la zone littorale du Tanganyika, avec des moustiques d'élevage marqués, puis lâchés dans la nature et recapturés, les femelles nullipares d'*A. gambiae* ont entre 1 et 4 jours, tandis que les femelles pares ont 4 jours ou plus (GILLIES, communication personnelle). Comme, dans cette région, la phase prégravidé est la règle, ces âges peuvent être diminués d'un jour dans les zones où *A. gambiae* pond après un seul repas.

HAMON, CHAUVET et THELIN (1959) ont proposé une autre combinaison pouvant s'appliquer à n'importe quel moustique pris sur appât humain, soit directement, soit à l'aide d'une moustiquaire-piège, et donc à jeun ou fraîchement gorgé. Elle consiste à faire l'extraction des ovaires dans le sérum physiologique, à

transférer dans une goutte d'eau distillée ceux qui ne dépassent pas le stade 2 âgé, et à dilacérer les autres dans le sérum physiologique pour individualiser les ovarioles. La parité est déterminée dans le premier lot par la méthode des trachéoles et sur le second par la méthode de LEWIS. Cette combinaison est très simple, a un bon rendement et ne fait pas entrer en ligne de compte de coefficient personnel. Son application est particulièrement aisée aux moustiques capturés directement sur appât humain, car la grande majorité d'entre eux est à jeun et la méthode des trachéoles peut être employée pour environ 98 % des spécimens, permettant d'examiner plusieurs centaines de femelles en une matinée.

CORBET (1960) a indiqué quatre caractères que l'on peut observer à l'aide d'une simple loupe binoculaire grossissant environ 16 fois pour reconnaître les femelles nullipares de certaines espèces de moustiques africains sans dissection. Ce sont :

- a) la présence d'Hydracariens vivants ;
- b) la vestiture intacte des écailles du corps et des ailes ;
- c) la présence visible de méconium dans l'abdomen ;
- d) la coloration verdâtre du thorax.

L'utilisation de ces caractères permet, selon CORBET, de reconnaître à vue 90 % des nullipares parmi les *Mansonia* du sous-genre *Coquillettidia* en Uganda.

14. - CONCLUSIONS.

De nombreuses méthodes ont été proposées depuis trente ans pour classer les moustiques d'après leur âge physiologique. La seule vraiment précise est celle découverte par POLOVODOVA en 1947, permettant de déterminer le nombre exact de pontes effectué par chaque femelle, mais elle est d'un emploi très délicat et constitue plutôt un instrument de recherche qu'une technique applicable sur le terrain dans le cadre des campagnes d'éradication du paludisme ou d'autres maladies transmises par les moustiques.

Par contre, d'autres méthodes, ou combinaisons de méthodes, permettent de classer les femelles en pares et nullipares, et donc de déterminer le pourcentage de femelles pares dans différentes situations, ce pourcentage permettant lui-même de calculer, si on le désire, le taux quotidien moyen de mortalité ou la fréquence des femelles d'âge épidémiologiquement dangereux.

Plusieurs de ces méthodes, ou combinaisons de méthodes, sont d'application relativement aisée sur le terrain, laissant une faible part au coefficient personnel et permettant d'examiner jusqu'à plusieurs centaines de moustiques par jour. Elles ont donc leur place dans le contrôle entomologique de toutes les grandes campagnes impliquant l'emploi massif d'insecticides. Elles permettent notamment d'établir si les différentes techniques employées fournissent des échantillonnages comparables de la population culicidienne et donnent la possibilité d'évaluer directement les répercussions des traitements insecticides sur l'âge des moustiques vecteurs et sur les possibilités de transmission de la maladie.

REMERCIEMENTS. — Tous nos remerciements vont à la Division de l'Eradication du Paludisme de l'O.M.S. qui a permis à trois d'entre nous de bénéficier de bourses d'études au cours desquelles nous avons pu nous familiariser avec les techniques employées par T.S. DETINOVA, M.T. GILLIES et P.S. CORBET. Ils vont aussi à T.S. DETINOVA, M.T. GILLIES et P. GRENIER, dont les commentaires nous ont été précieux lors de la rédaction de cette mise au point.

RÉSUMÉ. — La détermination de l'âge physiologique des moustiques peut apporter une réponse à de nombreux problèmes d'échantillonnage des populations culicidiennes et permet d'apprécier rationnellement les répercussions des campagnes insecticides sur la longévité des moustiques vecteurs et sur leur potentialité de transmission.

