

Validité d'une méthode chétotaxique de distinction
des larves des espèces *A* et *B* du complexe
Anopheles gambiae Giles à Madagascar

par

G. CHAUVET *, G. DAVIDSON ** et J. DÉJARDIN ***

RÉSUMÉ

Une comparaison des identifications obtenues par la méthode des croisements et une méthode chétotaxique a été effectuée à partir de pontes provenant de tout le territoire. Cette comparaison montre la validité de la soie mésothoracique n° 1 comme caractère de diagnostic d'espèce mais non celle de la soie suturale interne.

SUMMARY

A comparison of the identifications obtained by crossing method and a chetotaxic method carried out dating from batches proceeding from the whole country. This comparison demonstrates validity of the mesothoracic seta n° 1 as mean species diagnostic in Madagascar but not this of the inner sutural seta.

SOMMAIRE

RÉSUMÉ ET SUMMARY.

1. INTRODUCTION.

2. TECHNIQUE.

3. RESULTATS.

3.1 - *Comparaison des résultats obtenus par chacune des méthodes à partir d'une même ponte initiale.*

3.2 - *Comparaison basée sur la répartition géographique des espèces.*

3.3 - *Comparaison basée sur la répartition statistique des déterminations faites.*

4. CONCLUSION.

REMERCIEMENTS.

BIBLIOGRAPHIE.

* Centre ORSTOM, B.P. 434, Tananarive (Madagascar).

** London School of Hygiene and Tropical Medicine - Ross Institute, London (England).

*** Biométricien, S.S.C. ORSTOM, 70-74, route d'Aulnat, 93 - Bondy (France).

1. INTRODUCTION

Dans un article précédent deux des auteurs (CHAUVET et DÉJARDIN, 1968) ont exposé le résultat d'une étude biométrique portant sur douze soies différentes de larves au 4^e stade, appartenant aux espèces *A* et *B* du complexe *Anopheles gambiae* Giles. Pour chacune des espèces le nombre de branches de chaque soie a été relevé sur quatre échantillons expérimentaux. Chacun de ceux-ci correspondait à des conditions de développement différent, de façon à tenir compte d'éventuelles variations de la chétotaxie dues au milieu. D'amples variations chétotaxiques intraspécifiques ont effectivement été notées sur la plupart des soies étudiées. Malgré cela, deux de ces soies se sont révélées être significativement différentes entre les deux espèces. Il s'agissait de la soie mésothoracique n° 1 et de la soie suturale interne (Nomenclature de PURI, 1928). Cependant, il n'était pas possible d'affirmer, malgré l'artifice expérimental, que l'amplitude extrême des variations chétotaxiques susceptibles d'être rencontrées dans la nature, sur l'ensemble du territoire malgache, avait été obtenue. En effet, la répartition des espèces *A* et *B* couvre des aires étendues et diverses alors que les souches *A* et *B* utilisées avaient dans chaque cas une seule origine.

Ces données de base ont donc été appliquées à des souches provenant de diverses stations de récolte réparties sur toute l'île. Les résultats ont alors été confrontés à ceux obtenus par une seconde méthode d'identification dont les conclusions sont certaines.

Lorsque cette étude a débuté, la seule méthode incontestable d'identification était la méthode dite « des croisements ». Celle-ci avait été appliquée avec succès par différents auteurs et tout particulièrement par l'un d'entre nous (DAVIDSON, 1956, 1962 et 1964 a) et par PATERSON (1963). Ce sont d'ailleurs leurs études qui ont amené à reconnaître chez *A. gambiae* (*s. l.*) cinq formes distinctes, considérées peu de temps après comme des espèces vraies (PATERSON, 1963 et DAVIDSON, 1964 b).

Outre la nécessité d'appliquer cette technique à titre de vérification des données obtenues par la méthode chétotaxique, son utilisation nous assurait qu'il n'existait pas à Madagascar la troisième espèce d'eau douce *C*.

