

ISSN = 0037 - 9274

APPLICATION DE LA MÉTHODE DE POLOVODOVA À LA DÉTERMINATION DE L'ÂGE PHYSIOLOGIQUE DES *Aedes* (DIPTERA : CULICIDAE) VECTEURS DE FIÈVRE JAUNE

Bernard MONDET

Laboratoire d'Entomologie médicale ORSTOM, Institut Pasteur de Côte-d'Ivoire, 01 B.P. 490, Abidjan 01,
Côte-d'Ivoire.

Mots-clés : ovaires, Afrique de l'ouest.

Résumé. – En Afrique de l'ouest, les principales espèces vecteurs de fièvre jaune sont des *Aedes* des sous-genres *Stegomyia* et *Diceromyia*. L'étude des modifications anatomiques des ovaires et des ovarioles avant, pendant et après l'oogenèse, montre qu'il existe une possibilité de déterminer l'âge physiologique de pratiquement 100 % des femelles sauvages capturées sur appât humain. Cette technique, dérivée de celle de Polovodova, se base sur l'aspect de l'ovaire, la présence éventuelle de corps jaunes et de reliques folliculaires. Méthode praticable sur le terrain avec un stéréomicroscope, elle permet, une fois maîtrisée, la détermination de l'âge physiologique de 30 à 50 femelles par heure. Elle est d'un intérêt certain dans l'étude d'espèces telles que *Aedes* (*Dic.*) *furcifer*, vecteur important du secteur pré-forestier aux savanes soudaniennes, dont les populations de femelles agressives comportent parfois plus de 30 % d'individus ayant dépassé le stade II Agé du développement ovariole et dont l'âge physiologique est impossible à déterminer selon la technique de Detinova. Chez certaines espèces, mais surtout chez *Aedes* (*Dic.*) *furcifer*, il est également possible de faire le décompte des reliques folliculaires, c'est-à-dire des cycles trophogoniques effectués par les femelles multipares.

Abstract. – Application of the Polovodova's method to the determination of the physiological age of *Aedes* (Diptera : Culicidae) transmitting yellow fever. – In West Africa, Yellow fever is essentially transmitted by *Aedes* mosquitoes, belonging to *Stegomyia* and *Diceromyia* sub-genus. We have studied modifications of ovaries and ovarioles, in relation with oogenesis, of more than 15 000 mosquitoes belonging to six species, and now we are able to determine the physiological age of nearly all the wild-caught females. The technique is derived from the one of Polovodova, with special attention to the ovary, the presence of "yellow bodies" and follicular relics. This can be done in the field with a good stereomicroscope. After some training it is possible to study 30 to 50 females in one hour. This technique is very useful for *Aedes* (*Diceromyia*) *furcifer* (main vector in the savannas) in which many females have well developed ovarioles (stage III of Christophers'). In this case, it is impossible to use Detinova's technique. Finally, it is also possible to find multiple relics to a total of six in *Diceromyia* females, and so, to determine the number of trophogonic cycles and, consequently, the precise physiological age of such females.

Manuscrit accepté le 6-III-1992

Adresse actuelle : 31, rue Clovis Hugues, F-05200 Embrun.

27 MARS 1993

O.R.S.T.O.M. Fonds Documentaire
N° : 41554 ex 1
Cote : B

PB 331

La dissection de femelles de moustiques capturées sur appât humain permet d'obtenir de nombreux renseignements sur la biologie et, par conséquent, sur l'épidémiologie des maladies transmises. Le nombre d'oeufs en formation chez les femelles semi-gravides (plus souvent rencontrées que les gravides) donne une estimation de la fécondité. Les proportions relatives des différents stades de développement des ovarioles au moment de la prise de repas sanguin renseignent sur le déroulement du cycle trophogonique au sein d'une population donnée. La présence de femelles ayant du sang en cours de digestion dans l'estomac met en évidence le phénomène de double repas sanguin au cours d'un même cycle trophogonique.

La détermination de l'âge physiologique d'une population consiste à grouper les femelles en nullipares (n'ayant jamais pondu) et en pares (ayant pondu au moins une fois). Dans certains cas, il est possible de déterminer le nombre de cycles trophogoniques effectués par les femelles multipares. La durée du cycle étant connue on peut établir la courbe de survie de ces femelles. Cette dernière, compte tenu du temps nécessaire au virus pour être transmis, permet d'obtenir le pourcentage de femelles épidémiologiquement dangereuses au sein d'une population donnée (capables de transmettre autrement que par passage du virus par la voie trans-ovarienne, ce qui d'ailleurs ne représente qu'un infime pourcentage parmi les femelles infectées).

Des chercheurs russes, Detinova en 1945 et Polovodova en 1947 (*in* Detinova, 1963), ont établi deux méthodes de détermination de l'âge physiologique, basées sur l'étude des ovaires d'Anophèles. Ces méthodes ont été appliquées en Afrique à l'étude du paludisme (Gillies, 1958 ; Hamon *et al.*, 1961). Elles ont pu être utilisées chez de nombreux autres insectes d'intérêt médical, vétérinaire ou agricole (Detinova, *op. cit.* ; Charlowood *et al.*, 1980 ; Tyndale-Biscoe, 1984).

L'étude de l'âge physiologique des vecteurs potentiels de la fièvre jaune n'a pas été aussi systématique et approfondie que celle des vecteurs du paludisme. Il semble que cela provienne de la difficulté de réaliser, sur le terrain, des dissections fines d'ovaires pour la mise en évidence des reliques (méthode de Polovodova), comme le montre Peña de Grimaldo (1959) avec *Aedes aegypti*. En Afrique, exception faite d'un travail portant sur l'ensemble des vecteurs de fièvre jaune en Afrique de l'ouest (Cordellier, 1978) et basé sur la méthode de Detinova, seuls des résultats ponctuels sont disponibles. Nous avons donc étudié les possibilités de détermination de l'âge physiologique des vecteurs de fièvre jaune présents en Côte-d'Ivoire par les deux méthodes citées ci-dessus. Leurs avantages et leurs inconvénients ont été comparés et nous avons pu mettre au point une technique simple et rapide de dissection, basée sur la méthode de Polovodova, utilisable sur le terrain, permettant l'appréciation de l'état et de l'âge physiologiques des femelles.

I. – RAPPEL DE LA MORPHOLOGIE DE L'APPAREIL GÉNITAL INTERNE DES FEMELLES D'*Aedes* (Christophers, 1960 ; Bertram, *in* Detinova, *op. cit.*)

Il existe deux ovaires composés d'un nombre variable d'ovarioles (de 30 à 150 chez les vecteurs potentiels de fièvre jaune). Dans chaque ovaire se trouve un oviducte interne (*calice*) dans lequel débouchent les ovarioles. A la sortie des ovaires les deux oviductes externes se réunissent pour former l'oviducte commun. Ce dernier est suivi d'un vagin dans lequel s'ouvrent les deux canaux des trois spermathèques (deux spermathèques ayant des conduits se réunissant pour n'en former qu'un avant l'ouverture dans le vagin) et celui de la glande annexe. La bourse copulatrice, en forme de sac et à la paroi élastique, prend place près de l'ouverture génitale, dans l'atrium.

L'ovariole (fig. 1) est constituée d'un *germarium* et de deux *follicules* : le primaire, le plus éloigné du *germarium* et le secondaire, le plus proche. Le tout est enveloppé d'abord par l'*intima* (membrane amorphe, très fine, élastique) qui forme le tube ovario-

laire puis par l'*épithélium ovariolaire* (également élastique, possédant quelques noyaux). Cet épithélium enveloppe d'une façon plus ou moins lâche l'ovariole et l'intima. Le tube ovariolaire se nomme *funicule* entre les deux follicules et *pédicelle* entre le follicule primaire et le calice.

Le follicule est composé de sept cellules nourricières (les *trophocytes*) et d'une cellule germinale (l'*oocyte*). Ces cellules sont enveloppées d'un *épithélium folliculaire*, lui-même entouré par l'intima.