Les auteurs passent en revue les différentes méthodes permettant de reconnaître, parmi les femelles de moustiques, les nullipares, qui n'ont jamais pondu, des pares, qui ont pondu une ou plusieurs fois.

Parmi les différentes techniques existantes, les principales sont celle de POLOVODOVA (1941), basée sur les changements qualitatifs des oviductes pairs et des ampoules, applicable aux seuls anophèles, et celles basées sur les modifications irréversibles des trachéoles des ovaires (DETINOVA, 1945), et sur la présence de dilatations résiduelles de ponte sur les funicules des ovarioles (POLOVODOVA, 1947), qui sont applicables à tous les moustiques. Cette dernière technique peut permettre, dans certaines conditions, de déterminer le nombre exact de pontes déposé par chaque femelle.

Des méthodes mathématiques, dérivées des travaux de DAVIDSON (1953 et 1955) et de MACDONALD (1952 et 1957) permettent d'estimer, à partir des indices sporozoïtiques et oocystiques, ou à partir de la proportion de femelles pares, le taux quotidien moyen de mortalité et le pourcentage de femelles d'âge épidémiologiquement dangereux.

L'emploi combiné de plusieurs de ces méthodes permet l'étude de l'âge physiologique des moustiques dans la plupart des conditions susceptibles de se rencontrer au cours d'enquêtes sur le terrain.

BIBLIOGRAPHIE

- ALMAZOVA (V.V.), 1935. — Determination of the age of mosquito from its oviduct (*Med. Parazit. (Mosk.)*, 4, p. 345).
- BAILLY-CHOUMARA (H.), 1960. — Rapport du voyage de bourse O.M.S. effectué du 29-IX-1959 au 16-XII-1960 dans différents centres de lutte antipaludique d'Afrique centrale et orientale. O.R.S.T.O.M., Paris, ronéotypé, 18 p.
- BEKLEMISCHEV (W.N.), DETINOVA (T.S.) et POLOVODOVA (V.P.), 1959. — Determination of physiological age in anophelines and of age distribution in anopheline populations in the U.R.S.S. (*Bull. Org. mond. Santé*, 21, p. 223).
- BERTRAM (D.S.) et SAMARAWICKREMA (W.A.), 1958. — Age determination for individual *Mansonioides* mosquitoes (*Nature*, 182, p. 444).
- BUXTON (P.A.) et LEESON (H.S.), 1949. — Anopheline mosquitoes: life history. in BOYD, *Malariaology*, p. 257.
- CHOUMARA (R.), HAMON (J.), RICOSSE (J.) et BAILLY (H.), 1959. — Le paludisme dans la zone pilote antipaludique de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta. 4^e partie. *Epidémiologie du paludisme dans les zones traitées et non traitées*. Cahiers de l'O.R.S.T.O.M., Paris, p. 99.
- CHRISTOPHERS (S.R.), 1911. — The development of the egg follicle in anophelines (*Paludism*, 2, p. 73).
- COLLESS (D.H.), 1958. — Recognition of individual nulliparous and parous mosquitoes (*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 52, p. 187).

