

Estimation de l'effectif des populations larvaires d'*Aedes (O.) cataphylla* Dyar, 1916 (*Diptera-Culicidae*). I. - Méthode de "capture - marquage - recapture".

B. PAPIEROK

H. CROSET

J.-A. RIOUX

Laboratoire d'Ecologie Médicale
Faculté de Médecine, 34000 Montpellier

RÉSUMÉ.

La méthode « capture-marquage-recapture », utilisant le phosphore radioactif ^{32}P , est appliquée à l'établissement des effectifs absolus des populations larvaires d'*Aedes (O.) cataphylla* Dyar, 1916. Les auteurs réalisent cette étude dans une mare temporaire de l'étage subalpin des Pyrénées-Orientales. Dès la fonte des neiges, ce gîte héberge un nombre très élevé de larves qui évoluent de manière synchrone en quelques semaines. De telles conditions permettent de mettre au point la méthode et d'en apprécier les performances. Les larves capturées au filet ou à la louche sont marquées et comptées. Le lâcher est réalisé de manière « orientée » (lâcher unique corrigé), en introduisant dans chaque unité de surface un nombre de larves marquées proportionnel à la densité observée. La recapture s'effectue 24 h après. Le pourcentage de larves marquées est obtenu par passage individuel de cent larves au compteur de Geiger-Müller. La méthode appliquée de 1968 à 1971 a permis d'apprécier les fluctuations d'effectifs de populations dans le gîte considéré.

ABSTRACT.

The author uses the « capture-recapture-method » to number the larval population of *Aedes (O.) cataphylla* Dyar, 1916 at the sub-alpine stage in Pyrénées-Orientales (France). A temporary pool of moraine which shelters a very high number of larvae as soon as the snow melts allows them to put the finishing

touch to this method and to appreciate its performances. The larvae are captured with a net or with a ladle and marked by radio-active phosphorus ^{32}P . The counting is worked out by weighings. The release is led so that the number of marked larvae is proportional to the observed density. The recapture is made after 24 h. The marked larvae percentage is obtained after a separate examination of one hundred larvae samples with a Geiger-Müller counter. Realized from 1968 to 1971 in the same habitat, the capture-recapture method permitted to note important fluctuations in the size of the larval population.

Dans les domaines médical, vétérinaire et agricole, le développement des recherches à caractère écologique rend chaque jour plus nécessaire la mise au point de méthodes de dénombrement des populations naturelles. Il en est ainsi dans les études de dynamique des populations et, sur un plan plus pratique, dans les enquêtes épidémiologiques portant sur les maladies transmises par les Arthropodes, et plus encore dans la mise en place et la surveillance des opérations de lutte.

Le dénombrement des populations larvaires de Diptères *Culicidae* fait appel aussi bien aux méthodes d'estimation absolue que relative (1). Les méthodes

(1) Classiquement, on peut évaluer la taille d'une population animale, soit d'une manière absolue, soit d'une manière relative. La densité absolue représente la totalité des individus occupant une aire donnée. La densité relative n'en représente qu'une fraction, la population totale demeurant inconnue (ANDREWARTHA, 1961).

relatives sont très utilisées, en particulier dans les études à caractère extensif (KNIGHT, 1964). Toutefois, certains types de recherches, nécessitant des estimations précises, doivent s'appuyer sur les méthodes d'estimation absolue, à savoir : méthodes « d'échantillonnage », méthode dite de « l'effort de capture constant », et méthode de « capture - marquage - recapture ». L'échantillonnage repose sur le prélèvement d'un certain volume d'eau (CAMBOURNAC, 1939 ; BATES, 1941 ; HORSFALL, 1946 ; WELCH et JAMES, 1960 ; MINAR, 1968 ; HAGSTRUM, 1971). La méthode dite de « l'effort de capture constant » a été surtout utilisée par WADA (1962, *a* et *b*). La dernière méthode, dite de « capture-marquage-recapture », s'appuie sur l'estimation du taux de dilution obtenu après introduction dans la population originelle d'individus marqués et relâchés. Elle n'a été appliquée que rarement à l'étude des populations naturelles de Culiçides. Mise au point initialement au Canada (BALDWIN, JAMES et WELCH, 1955 ; WELCH, 1960), elle a été reprise par la suite en Europe (RIOUX, CROSET, SUQUET et TOUR, 1968 ; SERVICE, 1968). Dans tous les cas, les travaux ont été réalisés sur des espèces du genre *Aedes*, dont les caractéristiques biologiques (œufs en diapause, éclosions synchrones lors de la mise en eau, espèces univoltines, densités élevées) et écologiques (biotopes larvaires de taille moyenne) conviennent particulièrement aux essais de dénombrement.

