

## SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
GÉNÉRALITES .....	3
I. SYSTÉMATIQUE ET BIO-ÉCOLOGIE DES PRINCIPAUX GENRES .....	3
I.1. SYSTÉMATIQUE .....	3
I.2. BIO-ÉCOLOGIE .....	4
I.2.1. Les Aèdes .....	4
I.2.2. Les Anophèles.....	5
I.2.3. Les Culex .....	5
II. CYCLE DE DÉVELOPPEMENT ET BIOLOGIE DES DIFFÉRENTS STADES ....	6
II.1. Les œufs .....	6
II.2. Les larves et les nymphes .....	7
II.3. Les adultes .....	7
III. SYSTÈME REPRODUCTEUR DES MOUSTIQUES.....	8
III.1. Appareil génital mâle .....	8
III.1.1. Appareil génital mâle externe .....	8
III.1.2. Appareil génital mâle interne .....	8
III.1.2.1. Les testicules .....	8
III.1.2.2. Les vésicules séminales.....	8
III.2.3. Les glandes annexes .....	9
III.2. Appareil génital femelle .....	9
III.2.1. Les ovaires.....	9
III.2.2. Les spermathèques .....	9
III.2.3. La glande spermathècale .....	9
III.2.4. La bourse copulatrice .....	9
Première partie : Étude de l'influence de certains facteurs écobiologiques sur le développement des stades préimaginaux des moustiques (Diptera : Culicidae).....	10
INTRODUCTION.....	10
I. MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	10
I.1. MATÉRIEL .....	10
I.2. MÉTHODES .....	11
A. Récolte.....	11
B. Élevage .....	11
1. Nutrition des larves .....	11
2. Nutrition des adultes.....	12
3. Étude de la température.....	12
4. Étude de la résistance à la dessiccation .....	13
5. Choix des surfaces de ponte .....	13
6. Étude de la fécondité des femelles .....	14
a. Élevage des moustiques.....	14
b. Détermination de la longueur du premier cycle trophogénique.....	14

II. RÉSULTATS.....	15
II.1. Température.....	15
II.2. Résistance à la dessiccation.....	17
II.3. Choix des surfaces de ponte .....	18
II.4. Fécondité des femelles.....	19
Observations .....	20
a. Période de préoviposition.....	20
b. Période d'oviposition .....	20
III.DISCUSSION .....	22
CONCLUSION .....	26
 <u>Deuxième partie</u> : Étude structurale de quelques aspects de la gaméto-génèse chez les moustiques (Diptera : Culicidae).....	27
 INTRODUCTION.....	27
 I. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	27
I.1. MATÉRIEL .....	27
I.2. MÉTHODES .....	28
A. Récolte et élevage des moustiques .....	28
B. Repas sanguin .....	28
C. Extraction des gonades .....	28
 MICROSCOPIE PHOTONIQUE .....	29
1. Fixation.....	29
2. Inclusion à la paraffine .....	29
2.1. Déshydratation .....	29
2.2. Imprégnation .....	30
2.3. Inclusion .....	30
3. Tailles des blocs et coupes .....	30
4. Étalement et collage .....	31
5. Coloration.....	31
5.1. Déparaffinage et réhydratation.....	31
5.2. Coloration.....	31
5.3. Déshydratation .....	32
6. Coloration à l'orcène acétique .....	32
 II. RÉSULTATS DE LA MICROSCOPIE PHOTONIQUE .....	33
II.1. Gaméto-génèse mâle .....	33
II.2. Gaméto-génèse femelle.....	34
II.2.1. Les différents stades de l'ovogénèse .....	34
II.2.1.1. Prévitellogenèse .....	34
II.2.1.2. Vitellogenèse .....	34
II.2.1.3. Postvitellogenèse .....	37
 III. DISCUSSION .....	41

CONCLUSION .....	45
CONCLUSION GÉNÉRALE .....	46
PERSPECTIVES.....	47
REFFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	49

## AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué au laboratoire de Biologie de la Reproduction (L.B.R.) dirigé par le Professeur Omar Thiom THIAW, dans l'Unité d'Entomologie de Richettsiologie de Bactériologie et de Virologie (U.E.R.B.V.) dirigée par Monsieur Mady NDIAYE, Maître de Conférences au Département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences et Technique de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar.

Au terme de ces premières années d'initiation à la recherche, je souhaite exprimer ma reconnaissance à toutes les personnes qui ont contribué à l'élaboration de ce document.

Pour la partie Scientifique de ce travail, je dois une profonde reconnaissance à mon maître, Monsieur Mady NDIAYE, Maître de Conférences au département de Biologie Animale de la Faculté des Sciences et Techniques. Je vous remercie tout particulièrement pour m'avoir initier à la recherche. J'ai passé deux années dans votre Unité, pendant lesquelles vous avez eu la lourde et noble tache de m'introduire à la recherche. J'ai appris, à votre contact, à faire miennes des qualités essentielles. Vous avez dirigé ce travail avec rigueur et patience. Votre simplicité, votre sens élevé des rapports humains et votre courtoisie m'ont beaucoup marqué. J'ai pu apprécier, à sa juste valeur, votre grande humanité. Je vous remercie pour votre disponibilité, pour vos conseils, et pour la confiance que vous m'avez accordée tout au long de ces années.

Au Dr. Massamba SYLLA, Chercheur à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), je lui exprime toute ma gratitude pour avoir répondu favorablement à mes différentes sollicitations et pour avoir accepter de juger ce travail.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Lassana KONATE, Maître Assistant au département de Biologie Animale. C'est un honneur pour moi de vous compter parmi nos juges. Nous avons apprécié vos éminentes qualités humaines, d'homme de Science et d'enseignant. Votre commentaire et vos suggestions sur ce travail seront les bienvenus.

Je tiens a remercier vivement le Docteur Cheikhna DIABAKHATE d'avoir accepter de participer à ce jury. Depuis ses cours de Travaux Pratiques et dirigés de la première année, il a su me transmettre sa curiosité scientifique. Je lui suis reconnaissant pour l'intérêt qu'il a toujours porté à mon travail, et pour ses encouragements répétés au cours de ces années.

Je ne voudrais oublier mes aînés chercheurs et collègues du laboratoire dont les suggestions m'ont permis d'améliorer ce document, en particulier : Messieurs Fawrou SEYE, Raymond Demba NDIONE, Mamour TOURE, Mamina DAFE, Babacar SEMBENE, Mamadou Lamine DJIBA, Mamadou KELLY, Mame Birame BASSE et Madame Anne Marie NDIAYE SARR.

Je tiens également à remercier tout le personnel technique du département de Biologie Animale. Votre aide a été d'un apport déterminant dans la réussite de ce travail. Je vous témoigne ici toute ma reconnaissance, particulièrement à MM. Daouda DIOUF, Doudou NGOM, Mohamed MBENGUE, Mme. MBENGUE, Michel SARR, Ibrahima DIOUF, Edouard COLY, Emmanuel COLY. J'associe à ces remerciements Mme Rokhaya DIOUF SENGHOR, secrétaire du département de Biologie Animale, pour sa sympathie envers moi.

A tous mes camarades promotionnaires, plus particulièrement à mon frère et ami Saliou NIASSY, je vous remercie de vos encouragements répétés.

A tous ceux qui ont, de près ou de loin, consciemment ou inconsciemment, contribué à ce mémoire, je leur témoigne mes remerciements sincères, ma reconnaissance et ma gratitude.

# INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les moustiques sont des diptères nématocères appartenant à la famille des Culicidae. Ils sont très communs dans les écosystèmes terrestres et sont répartis un peu partout dans le monde à l'exception des régions polaires. Ils forment l'un des groupes de vecteurs le plus important en santé publique humaine et/ou animale. Leur importance parasitologique vient du fait qu'ils sont impliqués dans la transmission de nombreuses maladies ; paludisme (*Anopheles*), fièvre jaune, dengue, fièvre hémorragique de la vallée du Rift, de nombreuses encéphalites arbovirales (*Aedes*), filariose lymphatiques (*Culex*). Aussi, de nouvelles maladies transmises par les moustiques apparaissent alors que d'autres qui étaient supposées disparues réémergent (chikungunya).

En plus de leur rôle dans la transmission d'agents pathogènes, il convient d'ajouter leur impact économique considérable en santé publique.

Depuis l'avènement du dichlorodiphénytrichloroéthane (DDT), la plupart des efforts pour le contrôle des vecteurs se sont concentrés sur les moustiques adultes. Ainsi, la recherche sur la bio-écologie larvaire et sur la reproduction des moustiques vecteurs de malaria en Afrique et des autres culicidés a été en grande partie négligée. Comme conséquence, beaucoup de choses restent inconnues à propos de l'habitat, de l'abondance, de la distribution et des mécanismes d'adaptation des larves des principaux moustiques vecteurs.

Récemment, alors que des progrès considérables vers la compréhension des stades préimaginaux des culicidés ont été faits (Gimnig *et al.*, 2001, 2002 ; Bøgh *et al.*, 2003 ; Keating *et al.*, 2003 ; Koenraadt *et al.*, 2003), la recherche sur la biologie et sur l'écologie des larves de moustiques reste encore limitée.

L'étude des phénomènes de reproduction chez les insectes en général et des moustiques en particulier a intéressé de nombreux chercheurs depuis ces dernières années.

Christophers (1911) fut l'un des tous premiers à étudier la structure et le développement des organes génitaux femelles des moustiques. En 1949, Polovodova observe les modifications du tractus génital femelle en rapport avec l'âge des moustiques. Il propose alors une méthode d'estimation de l'âge physiologique qui, permet en outre, de distinguer aisément les femelles pares des nullipares. Clements (1956) montre que le développement des ovaires est sous contrôle hormonale chez les moustiques.

L'anatomie de l'appareil génital femelle et les mécanismes de l'ovulation chez *Anopheles melas* ont été décrits par Giglioli (1963). En 1992, Clements établit une synthèse des connaissances sur la reproduction des moustiques.

A l'opposé, la gamétogenèse femelle est peu étudiée. L'ultrastructure de l'ovogenèse des moustiques n'a été investie que par quelques auteurs Ndiaye (1996) ; Soumaré & Ndiaye (2004). Auparavant la seule étude retrouvée, est celle de Lu & Hagedorn (1986) chez *Anopheles albimanus*. Quant à la spermatogenèse, elle reste le champ le moins investi dans l'étude des phénomènes de reproduction chez les moustiques. Ndiaye & Mattei, 1993 ; Ndiaye *et al.*, 1996, 1997) sont parmi les tous premiers à étudier en microscopie photonique et électronique l'appareil génital mâle et la spermatogenèse chez les moustiques. Il ressort de ces constats que, la gamétogenèse mâle et femelle des moustiques est un champ d'étude qui reste à investir.

Ces raisons, alliées au fait que les moustiques constituent un modèle biologique pratique dans l'étude de la gamétogenèse chez les insectes, motivent l'étude de quelques facteurs influençant la bio-écologie ainsi que certains aspects de la gamétogenèse chez les moustiques. La présente étude est composée de deux parties.

Dans la première partie, nous étudierons l'influence de certains facteurs écobiologiques (température, humidité et la nature de l'eau) sur le cycle de développement des stades préimaginaux des culicidés. Dans la seconde partie, nous étudierons en microscopie photonique certains aspects de la gamétogenèse chez les moustiques.

# GÉNÉRALITÉS

Les moustiques sont des insectes qui à l'état adulte ont une seule paire d'ailes antérieures membraneuses fonctionnelles à l'instar des diptères. La paire postérieure est représentée par deux courts moignons appelés « balanciers ou altères » qui sont des organes sensoriels. Les stades préimaginaux des moustiques sont aquatiques alors que les adultes ont une vie aérienne. L'alternance, au cours du cycle de vie de l'insecte, de deux morphologies et de deux biologies bien différentes (l'une larvaire et l'autre imaginaire) est liée au développement holométabole (métamorphose complète).

