

## Relations mathématiques dans la maturation des follicules ovariens des femelles paires d'*Anopheles gambiae* (Diptera : Culicidae)

Pierre CARNEVALE \*

Michel MOLINIER \*

Marie-France BOSSÉNO \*\*

Jean MOUCHET \*\*\*

### RÉSUMÉ

Dans certaines conditions de maintien des femelles sauvages d'*Anopheles gambiae* le développement des follicules a pu être mathématiquement relié à la digestion du repas de sang.

L'accroissement de l'ovocyte, et celui du vitellus, se sont déroulés de façon continue et régulière : leur importance relative a permis de définir un nouveau critère de classification des follicules appelé « Degré de Remplissage »,  $DR = (\text{Hauteur du vitellus} / \text{Hauteur du follicule}) \times 100$ .

Les analyses des formules élaborées après 19 séries de mensurations (1568 follicules) ont montré que ce critère était satisfaisant aux plans mathématiques et biologiques. Il permet de mieux caractériser l'évolution des stades II, III et IV chez les femelles paires et de remarquer leurs éventuelles modifications en fonction des conditions écologiques.

MOTS-CLÉS : *Anopheles* - Cycle gonotrophique - Analyse mathématique.

### SUMMARY

The authors have studied the development of follicles of wild parous *Anopheles gambiae* A females caught in the field, blood-fed on human baits, then maintained in laboratory, under constant conditions (temperature, relative humidity, complete darkness...).

From 4 to 43 hours after their blood ingestion these females were dissected for ovary examination.

Follicles were isolated and 1568 unaltered were measured. Two kinds of measures were done :

—  $H$  = the height of the follicle,

—  $V$  = the height of the vitellus inside follicle.

Their ratio gave a new criterion which was used to define 8 stages in follicle maturation. This criterion was called "Degré de Remplissage",  $DR = (V/H) \times 100$ , and it expressed the degree of refill of follicle by vitellus.

A mathematical analysis was done to justify and validate this criterion, and therefore we precised some mathematical relationships between :

—  $DR$  and the time elapsing since blood ingestion ( $t$ ) :  
 $DR = 100 - 58,75 e^{-0,0524 t}$  (with  $r = 0,950$ ) (1)

—  $DR$  and both  $H$  and  $V$  :  
 $H = 0,21633 \cdot DR^{1,68}$  (with  $r = 0,959$ ) (2)  
 $V = 0,00217 \cdot DR^{2,63}$  (with  $r = 0,983$ ) (3)

—  $t$  and both  $H$  and  $V$  :  
 $H = 68,37 \cdot t^{0,447}$  (with  $r = 0,973$ ) (4)  
 $V = 24,35 \cdot t^{0,710}$  (with  $r = 0,982$ ) (5)

According to formulae (2) and (3) it was also possible to correlate the rates of increase of follicle ( $RH$ ) and of vitellus ( $RV$ ) :

$RV = 1,971 - 1,030 \cdot RH$  (with  $r = 0,9996$ ) for  $30\% < DR < 100\%$ .

It appeared, hence, that increasing of vitellus and follicle are synchronous, without any particular "step" during maturation period in our rearing conditions.

These formulae correctly tallied with current observations made directly in the field when studying *A. gambiae* A biology in Djoumouna village.

\* Entomologiste médical, Centre O.R.S.T.O.M. de Brazzaville, B. P. 181, Congo.

\*\* Technicienne d'Entomologie Médicale, O.R.S.T.O.M.

\*\*\* Entomologiste médical, O.R.S.T.O.M., 70, route d'Aulnay, 93140 Bondy.

Therefore this criterion will be used to examine more thoroughly the ovarian maturation of *A. gambiae* as well as others anautogenous anopheline species.

Different references curves will have to be established according to variable conditions (temperature, relative humidity, photoperiod, overcrowding...). Such curves will undoubtedly allowed a better knowledge of every natural alteration of maturation phase in usual conditions, such alterations will be accurately expressed by the "Degree of Refill".

KEY WORDS : *Anopheles* - Gonotrophic cycle - Mathematical analysis.

L'étude du cycle gonotrophique des anophèles est un élément essentiel pour évaluer la dynamique de leur population et leur potentialité épidémiologique.