- CORBET (P.S.), 1953. — Recognition of individual nulliparous and parous mosquitoes (*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 53, p. 297).
- 1960. — The use of external characters to age-grade adult mosquitoes (Dipt.) (*C.R. XI Intern. Ent. Kongress*, Wien, août 1960, sous presse).
- DAVIDSON (G.), 1955. — Measurements of the ampullae of the oviduct as a mean of determining the natural daily mortality of *Anopheles gambiae* (*Ann. trop. Med. Parasit.*, 49, p. 24).
- DAVIDSON (G.) et DRAPER (C.C.), 1953. — Field studies of some of the basic factors concerned in the transmission of malaria (*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 47, p. 522).
- DAVIES (L.), 1957. — A study of the age of females of *Simulium ornatum* Mg. (Diptera) attracted to cattle (*Bull. ent. Res.*, 48, p. 535).
- DEFINOVA (T.S.), 1945. — Determination of the physiological age of female *Anopheles* from the changes of the tracheal system of ovaries (*Med. Parazit. (Mosk.)*, 14, p. 45).
- 1949. — Physiological changes of ovaries in females of *A. maculipennis* (*Med. Parazit. (Mosk.)*, 18, p. 410).
- 1959. — Age-grouping methods in diptera of medical importance. WHO/Mal/238, Genève.
- DUKE (B. O. L.), 1960. — Studies of the biting habits of *Chrysops*. VII, The biting-cycle of nulliparous and parous *C. silacea* and *C. dimidiata* (Bombe form) (*Ann. trop. Med. Parasit.*, 54, p. 147).
- GILLET (J.D.), 1957. — Age analysis in the biting-cycle of the mosquito *Taeniorhynchus (Mansonioides) africanus* Theobald, based on the presence of parasitic mites (*Ann. trop. Med. Parasit.*, 51, p. 151).
- GILLIES (M.T.), 1954. — The recognition of age-groups within populations of *Anopheles gambiae* by the pregravid rate and the sporozoite rate (*Ann. trop. Med. Parasit.*, 48, p. 58).
- 1955. — The pregravid phase of ovarian development in *Anopheles funestus* (*Ann. trop. Med. Parasit.*, 49, p. 320).
- 1956. — A new character for the recognition of nulliparous females of *Anopheles gambiae* (*Bull. Org. mond. Santé*, 15, p. 451).
- 1957. — Age-groups and the biting-cycle in *Anopheles gambiae*. A preliminary investigation (*Bull. ent. Res.*, 48, p. 553).
- 1958. — A modified technique for the age-grading of populations of *Anopheles gambiae* (*Ann. trop. Med. Parasit.*, 52, p. 261).
- GORDON (R.M.), HICKS (E.P.), DAVEY (T.H.) et WATSON (M.), 1932. — A study of house-haunting *Culicidae* occurring in Freetown, Sierra Leone, and of the part played by them in the transmission of certain tropical diseases together with observations of the relationship of anophelines to housing and the effect of antilarval measures in Freetown (*Ann. trop. Med. Parasit.*, 26, p. 273).
- GRJEBINE (A.), 1952. — Enquêtes entomologiques à Bouar. 27 février-30 avril (*Bull. Inst. Et. centrafr.*, 4, p. 151).

- HADDOW (A.J.) et GILLETT (J.D.), 1958. — Laboratory observations on the oviposition-cycle in the mosquito *Taeniorhynchus (Coquillettidia) fuscopenatus* Theobald (*Ann. trop. Med. Parasit.*, 52, p. 320).
- HAMON (J.), ADAM (J.P.) et GRJEBINE (A.), 1956. — Observations sur la répartition et le comportement des anophèles de l'Afrique Equatoriale Française, du Cameroun et de l'Afrique occidentale (*Bull. Org. mond. Santé*, 15, p. 549).
- HAMON (J.), CHAUVET (G.) et THELIN (L.), 1959. — Observations sur les méthodes d'évaluation de l'âge physiologique des femelles d'anophèles. WHO/Mal/246, Genève.
- HAMON (J.), CHOUMARA (R.), ADAM (J.P.) et BAILLY (H.), 1959. — Le paludisme dans la zone pilote de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta. 2^e partie. Enquêtes entomologiques. Cahiers de l'O.R.S.T.O.M., Paris, 1, p. 37.
- LEBIED (B.), 1959. — Détermination de l'âge physiologique des diptères. Nouvelle méthode basée sur la recherche des vestiges du processus de l'ovulation (*Riv. Parasitologia*, 20, p. 91).
- LEWIS (D.J.), 1956. — Biting times of parous and nulliparous *Simulium damnosum* (*Nature*, 178, p. 98).
- 1957. — Aspects of the structure, biology and study of *Simulium damnosum* (*Ann. trop. Med. Parasit.*, 51, p. 340).
- 1958. — The recognition of nulliparous and parous *Anopheles gambiae* by examining the ovarioles (*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 52, p. 456).
- 1960. — Observations on *Simulium damnosum* in the Southern Cameroons and Liberia (*Ann. trop. Med. Parasit.*, 54, p. 208).
- MACAN (T.T.), 1950. — The anopheline mosquitoes of Iraq and North Persia (*Mem. Lond. Sch. trop. Med. Hyg.*, 7, p. 109).
- MACDONALD (G.), 1952 a. — The analysis of the sporozoite rate (*Trop. Dis. Bull.*, 49, p. 569).
- 1952 b. — The analysis of equilibrium in malaria (*Trop. Dis. Bull.*, 49, p. 813).
- 1956. — Theory of eradication of malaria (*Bull. Org. mond. Santé*, 15, p. 369).
- 1957. — The epidemiology and control of malaria. Oxford University Press, London.
- MARKOVITCH (N.Y.), 1951. — Fertility of *A. bifurcatus* and its changes under the influence of environmental conditions (*Med. Parazit. (Mosk.)*, 20, p. 50).
- MER (G.G.), 1932. — The determination of the age of *Anopheles* by differences in the size of the common oviduct (*Bull. ent. Res.*, 23, p. 563).
- 1936. — Experimental study on the development of the ovary in *A. elutus* Edw. (*Dipt. Culic.*) (*Bull. ent. Res.*, 27, p. 351).
- METSSELAAR (D.), 1957. — A pilot project of residual insecticide spraying in Netherlands New Guinea, contribution to our knowledge of holoendemic malaria. Utrecht, 128 p.
- MOUCHET (J.) et GARIOU (J.), 1957. — Cycle gonotrophique d'*Anopheles moucheti* Evans 1925, dans une localité du Sud Cameroun (*Bull. Soc. Path. exot.*, 50, p. 676).