## I. SYSTÉMATIQUE ET BIO-ÉCOLOGIE DES PRINCIPAUX GENRES

### I.1. SYSTÉMATIQUE

On divise généralement la famille des culicidae en se basant sur différents critères morphologiques visibles tant au niveau des œufs que des stades larvaire et imaginal. Mattingly, 1971 cité par Rhodain *et al.*, 1985 subdivise la famille des Culicidae en 3 Sous-familles : Anophelinae, Culicinae et Toxorhynchitinae. Cependant, en 1980, Roth classe les Dixinae et les Chaoborinae parmi les Culicidae. Les rapports phylogénétiques entre les familles de l'infra-ordre des Culicomorpha ont été étudiés en systématique moléculaire. Ainsi, la subdivision traditionnelle des Culicomorpha en deux super-familles : Culicoidea (Culicidae, Chaoboridae, Corethrellidae et Dixidae) et Chironomidea (Chironomidae, Ceratopogonidae, Simuliidae, Thaumaleidae) a été revisitée par Pawlowski *et al.*, 1996. Il précise alors que même si les rapports entre Culicidae, Chaoboridae et Corethrellidae sont clairement confirmés, les Dixidae, traditionnellement classés parmi les Culicoidea, n'ont pas été reconsidérés dans ce groupe. La classification de la famille des Culicidae a été examinée sur la base d'une analyse phylogénétique par Harbarch & Kitching en 1998. Ils établissent que la sous-famille des Anophelinae de même que les tribus des Culicini et Sebathini sont monophylétiques. Les Aedini formant un ensemble paraphylétique et sont en association avec les Mansoniini qui sont monophylétiques. Ils subdivisent la sous-famille des Culicinae en deux groupes, les Aedini et les Mansoniini d'une part, les Culicini et les Sebathini d'autre part. Le genre *Toxorhynchites* de la sous-famille des Toxorhynchitinae descend au statut de tribu.

## I.2. BIO-ÉCOLOGIE

Les moustiques adultes se nourrissent de sucs sucrés d'origine végétale. Cependant les femelles, de la plupart des espèces de culicidés, sont hématophages. Le régime hématophage entraîne, pour les femelles, la nécessité de rechercher un hôte convenable, ce qui favorise leur dispersion à partir du gîte d'origine. Les hôtes des moustiques peuvent être des mammifères, des oiseaux, des reptiles ou des batraciens. Les préférences trophiques sont extrêmement variables d'une espèce culicidienne à une autre. Certains moustiques apparaissent très stricts à cet égard et ne se gorgent que sur un petit nombre d'espèces de vertébrés proches les unes des autres. D'autres, au contraire s'attaquent à un éventail très large d'hôtes potentiels parfois très éloignés les uns des autres. On peut alors distinguer des espèces anthropophiles, simiophiles, ornithophiles etc. L'importance épidémiologique de ces préférences trophiques plus ou moins larges et les échanges d'agents pathogènes qu'elles permettent sont évidents. Suivant que la rencontre de l'hôte est facile ou difficile, la dispersion active des femelles est plus ou moins large. Ainsi, un moustique comme *Aedes aegypti*, s'il est anthropophile et urbain, ne parcourt guère plus de 300 ou 400m dans sa vie alors que d'autres espèces (*Anopheles funestus*), peuvent être amenées à franchir plusieurs dizaines de kilomètres.

L'ensemble des processus qui débutent par la recherche d'un hôte, se poursuivant par la prise du repas sanguin, puis par la digestion concomitante au développement des ovocytes et se termine par la ponte, est connu sous le nom de cycle trophogonique. Après la ponte, la femelle se met en quête d'un nouvel hôte et le cycle recommence. La durée du cycle trophogonique pour la plupart des espèces de moustiques est généralement de trois à cinq jours chez les femelles nullipares et deux à trois jours chez les femelles pares (Rodhain et al., 1985).

### I.2.1. Les Aèdes

Les Aèdes, sont pour la plupart des espèces sténotopes, c'est-à-dire les larves se déplacent habituellement dans des gîtes naturels de petite taille : creux d'arbres (*Aedes africanus*), tiges de bambous, aisselles des feuilles engainantes (*Aedes simpsoni*). Les larves sont aussi adaptées dans des gîtes artificiels : récipients de stockage d'eau, vieux pneus etc. La bio-écologie des imagos est également variée. *Aedes aegypti*, très domestique et anthropophile abonde dans les villages et les villes.

La présence des gîtes larvaires est fonction de la disponibilité en eau. Suivant les situations, par rapport aux habitations, on peut les classer en gîtes para domestiques et en gîtes sauvages.

### I.2.2. Les Anophèles

Chez les Anophèles, les gîtes larvaires sont presque toujours des collections d'eau calme (les larves sans siphon se noient facilement dans les eaux agitées). Ces gîtes larvaires sont peu profonds et ensoleillés : mares permanentes ou temporaires, anses calmes des rivières, bords des lacs, empreintes de pas. Les larves d'*Anopheles gambiae* et d'*Anopheles arabiensis* peuvent se rencontrer aussi dans d'autres gîtes, mais de façon inhabituelle. Elles ne se rencontrent pas en principe dans les eaux fortement ombragées, à courant rapides, alcalines ou polluées. Certaines espèces se développent préférentiellement dans les eaux salées ou saumâtres (*Anopheles melas*), alors que d'autres se montrent au contraire très sensibles aux sels (*Anopheles funestus*). Les larves se nourrissent de micro-organismes de surface.

L'agressivité des femelles est presque toujours nocturne, et les hôtes sont toujours des vertébrés homéothermes. Beaucoup d'espèces vectrices de paludisme sont en outre, endophiles.

### I.2.3. Les Culex

Les Culex ont des gîtes larvaires, surtout constitués par des mares permanentes ou temporaires, des terrains inondés ou les cultures irriguées, les bords des rivières. Certains Culex abondent dans des gîtes domestiques (réceptacles de stockage d'eau, pneus) ou même en milieu urbain, dans les eaux très polluées.

La même variété s'observe au niveau des préférences trophiques des nombreuses espèces de ce genre : beaucoup piquent les oiseaux ou les mammifères ; d'autres sont anthropophiles, certains, très domestiques, ayant un comportement très endophile (*Culex pipiens fatigans*). Ce genre comporte de nombreux vecteurs de filarioses lymphatiques, ainsi que d'arboviroses (Rodhain *et al.*, 1985).

## II. CYCLE DE DÉVELOPPEMENT ET BIOLOGIE DES DIFFÉRENTS STADES

### II.1. Les œufs

Les diptères culicidae sont des insectes ovipares. Les œufs sont toujours pondus sur surface humide ou sur eau. Après la ponte, ces œufs peuvent rester isolés (*Aedes*, *Anopheles*), regroupés en amas qui peut être flottant en forme de petit radeau ou barquette (*Culex*), ou fixés sur un support (*Mansonia*). D'après Rodhain et al., 1985, le nombre d'œufs composant une ponte est de l'ordre de 100 à 400 œufs et la durée des stades ovulaires est de 2 à 3 jours lorsque les conditions sont favorables à l'éclosion. La fécondité totale d'une femelle varie entre 800 et 2500 œufs. Selon l'espèce et la période de l'année, l'éclosion se produit après quelques heures ou est plus ou moins retardée, parfois de plusieurs mois (Rodhain et al., 1985).

Les œufs des Aèdes disposent d'une grande faculté de résistance au dessèchement. Selon Geiry et al., 1949, si normalement dans la nature ou dans les conditions expérimentales, le milieu humide, sur lequel l'œuf est déposé, dessèche, le développement embryonnaire continue sous l'enveloppe de l'œuf sans interruption. La jeune larve est alors formée au bout de 72 heures. A condition que le degré d'humidité de l'atmosphère ne descende pas au dessous de 70 %, l'organisme larvaire peut résister au dessèchement pendant plusieurs mois.

Les œufs des Anophèles sont pondus un à un et flottent à la surface de l'eau. Ils sont peu résistants à la dessiccation, à la chaleur ou au froid (Rodhain et al., 1985). D'après Beier et al., 1990, les œufs des anophèles peuvent survivre pendant 12 à 16 jours dans des conditions de sécheresse.

Les œufs des Culex sont organisés en radeau (barquette) et ont une coloration sombre. Cette coloration est acquise peu de temps après la ponte. La formation de barquette est due aux propriétés de chimiotactisme des œufs. Lorsque les conditions sont favorables, l'éclosion a lieu au bout de quelques heures seulement (NDiaye, 1996).

## II.2. Les larves et les nymphes

On distingue généralement quatre stades larvaires de morphologie semblable, hormis la taille. Ces différents stades larvaires sont successifs et séparés par des mues. Les larves et les nymphes sont aquatiques.

La durée d'évolution des stades aquatiques des culicidés est étroitement liée à l'action de multiples facteurs entre autre la température, la nourriture, la surpopulation, le pH de l'eau. La durée des quatre stades larvaires est habituellement de 8 à 12 jours lorsque les conditions de température sont favorables (20 à 30°C). C'est au début du quatrième stade que les exigences en nourriture des larves sont plus grandes. La dernière mue transforme la larve de quatrième stade en nymphe.

Cette nymphe, également aquatique, est mobile et ne se nourrit pas durant toute la durée de ce stade : généralement un à trois jours. Le stade nymphal est un stade de transition où le métabolisme du moustique est plus actif. Durant ce stade, l'insecte subit de profondes transformations morphologiques et physiologiques qui l'amènent du stade larvaire, aquatique et microphage, à la forme adulte aérienne et habituellement hématophage chez les femelles. Ce phénomène appelé émergence dure environ quinze minutes durant lesquelles l'insecte se trouve exposé et sans défense (Rodhain *et al.*, 1985).

## II.3. Les adultes

On peut distinguer le cas des mâles de celui des femelles :

- Mâles : leur longévité est relativement faible. Sur le plan épidémiologique, leur seule importance est de participer à la reproduction en fécondant les femelles.

- Femelles : leur longévité dans la nature est difficile à apprécier. En raison de leur rôle médical, les moustiques femelles ont fait l'objet de plusieurs recherches éco physiologiques. Les femelles de la plupart des espèces ont un régime surtout hématophage. Les substances résultant de la digestion du sang absorbé sont utilisées en partie pour la nutrition, mais surtout pour assurer la maturation des œufs. Le repas sanguin conditionne donc la ponte.

Dans la plupart des cas, les femelles à l'état libre ne s'accouplent qu'une seule fois et conservent les spermatozoïdes dans les spermathèques.

Par la suite, l'alternance des repas de sang et de ponte se poursuivra jusqu'à la mort de l'insecte.

Plus complexe est l'approche de l'activité nycthémérale, appréciée généralement par le rythme d'agressivité dans les vingt quatre heures. La plupart des espèces accusent un ou plusieurs pics d'agressivité bien précis, généralement crépusculaire ou nocturne.

### **III. SYSTÈME REPRODUCTEUR DES MOUSTIQUES**

#### **III.1. APPAREIL GÉNITAL MÂLE**

L'appareil génital mâle des moustiques comporte deux parties : une partie interne et une partie externe.

##### **III.1.1. L'appareil génital mâle externe :**

Il est constitué par les pièces copulatrices ou genitalia. Il est constitué d'une paire de coxites entourant le pénis. Chaque coxite est formé d'une pièce basale ou gonocoxite surmontée du style qui porte une épine terminale.

##### **III.1.2. L'appareil génital mâle interne :**

Il est constitué de deux testicules qui aboutissent à deux vésicules séminales par deux longs spermiductes. Deux glandes annexes très volumineuses s'associent aux vésicules séminales au niveau où elles confluent avec le canal éjaculateur.

###### **III.1.2.1. Les testicules :**

Les testicules sont de taille variable. Les plus petits sont généralement rencontrés chez les moustiques de genres *Culex*, *Anopheles* et *Aedes*, à l'exception de *Aedes mariae* (1200µm), *Culex tigripes* (500-600µm) et *Toxorhynchites brevipalpis* (600-700µm). Les testicules passent successivement par une phase d'immaturité, de maturité et de sénescence sexuelle. Les cystes sont organisés perpendiculairement au grand axe du testicule (NDiaye, 1996).

###### **III.1.2.2. Les vésicules séminales :**

Chaque vésicule séminale mesure entre 300 et 400µm avec un diamètre d'environ 50 et 100µm. La paroi des vésicules séminales a la même structure que celle des testicules. Chez les moustiques mâles fonctionnels, les vésicules séminales sont remplies de spermatozoïdes (NDiaye, 1996).

### **III.1.2.3. Les glandes annexes :**

Elles ont chacune une longueur qui varie entre 600 et 800 $\mu$ m pour un diamètre entre 300 et 400 $\mu$ m. Les cellules qui reposent sur une lame basale contiennent de nombreux granules de sécrétion et un noyau situé à la base. Au niveau de la région postérieure de la glande, des spermatozoïdes sont présents parmi les granules de sécrétions (NDiaye, 1996).