En effet, la durée de ce cycle étant connue, il suffit de déterminer le pourcentage de femelles nullipares et pares pour établir la structure en âge de la population donc la proportion de femelles pouvant atteindre, et dépasser, un âge épidémiologiquement dangereux (Davidson et Draper, 1953 ; Davidson, 1954 ; Coz *et al.*, 1961 ; Krafur, 1970 ; Brengues et Coz, 1973).

Ce cycle gonotrophique a reçu plusieurs définitions (Covell *et al.*, 1953 ; Gillies *et al.*, 1961 ; Detinova, 1963) mais actuellement on admet celle de Beklemishev (1940) qui divise le cycle des femelles pares en trois phases :

- 1) le temps écoulé entre la ponte et le repas de sang suivant (recherche de l'hôte),
- 2) le temps de maturation des ovaires accompagnant la digestion du sang ingéré,
- 3) le temps écoulé entre la fin de la maturation et la ponte (recherche d'un gîte favorable par la femelle gravide).

Dans le cadre d'une étude de la transmission du paludisme humain dans le village témoin de Djoumouna (République Populaire du Congo) nous avons entrepris un examen détaillé du cycle gonotrophique d'*Anopheles gambiae* A, le principal vecteur (Carnevale *et al.*, 1975, 1976, 1977 a et b).

Dans un premier temps nous avons noté l'influence de la proximité des gîtes larvaires sur le délai séparant la ponte du repas (phase 1).

Des marquages-lâchers-recaptures de femelles sauvages nous ont ensuite permis de préciser le délai séparant deux repas de sang successifs.

Entre temps nous avons effectué une série de mensurations des follicules en cours de développement (phase 2)

et dans le présent travail nous rapportons l'analyse mathématique des différentes valeurs obtenues.

## 1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les femelles sauvages d'*Anopheles gambiae* ont été capturées de nuit, au moment de leur piqûre sur sujets humains.

Les anophèles ont été immédiatement triées et les spécimens bien gorgés ont été placés par groupes d'une vingtaine approximativement dans des petites cages Roubaud portant mention de l'heure du repas de sang.

De retour au laboratoire ces cages ont été placées en obscurité permanente dans une cave insectarium où la température est constante (24-25 °C) et l'humidité relative toujours élevée (> 90 %). Ces femelles ont ensuite été régulièrement disséquées plusieurs heures après leur capture.

Un ovaire a servi à la détermination de la parturité (Polovodova, 1949 ; Detinova, 1963) tandis que l'autre ovaire a été délicatement dilacéré dans une goutte d'eau distillée pour individualiser les follicules.

Ces préparations ont ensuite été examinées au microscope Visopan de Reichert qui présente un large écran de verre dépoli.

A l'aide d'un calque transparent nous avons reproduit les contours des follicules intacts, et de leur masse vitelline, qui ont été mesurés ultérieurement. Pour évaluer l'importance prise par le vitellus au cours de la maturation de l'ovocyte deux mesures ont été relevées sur chaque follicule :

H = la hauteur totale du follicule considéré selon son grand axe,

V = la hauteur du vitellus dans le follicule.

Le rapport de ces deux valeurs a permis de définir un nouveau critère de classification des stades de développement folliculaire : le Degré de Remplissage (DR) tel que  $DR = (V/H) \times 100$ .

En fonction de ce critère nous avons défini 8 stades évolutifs chez les femelles pares :

— Stade 2 moyen	30 < DR < 40 %	
— Stade 2 fin	40 < DR < 50 %	
— Stade 3 début	50 < DR < 60 %	
— Stade 3 moyen	60 < DR < 70 %	
— Stade 3 fin	70 < DR < 80 %	
— Stade 4 début	80 < DR < 90 %	
— Stade 4 fin	DR > 90 %	Le follicule s'ovulise pour prendre la forme d'un œuf.
— Stade 5	DR # 100 %	Apparition des flotteurs.

## RELATIONS MATHÉMATIQUES DANS LA MATURATION DES FOLLICULES OVARIENS

Cette classification reprend celle classiquement admise :

- Stade II « l'œuf occupe presque la moitié du follicule » (Detinova, 1963).
- Stade III « the oocyte occupies two-third to three quarters of the follicle » (Clements, 1963).
- Stade IV « the nurse cell occupy only one tenth of the follicle » (Clements, *loc. cit.*).