Nous avons repris la méthode de « capture-marquage-recapture » dans le cadre d'une étude plus globale sur les Culiçides de l'étage subalpin des Pyrénées-Orientales. L'accent a été mis particulièrement sur les aspects méthodologiques et les problèmes statistiques soulevés par l'analyse des résultats.

MATERIEL ET METHODES.

Cinq représentants du genre *Aedes* évoluent aux étages subalpin et alpin des Pyrénées-Orientales (Massif du Capcir et Cerdagne, entre 1.500 et 2.300 m) : *Aedes cataphylla* Dyar, 1916, *A. communis* (DE GEER, 1776), *A. excrucians* (WALKER, 1856), *A. pullatus* (COQUILLETT, 1904) et *A. punctator* (KIRBY, 1837). Les œufs, en état de diapause dans la litière végétale des gîtes, éclosent dès la fonte des neiges. Les larves évoluent en un à deux mois. Les cinq espèces font preuve d'une certaine indépendance en ce qui concerne leurs préférences écologiques : *A. cataphylla*, de loin l'espèce la plus représentée, domine au printemps dans les prairies à *Nardus stricta* L. et *Carex vesicaria* L. (RIOUX et coll., *op. cit.* ; GILOT, 1968).

Le gîte larvaire pris en considération dans cette étude (route de la Bouillouse, à 10 km de Mont-Louis) résulte de la mise en eau d'une petite dépression d'origine morainique. A son maximum de remplissage, d'avril

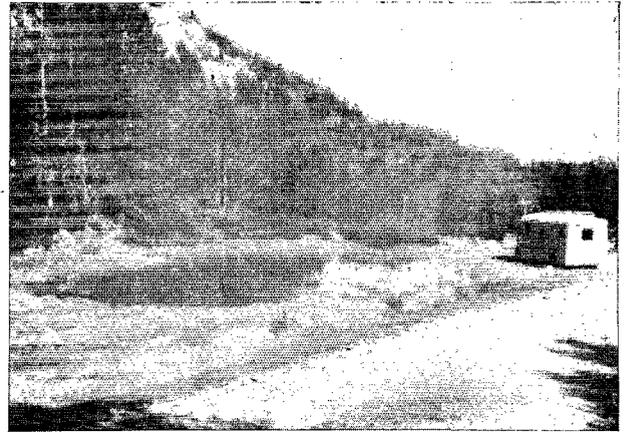


FIG. 1. — Mare n° 10 (Bouillouse, alt. 1.750 m) : gîte à *Aedes cataphylla* dominant. La station est préparée pour l'échantillonnage : les piquets sont placés à trois mètres de distance.

à mai, le gîte mesure 25 m dans sa plus grande longueur, 16 m dans sa plus grande largeur ; la profondeur ne dépassant pas 27 cm ; le volume d'eau atteint alors 45 m³ (fig. 1). De la périphérie vers le centre, les ceintures de végétation s'ordonnent de la façon suivante (coupe S.W.N.E., fig. 2) :

- 1) forêt de *Pinus montana uncinata* Ram. ;
- 2) lisière à *Juniperus communis* L. ;
- 3) prairie de bordure à *Nardus stricta* L. ;
- 4) ceinture à *Carex fusca* All. ;
- 5) bas-fond à *Carex vesicaria* L.

Dans ce gîte, le peuplement culicidien peut être considéré comme unispécifique (population au sens strict) ; *Aedes cataphylla* domine en effet à plus de 90 % (91 % en 1969 ; 92 % en 1970). Cette particularité faunistique alliée, tant au synchronisme du développement larvaire qu'à l'exceptionnelle densité larvaire (jusqu'à 100 larves par litre en moyenne), explique le choix d'une telle station pour la mise au point des méthodes de dénombrement.