## **III.2. APPAREIL GÉNITAL FEMELLE**

L'appareil génital femelle des moustiques est composé de deux ovaires, d'une ou trois spermathèques, d'une glande spermathècale et d'une bourse copulatrice qui s'ouvre au niveau du cloaque.

### **III.2.1. Les ovaires :**

Chaque ovaire renferme des ovarioles au sein desquels se développent des cellules germinales. Les canaux des ovarioles débouchent dans un oviducte latéral. Les oviductes latéraux confluent en un oviducte impair qui aboutit au cloaque. Chaque ovariole contient à son apex un germarium suivi d'un prévitellarium et d'un vitellarium.

### **III.2.2. Les spermathèques :**

Les spermathèques sont de petites sphères d'aspect sombre, localisées dans le dernier segment et au dessus de l'oviducte commun. Dans la plupart des cas, le nombre de spermathèques est de trois à l'exception du genre *Anopheles* où il n'en existe qu'une (NDiaye, 1996).

### **III.2.3. La glande spermathècale :**

La glande spermathècale se situe postérieurement par rapport aux spermathèques. Cette glande est d'un aspect claire et ses dimensions varient en fonction de l'activité physiologique de l'insecte. Ainsi, pendant la période d'activité reproductive, la taille augmente (NDiaye, 1996).

### **III.2.4. La bourse copulatrice :**

La bourse copulatrice constitue une poche légèrement allongée, située au dessus des spermathèques et qui s'ouvre directement dans le cloaque.

## **PREMIERE PARTIE :**

### **ÉTUDE DE L'INFLUENCE DE CERTAINS FACTEURS ÉCOBIOLOGIQUES SUR LE DEVELOPPEMENT DES STADES PRÉIMAGINAUX DES MOUSTIQUES**

#### **INTRODUCTION**

Les moustiques représentent parmi les insectes, le groupe de vecteurs de parasites le plus important et le plus étudié. Au cours de l'évolution, les moustiques sont parmi les organismes qui ont su développer diverses stratégies comportementales et physiologiques afin de s'adapter à leur environnement. La diversité des modes de reproduction, leurs grandes capacités reproductives et la complexité des mécanismes physiologiques qui leurs sont associées sont à l'image de ces adaptations.

La bio-écologie des moustiques est très variable d'un genre à un autre, d'une espèce à une autre. Dans la plupart des cas, les recherches concernant les moustiques se sont limitées aux adultes. Elles concernent le plus souvent les phénomènes épidémiologiques. L'étude de l'influence de certains facteurs environnementaux comme la température de l'eau, l'humidité, la compétition pour la nourriture, sur le développement des stades larvaires a été le plus souvent négligée (Bayoh & Lindsay, 2003 ; Koenraadt *et al.*, 2003)

Dans cette première partie nous proposons d'évaluer, le temps de développement des stades préimaginaux des moustiques pour différentes valeurs de la température et la résistance des larves à la dessiccation du substrat. De plus, le choix des surfaces de ponte de même que la fécondité des femelles chez *Aedes aegypti* sera étudié.

#### **I. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

##### **I.1. MATÉRIEL**

Le matériel animal que nous avons utilisé est constitué de quatre espèces de moustiques:

*Aedes aegypti*

*Anopheles gambiae* ssp

*Culex quinquefasciatus*

*Culex tigripes*

## I.2. MÉTHODES

### A. Récolte

Les différentes espèces utilisées ont été récoltées sous forme d'œufs, de larves, de nymphes ou d'imagos. Les récoltes sont faites soit dans les bacs se trouvant dans l'animalerie du Département de Biologie Animale (*Aedes*, *Culex*), dans divers endroits du campus social de l'Université de Dakar (*Culex*) ou dans la banlieue de Dakar, au Technopole de Rufisque (*Anopheles*). Les œufs de *Culex* sont récoltés à l'aide de brindilles et sont mis dans des gobelets contenant de l'eau. Les œufs d'*Anopheles* et d'*Aedes* sont obtenus après ponte des adultes élevés au laboratoire. Les larves et nymphes sont récoltées à l'aide d'une épuisette promenée rapidement à la surface de l'eau ou avec une louche. Quant aux imagos ils sont capturés à l'aide d'un aspirateur à bouche.

### B. Élevage

Les larves et les nymphes récoltées sont mises dans des gobelets en plastique de dimension (10×10×7cm) et contenant de l'eau. Ces gobelets sont placés dans des cages cubiques de 30cm d'arête, constituées d'une armature en bois, recouverte de tissu moustiquaire à mailles fines. L'élevage est fait dans une salle où règne une température ambiante d'environ 25° C en moyenne avec une humidité relative moyenne de 80 %. Les conditions d'éclairement sont 13 heures de lumière et 11 heures d'obscurité approximativement.

#### 1. Nutrition des larves

Les larves de culicidés sont microphages. Un bouillon de culture a été réalisé, en mélangeant environ 10g de chapelure de pain, à l'eau des gobelets. L'eau des gobelets est changée tous les deux à trois jours afin d'éviter la prolifération de champignons, pouvant gêner le développement des larves et de permettre une meilleure oxygénation. Les larves des espèces qui sont très voraces comme *Culex tigripes* sont nourries avec des larves d'autres espèces de culicidés. Elles sont élevées avec à une densité de cinq à dix individus par gobelet.

#### 2. Nutrition des adultes

Les adultes sont nourris avec une solution de sucre 10% déposée dans la cage d'élevage. Cette solution est changée de temps en temps pour éviter le développement éventuel de champignon. La main nue de l'expérimentateur a très souvent servi de source de repas sanguin.

### **3. Étude de la température**

Pour chaque valeur de la température, nous avons suivi le cycle préimaginal depuis la mise en éclosion des œufs jusqu'à l'émergence des adultes. Nous avons utilisé deux espèces de moustiques *Aedes aegypti* et *Anopheles gambiae*.

Pour chaque espèce, 20 œufs issus de la même ponte ont été mis dans un cristallisoir contenant 400ml d'eau, à raison de 3 volumes d'eau du gîte reconstituée pour 1 volume d'eau de robinet. Les températures de l'eau d'élevage sont comprises entre 20 et 37° C avec une erreur  $\pm 1^\circ$  C. L'humidité relative de la salle est environ à 80 % en moyenne, éclairement 13 heures de lumière et 11 heures d'obscurité approximativement. Le cristallisoir est placé dans un appareil qui est constitué d'un dispositif électrique de chauffage d'eau (Bain marie) muni d'un thermomètre incorporé et dont la température est réglable à volonté. Toutes les 2 heures, nous vérifions que la température de l'eau d'élevage est la même que celle de l'appareil. L'appareil fonctionne suivant un régime alternatif. Il est mis en marche toute la journée et est arrêté durant toute la nuit.

Suivant leur stade, les larves ont été nourries avec une quantité suffisante de chapelure de pain. Les larves de premier stade n'ont pas été nourries. L'ingestion de microorganismes contenus dans l'eau du gîte leur a permis d'évoluer jusqu'à la première mue.

La nourriture a été totalement supprimée lorsque près de la moitié des larves est passée au stade nymphal. Il semble, en effet, que les larves âgées de quatrième stade se nourrissaient très peu et ne consommaient qu'une faible part de la nourriture qui leur était fournie. Les observations ont été faites tous les matins en comptant le nombre d'individus qui passent d'un stade à un autre. Nous considérons qu'on passe d'un stade à une autre lorsque plus de la moitié des individus ont atteint le stade suivant.

Au temps  $t_k$ , allant de  $t_{k-1}$  à  $t_k$ , l'intervalle de temps (jours) qui sépare le passage de l'œuf à la larve, de la larve à la nymphe ou de la nymphe à l'adulte ; est donné par  $\Delta_{tk} = t_k - t_{k-1}$ .

Le temps de développement évalué entre l'immersion des œufs jusqu'à l'émergence des adultes est obtenu en faisant la somme des  $\Delta_{tk}$  entre les trois stades : œuf, larve et nymphe.

### **4. Étude de la résistance à la dessiccation**

Dans cette partie, nous avons étudié les possibilités d'éclosion des œufs de moustiques sur du substrat de terre humide mais également, la capacité des larves de moustique à résister à la dessiccation.

Du substrat de terre du gîte a été recueilli dans des boîtes de Pétri (10 cm de diamètre et 1 cm de hauteur) puis saturé avec de l'eau du gîte larvaire.

La nature du sable utilisé est la même durant toute l'expérience. De même, la quantité de sable et le volume d'eau utilisés sont aussi les mêmes pour tous les tests. Trois boîtes de Pétri contenant du sable humidifié sont utilisées pour effectuer un test préliminaire sur l'éclosion des œufs. Dans chaque boîte de Pétri, on dépose un lot d'œufs d'*Anopheles*. Les œufs utilisés sont tous issus d'une même ponte. Le constat d'éclosion est effectué 24, 48 et 72 heures après, respectivement en saturant chaque boîte avec de l'eau. Cette saturation en eau permet de constater la présence ou non de larves de premier stade.

Pour chacun des quatre stades larvaires (L1, L2, L3, L4), 20 larves d'*Anopheles gambiae*, sont placées dans une boîte de Pétri. Chaque boîte de Pétri contient du sable et est saturée avec de l'eau comme précédemment. Les conditions d'humidité relative variant entre 70-80%. La température de la salle est d'environ  $25^\circ \pm 2^\circ$  C. Durant toute l'expérience, les boîtes de Pétri sont exposées aux conditions ambiantes et laissées se dessécher au cours du temps. Chaque boîte de Pétri est recouverte d'une mousseline pour protéger les larves contre certains prédateurs (fourmis...). Chaque jour, nous évaluons le nombre de larves qui reste en survie. Le nombre de survivants est exprimé proportionnellement au nombre total de larves testés (20 par boîte de Pétri).

## 5. Choix des surfaces de ponte

Dix femelles d'*Aedes aegypti* âgées d'un jour et fraîchement gorgées sur le bras de l'expérimentateur ont été mises dans une cage à moustique de dimensions 60 x 60 x 60cm. Des mâles de même génération ont été introduits dans la cage selon le ratio : 2/1 (2mâles /1femelle).

Quatre bocaux de capacité 750 ml chacun ont été utilisés comme pondoirs. Ces bocaux contiennent respectivement, de l'eau de robinet, d'eau du gîte en présence de compétiteurs comme des larves de *Culex* et de têtards, d'eau résiduelle de l'élevage des moustiques de la même espèce et d'eau du gîte reconstituée.

Dans ce dernier cas, nous avons obtenu ce milieu en mélangeant dans un bêcher de 1 litre, de la litière du gîte avec 500ml d'eau de robinet. Au bout de quelques heures, l'eau ayant une couleur plus ou moins foncée est utilisée comme pondoir. Ces pondoirs ont été ensuite placés côte à côte au milieu de la cage et n'ont été retirés qu'au bout de dix jours. Les femelles sont gorgées avec un repas sanguin tous les deux jours. Une solution glucosée et placée dans la cage sert de nourriture aux mâles. Chaque jour le nombre d'œufs dans chaque pondoir est compté puis retiré du milieu. A la fin de l'expérience le nombre d'œufs cumulé dans chaque pondoir est noté.

## **6. Étude de la fécondité**

La fécondité peut être définie comme étant le nombre d'œufs élaborés par les ovaires pendant la période de reproduction et destinés à la ponte.

### **a. Élevage des moustiques**

Les moustiques sont élevés individuellement dans des cages cubiques de dimensions 30 x 30 x 30 cm selon le ratio une femelle pour deux mâles. Les femelles sont régulièrement gorgées sur notre bras après chaque cycle de ponte. Une solution de sucre déposée à l'intérieur de la cage, sert de repas aux mâles. Un bocal contenant de l'eau du gîte reconstituée est placé au milieu de la cage et sert de pondoir. Après chaque ponte, le nombre d'œufs est compté puis les œufs sont retirés du pondoir. L'expérience est répétée sur un total de 10 femelles et dure toute la durée de survie de la femelle. A la fin de l'expérience, le nombre moyen d'œuf par ponte chez toutes les femelles est calculé. La température moyenne de la salle est de 25-26° C, l'humidité relative est de 80-90%.

### **b. Détermination de la longueur du premier cycle trophogonique**

Cette période est définie comme l'intervalle de temps qui sépare le détachement de la femelle gorgée et le début de la première apparition d'œufs. Pour cela, l'heure du premier repas sanguin a été notée ainsi que la date de la première ponte.