Elle a toutefois l'avantage de bien préciser les stades II, III et IV début qui sont les plus fréquemment rencontrés en capture de nuit (II M, II F, III D) ou de jour (III D, III M et IV D le matin ; III M, III F l'après-midi et le soir).

TABLEAU I. — Mesurations des follicules d'*Anopheles gambiae* en fonction du temps de digestion.

t	N	V	H	DR
4	36	59,1	130,1	45,4
5	173	80,3	144,0	55,7
6	22	104,0	168,2	61,8
7	61	100,7	176,5	57,4
8	159	115,6	190,2	60,8
11	23	114,6	169,6	67,6
12	112	149,1	208,6	71,5
13	122	146,8	208,6	70,4
16	68	141,8	199,4	71,1
17	21	195,0	246,0	79,3
21	120	176,0	239,0	73,6
32	55	305,9	329,5	92,8
34	62	275,6	311,9	88,4
35	250	292,2	323,8	90,3
36	29	316,9	355,2	89,2
38	107	382,1	401,8	95,3
40	50	363,1	382,4	95,0
42	73	346,7	383,2	90,5
43	25	346,2	378,7	91,4

t : centre de la classe (en heures).

N : effectif par classe.

V : hauteur moyenne du vitellus dans la classe (en microns).

H : hauteur moyenne du follicule dans la classe (en microns).

DR : Degré de Remplissage,  $DR = 100 \times V/H$  (en pour cent).

## 2. RÉSULTATS ET OBSERVATIONS

### Analyse mathématique des mensurations.

L'analyse mathématique des mensurations a été effectuée sur un échantillon de 1568 valeurs. Ces valeurs ont été regroupées par classes d'heures et ramenées à 19 séries de mesures. Pour chaque série, on a calculé

la hauteur totale moyenne du follicule H et la hauteur moyenne du vitellus V (cf. tableau 1, colonnes 3 et 4). La colonne 5 de ce tableau donne le degré de remplissage DR tel que  $DR = 100 \times (V/H)$ . L'erreur introduite en prenant comme valeur du degré de remplissage le rapport des hauteurs moyennes de H et de V dans la classe au lieu de la valeur moyenne de DR est négligeable et ne dépasse pas 1 %.

### 2.1. Variation du degré de remplissage (DR) en fonction du temps écoulé depuis l'ingestion du sang (t).

L'analyse mathématique des 19 séries de valeur a montré que ce degré de remplissage varie de façon exponentielle avec le temps (fig. 1), suivant une relation qui peut se mettre sous la forme :

$$DR = 100 - 58,75 e^{-0,524t}$$

où t est exprimé en heure et DR en pour cent.

Le coefficient de corrélation calculé est égal à  $r = 0,950$  et l'écart type moyen est de 3,29 %.

L'examen de la courbe permet trois constatations :

— En extrapolant la courbe vers l'origine des abscisses on peut observer un DR d'environ 40 % au point 0. Autrement dit d'après l'analyse mathématique les follicules sont au stade II M - II F au moment du repas de sang ce qui est tout à fait conforme aux observations faites directement en captures de nuit à Djoumouma.

— En prenant sur l'axe des ordonnées des différentes limites du DR utilisées pour notre classification on peut avoir une estimation de la durée de chaque stade. Il apparaît ainsi que :

— Le stade III commence quelque trois heures après le repas ; il dure environ 18 heures et se compose de 3 stades d'inégales durées :

stade III début : 4 heures,

stade III moyen : 6 heures,

stade III fin : 8 heures.

Ceci correspond également aux observations habituelles des femelles sauvages au stade « III moyen » prises en fin de matinée - début d'après-midi et au stade « III fin » en fin d'après-midi - début de soirée.

— Le stade IV début ( $DR > 80\%$ ) est atteint environ 20 heures après le repas de sang et dure 12-14 heures approximativement. Dans les conditions naturelles, cette évolution a lieu pendant toute la nuit. Sa relative lenteur pourrait s'expliquer par un rythme endogène lié au fléchissement naturel des températures nocturnes.

Ce rythme de développement explique également la présence des femelles semi-gravidés (stade IV D) dans les récoltes de la faune résiduelle matinale et dans les abris extérieurs le matin.