Le principe de la méthode de « capture-marquage-recapture » est simple. Si l'on capture un nombre *M* d'animaux que l'on marque et que l'on relâche, et si *m* est le nombre d'individus présentant la marque dans un total de *n* capturés la seconde fois, l'estimateur de l'effectif *N* de la population pour une recapture simple est donné par l'indice de Lincoln (1930).

$$N = \frac{M \times n}{m}$$

$$\text{et var } N = \frac{M^2 \times n (n - m)}{m^2}$$

ECHANTILLONNAGE DES POPULATIONS LARVAIRES : METHODES

Si la recapture groupe plusieurs sous-échantillons (k) dans l'expression de N , m est alors le total des individus marqués, n celui des individus capturés dans les k sous-échantillons. Un estimateur à peu près non biaisé de la variance de N est (WELCH, *op. cit.*):

$$\text{var } N = \frac{M^2 \times n^2 (n - m)}{m^3 \times k}$$

Rappelons que la validité des estimations implique nécessairement les conditions suivantes : passivité de la marque sur les exemplaires porteurs, mélange effectif des animaux marqués dans la population et stabilité de la population.

La méthode de dénombrement fondée sur l'utilisation de l'indice de Lincoln comporte une succession d'opérations, à savoir dans l'ordre : la capture, le marquage, le comptage, le lâcher et la recapture.

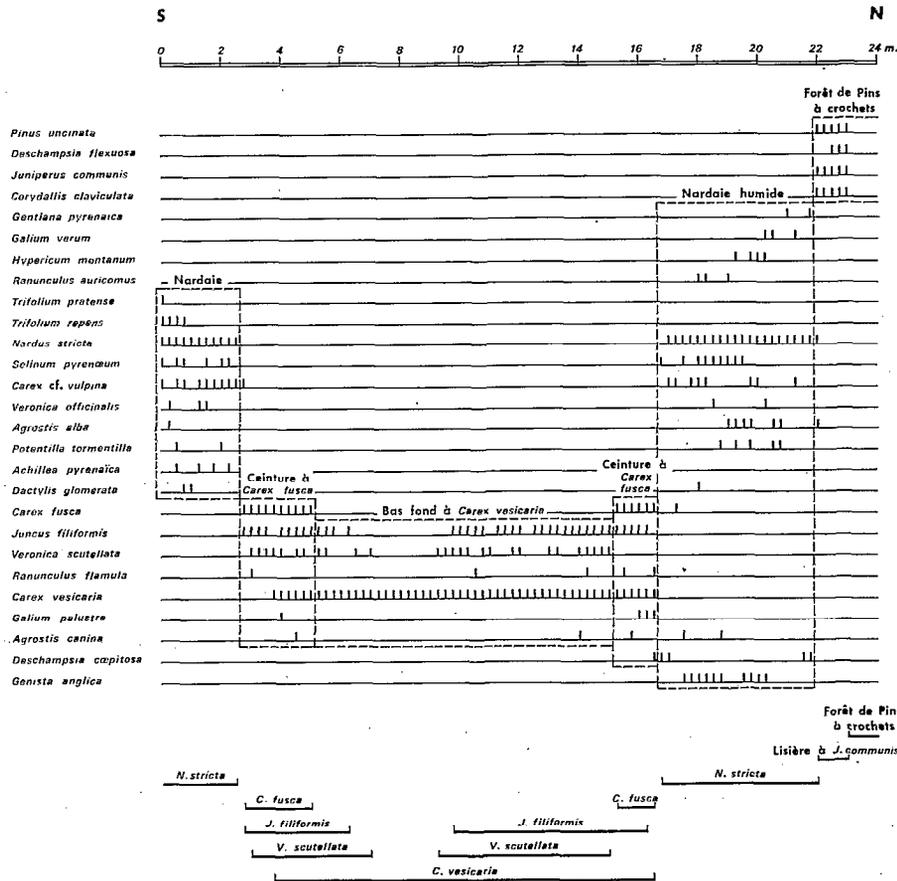


FIG. 2. — Coupe phytocœnotique de la mare n° 10.

Capture.

La capture des larves est réalisée généralement de jour, au filet Langeron. La louche est employée lorsque la densité est très importante: ainsi, un coup de louche (1,5 l) a pu prélever jusqu'à 1.680 larves lors d'une journée fortement ensoleillée. L'opération de capture peut être accélérée grâce à l'utilisation du pouvoir attractif de la lumière: une source lumineuse (lampe à lumière blanche type « Mazda-Mixa » 160 W, lampe à infrarouges) est placée, de nuit, à 0,80 m au-dessus de zones de forte densité larvaire relative (fig 3). La lampe

à rayonnement infrarouge est particulièrement efficace lorsque la température de l'eau du gîte est inférieure à 10° C. En revanche, les lampes à lumière blanche sont très attractives à température plus élevée et si le ciel est couvert. Les larves, attirées par la lumière, se groupent en grand nombre dans la zone éclairée; elles sont récoltées au filet Langeron ou à la louche, et placées dans des plateaux de 35 x 40 cm.