II. - DÉVELOPPEMENT OVARIOLAIRE

Chez les *Aedes* vecteurs de fièvre jaune, qui sont anautogènes, la maturation ovariolaire complète est obligatoirement liée à la digestion d'un ou de plusieurs repas de sang. Sans cet apport nutritif, le développement des oocytes est bloqué à un stade plus ou moins précoce selon l'espèce. Dès 1911, Christophers (*in* Clements & Boocock, 1984) a distingué, dans le développement des follicules, cinq stades qui ont été ensuite subdivisés par d'autres auteurs. Nous nous baserons sur les stades de développement décrits en regroupant ceux qui ne peuvent se distinguer au stéréomicroscope.

Stades ovariolaires chez les *Aedes* (1) :

- *Stade 0* (30 à 40 μm de diamètre) : le follicule n'est pas détaché du germarium, l'épithélium folliculaire n'existe pas, les cellules sont indifférenciées (il est alors le seul follicule dans l'ovariole). Un tel stade ne se rencontre que chez la femelle néonate qui n'est pratiquement jamais capturée sur homme.

- *Stade I* (40-70 μm sur 50-90 μm) : le follicule est en train de se séparer du germarium (formation du funicule), l'épithélium folliculaire est constitué, mais la distinction entre trophocytes et oocyte est impossible.

- *Stade II Jeune* (70-100 μm sur 90-130 μm) : la distinction entre trophocytes et oocyte devient possible. Les noyaux des trophocytes ont un diamètre deux à trois fois supérieur à celui de l'oocyte. On observe un début de dépôt de vitellus, sous forme de gouttelettes, qui commence à entourer le noyau de l'oocyte.

- *Stade II Moyen* (100-130 μm sur 130-160 μm) : le vitellus, composé de gouttelettes puis de gouttes, devient opaque, entoure le noyau qui reste cependant visible par transparence.

- *Stade II Agé* (130-160 μm sur 160-190 μm) : le vitellus cache le noyau de l'oocyte et sa masse emplît jusqu'à la moitié du follicule.

- *Stade III* (160-200 μm sur 190-220 μm) : la taille du follicule augmente toujours, mais sa forme légèrement ovale persiste, le vitellus emplît jusqu'à 75-90 % de l'oocyte.

- *Stade IV* (200-400 μm sur 220-250 μm) : le follicule augmente beaucoup de longueur, sa largeur augmente peu et se réduit même ensuite, à 100-120 μm . La taille atteinte finalement est pratiquement celle de l'oeuf. Les trophocytes, toujours visibles, occupent 10 % ou moins du volume du follicule. Ils finissent par disparaître.

- *Stade V* (400-500 μm sur 100-150 μm) : la forme et les dimensions définitives de l'oeuf sont atteintes. Le chorion est formé et sa structure est visible.

(1) Les dimensions des follicules sont données à titre purement indicatif et concernent les *Stegomyia*. Nous avons trouvé des dimensions moyennes plus élevées chez les *Diceromyia*.

III. – TECHNIQUES DE DISSECTION DES FEMELLES DE MOUSTIQUES

Pour être utilisables en virologie, les moustiques vecteurs d'arboviroses doivent être congelés encore vivants dans l'azote liquide. Avant la dissection, ils peuvent être conservés, durant 48 heures, sans mortalité, entre 4 et 8°C dans leurs tubes de capture clos par un bouchon en caoutchouc. Préalablement à la dissection, ils sont endormis par un séjour d'une dizaine de minutes à -10°C. Une boîte contenant un portoir pour tubes, remplie de liquide de congélation, est utilisée au cours de la dissection pour les maintenir dans cet état.

La femelle est déposée sur une lame microscopique, l'extrémité de l'abdomen en contact avec une goutte d'eau physiologique à 0,65 % et face ventrale vers l'observateur. Une première aiguille montée, placée contre le thorax, au niveau du premier sternite de l'abdomen, permet de la maintenir dans cette position. Une seconde aiguille est appuyée entre le sixième et le septième sternites, en position médiane. Cette aiguille, fortement pressée, est déplacée par une série de petits à-coups secs, ce qui permet la section de l'extrémité de l'abdomen à laquelle reste attaché l'ensemble des organes de reproduction. L'estomac et les tubes de Malpighi sont également entraînés. A l'aide des aiguilles montées, les deux ovaires sont alors isolés par section de l'oviducte commun, puis séparés l'un de l'autre. La femelle est récupérée à la pince souple et déposée dans un tube de Nunc utilisé pour la congélation à l'azote liquide et également conservé au froid au cours de la dissection. L'un des ovaires est retiré de la lame à l'aide d'une aiguille et déposé dans une gouttelette d'eau distillée. Nettoyé des impuretés l'accompagnant, son réseau trachéolaire sera observé au microscope après évaporation complète de la gouttelette, selon la méthode de Detinova. L'ovaire resté sur la lame de dissection est délicatement dilacéré afin de séparer les ovarioles les unes des autres et permettre l'observation éventuelle des dilatations, selon la méthode de Polovodova.

IV. – MÉTHODES CLASSIQUES DE DÉTERMINATION DE L'ÂGE PHYSIOLOGIQUE

L'âge physiologique d'une population de moustiques s'exprime, en général, par le pourcentage de femelles ayant pondu au moins une fois (femelles pares). La ponte entraîne plusieurs modifications au niveau des ovarioles et des ovaires. Detinova (*op. cit.*) décrit deux méthodes, la sienne et celle de Polovodova (déjà présentées en 1959 par Beklemishev *et al.*) utilisées pour la détermination de l'âge physiologique chez les moustiques (Anophèles en particulier). Ces méthodes consistent à noter soit les modifications du réseau de trachéoles ovariennes consécutives à la ponte (Detinova), soit les modifications se produisant au niveau des ovarioles (Polovodova).

1) Méthode de Detinova

Chaque ovaire de moustique est pénétré par deux troncs trachéens qui se ramifient de nombreuses fois à l'intérieur de l'organe. Ces ramifications de plus en plus fines forment un réseau dense de trachéoles. Avant leur terminaison, ces trachéoles sont enroulées sur elle-mêmes et forment des pelotons chez la femelle n'ayant jamais eu d'oogenèse (fig. 2 et 4). La relative élasticité des ramifications trachéolaires (ayant une structure de type ressort à boudin) permet au réseau de suivre la légère augmentation de taille de l'ovaire au début de chaque oogenèse. Les pelotons ne commencent à se dérouler, progressivement, qu'en fin d'oogenèse quand l'augmentation de taille de l'ovaire est importante (à partir du moment où les follicules ont atteint le début du stade IV).

Chez la femelle qui vient de pondre et possédant encore des ovaires de grande taille quoique vidés de leurs oeufs, les pelotons sont tous entièrement déroulés (fig. 3 et

5). Ensuite, la taille de l'ovaire diminue et, cependant, la plupart des pelotons restent déroulés. C'est sur ce phénomène irréversible que Detinova a basé sa méthode de détermination de l'âge physiologique. Elle permet de classer les femelles en deux groupes :