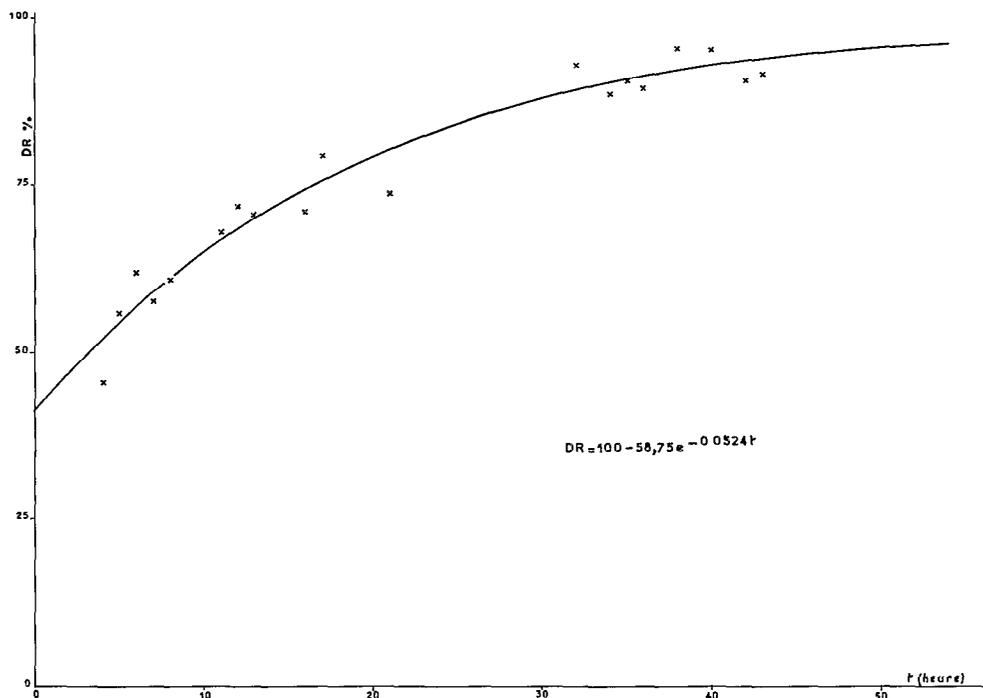


FIG. 1. — Variation du degré de remplissage en fonction de l'heure.

– 34 heures après le repas, les follicules sont au stade IV fin (DR > 90 %).

– Nos mensurations montrent qu'après 38-40 heures de « digestion-maturation » le vitellus remplit pratiquement tout l'œuf (DR ≈ 95 %) qui présente alors ses structures chorioniques.

La courbe 1, établie en laboratoire à partir des différents « degrés de remplissage » coïncide avec les observations réalisées couramment sur le terrain. Elle traduit aussi la durée moyenne de la maturation, telle qu'elle est généralement admise pour les températures habituelles de 25-26 °C confirmant ainsi la fiabilité de ce nouveau critère.

## 2.2. Croissance du follicule (H) et du vitellus (V) en fonction du degré de remplissage (DR)

A partir des valeurs portées dans le tableau I nous avons tracé les courbes de la figure 2 qui traduisent les variations des hauteurs moyennes du follicule (H) et du vitellus (V) en fonction du degré de remplissage (DR). Les équations de ces courbes montrent qu'H et V peuvent être reliés au DR selon les formules

$$H = 0,21633 DR^{1,63} \text{ (avec } r = 0,959) \text{ (2)}$$

et

$$V = 0,00217 DR^{2,63} \text{ (avec } r = 0,983) \text{ (3)}$$

pour DR compris entre 0 et 100 %, et H et V compris entre 0 et 395 microns.

Le calcul montre que le DR tel qu'il a été arbitrairement défini,  $(V/H) \times 100$ , est retrouvé par ces 2 formules à 3 millièmes près.

En effet si l'on effectue le rapport  $(V/H) \times 100$  en prenant pour valeur de H et V les deux formules (2) et (3) on obtient :

$$\begin{aligned} DR &= 100 \times (0,00217/0,21633) DR^{2,63-1,63} \\ &= 1,0031 DR \end{aligned}$$

Cette précision, et les valeurs des coefficients de corrélation toujours largement supérieurs à 0,9, démontre que l'on peut retenir les fonctions puissances comme relations entre la croissance follicule (et du vitellus) et le degré de remplissage. Ce caractère reçoit ainsi une nouvelle confirmation de sa validité.