2. TECHNIQUE

Des missions entomologiques furent effectuées sur tout le territoire de 1964 à 1968. De station en station, des pontes individuelles de femelles d'*A. gambiae* (*s. l.*) furent recueillies puis envoyées par les moyens de transport les plus rapides à Tananarive, sous conditionnement spécial. Chaque ponte était déposée sur des rondelles de papier filtre humide, contenue dans une petite boîte cartonnée fermée par un couvercle. Ces boîtes étaient ensuite mises dans une caissette en contre-plaqué, doublée de matière isotherme, hermétiquement close. Ce conditionnement permet de conserver des œufs viables pendant cinq jours en moyenne. Il donne de meilleurs résultats que le procédé utilisant des sachets en polyéthylène, mais il est plus onéreux. Arrivées au laboratoire, les pontes étaient en principe séparées en deux parties égales. Sur l'une des parties, l'espèce devait être déterminée par la méthode chétotaxique, sur l'autre par la méthode des croisements.

Cette dernière représentait suffisamment de difficultés techniques, en particulier celles de maintenir des souches de référence et de pratiquer d'une façon routinière des inséminations forcées, pour que son application se fasse à Londres, par l'un d'entre nous (G. D.).

En fonction de cette décision, les pontes reçues à Tananarive étaient utilisées de deux façons différentes, suivant qu'elles pouvaient parvenir à Londres en bon état de viabilité ou non. Si les circonstances étaient favorables, ces pontes étaient effectivement partagées en deux parties et l'une de celles-ci réexpédiée ; sinon elles étaient

mises en élevage en totalité au laboratoire de Tananarive. En principe un quota d'une trentaine de pontes entières ou fractionnées pouvait être envoyé mensuellement. Lorsque ce contingent n'était pas utilisé par des demi-pontes, des pontes entières étaient également réexpédiées au laboratoire londonien.

3. RÉSULTATS

3.1. Comparaison des résultats obtenus par chacune des méthodes à partir d'une même ponte initiale.

Un total de 142 pontes a été partagé. A partir de cet échantillonnage, 87 déterminations ont été réalisées à Londres par la méthode des croisements et 56 par la méthode chétotaxique à Tananarive. Mais, en définitive, il n'y a eu que 33 doubles déterminations, correspondant donc à la même ponte initiale. La plus faible proportion de succès obtenus par la méthode chétotaxique (39,4 % de déterminations contre 61,3 %) est due à ce que la diminution du nombre d'œufs, conséquence du partage, réduit les possibilités de la méthode basée sur l'analyse statistique où la taille de l'échantillon est le facteur primordial.

Les résultats obtenus par les deux méthodes sont identiques, si l'on ne considère dans la méthode chétotaxique que le résultat donné par l'étude de la soie mésothoracique n° 1 et si l'on s'en tient aux limites fixées par l'étude statistique initiale (cf. p. 95, *op. cit.*). En effet, comme celle-ci l'avait théoriquement prévue, les zones du graphique 6 dénommées « plutôt A » ou « plutôt B », traduites dans le texte par « A » ou « B », correspondent à des risques plus grands de détermination erronée. Une détermination que nous nous sommes *risqués* à faire à partir d'un point représentatif situé dans ces zones, a été en contradiction avec celle obtenue par la méthode des croisements : il s'agit d'une détermination portant sur un échantillon de taille $n = 14$.

TABLEAU I

Déterminations chétotaxiques et génétiques des espèces A et B

En marge, les déterminations fournies par la méthode chétotaxique, dans le corps du tableau, les déterminations génétiques accompagnées du nombre de cas, totalisés en marge pour chaque espèce.

		Soie mésothoracique n° 1					TOTAL
		A	« A »	B	« B »	non décision	
Soie suturale interne	A	A : 10	A : 1	B : 2	A : 1	B : 1	A : 12 B : 3
	B	A : 1		B : 16			A : 1 B : 16
	non décision						
	inutilisable			B : 1			B : 1
Total		A : 11	A : 1	B : 19	A : 1	B : 1	A : 13 B : 20

correspondant à un risque primitivement calculé de 20 %. Pour un autre cas, la détermination n'a pu être faite, la moyenne observée étant juste égale à la valeur limite séparant les deux domaines « A » et « B ».

Quant à la soie suturale interne elle a permis 32 déterminations, un échantillon de taille $n=12$ n'ayant pu être utilisé étant donné son trop faible effectif. Dans quatre cas, elle a fourni un résultat opposé à celui de la méthode des croisements, soit 12,5 % de déterminations erronées ; trois de ces quatre résultats étaient en opposition avec la détermination obtenue de la soie mésothoracique n° 1 (la quatrième correspondait à la non-décision par la soie mésothoracique).