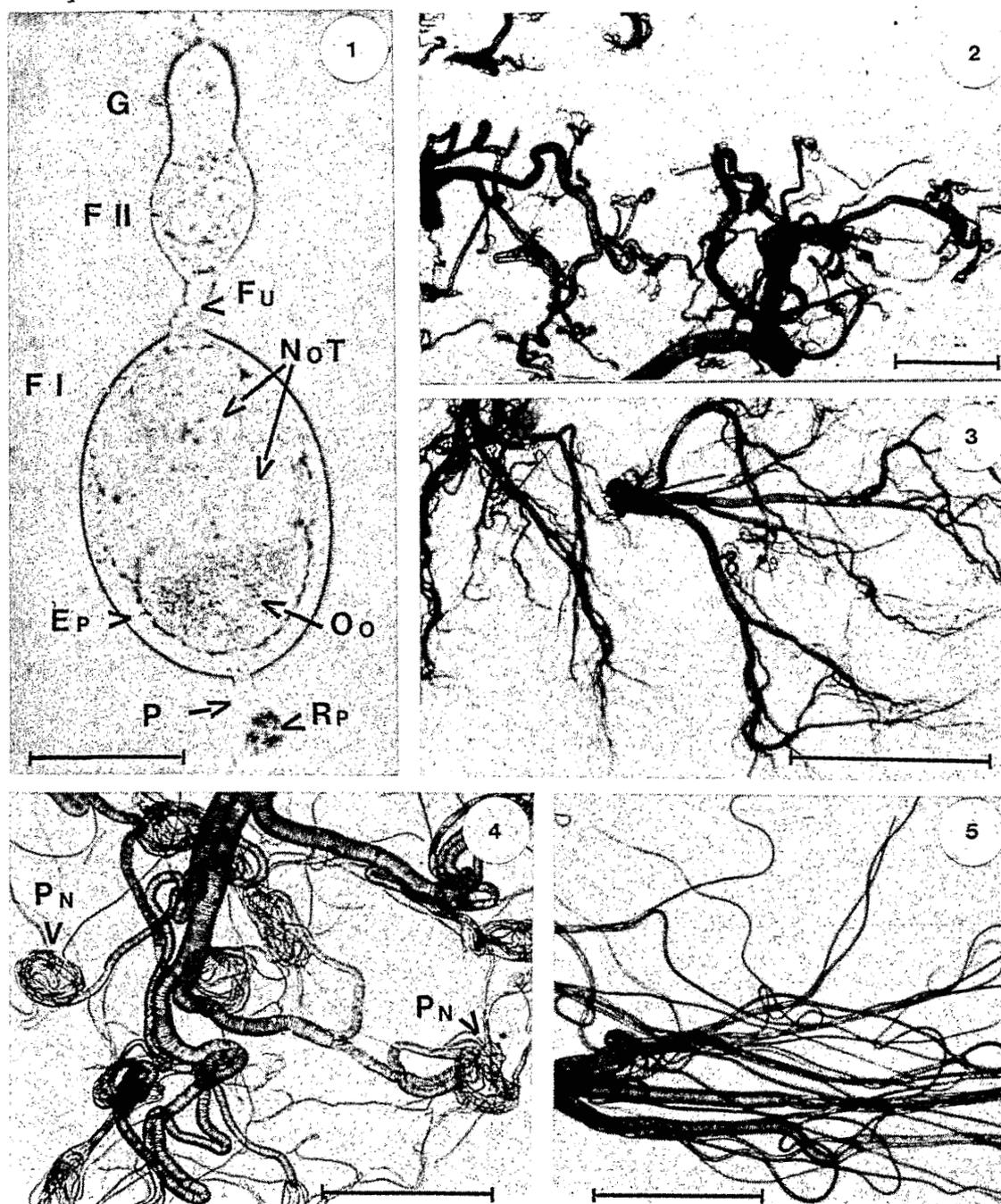


Fig. 1 à 5. - 1, ovariole (fin de stade II Jeune) extraite de l'ovaire d'une femelle pare de *Ae. (Steg.) africanus*. - 2, réseau trachéolaire d'une femelle nullipare (stade I) de *Ae. (Dic.) cordellieri*. - 3, réseau trachéolaire d'une femelle pare venant de pondre (stade II Jeune) de *Ae. (Dic.) furcifer*. - 4, terminaisons des trachéoles avec pelotons d'une femelle nullipare (stade I) de *Ae. (Steg.) luteocephalus*. - 5, terminaisons des trachéoles dépourvues de pelotons d'une femelle pare venant de pondre (stade II Jeune) de *Ae. (Dic.) furcifer*.
 EP : épithélium folliculaire ; FI : Follicule primaire ; FII : Follicule secondaire ; FU : funicule ; G : Germarium ; NOT : noyaux des trophocytes ; OO : oocyte ; P : pédicelle ; PN : peloton ; RP : relique de ponte. (échelles 1, 4 et 5 = 50 μ m) (échelles 2 et 3 = 250 μ m).

femelles nullipares chez qui les pelotons trachéolaires sont nombreux et parfaitement enroulés ; femelles pares chez qui les pelotons sont absents (car totalement déroulés) ou, s'ils existent, sont rares et enroulés d'une manière plus ou moins lâche.

2) Méthode de Polovodova

C'est au niveau du pédicelle de l'ovariole que se situent les transformations physiques différenciant une femelle pare d'une femelle nullipare. L'oeuf, au cours de sa formation, entraîne une dilatation importante du tube ovariole (formé par l'intima). Alors que l'oeuf est expulsé, les cellules épithéliales ayant participé à la formation du chorion restent sur place et commencent à dégénérer. Elles se concentrent en un amas, appelé « corps jaune », qui sera progressivement éliminé des oviductes. Cependant, une partie plus ou moins importante de ces débris cellulaires peut être retenue au moment de la rétraction de l'intima, ce qui entraîne la formation d'une dilatation du pédicelle (appelée « dilatation folliculaire » ou « relique folliculaire » dans le cas où des débris cellulaires sont visibles à l'intérieur de la dilatation). La présence de telles dilatations du pédicelle signe la parité de la femelle (fig. 10 et 15). Elles sont définitives et irréversibles. Chez certaines espèces, à chaque ponte apparaît une nouvelle dilatation, ce qui permet de dénombrer les cycles trophogoniques effectués par une femelle multipare (chaque cycle correspondant à une ponte, donc à une dilatation). Chez d'autres espèces, il est très rare sinon impossible de compter plus d'une relique et de dénombrer ainsi les cycles effectués (cf. Discussion).

V. - APPLICATION DE CES DEUX MÉTHODES A L'ÉTUDE DE L'ÂGE PHYSIOLOGIQUE DES *Aedes* VECTEURS POTENTIELS DE FIÈVRE JAUNE EN CÔTE-D'IVOIRE

Ces deux méthodes ont été utilisées simultanément au cours de la dissection des femelles suivantes : 6381 d'*Aedes (Stegomyia) africanus* en provenance de quatre zones (forêt ombrophile dégradée, forêt semi-décidue, mosaïque forêt-savane, savane sub-soudanienne), 1796 d'*Ae. (Stg.) opok*, 3156 d'*Ae. (Stg.) luteocephalus*, 3794 d'*Aedes (Diceromyia) furcifer*, en provenance de deux zones (mosaïque forêt-savane et savane sub-soudanienne), 219 d'*Ae. (Dic.) cordellieri* et 177 d'*Ae. (Dic.) flavicollis* (de la seule zone de mosaïque forêt-savane).

1) Résultats obtenus avec la méthode des trachéoles et difficultés rencontrées

Une femelle néonate possède des ovaires de petite taille et des ovarioles de stade 0 (ou I) donc sans vitellus. Chez une telle femelle, nullipare, le réseau de trachéoles est particulièrement dense et les pelotons sont serrés et nombreux. Une femelle jeune et nullipare (stade de développement ovariole II Jeune) possède encore un réseau de trachéoles dense et serré et les pelotons sont toujours parfaitement visibles (fig. 2 et 4). Une femelle qui vient de pondre a également des ovarioles au stade I ou II Jeune mais des ovaires de grande taille, car encore dilatés. Le réseau trachéolaire est étiré, les trachéoles entièrement déroulées et les pelotons n'existent plus (fig. 3 et 5).

Dans ces trois cas, la nulliparité ou la parité ne fait aucun doute, les pelotons, quand ils sont présents sont très facilement visibles. Ils peuvent devenir difficiles à voir dès les stades II Moyen ou II Agé. Le développement des ovarioles commence à entraîner une augmentation de la taille des ovaires, donc un étirement du réseau trachéolaire qui apparaît, chez la femelle nullipare, de moins en moins dense au fur et à mesure du développement. Les pelotons, comprimés entre deux ovarioles, peuvent être difficiles à examiner quand ils se présentent de profil.