Ces deux expressions mathématiques permettent de suivre les rythmes d'accroissement RH pour le follicule et RV pour le vitellus. Ceux-ci évoluent de façon conti-

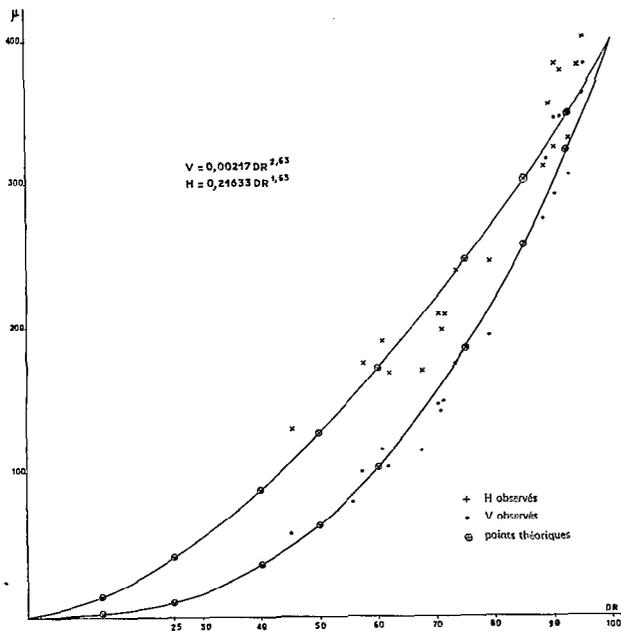


FIG. 2. — Croissance du Vitellus (V) et du Follicule (H) en fonction du degré de remplissage (Dr).

nue, au cours des différents stades définis précédemment, suivant une relation linéaire où le coefficient angulaire est fonction du rapport des degrés de remplissage successifs.  $RV = (DR_{i+1}/DR_i) RH$ ,  $DR_i$  représentant le degré de remplissage au stade  $i$  et  $DR_{i+1}$  le degré de remplissage au stade  $i + 1$ .

Si on se limite aux portions de courbes comprises entre 30 % et 100 % la relation entre ces deux accroissements peut se mettre sous la forme linéaire suivante :  $RV = 1,971 - 1,030 RH$  ( $r = 0,9996$ ) (4).

Chez les femelles sauvages et pares d'*Anopheles gambiae* maintenues en conditions constantes au laboratoire, l'ovogenèse et la vitellogenèse s'accomplissent donc régulièrement, de façon synchrone et continue, pendant toute la période de la maturation ovarienne.

2.3. Croissance du follicule et du vitellus en fonction de l'heure

Les 19 valeurs moyennes du follicule et du vitellus, calculées à partir des dissections retardées (tableau I), ont ensuite été rapportées au laps de temps écoulé depuis l'ingestion du sang (fig. 3). Il apparaît ainsi que, dans

nos conditions expérimentales, la croissance du follicule et celle du vitellus sont des fonctions puissances du « temps de digestion » :

$$H = 68,37 \cdot t^{0,447} \text{ (avec } r = 0,973 \text{) (5)}$$

(écart-type moyen 32,1)

et

$$V = 24,35 \cdot t^{0,710} \text{ (avec } r = 0,982 \text{) (6)}$$

(écart-type moyen 21,8)

où H et V sont exprimés en microns et t en heures.

Les mesures ont commencé 4 heures après le repas, sur les 36 follicules examinés dans cette première tranche d'heure les valeurs moyennes étaient de 130,1  $\mu$  pour H et 59,1  $\mu$  pour V.

Arrivés à maturité les follicules mesuraient environ 380-400  $\mu$ . Ainsi entre le repas de sang (follicule stade II M - II F, DR # 40 %) et la fin de la digestion (follicule stade V, DR # 99 %) l'ovocyte triple de taille, tandis que celle du vitellus est pratiquement multipliée par 7.

En outre 41 œufs ont été mesurés quelques heures après leur ponte et leur taille moyenne a été de  $452,4 \pm 22,1 \mu$ . Par rapport à l'ovocyte mûr encore dans l'ovaire on peut noter une augmentation de taille qui doit être imputée au durcissement des structures chorioniques. La vitellogenèse paraît s'effectuer plus « rapidement » que l'ovogenèse mais l'examen des courbes 3 montrent que ces 2 processus physiologiques se déroulent d'une manière constante et continue jusqu'à la réalisation complète de l'œuf. Cette régularité peut s'expliquer par l'absence de stress physiologique important pendant la maturation et la constance des conditions extérieures (température, HR, photopériode).