## II. RÉSULTATS

### II.1. Température

Le temps de développement des stades pré imaginaux, évalués en jours entre l'immersion des œufs et l'émergence des adultes pour différentes températures étudiées, est représenté dans les tableaux ci-dessous :

Tableau I : Temps de développement en jours des différents stades en fonction de la température (en ° C) chez *Anopheles gambiae* ssp.

Stades	Température en ° C										Temps de développement en
	20	22	24	25	26	28	30	32	34	37	
Œufs	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Larves	18	15	11	13	11	7	8	8	6	5	
Nymphes	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Œufs-adultes	21	18	14	16	14	10	11	11	9	8	

Tableau II : Temps de développement en jours des différents stades en fonction de la température (en ° C) chez *Aedes aegypti*.

Stades	Température en ° C										Temps de développement en
	20	22	24	25	26	28	30	32	34	37	
Œufs	3	2	2	2	2	2	2	2	1	1	
Larves	15	11	10	6	6	5	5	4	4	4	
Nymphes	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
Œufs-adultes	21	15	14	10	10	9	9	8	7	7	

Le temps de développement des stades préimaginaux de ces deux espèces de moustiques est d'environ 7 à 20 jours à température variant entre 20 et 30° C. Chez les deux genres (*Anopheles* et *Aedes*), le temps de développement des stades préimaginaux diminue lorsque la température de l'eau d'élevage s'élève. Ce temps est globalement plus long pour *Anopheles gambiae* que pour *Aedes aegypti* (fig 1).

Dans le cas des œufs et des nymphes, la température n'a apparemment aucun effet sur la durée de développement. Par contre pour le stade larvaire, cette durée est très variable en fonction de la température de l'eau.

Ils existe cependant une température optimale limite au delà de laquelle les larves meurent. Dans le cas de notre expérience nous avons fixé cette température à environ 38° C. En se basant sur ces observations, des mortalités journalières de plus de 70% et 100% ont été enregistrées pour une température maximale de l'eau de 2 et 4° C respectivement au dessus de la température létale (38°C).

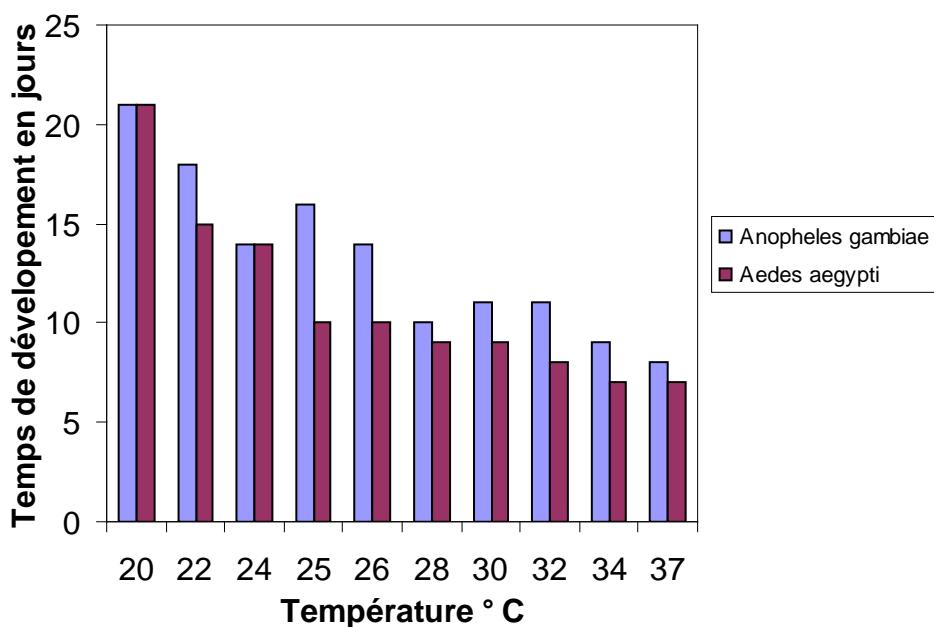


Figure 1 : Variation de la durée de développement des stades pré imaginaux en fonction de la température de l'eau chez *Aedes aegypti* et chez *Anopheles gambiae*.

## II.2. Résistance à la dessiccation

Dans cette expérience, nous avons simulé une situation naturelle où les œufs restent sur sol humide lorsque le niveau de l'eau baisse, ou lorsque les œufs sont pondus délibérément sur un sol humide. Nous avons constaté que, lorsque les œufs d'*Anopheles gambiae* sont déposés sur un sol humide, ils peuvent éclore et que les larves qui y émergent montrent des capacités limitées pour atteindre le plus proche gîte de développement. En plus nous avons constaté que les larves d'*Anopheles gambiae*, en fonction de leur stade, peuvent survivre pendant quelques jours dans les gîtes en desséchement. La durée de survie sur sol humide dépend donc du stade de développement des larves. Cette durée est de 48 à 72 heures pour les larves des stades L1, L2, L3 et 92 heures pour les larves de stade L4 (Figure 2).

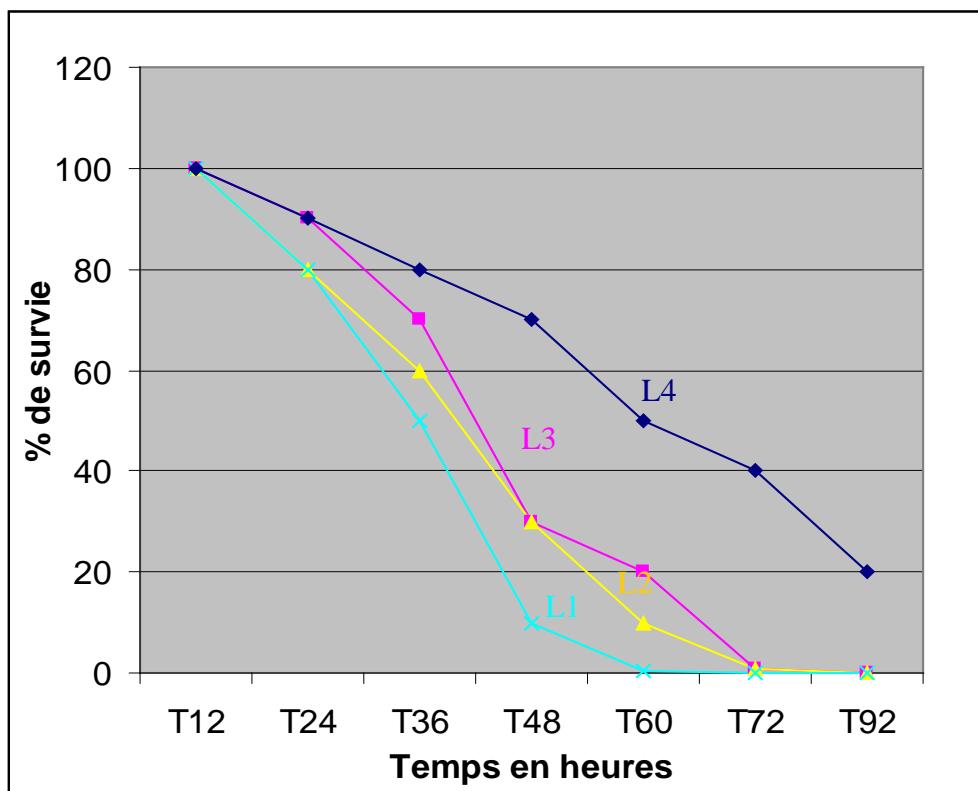


Figure 2 : Évolution du pourcentage (%) de survie des larves d'*Anopheles gambiae* en fonction du temps (heures).

### II.3. Choix des surfaces de ponte

Les résultats obtenus à la suite de nos expériences sont représentés sur la figure 3. Nous constatons que l'eau de gîte reconstituée serait un élément attractif pour les femelles gravides de *Aedes aegypti*. Plus de 70% des œufs sont pondus dans ce milieu. Également, un certain nombre d'entre elles sont fortement attirées par les pondoirs contenant de l'eau résiduelle d'élevage de larves et de nymphes de la même espèce (14% des œufs). De plus elles préfèrent déposer leurs œufs dans les pondoirs qui hébergent des larves d'autres espèces que dans des

pondoirs  
inhabités  
(10% et  
moins de 5%  
des œufs,  
respectiveme  
nt).

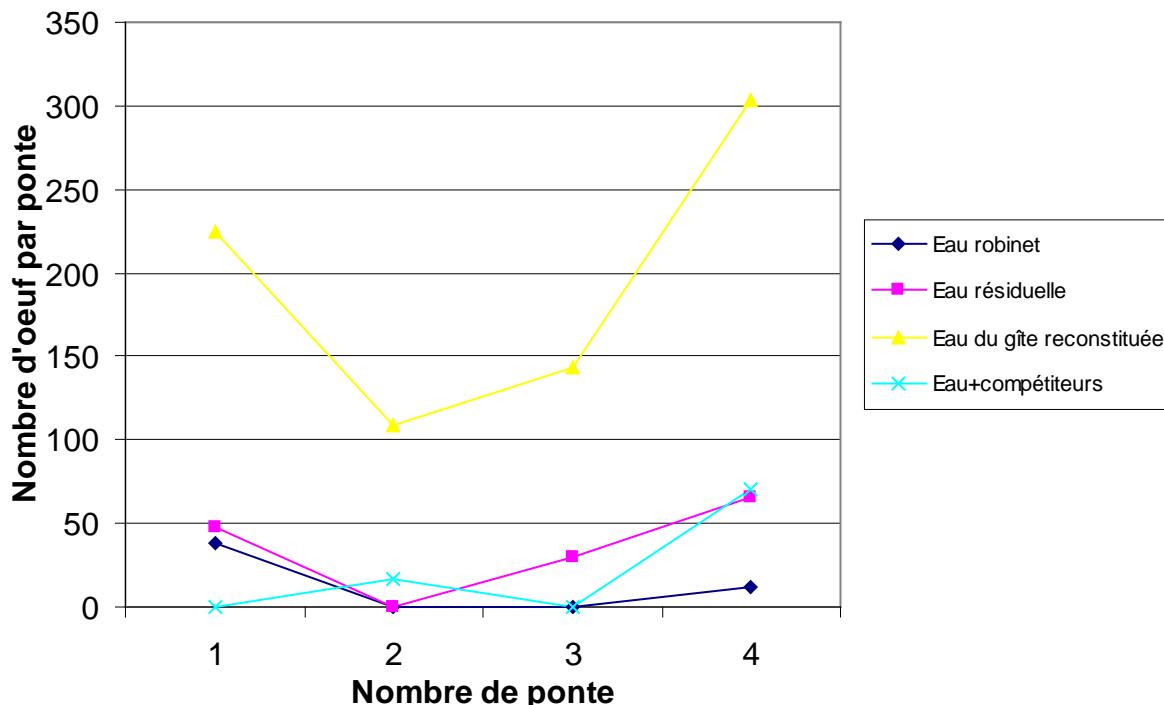


Figure 3 : Variation du nombre d'œufs pondus par *Ades aegypti* en fonction de la nature du milieu de ponte.

## II.4. Fécondité des femelles

L'étude de la capacité reproductive des moustiques nécessite la prise en compte de la fécondité. La fécondité, étant estimée en nombre d'œufs élaboré par les ovaires pendant la période de reproduction et destiné à la ponte, est un paramètre important dans l'équilibre des populations. La fécondité totale d'une femelle de moustique, difficile à estimer, est la somme des œufs émis pendant les différentes phases de ponte durant la vie de la femelle.

Le nombre d'œufs pondus par individu montre une large gamme de variation aussi bien entre individu qu'en fonction des expériences. Chez *Aedes aegypti*, la fécondité varie en fonction de l'âge du moustique. Elle augmente d'abord dès les premières pontes jusqu'à atteindre une valeur maximale puis, diminue progressivement au cours du temps (Fig4).