Le tableau I résume l'ensemble des résultats.

Parmi les quatre déterminations erronées fournies par la soie suturale interne, trois sont sans ambiguïté comme le montre le tableau ci-dessous :

Taille de l'échantillon	Nombre de larves porteuses de soies à deux branches	
	observé	limite calculé
32	12	9 (1)
15	7	4 (1)
19	13	5 (1)
52	10	10 (2)

(1) Détermination A erronée.

(2) Détermination B erronée.

La proportion observée, 12,5 %, de déterminations fausses, comparée à la proportion théorique admise, 5 %, se trouve juste à la limite de signification. La soie suturale interne est donc actuellement abandonnée. La soie mésothoracique n° 1 fournit des résultats conformes à ceux que nous attendions.

3.2. Comparaison basée sur la répartition géographique des espèces.

Nous avons effectué 297 déterminations, intéressant 54 stations, par la méthode des croisements et 946 déterminations, concernant 135 stations, par la méthode chétotaxique.

Grâce aux déterminations du Ross Institute, il apparaissait que certaines régions ne possédaient qu'une seule espèce. Ainsi pour les huit stations de la région des plateaux du centre correspondant à 70 déterminations, seule l'espèce B était reconnue. La méthode chétotaxique donnait des résultats absolument concordants à partir de 148 déterminations concernant 22 stations.

De même, les zones de sympatrie à espèces A et B découvertes par l'une des méthodes ont été quelque temps plus tard confirmées par la seconde, qu'il s'agisse de régions aussi différentes que celles de l'Est, du Nord ou du Nord-Ouest de l'île.

La validité de la méthode est également apparue d'une façon assez spectaculaire dans les circonstances suivantes : il semblait que seule l'espèce B soit inféodée aux Plateaux (cf. *sup.*). Or, dans une station située au S.-E. de Tananarive, nous avons déterminé contre toute attente, étant donné les résultats antérieurs, 5 femelles d'espèce A et 25 femelles d'espèce B par la soie mésothoracique n° 1. Un échantillonnage de cette population immédiatement envoyé à Londres montrait que, effectivement, l'espèce A s'y trouvait (1 A pour 3 B). De même nous avons mis en évidence, par étude chétotaxique, l'espèce B (3 B pour 9 A) dans une station considérée jusqu'à maintenant comme une station à espèce A. Le même processus de vérification confirmait bientôt la réalité de cette présence (1 B pour 3 A).

3.3. Comparaison basée sur la répartition statistique des déterminations faites.

Sur les 946 déterminations faites, 33 ont été contrôlées comme nous l'avons vu, par la méthode génétique. Il est bien évident que les 913 autres apportent au point de vue validité de la méthode beaucoup moins d'information que les précédentes puisque les erreurs ne sont pas détectées.

Il est toutefois possible d'examiner l'identité des deux séries en ce qui concerne les déterminations faites par chacune des soies en n'utilisant que la partie supérieure gauche (843 déterminations) du tableau II, c'est-à-dire la fraction des échantillons qui ont permis d'affecter une ponte à l'une des espèces, autrement dit pour lesquels une décision a été prise.

TABLEAU II

Répartition totale des déterminations chétotaxiques non contrôlées

	Soie mésothoracique n° 1						Total
	A	« A »	B	« B »	non décision		
Soie suturale interne	A	278	47	117	43	6	491
	B	34	5	305	14	3	361
	non décision	7	1	15	—	3	26
	Total utilisable	319	53	437	57	12	878
	Inutilisables	6	2	23	4	—	35
Total		325	55	460	61	12	913

Nous arrivons ainsi par totalisation aux tableaux III a et III b qui ne détectent aucune différence, ni pour la soie suturale interne (χ^2 (corrigé) = 1,397 à 1 d. d. l., non significatif), ni pour la soie mésothoracique n° 1 (χ^2 (corrigé) = 0,095 à 1 d. d. l., non significatif).

TABLEAU III

Comparaison des déterminations contrôlées et non contrôlées pour chacune des soies utilisées.