3. CONCLUSION

Un nouveau critère, le « Degré de Remplissage » a été défini [ $DR = (V/H) \times 100$ ] et a servi à caractériser 8 stades évolutifs au cours de la maturation du follicule.

La validité de cette classification a été mathématiquement démontrée puisque trois types de relations ont pu être ajustées aux courbes représentant les variations du degré de remplissage, du temps écoulé depuis l'ingestion du sang et des hauteurs du follicule (et du vitellus).

Une première relation, de type exponentiel, entre le degré de remplissage et le temps écoulé depuis le repas de sang (courbe 1) a permis d'estimer la durée des stades 3 début (= 4 heures), 3 moyen (= 6 heures), 3 fin (= 8 heures) et 4 début (= 12 heures).

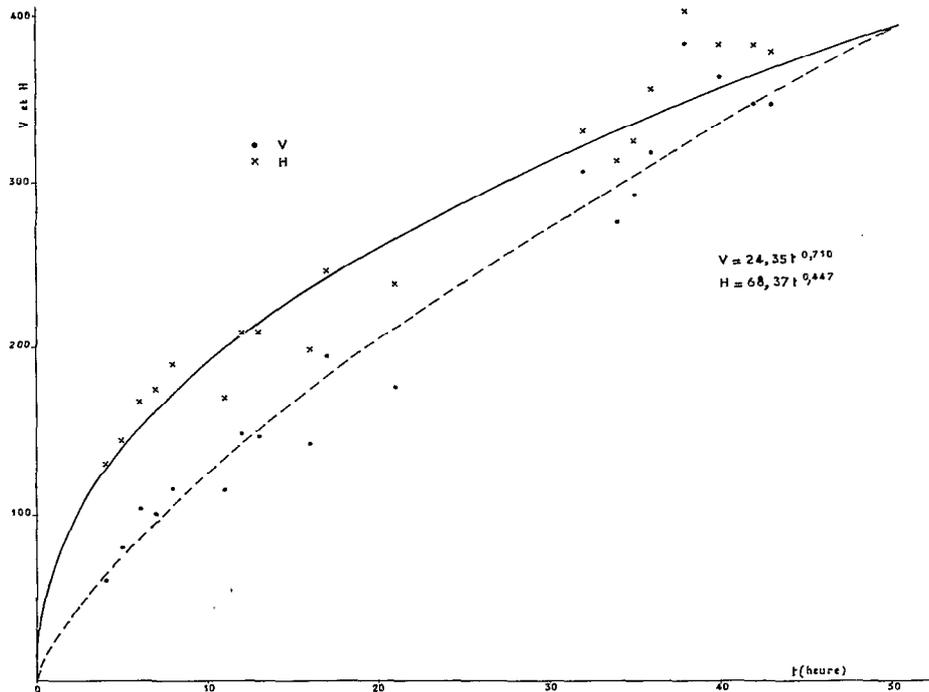


FIG. 3. — Croissance du Vitellus et du Follicule en fonction du temps écoulé depuis le repas de sang.

Les hauteurs du follicule et du vitellus ont ensuite été reliées, par des fonctions de type puissance, au degré de remplissage (courbes 2) et au temps de maturation (courbes 3).

Ces courbes permettent de déterminer soit le DR, soit les tailles V et H pour un temps de digestion donné dans les conditions définies expérimentalement. Ces différents ajustements se sont avérés satisfaisants sur les plans mathématiques et biologiques. En effet les coefficients de corrélation ont toujours été largement supérieurs à 0,9 et l'analyse des courbes a permis de retrouver certaines observations faites couramment sur le terrain lors des captures d'*Anopheles gambiae*.

Ayant ainsi confirmé leurs valeurs, ces formules pourront désormais être utilisées pour suivre l'évolution des ovocytes d'*A. gambiae* pendant leur maturation dans des conditions bien précises.

Celles-ci pourront être modifiées pour quantifier leurs effets et obtenir une série de courbes de références traduisant les éventuelles altérations physiologiques. Toute variation pourra être correctement indiquée par les mesures du follicule et du vitellus donc du degré de remplissage.