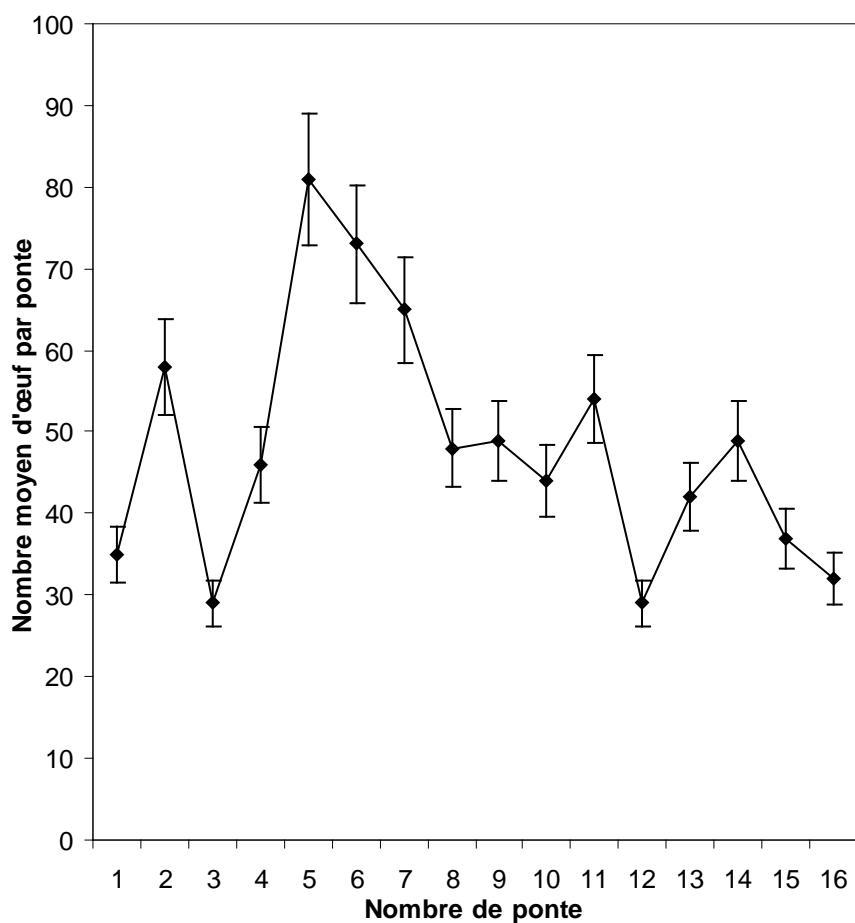


Figure 4 : Évolution de la fécondité moyenne d'une femelle d'*Aedes aegypti* en fonction du nombre de ponte (âge de la femelle en moyenne). Chaque point de la courbe représente le nombre moyen d'œufs pondus pendant cette date. Le trait vertical représente l'erreur standard.

## **Observations**

### **a. La période de préoviposition**

Cette période peut être définie comme étant l'intervalle de temps entre le repas sanguin et le début de la première apparition des œufs. La corrélation entre le processus de digestion du sang et le développement des follicules ovariens est appelée concordance trophogonique. Chez *Anopheles gambiae* et *Aedes aegypti*, les observations qui ont été faites ont montré que cette durée est plus ou moins longue. Elle varie de trois jours à une semaine selon les conditions du milieu d'étude. En plus de la longueur du premier cycle trophogonique, nous avons constaté que, pour achever leur cycle, 40 à 45% des femelles d'*Anopheles gambiae* qui ont pris le premier repas sanguin ont besoin d'un deuxième, un jour après le premier. Nous avons également constaté dans la plupart des cas que, lorsque le premier repas sanguin du moustique est interrompu, la ponte ne peut avoir lieu.

Chez *Aedes aegypti*, la concordance trophogonique s'observe lorsque le repas est pris au stade II moyen de Christophers ; il est, en général, suffisant pour permettre la maturation des ovaires. Dans les conditions naturelles, la plupart des femelles de Culicidés semblent en fait atteindre ce stade lorsqu'elles prennent leur premier repas. A 25-26° C et avec une humidité relative comprise entre 80-90%, la première ponte d'œufs d'*Aedes aegypti* a été constatée au 4<sup>ème</sup> jour après le repas sanguin. Chez certaines femelles, elles peuvent même s'étaler jusqu'au septième jour. Ce retard a été observé fréquemment dans les élevages.

### **b. La période d'oviposition**

Cette période dépend de l'âge et peut être même de la durée de vie de la femelle. Dans la nature cette période est difficile à apprécier. Elle est très variable puisque le moustique est proie de plusieurs autres espèces. Au laboratoire cette période est relativement plus ou moins longue. Les durées des différents stades du cycle de vie d'*Aedes aegypti*, dans les conditions de laboratoire (25-26° C et 80-90% d'humidité relative) sont représentées sur le tableau III.

Tableau III : Cycle de vie de *Aedes aegypti* depuis le premier gorgement jusqu'à l'émergence de l'adulte.

Stades	Durée en jours			
	Minimum	Maximum	Moyenne	Total
Avant premier gorgement	1	2	1.5	3
Préoviposition	3	7	5	10
Oviposition	5	-	-	-
Eclosion	1	3	2	4
Larves	7	10	8.5	17
Nymphes	2	3	2.5	5

## DISCUSSION

Les stades jeunes et adultes des moustiques sont poïkilotermes, la température représente donc une variable épidémiologique importante. La température est le principal régulateur de croissance et de développement entre les différents stades. Elle a une influence sur la durée des différents stades et règle la longueur du cycle trophogonique. Par exemple, dans une gamme de 18° C à 26° C, un changement de 1° C seulement de la température peut changer la durée de vie d'un moustique à plus d'une semaine (Jepson *et al.*, 1947 cités par Depinay *et al.*, 2004). Bien que la gamme de température de l'eau soit très large, elle est rarement prise en compte dans la littérature (Depinay *et al.*, 2004). Certains auteurs ont enregistré des températures voisines de 40° C dans les petites collections d'eau. De telles températures dépassent la température létale de beaucoup d'espèces de moustiques.

Pour une gamme de température située entre 18 et 40° C, Bayoh & Lindsay (2003), trouvent qu'aucun adulte n'émerge en deçà de 18° C. Ils fixent la température maximale correspondant au point létal pour les larves à 40° C. Dans nos travaux, nous n'avons pas observé des phénomènes de survie au delà de 38° C. Cela pourrait être expliqué par le fait que certaines espèces de moustiques se retrouvent rarement dans ces petites collections d'eau. Nous n'avons pas évalué la température minimale au point létal par défaut d'appareil.

Chez *Anopheles gambiae*, les résultats de notre expérience sont similaires à ceux obtenus par Bayoh & Lindsay, 2003 ; Depinay *et al.*, 2004, alors que pour *Aedes aegypti*, nous n'avons pas retrouvé de publications dans ce domaine.

Ces résultats pourraient s'expliquer par le fait que l'éclosion des œufs est principalement liée aux propriétés chimiques de l'eau telles que le pH et l'oxygénation. Pour le cas des nymphes, cela peut être dû à des phénomènes physiologiques et métaboliques particuliers. En effet, les différentes étapes du développement larvaire de certains insectes sont sous contrôle hormonal. Selon Sharpe *et al.*, 1977 ; Schoofield *et al.*, 1981, le développement des poïkilotermes est régulé par une enzyme dont le taux de réaction détermine le taux de développement de l'organisme. C'est d'intérêt spécial parce que chaque paramètre de l'eau du gîte larvaire a une signification biologique qui peut avoir un impact épidémiologique. La température représente l'un des facteurs abiotiques les plus importants pour le développement des stades larvaires des moustiques.

Chez les insectes en général et les moustiques en particulier, le développement des stades larvaires se fait par des mues. Ces mues sont sous le contrôle d'une hormone : hormone juvénile (HJ), secrétée par les corps allates et qui déclenche ou inhibe la métamorphose (Raabe, 1986). Charmillot, 2004 a montré que, la teneur en HJ est particulièrement faible aux stades œuf et nymphal. Le taux d'HJ retrouvé dans l'organisme des insectes est maximal pendant le stade larvaire. Cette variabilité du temps de développement en fonction de la température, pendant le stade larvaire, laisse supposée que la température aurait une influence sur l'activité de l'hormone responsable de la mue. Le mécanisme par lequel la température influence la croissance est peu connu.

L'humidité, sous forme de précipitation ou d'humidité relative, est un autre facteur abiotique, avec ses effets qui en partie interagissent avec ceux de la température.

Lorsque l'habitat naturel des larves d'*Anopheles gambiae* dessèche, leur contribution à la dynamique des populations des stades adultes est souvent négligée, car c'est la mortalité massive des larves qui est prise en compte. D'après Takken, 1999 ; Blackwell & Johnson., 2000, les femelles des moustiques du genre *Anopheles* utilisent des propriétés chimiques pour sélectionner des habitats convenables pour l'oviposition. Elles prennent un haut risque quand elles sélectionnent des gîtes pour l'oviposition, comme il a été montré par Minakawa *et al.*, 2001. Ce comportement n'est pas rare puis que d'autres espèces vectrices de la malaria, tel que *Anopheles balabacensis* (Wilkinson *et al.*, 1978), *Anopheles albimanus* (Breeland *et al.*, 1970) expriment bien ce comportement.

Probablement, le risque de pondre des œufs sur du sol humide peut avoir du succès lorsque les gîtes deviendront inondés, puis que ces gîtes n'auront pas été colonisés alors par les prédateurs, parasites et/ou pathogènes. Cependant, dans notre étude nous avons montré que les œufs du moustique *Anopheles gambiae* sont capables d'éclore sur substrat de terre humide. De plus, selon le stade, les larves peuvent survivre pendant quelques heures en dehors de l'eau à condition que le substrat reste humide. Koenraadt *et al.*, 2003 estiment que les larves de premier, second et troisième stade peuvent survivre 64, 65 et 69 heures, respectivement, alors que le quatrième stade peut survivre pendant plus de 113 heures. Ce dernier résultat n'est cependant qu'une simple estimation. Muirhead-Thomson, 1945 cité par Koenraadt *et al.*, 2003 trouve que les stades larvaires les plus jeunes peuvent survivre pendant 2 jours sur sol humide, alors que les stades âgés sont plus sensibles à la dessiccation.

Malheureusement, aucune précision sur la durée maximale de survie n'a été faite. Dans notre étude, par contre, nous avons constaté que les larves de quatrième stade survivent plus longtemps que les larves des trois premiers stades.

Ce qui n'est pas en parfaite adéquation avec celle de Muirhead-Thomson, 1945. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les larves de moustique se nourrissent de micro-organismes et de substances dissoutes dans l'eau. En absence d'eau les jeunes larves pourraient mourir de faim, alors que les larves de stade avancé (L4) qui ne se nourrissent plus, ou qui se nourrissent que très peu, peuvent survivre plus longtemps. Holstein, 1954 avait aussi observé que des larves de moustiques (stades indéterminés), placées sur de l'argile humide ont nymphosé au bout de 4 jours.

Cependant, Beier *et al.*, 1990 estiment que les œufs d'Anophèles peuvent survivre 2 à 3 semaines dans les conditions de sécheresse et les larves pendant quelques jours sur sol humide. Ces stratégies ne peuvent être suffisantes en saison sèche qui dure 6 à 8 mois en Afrique au sud du Sahara. Chez certaines espèces de moustiques telles que les *Aedes* (Sota et Mogi, 1992), et d'autres diptères tels que *Pylopedilum vanderplanki* ( chironomidae), la dormance des stades immatures est de quelques mois à plusieurs années, respectivement. Ces espèces sont adaptées à la survie à court terme dans diverses conditions. Toute fois la survie à court terme des œufs et des larves d'Anophèles dans les habitats en desséchement, pourrait être considérée comme une stratégie d'exploitation rapide de ces habitats que ces moustiques ont adopté.

Les populations des moustiques fluctuent en fonction du temps et du climat. Elles augmentent en saison humide et diminuent en saison sèche. L'oviposition est l'un des nombreux facteurs qui déterminent la distribution des moustiques. Elle peut donc être une des raisons possibles de la prolifération des moustiques. L'oviposition peut être influencée par des facteurs comme la distribution saisonnière et hétérogène des populations humaines. Par exemple, la distribution des gîtes peut devenir plus hétérogène en saison sèche, conduisant à la prolifération des moustiques autour des points d'eau. Selon Menach *et al.*, 2005 la disponibilité des gîtes larvaires est quelque fois corrélée avec la densité des habitations humaines. Il a été démontré que la disponibilité en eau, associée aux comportements des moustiques pendant la période d'oviposition, peuvent jouer un rôle important dans la détermination des risques de prolifération des moustiques.

Du fait que les moustiques reviennent pondre dans les anciens gîtes, cela entraîne que ces gîtes constituent alors leur point de départ à la recherche d'un hôte pour le repas sanguin. Beaucoup d'incertitudes existent encore sur les stratégies qu'utilisent les moustiques pour la localisation et le choix des surfaces de ponte.