La première difficulté insurmontable se présente chez la femelle dont les ovarioles ont atteint ou dépassé le stade III. Une fois l'ovaire asséché, le vitellus est si dense qu'il recouvre entièrement le réseau trachéolaire et les pelotons ne sont plus visibles. Un tel développement des ovarioles est en général en relation avec la prise d'un second repas sanguin au cours du cycle trophogonique. Ce phénomène a été noté par Germain *et al.* (1974) chez *Ae. africanus*, par Cornet *et al.* (1978) chez *Ae. aegypti*, *Ae. luteocephalus* et les *Diceromyia*.

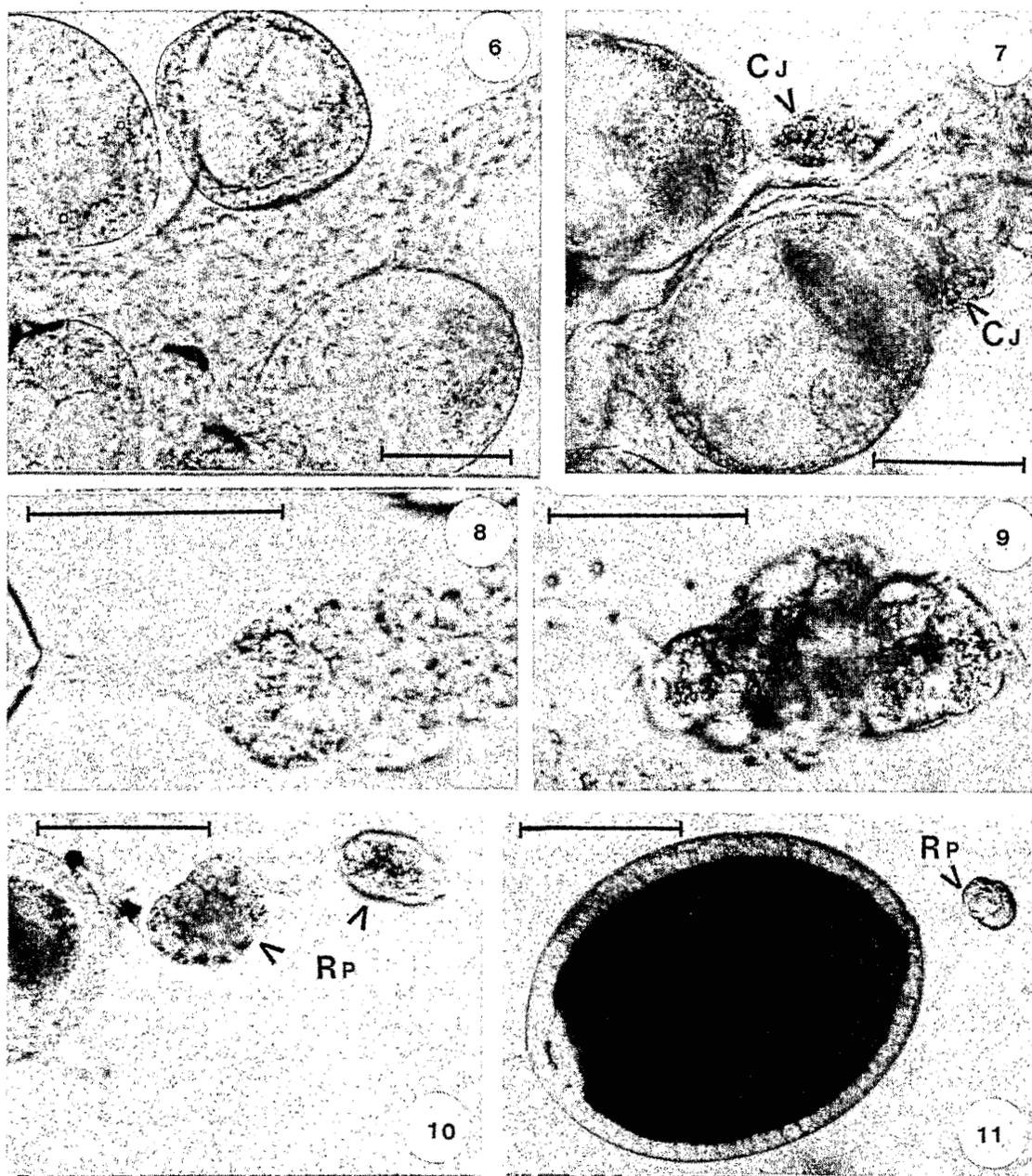


Fig. 6 à 11. – 6, ovaire de femelle nullipare (stade II Jeune) de *Ae. (Steg.) africanus*, sans corps jaune. – 7, ovaire de femelle pare (fin de stade II Jeune) de *Ae. (Steg.) luteocephalus*, avec corps jaunes *in situ*. – 8, sac de ponte chez une femelle pare de *Ae. (Steg.) africanus*, venant de pondre. – 9, relique de résorption chez une femelle de *Ae. (Dic.) flavicollis* pouvant être nullipare. – 10, ovariole de stade II Moyen, avec deux reliques de ponte d'une femelle pare de *A. (Dic.) furcifer*. – 11, ovariole de stade IV et relique de ponte chez une femelle pare de *Ae. (Dic.) furcifer*.

CJ : corps jaune ; RP : relique de ponte. (échelles 6, 7, 8, 9 = 50 μm) (échelles 10 et 11 : 100 μm)

Cordellier (*op. cit*) donne des pourcentages de femelles "inclassables" (en nullipares ou pares) dont les ovarioles sont de stade III : chez les *Stegomyia* de 0 (*Ae. africanus* en forêt) à 15 % (*Ae. aegypti* en savane soudano-sahélienne) et chez les *Diceromyia* des pourcentages variant de 10,6 à 40 % (des savanes sub-soudaniennes à celles soudano-sahéliennes).

Au cours de nos dissections nous avons trouvé (en zone de mosaïque forêt-savane et en savane sub-soudanienne) les deux pourcentages suivants pour chacune des espèces (% de "sang noir" correspondant aux femelles ayant un repas de sang en cours de digestion au moment de la capture et % des stades III à V) : *Ae. africanus* (7,7 % et 2,4 %), *Ae. opok* (1,6 % et 0,4 %), *Ae. luteocephalus* (8,1 % et 5,7 %), *Ae. furcifer* (35,3 % et 30,3 %), *Ae. cordellieri* (31,6 % et 25,8 %) et *Ae. flavicollis* (28,5 % et 19,5 %).

La seconde difficulté concerne une faible quantité de femelles : celles qui ont pondu un nombre d'oeufs réduit (certaines ovarioles ne se développant pas normalement) et celles dont une partie, parfois la totalité, des ovarioles a dégénéré à un stade avancé (souvent le III). Les deux cas se rencontrent essentiellement chez les *Diceromyia*. Les pelotons dans un même ovaire, peuvent alors se présenter déroulés, ou en partie déroulés, ou encore parfaitement enroulés. Enfin la dissection pratiquée, si elle est trop rapide, peut entraîner une extraction brutale des ovaires ; les troncs trachéens restant alors retenus dans le corps de la femelle, c'est le réseau trachéolaire qui s'arrache de l'ovaire.

2) Résultats obtenus avec la méthode des dilatations et difficultés rencontrées

Immédiatement après la ponte la femelle possède des ovaires encore distendus. Le pédicelle qui reste dilaté, se présente comme un « sac » à l'intérieur duquel l'ensemble des cellules de l'épithélium folliculaire est encore présent (fig. 8 et 14). Le follicule suivant est au stade I (ou II Jeune) de son développement. En raison de la dilatation persistante du pédicelle et de la présence des nouveaux débris cellulaires, les éventuelles dilatations folliculaires ou reliques précédentes ne sont pas visibles. La parité d'une telle femelle est évidente et ce phénomène concerne l'ensemble des espèces vectrices. Ces femelles peuvent également posséder un ou plusieurs oeufs résiduels.