Ce caractère peut raisonnablement servir désormais de critère d'évaluation des stades de développement des ovaires d'*A. gambiae*.

Manuscrit reçu au service des Publications de l'O.R.S.T.O.M. le 6 mars 1978

#### BIBLIOGRAPHIE

- BEKLEMISHEV (W. N.), 1940. — Le cycle gonotrophique, principe de base de la biologie d'*Anopheles*. *Vop. Fiziol. Ekol. Malar. Komama*, 1, 3.
- BRENGUES (J.) et Coz (J.), 1973. — Quelques aspects fondamentaux de la biologie d'*Anopheles gambiae* Giles (sp. A) et d'*Anopheles funestus* Giles en zone de savane humide d'Afrique de l'Ouest. *Cah. O.R.S.T.O.M., sér. Ent. méd. et Parasitol.*, vol. XI, n° 2 : 107-126.
- CARNEVALE (P.), BOSSENO (M. F.), LANCIEN (J.) et LE PONT (F.), 1975. — Studies on the gonotrophic cycle of *Anopheles gambiae* A (Diptera : Culicidae). I. Time elapsing between oviposition and biting. *Rapp. O.R.S.T.O.M./Brazza/EMP/PC/75-174*.

RELATIONS MATHÉMATIQUES DANS LA MATURATION DES FOLLICULES OVARIENS

- CARNEVALE (P.), FREZIL (J. L.), BOSSENO (M. F.), LE PONT (F.) et LANCIEN (J.), 1976. — Etude de l'agressivité d'*Anopheles gambiae* A en fonction de l'âge et du sexe des sujets humains. *WHO/MAL/76.874*; *WHO/VBC/76.633*.
- CARNEVALE (P.), MOLINIER (M.) et BOSSENO (M. F.), 1977 a. — Etude du cycle gonotrophique d'*Anopheles gambiae* A (Diptera: Culicidae). II. La croissance du follicule au cours de la maturation ovarienne. *Rapp. O.R.S.T.O.M./Brazza/EMP/PC/77-189*.
- CARNEVALE (P.), BOSSENO (M. F.), LANCIEN (J.), LE PONT (F.) et MOLINIER (M.), 1977 b. — Studies on the gonotrophic cycle of *Anopheles gambiae* A (Diptera: Culicidae). III. Breeding-site seeking phase by gravid females. *Rapp. O.R.S.T.O.M./Brazza/EMP/PC/77-192*.
- CLEMENTS (A. N.), 1963. — The Physiology of Mosquitoes. Pergamon Press Book, Mac Millan Co., 393 p.
- COVELL (G.), RUSSELL (P. F.) et SWELLENGREBEL (N. H.), 1953. — Malaria Terminology. *Wld. Hlth. Org., Monogr. Ser.*, n° 17, 82 p.
- COZ (J.), GRUCHET (H.), CHAUVET (G.) et COZ (M.), 1961. — Estimation du taux de survie chez les Anophèles. *Bull. Soc. Path. exot.*, 54 : 1353-1358.
- DAVIDSON (G.), 1954. — Estimation of the Survival-Rate of Anopheline Mosquitoes in Nature. *Nature*, octobre 23, 4434 : 792-793.
- DAVIDSON (G.) et DRAPER (C. C.), 1953. — Field Studies of some of the basic factors concerned in the transmission of malaria. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 47 : 522-535.
- DETINOVA (T. S.), 1963. — Méthodes à appliquer pour classer par groupes d'âge les Diptères présentant une importance médicale notamment certains vecteurs de paludisme. *Wld. Hlth. Org., Monogr. Ser.*, n° 47, 220 p.
- GILLIES (M. T.), HAMON (J.), DAVIDSON (G.), DE MEILLON (B.) et MATTINGLY (P. F.), 1961. — Guide d'Entomologie appliquée à la lutte antipaludique dans la Région africaine de l'O.M.S. O.M.S. Brazzaville, Bureau Régional pour l'Afrique.
- KRAFSUR (E. S.), 1970. — Estimation of the theoretical daily survival rate in some malaria vectors in a lowland region of Ethiopia. *Parassitologia*, XII, (1) : 47-61.
- POLOVODOVA (V. P.), 1949. — (Détermination de l'âge physiologique d'*Anopheles femelle*). *Med. Parazit.*, Moscou, 18 : 352-355.