Seul le marquage par substance radioactive ou par substance colorante peut être envisagé avec succès dans le cas des organismes aquatiques de petite taille. En ce qui concerne les larves de Culicides, on préfère de

beaucoup utiliser les isotopes radioactifs. Marqueurs de surface, les colorants disparaissent en effet, lors des mues successives. A l'inverse, les substances radioactives permettent un marquage interne rapide, persistant au cours du développement larvaire, et au-delà chez la nymphe et l'adulte.

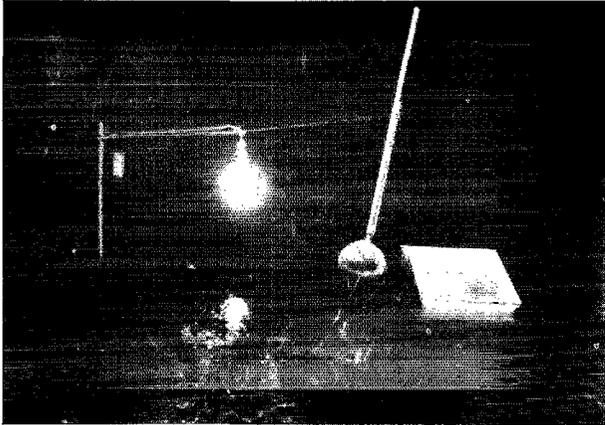


Fig. 3. — Capture de nuit à la lampe Mazda-Mixa 250 VA.

Pour plusieurs raisons, notre choix s'est porté sur le phosphore radioactif ^{32}P : citons entre autres la rapidité d'assimilation par les insectes, la simplicité de détection à l'aide d'un matériel rustique et peu coûteux (compteur Geiger-Müller).

En pratique de terrain, il importe d'évaluer avec précision la concentration en ^{32}P du milieu de marquage, car la radioactivité acquise par la larve en dépend directement. Ainsi, les doses absorbées ne doivent provoquer aucune altération physiologique, tout en permettant de déceler la marque pendant la durée de l'expérience. HASSETT et JENKINS (1949) ont montré que la concentration pour obtenir une radioactivité correcte était létale pour les larves du 1^{er} et 2^e stades. Le marquage ne peut donc être réalisé que sur des larves des 3^e et 4^e stades.

La concentration optimale en phosphore radioactif est de l'ordre des sous-multiples du microcurie par millilitre [0,3 $\mu\text{Ci/ml}$ pour JENKINS (1949) ; 0,2 $\mu\text{Ci/ml}$ pour BUGHER et TAYLOR (1949)]. Par ailleurs, HASSETT et JENKINS (1951) ont montré que la concentration optimale du bain de marquage est celle qui développe une activité de 0,1 μCi par larve et par millilitre. Un tel niveau d'activité n'a pas d'effet nocif sur le développement des individus marqués (ABDEL-MALEK, 1961).

Au laboratoire, les études préliminaires réalisées sur *Aedes detritus* (Hal.) (RIOUX et coll., 1968 ; TOUR, 1969) ont abouti à la même conclusion tout en soulignant l'influence de la température sur la vitesse d'assimilation, ainsi que l'importance de la durée de contact avec le

marqueur. Dans la présente étude, nous avons utilisé le phosphore radioactif à un niveau d'activité spécifique d'environ 0,05 $\mu\text{Ci/ml}$ par millilitre et par larve, le temps de marquage étant de 24 h pour une température voisine de 12° C.

Comptage.

Le comptage des larves est effectué soit directement à la pipette, soit indirectement par pesée. Le premier procédé est certainement le plus simple et le plus précis, mais il devient rapidement astreignant lorsque le niveau de la population nécessite le marquage d'un grand nombre d'individus. C'est pourquoi nous avons mis au point une technique de comptage par pesée qui permet, à partir du poids d'un lot de larves, d'estimer leur nombre avec une précision acceptable.

LE MATÉRIEL COMPREND :

- 1) une balance « Metler » d'une portée de 800 g et d'une sensibilité de 0,05 g ;
- 2) une passoire en acier inoxydable à mailles très fines, de 10 cm de diamètre et de 4 cm de profondeur.