Chez les *Diceromyia*, la taille de la dilatation est en relation avec la quantité, souvent importante, de débris cellulaires qui y sont inclus. Les reliques peuvent être ainsi immédiatement visibles. Bien que toujours délicate, surtout à un stade tardif du développement ovariole (2), l'extraction des ovarioles accompagnées de leurs pédicelles permet, assez facilement, de dénombrer les cycles trophogoniques effectués par la femelle multipare (fig. 10). Nous avons ainsi trouvé jusqu'à cinq cycles chez *Ae. furcifer*.

Chez les *Stegomyia* récoltés en Côte-d'Ivoire, la taille de la relique est assez réduite et les corps jaunes peuvent paraître parfois inexistantes par absence de pigmentation. Il semble rare (chez *Ae. opok*), exceptionnel (chez *Ae. luteocephalus*) ou impossible (chez *Ae. africanus*) d'observer deux ou trois reliques. Ces femelles semblent appartenir à une catégorie dont les pédicelles des ovarioles ne peuvent posséder, sauf exception, plus d'une dilatation, quel que soit le nombre de cycles trophogoniques effectués (*cf.* Discussion).

(2) Les rares femelles dont les ovarioles sont de stade V sont incluses dans la catégorie des femelles pares.

VI. - CHOIX DE LA MÉTHODE

La méthode de Detinova ne demande que la dissection de la femelle, qui se réalise sans difficulté. Elle est ainsi plus simple et plus rapide que celle de Polovodova car, même si elle est composée de deux étapes, l'examen des lames supportant les ovaires asséchés peut se réaliser extemporanément (il doit cependant s'effectuer à l'aide d'un microscope). Mais, par cette méthode, la détermination de l'âge physiologique de certaines femelles pose des problèmes que la technique de Polovodova permet de résoudre, laquelle ne nécessite, par ailleurs, qu'un bon stéréomicroscope (3)

La méthode de Polovodova est plus difficile à exécuter que celle de Detinova, car elle exige la dissection des ovaires et l'isolement des ovarioles, ce qui demande un certain doigté. La dissection des ovaires d'*Aedes* sauvages est cependant facilitée par le nombre d'ovarioles souvent relativement faible (par rapport à celui des ovarioles de *Ae. aegypti* ou de la majorité des *Culex* et des *Anopheles*). Pour être certain de la présence d'une ou de plusieurs reliques folliculaires, il est indispensable d'isoler le pédicelle sans le rompre et de faire l'observation sur plusieurs ovarioles. La facilité et la rapidité d'exécution varient, cependant, en fonction des espèces. La dilacération des ovaires, et surtout l'extraction de l'ovariole accompagné du pédicelle intact, sont plus difficiles à réaliser chez les *Stegomyia* que chez les *Diceromyia*.

Ainsi, par la méthode des trachéoles, l'estimation de l'âge physiologique d'un certain pourcentage de femelles est soit impossible soit incertaine. Ce pourcentage, qui dépend de la composition des populations de femelles agressives (proportions relatives des différents stades de développement des ovarioles) est très variable selon les espèces. Il concerne l'ensemble des espèces de vecteurs, tout en étant particulièrement faible chez *Ae. opok*. Cette dernière a en effet un cycle trophogonique parfaitement régulier et les femelles qui viennent piquer ont, dans pratiquement 100 % des cas, des ovaires dont les ovarioles ne dépassent pas le stade II Jeune (9 femelles sur 1796 disséquées ont eu des ovarioles de stade plus avancé). Ce n'est donc que chez cette espèce que la méthode de Detinova peut être pratiquée avec plein succès.

Pour la détermination de l'âge physiologique de l'ensemble des vecteurs potentiels de fièvre jaune, nous choisissons donc la méthode de Polovodova comme méthode de base. Les résultats que nous avons obtenus nous permettent de proposer, dans certains cas, une méthode d'observation accélérée. En effet, la présence très nette de corps jaunes dans les pédicelles et les oviductes rend rapide la détermination des femelles pares. C'est seulement si l'on recherche des reliques multiples que le temps moyen consacré à chaque femelle s'allonge parfois considérablement (les ovaires devant être alors disséqués minutieusement).

VII. - DÉTERMINATION DE L'ÂGE PHYSIOLOGIQUE DES FEMELLES D'*AEDES* VECTEURS DE FIÈVRE JAUNE

Différentes observations nous ont permis de constater la présence d'un corps jaune parfaitement visible (dans plus de 95 % des cas), *sous éclairage naturel*, chez les femelles pares de *Stegomyia* et de *Diceromyia*. La présence de ce corps jaune s'observe parfois avant même la dissection de l'ovaire (fig. 13). Pour qu'il se confirme, il suffit d'écartier, à l'aide des deux aiguilles montées utilisées pour la dissection de la femelle, les ovarioles les unes des autres. Le corps jaune apparaît alors sous forme d'amas de débris cellulaires, souvent plus denses au niveau des pédicelles qu'à l'intérieur de l'oviducte interne (fig. 14). Ce corps jaune persiste tout au long de l'oogenèse (fig. 16 et 17). Chez les *Ste-*

(3) Un microscope peut être cependant utile quand les corps jaunes sont difficiles à voir.

gomyia, en particulier *Ae. luteocephalus*, le corps jaune est souvent très visible chez la femelle qui a récemment pondu, un peu moins ensuite. Il n'y a que chez *Ae. opok* (parfois chez *Ae. africanus*) que ce corps jaune est peu ou pratiquement pas visible, car faiblement pigmenté. Ceci représente les 5 % de cas où le corps jaune n'est pas parfaitement repérable.

Chez les *Diceromyia*, une fois observée la présence de corps jaune, il est possible de rechercher le nombre de reliques en détachant l'ovariole par étirement. L'amas dense du corps jaune peut alors se révéler être composé de plusieurs parties qui sont autant de reliques (fig. 10).

Méthode à suivre en fonction du stade de développement ovarioleaire (voir tableau)

– *Stade I (II Jeune en partie)*. Si l'on extrait du corps d'une femelle des ovaires gonflés et opaques, c'est que celle-ci vient de pondre. Même en l'absence d'oeufs résiduels, la présence de « sacs » encore remplis de débris provenant des cellules épithéliales folliculaires est évidente, et permet immédiatement de ranger la femelle dans la catégorie des femelles pares (fig. 13). Ceci est valable pour l'ensemble des vecteurs, y compris *Aedes opok*. Une dissection plus approfondie est inutile, puisque le pédicelle en forme de sac (fig. 8 et 14) ne permet pas d'observer de reliques.

Par opposition, si les ovaires sont petits et transparents, il ne peut s'agir que d'une femelle nullipare (fig. 12).

– *Stades II Jeune (en partie), II Moyen et II Agé*. Un certain temps après la ponte, l'ovaire perd son aspect gonflé en raison de la rétraction des sacs de ponte et des oviductes. La dissection de l'ovaire devient alors indispensable pour établir l'âge physiologique.

L'ovaire est tout d'abord étiré en utilisant deux aiguilles montées, piquées l'une à sa base, l'autre à son apex. Une première indication sur l'état physiologique de la femelle est fournie par la consistance de l'ovaire (en fait celle de la membrane ovarienne). Une seconde indication est fournie par l'absence ou la présence de corps jaune.

– Si l'ovaire se déchire aisément et que les oviductes sont transparents, donc dépourvus de corps jaune (fig. 6), la femelle est nullipare.

– Si l'ovaire est facilement étiré sans être rompu et que l'on observe la présence de corps jaune dans les oviductes et surtout à la base des ovarioles, la femelle est pare (fig. 7, 13 et 16). Les ovarioles ne s'isolent qu'après déchirement de la membrane ovarienne qui est élastique.

La recherche des reliques est alors possible quand la femelle est pare, mais chez les *Stegomyia* il est difficile d'obtenir une ovariole avec son pédicelle entier. Celui-ci se rompt souvent au milieu d'une dilatation ou au niveau du calice (fig. 15). On aura affaire à une dilatation si l'on observe la présence de granulations (corps jaune, débris cellulaires de l'épithélium). Dans tous les cas, il est nécessaire d'examiner une série d'ovarioles.