	Contrôlées	Non contrôlées		Contrôlées	Non contrôlées
A	14	485	A	12	364
B	17	358	B	19	479

a) Soie suturale interne

b) Soie mésothoracique n° 1

Le détail des doubles déterminations ne fait pas ressortir, lui non plus, de divergence [tableau IV — $\chi^2 = 3,068$ à 3 d. d. l. (1) non significatif].

(1) Ce χ^2 est quelque peu sujet à caution étant donné la faiblesse d'un effectif calculé, mais sa valeur observée est si proche de sa valeur moyenne que la conclusion peut, semble-t-il, être acceptée.

TABLEAU IV

Détail des doubles déterminations contrôlées et non contrôlées

Suturale interne	Mésothoracique n° 1	Contrôlées	Non contrôlées
A	A et « A »	11	325
A	B et « B »	3	160
B	A et « A »	1	39
B	B et « B »	16	319

Il résulte de ces comparaisons que l'ensemble des échantillons contrôlés est une bonne image du total à qui nous pouvons attribuer les mêmes caractéristiques, en particulier une proportion trop élevée d'erreurs de détermination faites par la soie suturale interne. Si tel n'était pas le cas d'ailleurs, les discordances de déterminations (A, B et « B » et B, A et « A ») devraient être en nombre égal et le tableau V symétrique par rapport à sa diagonale principale.

TABLEAU V

Répartition des déterminations chétotaxiques décidées et non contrôlées

		Soie mésothoracique n° 1		Total
		A et « A »	B et « B »	
Soie suturale interne	A	325	160	485
	B	39	319	358
Total		364	479	843

Numériquement l'égalité est loin d'être réalisée ; cette constatation est confirmée par le test de symétrie de ce tableau : χ^2 (corrigé) = 72,4 à 1 d. d. l., significatif. Le même test ne peut être appliqué au tableau des déterminations contrôlées (effectifs trop faibles) mais la structure est la même (en gros 3 à 4 fois plus de A, B et « B » que de B, A et « A »). On retrouve d'ailleurs cette disproportion, plus ou moins marquée, dans chacune des grandes régions géographiques comme le montre le tableau VI.

Il semble donc bien, en définitive, que pour l'ensemble des régions, les déterminations faites par utilisation de la soie suturale interne ne présentent pas de garanties suffisantes alors qu'une plus grande confiance puisse être accordée à la soie mésothoracique n° 1.

Un problème reste avec cette dernière soie, celle qui en fin de compte a été effectivement utilisée : c'est celui de la taille d'échantillon. Primitivement la taille de $n = 50$ avait été calculée comme limite permettant une bonne détermination : c'est là une taille déjà grande pour la pratique et une exploration expérimentale de l'influence de la taille de l'échantillon a été tentée par recherche d'une taille à partir de laquelle la détermination faite était identique à la détermination définitive.

Nous avons tout d'abord tenté d'estimer la proportion de mauvaises déterminations entraînée par de tout petits échantillons ; partant de 553 échantillons de tail-

METHODE CHETOTAXIQUE DE DISTINCTION DES LARVES DU COMPLEXE *AN. GAMBIAE*

TABLEAU VI

Répartition, région par région, des déterminations chétotaxiques décidées et non contrôlées

Région	Soie suturale interne	Soie mésothoracique n° 1		Total
		A et « A »	B et « B »	
Hauts Plateaux	A	1	21	22
	B	7	79	86
	Total	8	100	108
Côte Orientale	A	250	67	317
	B	17	34	51
	Total	267	101	368
Côte Occidentale	A	62	57	119
	B	14	157	171
	Total	76	214	290
Sambirano	A	6	12	18
	B	1	19	20
	Total	7	31	38
Région Sud	A	—	—	—
	B	—	8	8
	Total	—	8	8
Région Nord	A	6	3	9
	B	—	22	22
	Total	6	25	31

les variées, nous avons tiré au sort 10 individus (lames) dans chaque échantillon et procédé à la détermination à partir de sous-échantillon. Les résultats de ces observations sont fournies dans le tableau VII.