Les résultats de notre étude confirment que les moustiques utilisent aussi bien les propriétés chimiques et biologiques pour évaluer la convenance du milieu de ponte. Les moustiques pondent plus fréquemment dans les eaux où sont présentes des larves de la même espèce, mais surtout dans les eaux de gîte reconstituées.

Ces résultats confirment ceux de Millar *et al.*, 1994 ; Edgerly *et al.*, 1998, qui ont montré que les moustiques utilisent des propriétés chimiques des espèces apparentées pour identifier les gîtes d'oviposition convenables.

*Aedes aegypti* est attiré par les milieux contenant des larves de la même espèce. La présence de larves de même espèce peut indiquer que le milieu est très favorable au développement des larves. Les produits chimiques élaborés par les espèces apparentées ainsi que les oeufs, les larves et les phéromones des nymphes (Taken, 1999) de même que les produits chimiques élaborés par des bactéries qui sont associées aux larves des moustiques, agissent comme des attractifs à l'oviposition. Très tôt, les recherches ont montré que les phéromones des larves influencent le choix des surfaces de ponte chez *Aedes aegypti* (Ahmadi & McCelland, 1983 ; Williams *et al.*, 1999). Des études précédentes ont aussi montré que les moustiques ne pondent pas très souvent dans des endroits où la compétition interspécifique est présente.

D'après notre étude, *Aedes aegypti* ne semble pas être trop gêné par cette compétition interspécifique. Soit ces moustiques sont incapables de détecter la présence de concurrents, soit ils les détectent mais ne modifient pas leurs comportements en réponse à cette propriété. Cela pourrait expliquer le fait qu'on trouve dans certains habitats des associations larvaires d'*Anophelinae* et de *Culicinae*.

Plusieurs propriétés pourraient conduire les moustiques à pondre dans des sources d'eau non productives. Ces propriétés peuvent dépendre de l'inaptitude des moustiques à détecter un habitat non favorable, du statut physiologique du moustique, ou de plusieurs autres facteurs. En effet, la recherche d'un gîte pour la ponte peut être un facteur sensible sur le cycle trophogénique du moustique car, un moustique gravide recherche le gîte le plus proche pour pondre.

## **CONCLUSION**

Cette présente étude nous a permis de montrer que la répartition, la survie et le développement des stades préimaginaux de moustiques sont fonction des conditions environnementales. Au cours du temps, certains facteurs comme la température, l'humidité, de même que les propriétés chimiques de l'eau peuvent subir d'importantes variations. Cette grande variabilité de ces facteurs de l'environnement a entraîné chez les moustiques le développement de diverses stratégies d'adaptations. Leurs grandes capacités reproductive et de résistance ainsi que la complexité des mécanismes physiologiques qui leurs sont associés sont à l'image de ces adaptations.

## **DEUXIÈME PARTIE : ÉTUDE STRUCTURALE DE LA GAMETOGENÈSE CHEZ LES MOUSTIQUES**

### **INTRODUCTION**

Malgré leur importance médicale, nous pouvons noter que peu d'investigations structurales ont été réalisées sur les gonades des moustiques. C'est Nunez (1963) qui pour la première fois a réalisé une étude ultrastructurale du flagelle chez *Culex pipiens*. En 1990, Ndiaye a fait l'étude ultrastructurale de la gamétogenèse mâle de *Toxorhynchites brevipalpis*. De rares études ultrastructurales ont été menées sur les autres catégories de cellules germinales mâles (Clements, 1992, Ndiaye *et al.*, 1996). La structure et le développement des organes génitaux femelles de moustiques a été étudier pour la première fois par Christophers (1911, 1923). Actuellement les études les plus ressentes concernant la structure et l'ultrastructure de l'ovogenèse chez les moustiques sont représentées à notre connaissance par celles de Ndiaye (1996) et de Soumaré & Ndiaye, 2004.

Dans cette partie, nous proposons d'étudier à l'aide du microscope photonique, d'une part l'appareil génital et la spermatogenèse chez les mâles et d'autre part l'ovogenèse chez les moustiques femelles hématophages.

### **I. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **I.1. MATÉRIEL**

Le matériel animal que nous avons utilisé est constitué de moustiques, des genres et espèces suivants :

*Aedes aegypti*

*Anopheles gambiae* ssp

*Culex quinquefasciatus*

*Culex tigripes*

## I.2. MÉTHODES

### A. Récolte et élevage des moustiques

Les méthodes de récolte et d'élevage employées sont les mêmes que celles utilisées dans la première partie.

### B. Repas sanguin

Pour initier la vitellogenèse, un ou deux repas sanguins sont donnés aux femelles. La main nue de l'expérimentateur plongée dans la cage a toujours servi comme la source du repas sanguin. Les différents événements du développement ovocytaire chez les moustiques, se déroulent suivant une chronologie précise après le repas sanguin. A cet effet, l'heure à laquelle le repas sanguin est pris par le moustique est notée. De plus le temps qui s'écoule entre la prise du repas sanguin et le moment pendant lequel le moustique est capturé pour la dissection est aussi noté.

### C. Extraction des gonades

Les moustiques adultes sont capturés de la cage à l'aide d'un aspirateur à bouche. Ils sont ensuite immobilisés par un court passage de deux à trois minutes environ dans la chambre froide du réfrigérateur. Les pattes et les ailes du moustique sont enlevées, pour éviter une éventuelle fuite de l'insecte lors d'un réveil prématuré. La dissection se fait sous une loupe binoculaire modèle Wild Heerbrugg, à l'aide de deux aiguilles fines.

L'individu est placé sur une lame porte-objet, son abdomen plongeant dans une goutte d'eau distillée ou dans du glutaraldéhyde. Le thorax est ensuite immobilisé avec une aiguille, tandis qu'avec l'autre, nous exerçons une traction sur les deux derniers segments abdominaux, jusqu'à extirpation du tractus génital. Les testicules ou les ovaires du moustique sont alors immédiatement fixés dans des piluliers contenant du liquide de fixation.

## **MICROSCOPIE PHOTONIQUE**

Même si, dans certains cas favorables, l'observation de matériel biologique avec un microscope optique peut être faite directement, elle nécessite le plus souvent des traitements particuliers des échantillons. En effet, l'observation avec un microscope photonique ordinaire suppose l'utilisation d'échantillons très fins puisque la lumière doit pouvoir les traverser pour qu'une image se forme. Dans ces conditions, les structures cellulaires sont extrêmement difficiles à distinguer et les méthodes de coloration particulières s'avèrent le plus souvent indispensables pour pouvoir étudier cellules et tissus.

### **1. Fixation**

La fixation représente le temps essentiel de la technique histologique. Le but essentiel de la fixation histologique ou cytologique est de consolider le substrat morphologique et d'assurer le mordançage. Etant donnée l'importance majeure des protéines dans la constitution des organites cellulaires, c'est surtout leur bonne conservation qui est recherchée pour les études morphologiques et cytologiques.

Les fixateurs utilisés dans notre étude sont des mélanges de corps chimiques ayant des propriétés fixatrices. Nous avons utilisé comme fixateurs le Bouin alcoolique et le Carnoy II.

### **2. Inclusion à la paraffine**

La substance d'inclusion que nous avons utilisée est la paraffine. Du fait du caractère hydrophobe de cette substance, les tissus ont subi une déshydratation, l'imprégnation avant l'inclusion proprement dite.

#### **2.1. Déshydratation**

Le matériel fixé au liquide de Bouin est déshydraté par deux bain successifs de six heures et d'une nuit dans de l'éthanol à 70%, suivis de deux bains de sept heures et de trois heures dans l'éthanol à 95%. L'éthanol, non miscible à la paraffine, est ensuite remplacé par du butanol, miscible à l'alcool et à la paraffine. Ce remplacement est effectué par trois bains de butanol de durées respectives : une nuit, sept heures et trois heures.

Les tissus fixés au Carnoy II sont déshydratés par deux bains de sept heures et trois heures dans de l'éthanol à 95%, suivis de trois bains de butanol d'une nuit, sept heures et 3 trois heures respectivement.

## **2.2. Imprégnation**

Elle consiste à un remplacement progressif du butanol contenu dans les tissus, par de la paraffine. L'imprégnation se fait d'abord par un bain de butiparaffine (mélange 1/1 de butanol et de paraffine) d'environ une nuit, puis par deux bains de quatre heures, dans de la paraffine pure. Les tissus sont maintenus dans l'étuve à 60° C pendant toute la durée de manipulation.

## **2.3. Inclusion**

La paraffine liquéfiée est versée dans des moules réalisés avec des barres de Leuckart. Le matériel est introduit dans la paraffine et bien orienté avant que la paraffine ne polymérisé.

## **3. Taille des blocs et Coupes**

L'excès de paraffine, qui entoure le matériel, est éliminé avec une lame de scalpel, de manière à dégager en relief un prisme contenant le matériel. La surface de la coupe a la forme d'un trapèze rectangle, dont au moins deux cotés sont parallèles.

Les coupes ont été faites au microtome (type Minot), modèle Stiassnie, avec une épaisseur de coupe de 5 ou 7 $\mu$ m environ.

Parfois la méthode dite de Nageotte, décrite par (Martoja et Martoja-Pierson., 1967) nous a permis d'obtenir de bonnes coupes. Elle consiste à tremper le bloc entamé dans de l'eau, avant la coupe. La présence, dans un ovaire ou dans un embryon, de quantités importantes de vitellus entraîne de sérieuses difficultés pour la confection des coupes à la paraffine. Le procédé proposé par Baker, permet de faciliter la coupe d'organes riches en vitellus. L'auteur propose de traiter les blocs entamés, non par l'eau comme dans le procédé classique, mais par le mélange : neuf volumes d'alcool éthylique à 60° pour un volume de glycérine.

## **4. Étalement et Collage**

Les coupes, sous forme de ruban, sont déposées sur des lames propres et dégraissées, de façon que la face interne de la coupe soit en contact avec la lame.

Le liquide de montage utilisé est l'albumine glycérinée de Meyer. L'étalement se fait sur une plaque chauffée à une température légèrement inférieure à la température de fusion de la paraffine. Lorsque les coupes sont bien étalées, les lames sont égouttées et mises à sécher dans l'étuve à 40° C pendant au moins 48heures.

## **5. Coloration**

### **5.1. Déparaffinage et réhydratation**

L'inclusion de l'échantillon dans la paraffine (nécessaire pour réaliser les coupes) implique son élimination avant la coloration.

En effet, la paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains.

Chaque bain dure environ cinq minutes et est fait dans un flacon cylindrique adapté appelé tube de Borel. Cette étape commence, d'abord par deux bains dans un solvant (toluène) permettant l'élimination de la paraffine, puis par des bains d'alcools de titre décroissant, de 100 % (compatible avec le solvant précédent) jusqu'à 70 % (compatible avec l'eau). Un bain dans l'eau pure assure la réhydratation finale.

### **5.2. Coloration**

Après réhydratation, la coupe est colorée. Elle est d'abord plongée dans de l'Hématoxyline de Groat pendant 5 minutes, puis rincée dans l'eau distillée. La coupe est ensuite plongée successivement dans la Fuchsine Ponceau, l'Orangé G-molybdique et le Vert Lumière. Chacun de ces bains est séparé du suivant par un rinçage des tissus dans de l'eau acétique à 1%. Il faut alors procéder à la déshydratation, opération inverse de celle menée au début, avant de pouvoir faire le montage dans du baume de Canada.

### **5.3. La déshydratation**

La déshydratation est réalisée en plongeant successivement la lame dans deux bains d'alcool à 95 % puis dans l'alcool à 100 % et enfin dans le solvant (toluène). À la sortie du solvant, une goutte de baume de Canada est disposée sur la coupe et une lamelle est appliquée de façon à ce que le baume de Canada recouvre l'ensemble de la coupe.

Le baume de Canada polymérise à l'air libre mais on peut accélérer le processus en plaçant la lame sur une plaque d'histologie à 50° C ou simplement dans l'étuve à 40° C pendant 48 à 72 heures. La préparation microscopique est alors prête pour l'observation.