Chez les *Diceromyia*, il est relativement facile d'isoler les pédicelles entiers et de dénombrer les cycles trophogoniques effectués par la femelle. Un problème peut alors apparaître, lié à la présence de « fausses reliques ». Magnarelli (1983) cite ce phénomène de résorption des follicules observé chez certains *Aedes* et mis en évidence aussi chez les *Mansonia*, par Samarawickrema (1962). Ces reliques sont constituées non de débris cellulaires, mais d'un follicule (stade III-IV) en cours de résorption, donc essentiellement de vitellus ; c'est pourquoi l'aspect d'une telle relique est différent de celui d'une relique (fig. 9). Au début de ce phénomène de résorption, il est possible de différencier ces reliques des autres par leur taille, leur aspect et leur quantité au sein de l'ovaire. Il est en

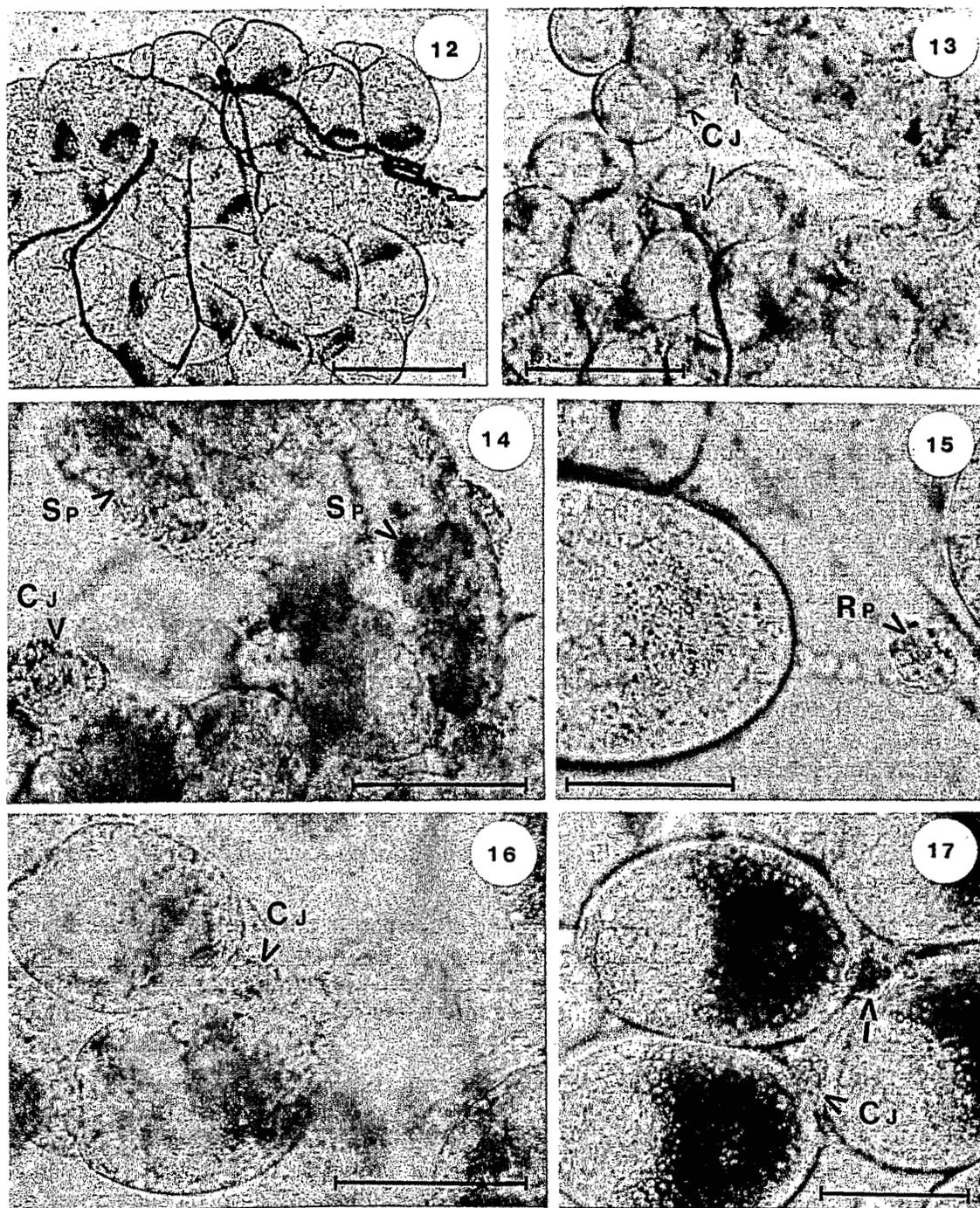


Fig. 12 à 17, *Ae. (Steg.) africanus*. – 12, ovaire de femelle nullipare (stade II Jeune) sans corps jaune. – 13, ovaire de femelle pare (stade II Jeune) avec corps jaune *in situ*. – 14, ovaire d'une femelle pare (stade I), venant de pondre, avec sacs de ponte et corps jaunes *in situ*. – 15, ovariole de stade II Jeune et relique de ponte incomplète, conservant une partie du corps jaune. – 16, ovarioles de stade II Moyen avec corps jaunes *in situ*. – 17, ovarioles de stade II Agé avec corps jaunes *in situ*.
 CJ : corps jaune ; RP : relique de ponte ; SP : sac de ponte. (échelles 12, 13, 14, 16, 17 = 100 μm)
 (échelle 15 = 50 μm)

effet exceptionnel d'observer de telles reliques de résorption dans l'ensemble des pédicelles (4). Par contre, à un stade plus poussé de résorption, il n'est pas toujours possible de différencier reliques de résorption et reliques de ponte sur une ovariole isolée.

– *Stades III et suivants.* La dissection de femelles dont les ovarioles ont dépassé le stade II Agé pour atteindre le stade III ou IV de développement concerne essentiellement les *Diceromyia* (27,9 % des femelles des trois espèces présentes, contre 2,7 % chez les trois espèces de *Stegomyia*). La mise en évidence de reliques reste possible quoique délicate, chez les femelles dont les ovarioles ont atteint le stade III-IV (fig. 11). Nous avons trouvé de telles femelles avec deux et même trois reliques. Enfin, il est parfois possible d'observer *in situ* un corps jaune dans le pédicelle d'ovarioles de stade IV-V.

DISCUSSION

Les observations conduites par Polovodova, puis poursuivies par Detinova, sur certains Anophèles et beaucoup d'autres moustiques, sont de grande portée et ont permis de nombreux travaux entomologiques. La méthode des trachéoles ne peut cependant que rarement être utilisée avec des résultats satisfaisants et, par exemple, Nelson (1966) la déconseille pour la détermination de l'âge physiologique de *Culex tarsalis*. La méthode des dilatations ne peut pas, non plus, s'appliquer systématiquement à toutes les espèces. Chez certaines d'entre elles, quand les femelles possèdent des ovaires de très petite taille, comme *Anopheles triannulatus* (Suarez & Marinkelle, 1980), la dissection est difficile et l'obtention des pédicelles intacts souvent impossible. Chez d'autres comme *An. darlingi*, Charlwood & Wilkes (1979) au Brésil dénombrent jusqu'à 6 dilatations bien visibles. Parfois, il est impossible de dénombrer plus d'une relique même si la femelle est multipare confirmée. Alors que chez *An. gambiae* l'on peut trouver jusqu'à 4 ou 5 dilatations, chez *An. melas*, espèce du même complexe, Giglioli (1965a) n'en trouve qu'une dans la très grande majorité des cas, même chez des femelles infestées de sporozoïtes ce qui indique un âge avancé et au moins 4 ou 5 cycles trophogoniques effectués. Hamon *et al.* (1961) font la même remarque concernant *An. funestus* et *An. nili* (et même *An. gambiae*) et mettent en cause la fragilité du pédicelle, qui pourrait varier en fonction de l'origine géographique des femelles.