- PERRY (R.L.), 1912. — Malaria in the Jeypore Hill tract and adjoining coastland (*Paludism*, 5, p. 32).
- PETERS (W.) et STANDFAST (H.A.), 1960. — Studies on the epidemiology of malaria in New Guinea. Part. II. Holoendemic malaria. The entomological picture (*Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 54, p. 249).
- POLOVODOVA (V.P.), 1941. — Age-changes in ovaries of *Anopheles* and methods of determination of age composition in mosquito populations (*Med. Parazit. (Mosk.)*, 10, p. 387).
- 1947. — Ages changes in the female reproductive system of *Anopheles* and age composition of mosquito population. Thèse (Cand. Biol. Soc.), Rostov sur le Don.
- 1949. — Determination of the physiological age of female *Anopheles* (*Med. Parazit. (Mosk.)*, 18, p. 352).
- ROZEBOOM (L.E.), 1936. — The life cycle of laboratory-bred *Anopheles albimanus* Wiedemann (*Ann. ent. Soc. America*, 29, p. 480).
- STONE (A.), KNIGHT (K.L.) et STARCKE (H.), 1959. — A synoptic catalog of the mosquitoes of the world. Publ. ent. Soc. America, 358 p.
- VAN THIEL (P.H.), 1953. — Method and significance of the determination of age of female anophelines for basic entomological research in DDT house spraying (*Doc. Med. Geogr. trop.*, 5, p. 289).
- VAUCEL (M.), ROUBAUD (E.) et GALLIARD (H.), 1954. — Terminologie du paludisme. Rapport d'un comité de rédaction nommé par l'Organisation mondiale de la Santé. O.M.S., Série de monographies, 25, p. 50.
- VINCKE (I. H.), 1946. — Note sur la biologie des anophèles d'Elisabethville et environs (*Ann. Soc. belge Méd. trop.*, 26, p. 385).
- WANSON (M.), WOLFS (J.) et LEBIED (B.), 1947. — Comportement de l'*Anopheles (Myzomyia) moucheti* Evans (*Rec. trav. Sci. Méd. Congo belge*, 6, p. 39).
- WIGGLESWORTH (V.B.), 1939. — The principles of Insect physiology. Methuen et Co., London.
- YAGUZHINSKAYA (L.V.), 1945. Malaria vectors in the northern part of the Urgut region in 1943 (*Med. Parazit. (Mosk.)*, 14, p. 47).

O.R.S.T.O.M., Paris.

Laboratoires d'Entomologie médicale

— du Centre Muraz (O.C.C.G.E.), Bobo Dioulasso.

— de l'Institut de Recherche scientifique de Madagascar, Tananarive.

— de l'Institut d'Etudes Centrafricaines, Brazzaville.

E.A. 112

BULLETIN
DE LA
SOCIÉTÉ ENTOMOLOGIQUE DE FRANCE

EXTRAIT

1961 - vol. 66

Les Méthodes d'évaluation de l'âge physiologique des moustiques
(Dipt. Culicidae)
par J. Hamon etc...

S. E. T. O. M.
Collection de Mémoires
17565 ep 1