## **6. Coloration à l'orcéine acétique**

Les gonades sont placées dans une goutte d'eau distillée sur une lame porte objet. La goutte d'eau est ensuite aspirée délicatement avec une pipette et on laisse le reste sécher sur la lame de manière à ce que l'appareil génital adhère fortement à celui-ci. La lame est ensuite plongée dans l'acide chlorhydrique HCl 1 N pendant 2 minutes, puis dans l'alcool acétique pendant 10 minutes. La coloration est faite avec de l'orcéine acétique (2g d'orcéine dans 100 cm<sup>3</sup> d'acides acétiques à 45% dans l'eau) pendant 30 minutes. Le montage de la lamelle sur la lame porte-objet est réalisé avec le baume de Canada. Les préparations sont séchées à l'étuve à 60°C pendant 48 heures et observées au microscope photonique.

## II. RESULTATS DE LA MICROSCOPIE PHOTONIQUE

### II.1. Gaméto-génèse mâle

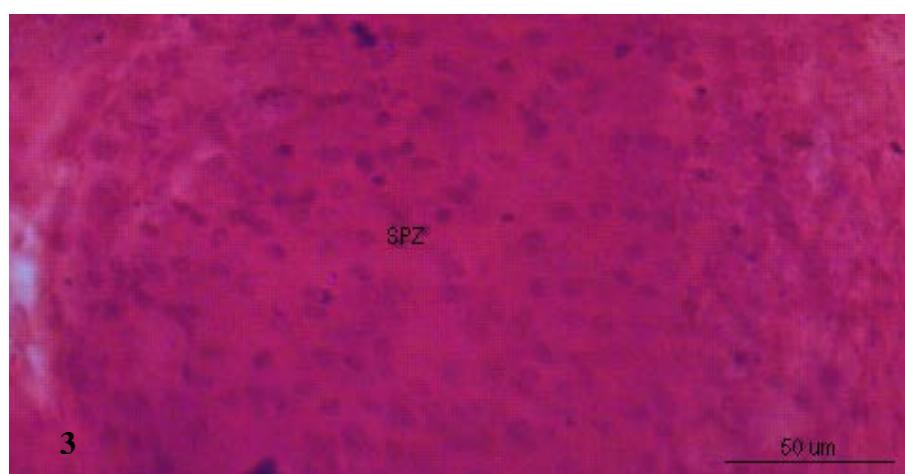
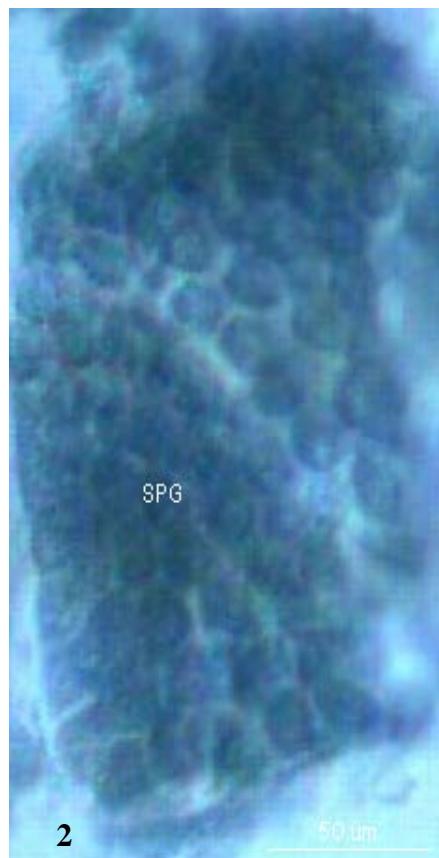
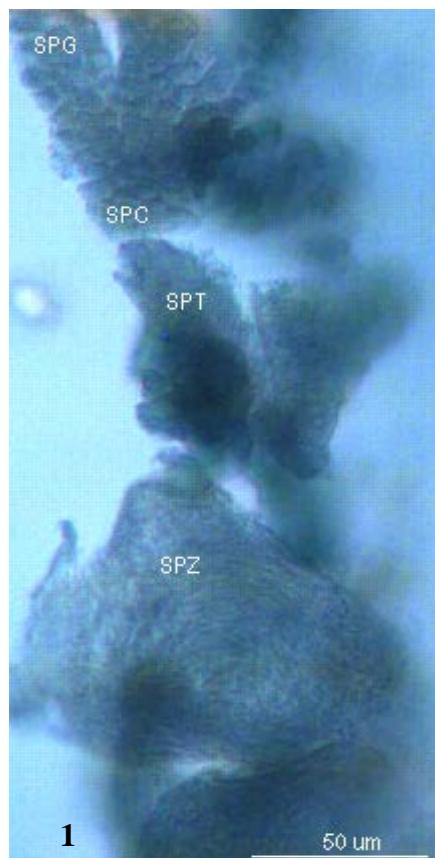
L'évolution du gamète mâle de moustique suit un processus continu comme dans la plupart des cas chez les insectes. Nous avons pu observé que l'apex du testicule de moustique est occupé par des gonocytes qui constituent les premières cellules du premier cyste. Ce sont de très grandes cellules par rapport aux autres et ont une forme prismatique. Elles sont peu nombreuses.

Nos résultats histologiques montrent que les spermatogonies sont situées au niveau de la région antérieure du testicule (fig 1). Ils sont issus de la division des cellules germinales (gonocytes) et disposés en rangés. Il existe deux types de spermatogonies (I et II). Du point de vu de leur taille, ces deux types sont très comparables (fig 2 & 4). La coloration à l'orcène acétique de la vésicule séminale fait apparaître à l'intérieur de celle-ci des spermatozoïdes sous forme de petits points plus ou moins sombres (fig 3).

Les spermatocytes sont issus de la division des spermatogonies. On les retrouve au niveau de la région moyenne du testicule. Ils ont un aspect globuleux, cependant nous n'avons pas distingué les deux types de spermatocytes. Le stade spermatocyte II est plus court et difficile à caractériser (fig 5).

Les spermatides apparaissent plus allongés que les spermatocytes. On les retrouve également dans la région antérieure du testicule (fig 6).

Les spermatozoïdes ont un aspect filiforme et sont très nombreux. Ils se localisent sur le trajet des spermiductes et dans les vésicules séminales (figs 7 & 8). Les spermatozoïdes achèvent leur maturation dans les vésicules séminales. A ce niveau ils sont disposés en spirale concentrique.



**Figure 1 :** Topographie et évolution des gamètes mâle de *Culex tigripes*. On peut noter la présence de spermatogonies (SPG) dans la région antérieure, de spermatocytes (SPC) et de spermatides (SPT) dans la région moyenne. Au niveau de la région postérieure et dans les vésicules séminales on retrouve les spermatozoïdes (SPZ).

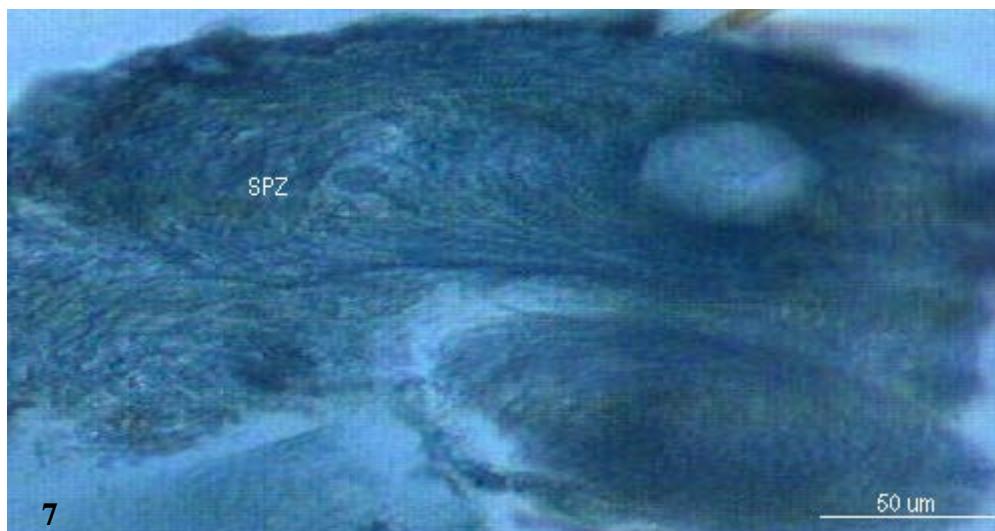
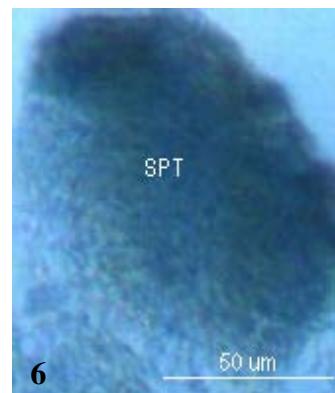
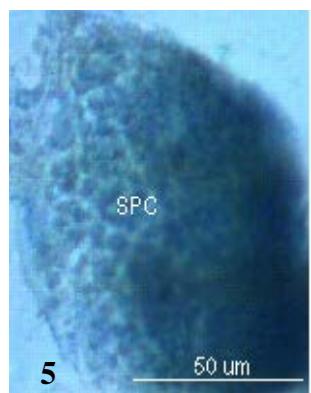
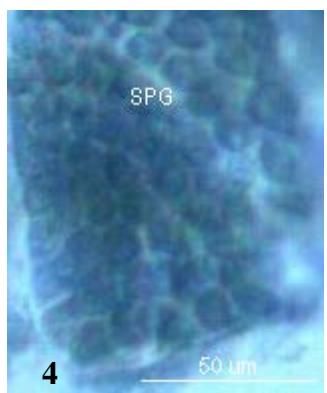
**Figure 2 :** Spermatogonies (SPG) de *Culex tigripes*. Du point de vue de la taille, il est difficile de distinguer les spermatogonies I et II.

**Figure 3 :** Portion d'une vésicule séminale d'*Aedes aegypti* colorée à l'orcéine acétique. Les spermatozoïdes apparaissent sous forme de points noirs.

**Figure 4 :** Coupe de testicule de *Culex tigripes* passant par la région antérieure. Les spermatogonies (SPG) au contenu dense sont disposées en rangés et sont reliées entre elles.

**Figure 5 & 6 :** Coupes de testicule de *Culex tigripes* passant par la région moyenne et montrant la présence de spermatocytes (fig 5) et de spermatides (fig 6).

**Figure 7 & 8 :** Coupe de testicule de *Culex tigripes* passant par la vésicule séminale. Les spermatozoïdes sont disposés en spirale concentrique.



## II.2. Gamétogenèse femelle

### II.2.1. Les différents stades de l'ovogenèse

Il s'agit d'observer le follicule ovocytaire, c'est-à-dire l'ovocyte entouré de ses enveloppes.

La différenciation ovogénétique du follicule ovarien est un phénomène progressif et complexe. Nous avons observé au cours du développement ovocytaire les différentes étapes caractéristiques de l'élaboration du gamète femelle.

#### II.2.1.1. Prévitellogenèse

Les premières étapes du développement ovocytaire, précédant celles de l'accumulation de réserves, constituent la prévitellogenèse. Elle est surtout marquée par une multiplication et une croissance de cellules germinales issues du gremarium.

Chez *Aedes aegypti* l'ovocyte est arrondi, et occupe la moitié du follicule (fig 9). L'autre moitié est occupée par des cellules nourricières à noyau sphérique. Des vésicules claires commencent à se développer autour des cellules nourricières.

Chez *Culex quinquefasciatus*, les follicules sont constitués de cellules (CF) non encore différenciées et de formes irrégulières. A ce stade, le follicule est très vascularisé (fig 10).

#### II.2.1.2. Vitellogenèse

Elle correspond aux premières manifestations vitellogéniques dès la fin de la prévitellogenèse. Elles se traduisent par l'apparition dans l'ovoplasme (cytoplasme de l'ovocyte) de petits globules lipidiques ainsi que de petits alvéoles corticaux.