Chez certains *Culex*, Rosay (1969) note d'une part la présence possible de dilatations par dégénérescence de follicules chez des femelles n'ayant jamais eu de repas de sang (observé chez *C. tarsalis* par Bellamy & Corbet, 1974) et, d'autre part, la présence de vraies dilatations mais dont le nombre est inférieur à celui des cycles trophogoniques effectués par les femelles.

En ce qui concerne les *Aedes*, Ebsary & Crans (1977) au New Jersey, dénombrent jusqu'à 3 dilatations chez *Aedes sollicitans*; Mokry (1984), à Terre-Neuve, note 4 dilatations chez *Ae. punctator* et *Ae. communis*, 3 chez *Ae. abserratus* et *Ae. canadensis*. Porter & DeFoliart (1985) constatent que, chez des femelles d'élevage de *Ae. triseriatus*, une partie de celles ayant pondu deux fois ne présentent qu'une dilatation du pédicelle au lieu de deux.

Lewis (1958) observe, chez *An. gambiae*, un allongement du pédicelle chez les femelles âgées et Beklemishev *et al.* (1959) notent que la longueur du pédicelle augmente avec le nombre de cycles trophogoniques effectués par les femelles chez lesquelles on observe des reliques multiples. Ce phénomène est également signalé chez *Anopheles*

(4) Ce phénomène peut exister cependant chez les *Diceromyia*, surtout chez les toutes premières femelles apparaissant après la saison sèche (qui peuvent donc être nullipares).

**Tableau dichotomique pour la détermination de l'âge physiologique
des *Aedes* vecteurs de fièvre jaune**

Aspect des ovaires	DILACERATION DES OVAIRES	Consistance de la membrane	Corps jaunes	ISOLEMENT DES OVARIOLES	Nombre de dilatations	Age physiologique
--------------------	--------------------------	----------------------------	--------------	-------------------------	-----------------------	-------------------

I et IIJ (en partie)

petits et translucides	facultative	fragile	0	inutile	-	NULLIPARE (néonate ou jeune femelle)
gonflés et opaques	facultative	élastique	visibles mais informés, épars dans sacs de ponte et oviducte interne	inutile	impossible à déterminer	PARE (vient de pondre)

II Jeune (partie) II Moyen et II Agé

obligatoire	fragile	0	non	-	NULLIPARE
	élastique	+ ou - importants et visibles, concentrés à la base des ovarioles	facultatif chez <i>Stegomyia</i>	1 (*)	PARE
				(2 ou 3)	(MULTIPARE) incertain
			oui chez <i>Diceromyia</i>	1	UNIPARE
				2 à 6	MULTIPARE

III et IV (en partie)

obligatoire	-	0 ?	oui pour confirmation <i>Stegomyia</i> <i>Diceromyia</i>	0	NULLIPARE
	-	difficilement visibles chez <i>Stegomyia</i> souvent très visibles chez <i>Diceromyia</i>	oui	1 au maximum	PARE
				1 (*) (2 ou 3)	PARE (MULTIPARE) incertain

IV (en partie) et V

impossible chez <i>Stegomyia</i>					rangée parmi les PARES
très difficile chez <i>Diceromyia</i>	-	non	très difficile	1	PARE
				0 ?	rangée parmi les PARES
				1 ?	rangée parmi les PARES

œufs

impossible					rangée parmi les PARES
------------	--	--	--	--	------------------------

(*) même chez certaines multipares

farauti, de Nouvelle-Guinée, par Spencer (1974), qui note aussi l'importance de la présence de corps jaune pour la détermination de la parité des femelles. Hamon (1963) relève la présence de granulations pigmentées chez les seules femelles de *An. flavicosta* et *An. nili* parmi les sept espèces courantes au Burkina-Faso. Ces deux phénomènes : allongement du pédicelle avec l'âge et présence de corps jaune, s'observent chez les *Aedes* vecteurs de fièvre jaune, plus particulièrement chez les *Diceromyia* que nous avons disséqués.

Une revue de l'ensemble des méthodes utilisées pour déterminer l'âge physiologique des insectes a été écrite par Tyndale-Biscoe en 1984. En annexe, une liste de 75 moustiques, dont l'âge physiologique a été étudié par la méthode de Detinova ou de Polovodova, inclut 16 *Aedes* mais seulement un vecteur de fièvre jaune : *Ae. simpsoni* (Pajot, 1976). Plusieurs auteurs ont cependant étudié l'âge physiologique de ces vecteurs en Afrique, en utilisant la méthode de Detinova : Cordellier (*op. cit*) pour l'ensemble des vecteurs, Hervé *et al.* (1977) chez *Ae. africanus* et *Ae. opok*. La méthode de Polovodova a été utilisée par d'autres auteurs avec plus ou moins de succès mais leurs études ne concernent aucun *Diceromyia*. Germain *et al.* (1973), au Cameroun occidental, dénombrent jusqu'à 5 reliques chez *Ae. africanus* (mais il a pu y avoir confusion avec une espèce associée, décrite par Huang en 1990 comme *Ae. maxgermaini*). Ils reconnaissent par ailleurs la grande fragilité du pédicelle. Germain *et al.* (1974), en Centrafrique, trouvent chez une femelle d'*Ae. africanus* « au moins trois dilatations ». Toujours en Centrafrique, Pajot (*op. cit*) constate qu'il ne persiste pas de dilatation chez *Ae. simpsoni* après la ponte (au-delà du « stade en sac » du pédicelle), Cornet *et al.* (1975), au Sénégal, ne parviennent pas à compter les reliques chez *Ae. aegypti* et *Ae. vittatus*, sans doute parce qu'elles sont mal individualisées.

Concernant la méthode des reliques, Tyndale-Biscoe (*op. cit*) note le fait que chez des exemplaires d'une même espèce, mais d'origines géographiques différentes, certains auteurs ne trouvent qu'une relique alors que d'autres en dénombrent plusieurs. Sans aller jusqu'à parler de « don », mais sans sous-estimer non plus la capacité individuelle à disséquer, il semble que la structure de l'intima au niveau du pédicelle ait une importance particulière et fasse ainsi, au moins une partie de la différence : plus souple et plus élastique dans un cas que dans l'autre, le pédicelle sera intact (donc porteur éventuel de reliques multiples) ou rompu au moment de l'extraction de l'ovariole (Giglioli, 1965b).

CONCLUSION

Nous avons vu que la méthode des trachéoles n'était guère à conseiller pour l'établissement de l'âge physiologique des *Aedes* vecteurs potentiels de fièvre jaune en Afrique de l'ouest. L'impossibilité de déterminer l'âge avec certitude d'après la forme des pelotons trachéolaires chez certaines femelles, en raison du stade de développement atteint par les ovarioles, est un handicap certain. Par comparaison, la méthode établie ici, dérivée de celle de Polovodova, adaptée aux vecteurs de fièvre jaune, donne un excellent résultat. La simple observation des ovaires pour y noter la présence de corps jaune est très souvent suffisante pour déterminer la parité de la femelle disséquée. La dissection des ovaires n'est donc pas systématiquement nécessaire, celle des ovarioles pour le décompte des reliques n'est intéressante qu'en ce qui concerne les femelles de *Diceromyia*. C'est une méthode qui demande un certain apprentissage mais qui peut se réaliser sur le terrain, à condition d'utiliser un stéréomicroscope de grossissement 75 x (pour les reliques) et, obligatoirement, un éclairage naturel.

L'application satisfaisante de la méthode de Polovodova aux *Aedes* vecteurs potentiels de fièvre jaune a un grand intérêt : celui de permettre la détermination de l'âge physiologique des populations de *Diceromyia*, vecteurs sauvages très impliqués dans l'épidémiologie de la fièvre jaune partout où ils sont présents en Afrique.