LA TECHNIQUE DE PESÉE EST LA SUIVANTE :

- 1) un récipient contenant environ 600 ml d'eau et dans lequel plonge la passoire est taré ;
- 2) la passoire est alors retirée et égouttée soigneusement au-dessus du récipient (nombre standard de 35 secousses) ;
- 3) un certain nombre de larves sont récoltées à l'aide de la passoire ; celle-ci est alors égouttée sans mouvement jusqu'à ce que 5 secondes au moins séparent 2 gouttes successives (égouttage de 30 à 40 secondes) ;
- 4) la passoire est posée dans le récipient sur la balance ;
- 5) la pesée est effectuée,
- 6) les larves pesées sont transférées dans un plateau contenant de l'eau et nourries légèrement.

Parallèlement à cette mise au point s'impose l'établissement de la relation poids-nombre de larves. Dans ce but des lots, d'effectif connu, sont pesés. Ainsi, en 1970, la pesée de 10 lots de 5.000 larves d'*Aedes cataphylla* (en majorité 3^e stade) donne un poids moyen de 32,21 \pm 1,84 g au niveau 95 % (extrêmes : 28,88 g et 33,86 g). L'opération inverse, c'est-à-dire le comptage de lots préalablement pesés, donne un coefficient de corrélation poids-nombre de 0,9995. Un tel niveau de précision peut être considéré comme acceptable dans les conditions de terrain.

La correspondance poids-nombre doit être évidemment renouvelée à chaque opération de « capture-marquage-recapture », car elle n'est valable que pour une population d'une espèce donnée à un moment précis de son développement, et ce dans des conditions de capture bien déterminées.

Lâcher.

Le retour des larves capturées et marquées dans la population d'origine constitue l'une des étapes les plus délicates de la méthode. En effet, l'application de l'indice de Lincoln nécessite le mélange effectif des animaux marqués parmi les non marqués. Lorsque le pourcentage de recapture est estimé à partir d'un certain nombre de prélèvements réalisés sur l'ensemble de la mare, le mélange correct se traduit par l'homogénéité des pourcentages observés dans chaque échantillon. Or, dans les biotopes ouverts des régions à forte variation nyctémérale, les larves ne sont jamais réparties au hasard ou d'une façon régulière. Ainsi, au même moment, on peut observer des zones de densité élevée jouxtant des zones pratiquement « vides ». Les raisons de cette hétérogénéité sont certainement nombreuses. Il a été montré en particulier que la température agit directement, les larves ayant tendance à se rassembler dans les parties les plus chaudes du biotope (HOCKING, 1953 ; HAUFE, 1957 ; GJULLIN, SAILER, STONE et TRAVIS, 1961). Dans ces conditions, l'expérience prouve que les lâchers « au hasard » ou les lâchers « systématiques », qui ne tiennent pas compte de la répartition larvaire, ne conduisent pas à des pourcentages de recapture homogènes.

En revanche, répondent parfaitement à ces conditions les lâchers « orientés » (PAPIEROK, 1972), qui consistent à relâcher dans chaque unité de surface un nombre de larves marquées proportionnel à la densité observée. Cette densité peut être évaluée soit à partir des données d'un premier lâcher (protocole du « lâcher en deux temps »), soit mieux encore à partir des résultats d'une série de prélèvements à la louche (protocole du « lâcher unique corrigé »). Ce dernier type de lâcher est le plus rapide. En pratique, l'échantillonnage est réalisé à l'intérieur d'une surface de 9 m², délimitée par quatre piquets (fig. 1 et 4) espacés de trois mètres. Neuf « dipping » (quatre à la verticale des piquets, cinq à égale distance de ceux-ci) sont effectués à l'intérieur de cette zone. La recapture consiste en un seul prélèvement par unité de surface (filet Langeron). Ainsi, pour 27 échantillons analysés selon cette dernière technique, le calcul montre que les pourcentages de recapture (moyenne : 0,295 ; extrêmes : 0,24 et 0,34) sont homogènes ($\chi^2 = 6,07$, non significatif au seuil 5 %). Les résultats obtenus traduisent un mélange effectif des larves marquées dans la population. Dès lors, l'indice de Lincoln peut être appliqué (2).