TABLEAU VII

Détermination sur l'échantillon complet	Détermination sur le sous-échantillon de taille 10		Total
	A et « A »	B et « B »	
A et « A »	195	20	215
B et « B »	25	313	338

Ce tableau est symétrique par rapport à sa diagonale principale (χ^2 (corrigé) = 0,356 à 1 d. d. l., non significatif) : les discordances sont donc également réparties et leur proportion est de 45/553, soit 8,1 %, ce qui est élevé.

Nous avons ensuite, toujours par tirage au sort, augmenté la taille du sous-échantillon à 15, 20 et 25 lames. Les proportions de discordances ont évolué de la façon suivante :

- pour 15 lames 33/553, soit 6,0 %,
- pour 20 lames 30/553, soit 5,4 %,
- pour 25 lames 20/553, soit 3,6 %.

Il faut remarquer que 19 des 45 déterminations initiales, soit 3,4 % du total, ont exigé, pour être concordantes, l'utilisation de la quasi-totalité de l'échantillon. On peut penser qu'il s'agit là vraisemblablement d'erreurs de détermination sur l'échantillon complet, amenées par la présence de mesures extrêmes qui modifient la conclusion sur l'ensemble. Si cette hypothèse est exacte une détermination douteuse peut aisément être contrôlée par échantillonnage aléatoire dans les lames disponibles et, si un doute subsiste encore, soumise au contrôle biologique.

Il semble donc, au vu de ces résultats, qu'au-delà de la taille $n = 25$ la conclusion définitive ne soit pratiquement plus modifiée.

Pour vérifier cette conclusion nous avons, pour 814 échantillons non contrôlés, établi la distribution des « A » et des « B » en fonction de la taille d'échantillon. Ces distributions figurent au tableau VIII.

TABLEAU VIII

Déterminations « A » et « B » en fonction de la taille d'échantillon

Taille d'échantillon	« A »	« B »	Ensemble
10-15	27	15	42
16-20	12	19	31
21-25	4	9	13
26-30	6	3	9
31-35		5	5
36-40		2	2
41-45		1	1
46-50			
Total	49	54	103
Total A et « A » : 355		Total B et « B » : 459	

Nous constatons sur ce tableau que les tailles d'échantillon supérieures à 25 ne nous conduisent qu'à peu de déterminations douteuses :

- $6/355 = 1,7$ % pour A
- $11/459 = 2,4$ % pour B
- $17/814 = 2,1$ % dans l'ensemble.

Nous pouvons donc dire, compte tenu des deux observations qui ont été faites, que la taille minimale peut sans gros inconvénients être ramenée à $n = 25$. Cette taille est praticable et les proportions de doutes (2,1 %) et de non-décision (1,3 %) sont telles que ces cas puissent aisément être soumis à la détermination biologique.

Remarquons pour terminer que, d'après les calculs de l'étude biométrique (cf. p. 96 *op. cit.*), à la taille $n = 25$ correspond un risque de 13 % alors que nous venons de constater 2 ou 3 % ; en ajoutant à ceci le fait que les non-décisions sont en proportion de 1,3 % (12/913) au lieu de 5 % attendu (et que ces deux proportions diffè-

rent significativement), nous pouvons valablement penser avoir atteint par notre artifice expérimental les limites de la variabilité intraspécifique naturelle pour la soie mésothoracique n° 1. Pour la soie suturale interne, le contraire paraît plus plausible étant donné le relatif insuccès que nous avons obtenu par son utilisation.

4. CONCLUSION *

L'application de la méthode chétotaxique à l'ensemble des souches récoltées sur tout le territoire de Madagascar et la vérification des résultats obtenus par la méthode des croisements aboutissent aux conclusions suivantes :

— la soie suturale interne est à abandonner, tout au moins dans le cadre des limites initialement proposées,

— la soie mésothoracique n° 1 nous semble en revanche permettre un diagnostic sûr des espèces *A* et *B* à condition d'utiliser des tailles d'échantillon au moins égales à 25.

Les comparaisons effectuées à partir d'individus provenant d'une même ponte sont incontestables. D'autres, fondées sur l'étude d'un échantillonnage de la population du complexe à l'échelle de la station ou d'une unité écologique régionale, n'ont à proprement parler qu'une valeur indicative et complémentaire. Elles n'en gardent pas moins une réelle valeur puisque, d'une part, elles ne révèlent aucune déformation systématique par rapport à l'échantillonnage contrôlé par double détermination et que, d'autre part, elles aboutissent toujours à une conclusion concordante en donnant une image identique de la distribution des espèces pour un nombre important de stations.