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une étude sur la biologie et l'écologie des vecteurs potentiels de fièvre jaune en Côte-d'Ivoire. Son financement a été assuré par l'ORSTOM et l'Institut Pasteur de Côte-d'Ivoire. Ma gratitude va à Messieurs les Directeurs, notamment M. le Professeur A. Ehouman, Directeur de l'IPCI, pour les facilités de travail dont il nous a toujours fait bénéficier. C'est grâce à M. R. Cordellier, Chef de l'Unité de Recherche "Arboviroses et fièvres hémorragiques" de l'ORSTOM, que ce travail a vu le jour et est arrivé à son terme. Je le remercie particulièrement pour le soutien et l'aide qu'il m'a toujours apportés au cours de ces années.

LITTERATURE CITEE

- BEKLEMISHEV W.N., DETINOVA T.S. & POLOVODOVA V.P., 1959. – Determination of physiological age in Anophelines and of age distribution in Anopheline populations in the USSR. – *Bulletin of the World Health Organization*, **21** : 223-232.
- BELLAMY R.E. & CORBET P.S., 1974. – Occurrence of ovariole dilatations in nulliparous mosquitoes. – *Mosquito News*, **34** : 334-335.
- CHARLWOOD J.D., RAFAEL J.A. & WILKES T.J., 1980. – Métodos de determinar a idade fisiológica em Diptera de importância médica. Uma revisão com especial referência aos vetores de doenças na América do Sul. – *Acta Amazonica*, **10** : 311-333.
- CHARLWOOD J.D. & WILKES T.J., 1979. – Studies on the age-composition of samples of *Anopheles darlingi* Root (Diptera : Culicidae) in Brazil. – *Bulletin of Entomological Research*, **69** : 337-342.
- CHRISTOPHERS S.R., 1960. – *Aedes aegypti* (L.). The yellow fever Mosquito ; its life history, bionomics and structure. Cambridge University Press, U.K., 739 pp.
- CLEMENTS A.N. & BOOCOCK M.R., 1984. – Ovarian development in mosquitoes : stages of growth and arrest, and follicular resorption. – *Physiological Entomology*, **9** : 1-8.
- CORDELLIER R., 1978. – Les vecteurs potentiels sauvages dans l'épidémiologie de la fièvre jaune en Afrique de l'ouest. – *Travaux et Documents de l'O.R.S.T.O.M., Paris*, **81** : 258 pp.
- CORNET M., CHATEAU R., VALADE M., DIENG P.L., RAYMOND H. & LORAND A., 1978. – Données bio-écologiques sur les vecteurs potentiels du virus amaril au Sénégal oriental. Rôle des différentes espèces dans la transmission du virus. – *Cahiers O.R.S.T.O.M., série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **16** : 315-341.
- CORNET M., RAYMOND H. & DIENG P.Y., 1975. – Etudes sur les vecteurs sylvatiques du virus amaril. Essai de mise en évidence de la survie de femelles en saison sèche dans un foyer endémique au Sénégal Oriental. – *Cahiers O.R.S.T.O.M., série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **13** : 215-222.
- DETINOVA T.S., 1963. – Méthodes à appliquer pour classer par groupes d'âge les Diptères présentant une importance médicale, notamment certains vecteurs du paludisme. – *O.M.S. Série de Monographies*, **47** : 220 pp.
- EBSARY B.A. & CRANS W.J., 1977. – The physiological age structure of an *Aedes sollicitans* population in New Jersey. – *Mosquito News*, **37** : 647-653.
- GERMAIN M., EOUZAN J.P., FERRARA L. & BUTTON J.P., 1973. – Données complémentaires sur le comportement et l'écologie d'*Aedes africanus* (Theobald) dans le nord du Cameroun occidental. – *Cahiers O.R.S.T.O.M., série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **11** : 127-146.
- GERMAIN M., HERVE J.P. & GEOFFROY B., 1974. – Evaluation de la durée du cycle trophogonique d'*Aedes africanus* (Theobald), vecteur potentiel de fièvre jaune, dans une galerie forestière du sud de la République Centrafricaine. – *Cahiers O.R.S.T.O.M., série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **12** : 127-134.
- GIGLIOLI M.E.C., 1965a. – The age-composition of *Anopheles melas* Theobald (1903) populations collected simultaneously by different methods in the Gambia, West Africa. – *Cahiers O.R.S.T.O.M., série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **3-4** : 11-26.
- 1965b. – The problem of age determination in *Anopheles melas* Theo. 1903, by Polovodova's method. – *Cahiers O.R.S.T.O.M., Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **3-4** : 157-177.
- GILLIES M.T., 1958. – A modified technique for the age-grading of populations of *Anopheles gambiae*. – *Annals of tropical Medicine and Parasitology*, **52** : 261-273.
- HAMON J., 1963. – Etude de l'âge physiologique des femelles d'*Anophèles* dans les zones traitées au DDT, et non traitées, de la région de Bobo-Dioulasso, Haute-Volta. – *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, **28** : 83-109.
- HAMON J., CHAUVET G. & THELIN L., 1961. – Observations sur les méthodes d'évaluation de l'âge physiologique des femelles d'*anophèles*. – *Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé*, **24** : 437-443.
- HERVE J.P., GERMAIN M. & GEOFFROY B., 1977. – Bioécologie comparée d'*Aedes (Stegomyia) opok* Corbet et Van Someren et *A. (S.) africanus* (Theobald) dans une galerie forestière du sud de l'Empire Centrafricain. II. Cycles saisonniers d'abondance. – *Cahiers O.R.S.T.O.M., série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **15** : 271-281.

- HUANG Y-M, 1990. – The subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in the afrotropical region. I. The *africanus* group of species (Diptera : Culicidae). – *Contributions of the American Entomological Institute*, **26** : 1-89.
- LEWIS D.J., 1958. – The recognition of nulliparous and parous *Anopheles gambiae* by examining the ovarioles. – *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **52** : 456-461.
- MAGNARELLI L.A., 1983. – Resorption of retained eggs and follicular degeneration in mosquitoes (Diptera : Culicidae). – *Journal of Medical Entomology*, **20** : 106-107.
- MOKRY J., 1984. – Studies on Newfoundland *Aedes* mosquitoes with reference to their reproductive and vector potentials. – *Mosquito News*, **44** : 221-227.
- NELSON R.L., 1966. – A comparison of two techniques for distinguishing parous from nulliparous *Culex tarsalis* Coquillett. – *Mosquito News*, **26** : 11-13.
- PAJOT F.X., 1976. – Aspects physiologiques impliqués dans l'étude écologique des femelles d'*Aedes (Stegomyia) simpsoni* (Theobald, 1905) (Diptera : Culicidae) : âge physiologique, cycle gonotrophique, fécondité, longévité. – *Cahiers O.R.S.T.O.M., Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, **14** : 271-291.
- PEÑA DE GRIMALDO E., 1959 – Age determination in *Aedes aegypti*. – *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **53** : 6.
- PORTER C.H. & DEFOLIART G.R., 1985. – Gonotrophic age, insemination, and *Ascogregarina* infection in a southern Wisconsin population of *Aedes triseriatus*. – *Journal of the American Mosquito Control Association*, **1** (2) : 238-240.
- ROSAY B., 1969. – Anatomical indicators for assessing age of mosquitoes : changes in ovarian follicles. – *Annals of the Entomological Society of America*, **62** : 605-611.
- SAMARAWICKREMA W.A., 1962. – Changes in the ovariole of *Mansonia (Mansonioides)* mosquitoes in relation to age determination. – *Annals of the Tropical Medicine and Parasitology*, **56** : 110-126.
- SPENCER M., 1974. – A simple field method for assessing the proportion of older parous females in an anopheline sample (*Anopheles farauti*). – *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **68** : 15.
- SUAREZ M.F. & MARINKELLE C.J., 1980. – Parous rates for sylvatic *Anopheles* mosquitoes in two areas of Colombia S.A. – *Mosquito News*, **40** : 637-640.
- TYNDALE-BISCOE M., 1984. – Age-grading methods in adult insects : a review. – *Bulletin of Entomological Research*, **74** : 341-377.