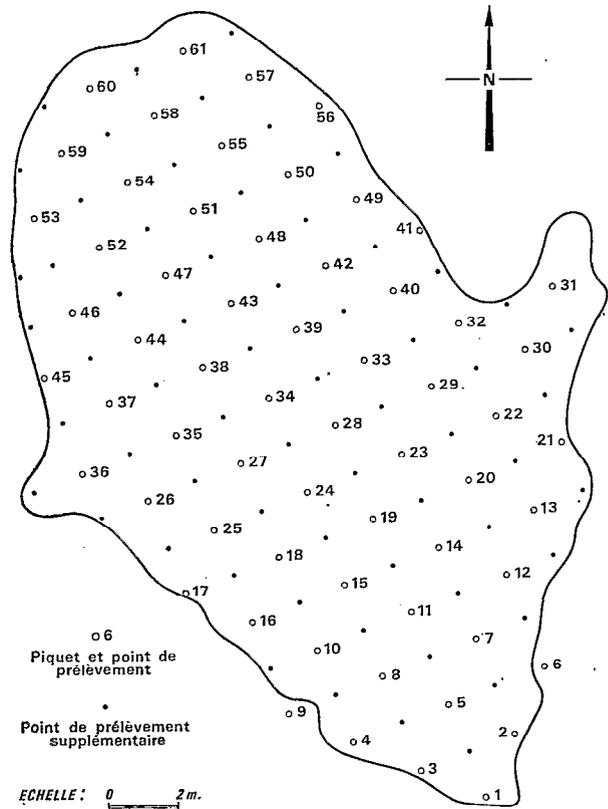


FIG. 4. — Plan de la mare n° 10. Points de prélèvement. (Seuls les piquets sont numérotés).

Compte tenu des opérations de marquage et de comptage, le lâcher doit intervenir au plus tard 48 h après la capture. Dans ce laps de temps, la mortalité larvaire est très faible, de 0,3 à 3,7 %. Le lâcher est réalisé la nuit, au moment où les larves semblent le moins actives, de telle sorte qu'une activité anormale, recherche de nourriture par exemple, n'entraîne pas de différence entre les individus marqués et les non marqués (SOUTHWOOD, 1966).

Recapture.

La recapture prend place 24 h au moins après le lâcher. Ce délai, nécessaire au brassage des animaux, ne doit pas cependant être dépassé en raison des modifications d'effectifs qu'entraîne le départ des imagos.

(2) Le lâcher en deux temps, beaucoup plus long, conduit à des résultats très voisins : pour 26 recaptures, les pourcentages varient entre 0,38 et 0,48 (moyenne : 0,425 ; $\chi^2 = 8,3$ non significatif au seuil 5 %).

L'opération consiste à prélever dans chaque unité de surface un échantillon de 100 larves et à mesurer pour chacun d'eux le pourcentage d'individus marqués (taux de recapture). La radioactivité est décelée après passage individuel des larves au compteur Geiger-Müller. La larve, asséchée sur du papier Joseph, est présentée à l'aide d'une pince devant le tube du compteur (modifié d'après HASSETT et JENKINS, 1951). Aux doses utilisées, le marquage se traduit par une activité spécifique correspondant au minimum à 780 coups par minute (cpm). Le bruit de fond oscillant entre 25 et 30 cpm, la distinction entre individus marqués et non marqués se fait facilement (3).

RESULTATS.

Grâce à la méthode de « capture-marquage-recapture », dont les modalités d'application viennent d'être exposées, le nombre de larves d'*Aedes cataphylla* (majorité de 4^e stade à chaque fois) a été estimé quatre années de suite, de 1968 à 1971 (cf. tableau).

Date	Effectif larvaire d' <i>Aedes cataphylla</i>
1-5-1968 .	527 791 ± 12 845
8-5-1969 .	4 000 000 ± 259 510
10-5-1970 .	1 781 265 ± 43 758
17-5-1971 .	1 938 972 ± 27 477

Au vu des résultats, il apparaît que la taille de la population occupant ce même gîte est très variable d'une année à l'autre, oscillant ainsi entre 500.000 individus (1968) et 4.000.000 (1969). Dès lors, le problème est posé de rechercher les causes de cette variation. Les facteurs abiotiques, climatiques en particulier, sont-ils les principaux responsables? Interviennent-ils sélectivement à un stade précis (ponte, éclosion, mues larvaires)? Seule une étude écologique intégrée de tous les stades (œuf, larve, nymphe, adulte) permettra de répondre à ces délicates questions. Remarquons simplement que la méthode de « capture-marquage-recapture », déjà employée avec succès en Entomologie agricole, donne des résultats appréciables dans le calcul des effectifs larvaires de Diptères Culicidés, effectifs dont la connaissance constitue le fondement de toute étude de dynamique de population.