Il serait intéressant de savoir si cette méthode est applicable hors de Madagascar. Expérimentée en Afrique de l'Ouest, Haute-Volta, sans considération, semble-t-il, des limites de tolérance, fonctions de la taille de l'échantillonnage, elle n'aurait pas donné les résultats escomptés (Coz, 1967). Il resterait, dans tous les cas, à en faire l'essai dans la partie orientale de la Région éthiopienne, où les données sont peut-être différentes. Quoi qu'il en soit, on peut concevoir qu'il y ait eu une évolution particulière des espèces à Madagascar, en fonction de l'insularité du territoire qui remonte à une époque postérieure à l'apparition des moustiques. Nous n'en prendrions comme présomption que le grand nombre d'espèces endémiques anophéliennes malgaches (50 % des espèces).

En tout état de cause, cette méthode nous a permis de faire progresser les études sur la répartition, les variations saisonnières et les facteurs de distribution des espèces *A* et *B* beaucoup plus rapidement que ne nous l'aurait permis la méthode lente et difficile des croisements, méthode par ailleurs indispensable.

REMERCIEMENTS.

Nos remerciements vont d'abord à M. le Docteur F. ESTRADE, Directeur du Service de Lutte contre les Grandes Endémies (S.L.G.E.) de la République malgache, qui a mis à notre disposition des Assistants d'Hygiène de grande valeur et d'une conscience professionnelle tout à fait remarquable. Ils vont aux Chefs de Missions entomologiques et en particulier à E. RAJAONARIVELO (S.L.G.E.) et J. ANDRIANABIBY qui ont parcouru toute l'île dans des conditions souvent très difficiles, utilisant les moyens de transports les plus variés, allant de l'avion à la bicyclette et de la voiture au char à bœufs. Nous remercions aussi M. C. RAVAONJANAHARY (S.L.G.E.) qui a également dirigé certaines de ces missions de prospection mais qui fut surtout un microscopiste de premier

* A titre de « Remarque », nous signalons que chez les larves d'*A. merus*, la soie mésothoracique n° 1 est identique à celle de l'espèce *A*.

ordre. Il secondait dans ce travail M. G. VERVENT, technicien de l'O.R.S.T.O.M. Celui-ci a collationné en plus les différents résultats de cette étude avec beaucoup d'ordre et de rigueur. M^{me} D. SCHWARTZ a regroupé les observations, exécuté et vérifié avec soin les calculs numériques aux Services Scientifiques Centraux de l'O.R.S.T.O.M. Qu'ils reçoivent ici tous nos remerciements.

BIBLIOGRAPHIE

- CHAUVET (G.) et DÉJARDIN (J.), 1968. — Caractères chétotaxiques de distinction entre larves (stade IV) de l'espèce A et de l'espèce B du complexe *Anopheles gambiae* à Madagascar. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd.*, VI (1), 69-101.
- COZ (J.) et BRENGUES (J.), 1967. — Le complexe *Anopheles gambiae* et l'épidémiologie du paludisme et de la filariose de Bancroft en Afrique de l'Ouest. *Méd. Afr. noire*, 6, 301-303.
- DAVIDSON (G.), 1956. — Insecticide resistance in *Anopheles gambiae* Giles, a case of simple mendelian inheritance. *Nature (Lond.)*, 178, 863-864.
- DAVIDSON (G.), 1962. — *Anopheles gambiae* complex. *Nature (Lond.)*, 196, 907.
- DAVIDSON (G.), 1964 a. — *Anopheles gambiae*, a complex of species. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 31, 625-634.
- DAVIDSON (G.), 1964 b. — The five mating-types in the *Anopheles gambiae* complex. *Riv. Malariol.*, 43, 167-183.
- PATERSON (H. E.), 1963. — The species, species control and antimalarial spraying campaigns. Implications of recent work on the *Anopheles gambiae* complex. *S. Afr. J. med. Sci.*, 28, 33-34.
- PURI (I. M.), 1928. — The relationship of certain morphological characters of anopheline larvae to the classification of Indian anopheline mosquitoes. *Indian. J. med. Res.*, 16, 519-528.