Manuscrit reçu au S.C.D. le 9 juillet 1973.

(3) Ensemble de comptage S.A.I.P. type ECH 20 T.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDEL-MALEK (A. A.), 1961 — The effect of radioactive phosphorus on the growth and development of *Culex pipiens molestus* Forsk (*Diptera-Culicidae*). *Bull. ent. res.*, **52**, 701-708.
- BALDWIN (W. F.), JAMES (H. G.) et WELCH (H. E.), 1955 — A study of predators of mosquito larvae and pupae with a radioactive tracer. *Can. Ent.*, **87**, 350-356.
- BATES (M.), 1941 — Field studies of the anopheline mosquitoes of Albania. *Proc. Ent. Soc. Wash.*, **43**, 37-58.
- BUGHER (J. C.) et TAYLOR (M.), 1949 — Radiophosphorus and radiotritium in mosquitoes. Preliminary report. *Science*, **110**, 146-147.
- CAMBournac (F. J. C.), 1939 — A method for determining the larval *Anopheles* population and its distribution in rice fields and other breeding places. *Riv. Malar.*, **18**, 17-22.
- GILOT (B.), 1968 — Introduction à l'écologie des *Culicini* de la région grenobloise. Etude de « Chorologie » verticale. *Thèse Médecine, Grenoble*, 243 p.
- HAGSTRUM (D. W.), 1971 — Evaluation of the standard pint dipper as a quantitative sampling device for mosquito larvae. *Ann. Ent. Soc. Am.*, **64**, 537-540.
- HASSETT (C. C.) et JENKINS (D. W.), 1949 — Production of radioactive mosquitoes. *Science*, **110**, 109-110.
- HAUFE (W. O.), 1957 — Physical environment and behaviour of immature stages of *Aedes communis* (*Diptera-Culicidae*) in subarctic Canada. *Can. Ent.*, **89**, 120-139.
- HOCKING (B.), 1953 — Notes on the activities of *Aedes* larvae. *Mosq. News.*, **13**, 77-81.
- HORSFALL (W. R.), 1956 — A method for making a survey of floodwater mosquitoes. *Mosq. News.*, **16**, 66-71.
- JENKINS (D. W.) et HASSETT (C. C.), 1951 — Dispersal and flight range of subarctic mosquitoes marked with radiophosphorus. *Can. J. Zool.*, **29**, 178-187.
- KNIGHT (K. L.), 1964 — Quantitative methods for mosquito larval surveys. *J. Med. Ent.*, **1**, 109-115.
- LINCOLN (F. C.), 1930 — Calculating waterfowl abundance on the basis of banding returns. *U.S.D.A. Circ.*, **118**, 1-4.
- MINAR (J.), 1968 — A device for quantitative sampling of immature stages of mosquitoes and other aquatic arthropods. *Folia Parasit.*, **15**, 377-380.

ECHANTILLONNAGE DES POPULATIONS LARVAIRES : METHODES

- PAPIEROK (B.), 1972 — Dénombrement de populations larvaires de Culicides (*Diptera-Culicidae*). *Thèse 3^e cycle, Univ. Paris VI, Paris*, 133 p.
- RIOUX (J.-A.), CROSET (H.), SUQUET (P.) et TOURS (S.), 1968 — Essais de marquage par le phosphore radioactif P 32 pour l'estimation absolue des populations larvaires de Culicides (*Diptera-Culicidae*). *Vie et Milieu, série C*, **19**, 55-62.
- SERVICE (M. W.), 1968 — The ecology of the immature stages of *Aedes detritus* (*Diptera-Culicidae*). *J. appl. Ecol.*, **5**, 613-630.
- TOUR (S.), 1969 — Ecologie des microsporidioses chez les Culicides du « Midi méditerranéen ». *Thèse 3^e Cycle, Sciences, Montpellier*, 82 p.
- WELCH (H. E.), 1960 — Two applications of a method of determining the error of population estimates of mosquito larvae by the mark and recapture technique. *Ecology*, **41**, 228-229.
- WELCH (H. E.) et JAMES (H. G.), 1960 — The Belleville trap for quantitative samples of mosquito larvae. *Mosq. News*, **20**, 23-26.