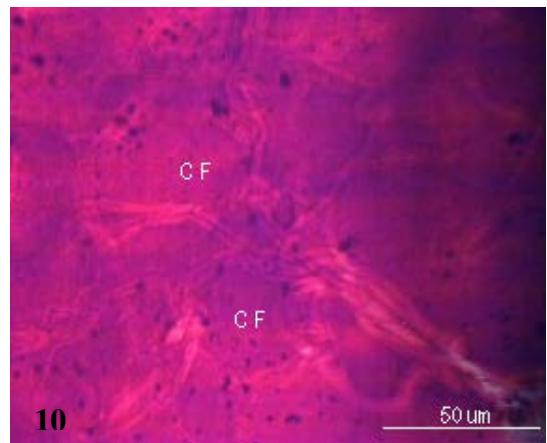
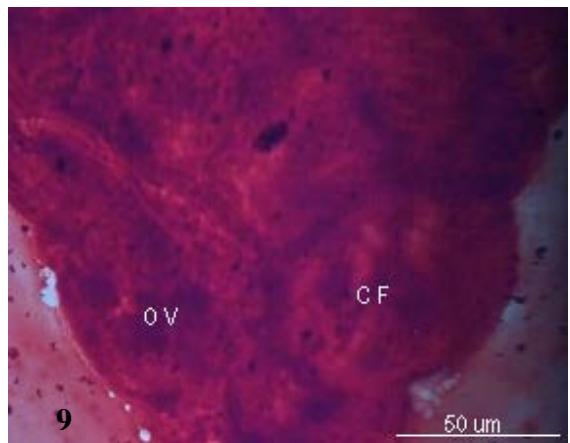
La cellule folliculaire en vitellogenèse est caractérisée par un remplissage progressif en vitellus. Les cellules nourricières commencent à migrer vers la périphérie et forment une couche plus ou moins continue entourant la masse cytoplasmique. L'épithélium folliculaire est très aplati au dessus des cellules nourricières situées au niveau du pôle. Les dépôts périovocytaires sont absents entre l'épithélium folliculaire et les cellules nourricières (figs 13, 14 & 15). Le follicule augmente de taille et les espaces comprises entre les cellules se rétrécissent progressivement (fig 16).

Le follicule ovocytaire, ou ovocyte entouré de ses enveloppes cellulaires et acellulaires est en place (fig. 17). La couche de cellules granulosaires est alors formée par des cellules très aplatis, en nombre restreint, mais ayant déjà sécrétée leur matrice extracellulaire constituant

la lame basale. Les cellules thécales commencent à quitter le tissu conjonctif extraovocytaire pour venir se placer sur la lame basale. A ce stade, elles sont encore en nombre très limité ne recouvrant pas encore dans certains cas toute la surface de la lame basale (figs 17 & 19). Les cellules de l'épithélium folliculaire situées au dessus de la lame basale forment une couche continue (fig 20). Cet épithélium folliculaire est absent au niveau d'un des pôles qui deviendra le futur pôle micropylaire fig 21).

### **II.2.1.3. Postvitellogenèse**

Elle est caractérisée par une profonde réorganisation de l'exochorion. Durant ce stade, il se produit une morphogenèse complète de l'œuf. L'ovocyte postvitellogénétique est entouré par deux couches nommées endochorion et exochorion. Ces deux couches sont séparées par une mince membrane continue (fig 22). L'exochorion apparaît plus dense et subit un début de fragmentation (fig 23). L'ovocyte est caractérisé par un cytoplasme très riche en vitellus. En plus des globules vitellins, le cytoplasme de l'ovocyte renferme de grosses granulations (fig 24). Des structures globuleuses colorées en gris apparaissent au niveau du pôle correspondant au pôle micropylaire. La localisation de ces éléments est la même dans toutes les cellules observées (fig 25 & 26).



**Figure 9 :** Structure d'une portion de follicule d'*Aedes aegypti* en prévitellogenèse.

Dans certains cas, l'ovocyte (O v) s'est différentié et occupe la moitié du follicule. L'autre moitié est occupée par un épithélium de cellules à petit noyau (tête de flèche). Coloration à l'orcéine acétique.

**Figure 10 :** Structure d'une portion de follicule de *Culex quinquefasciatus* en prévitellogenèse.

Les follicules sont constitués de cellules (CF) non encore différenciées et de formes irrégulières. A ce stade, le follicule est très vascularisé. Coloration à l'orcéine acétique.

**Figure 11 :** Morphologie générale d'une portion d'un follicule ovarien d'*Aedes aegypti* montrant l'agencement des cellules folliculaires. Coloration à l'orcéine acétique. O d = oviducte. C F = cellule folliculaire.

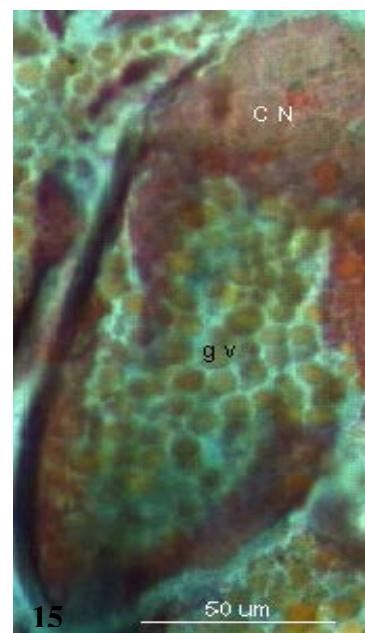
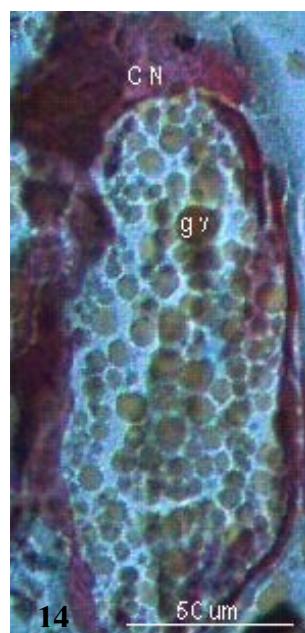
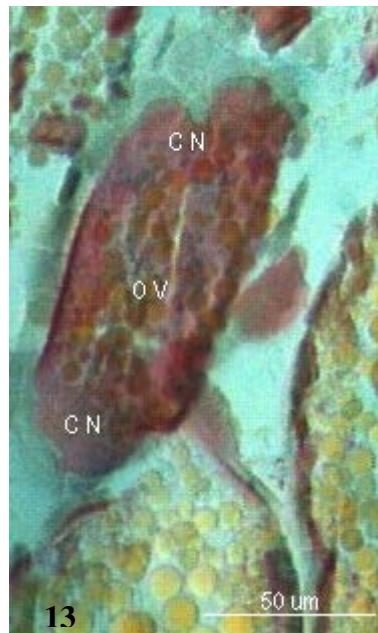
**Figure 12 :** Morphologie générale d'un ovaire prévitellogénétique de *Culex tigripes*. Coloration à l'orcéine acétique. F O = follicule ovarien.

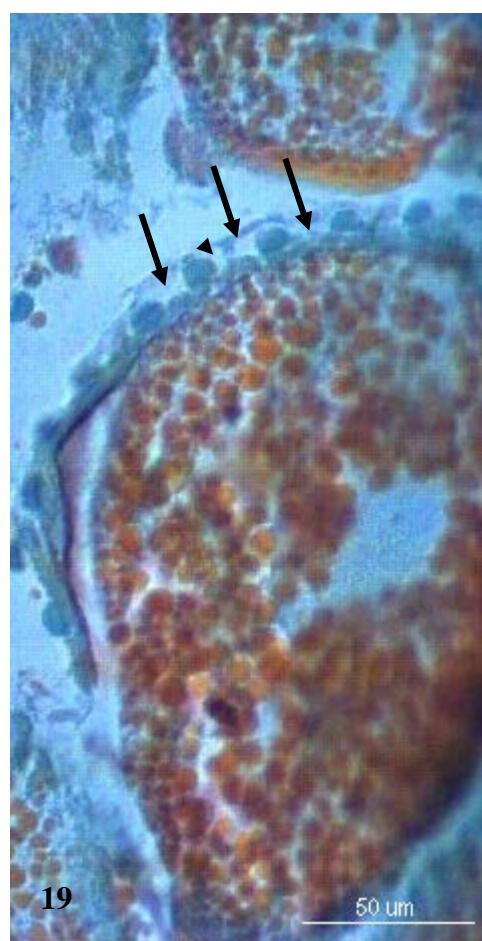
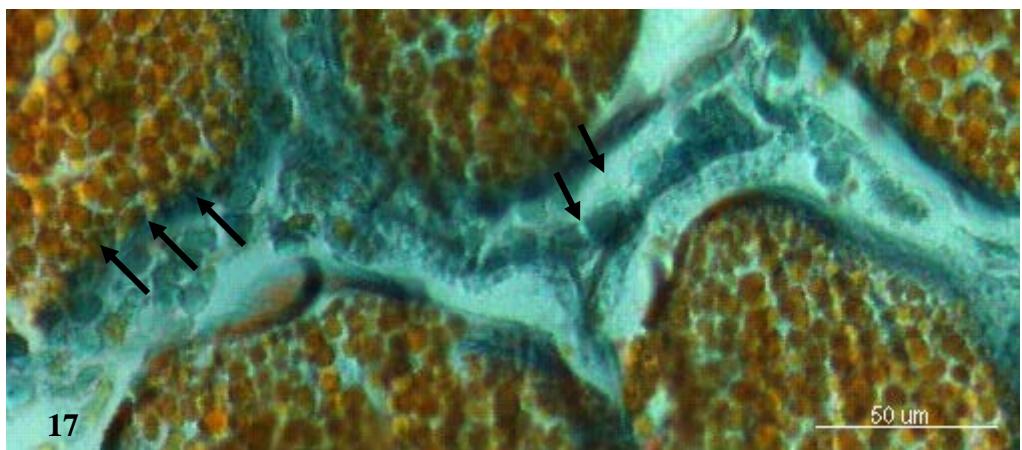
**Figure 13 :** Cellules folliculaires en début de vitellogenèse. Les cellules nourricières (CN) sont reléguées aux pôles.

**Figure 14 :** Cellules folliculaires accumulent progressivement du vitellus (g v). Les cellules nourricières (C N) forment une couche plus ou moins continue entourant la masse cytoplasmique.

**Figure 15 :** Cellules nourricières (CN) sont rejetées en un pôle du follicule. L'épithélium (flèches) est très aplati au dessus des cellules nourricières. Les dépôts périovocytaires sont absents entre l'épithélium folliculaire et les cellules nourricières.

**Figure 16 :** Cellules folliculaires augmentent considérablement de taille par accumulation et par fusion de globules vitellins (g v). Les espaces comprises entre les cellules se rétrécissent progressivement.





**Figure 17 :** Les espaces interstitiels sont riches en particules globuleuses (flèches) qui interviennent dans la formation de l'épithélium folliculaire.

**Figure 18 :** Coupe de follicule ovarien en vitellogenèse montrant la disposition des cellules folliculaires.

**Figure 19 :** Début de la formation du chorion. Le matériel extracellulaire (flèches) issu des espaces interstitiels vient se déposer sur la lame basale pour former l'épithélium folliculaire.

**Figure 20 :** Les cellules de l'épithélium folliculaire (flèches) adoptent une disposition plus régulière et forme une couche continue autour des cellules nourricières (CN).

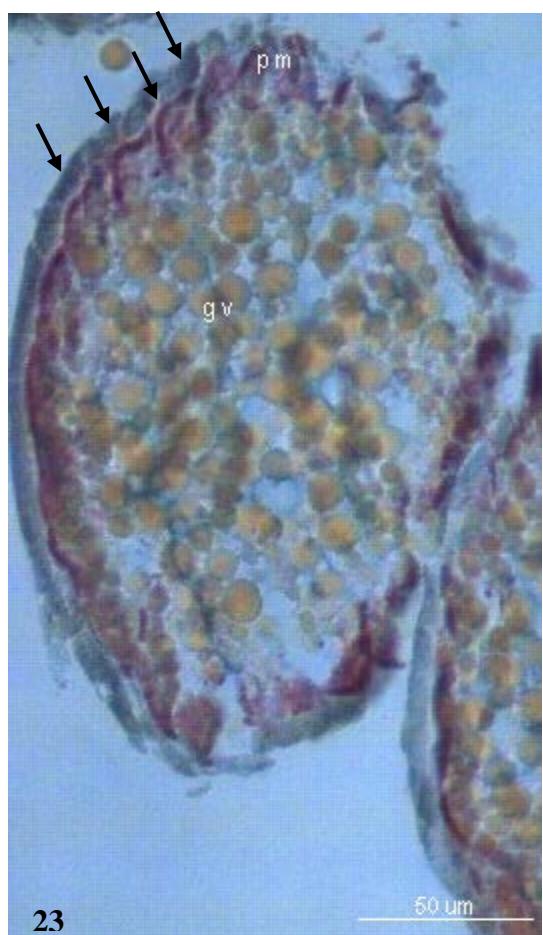
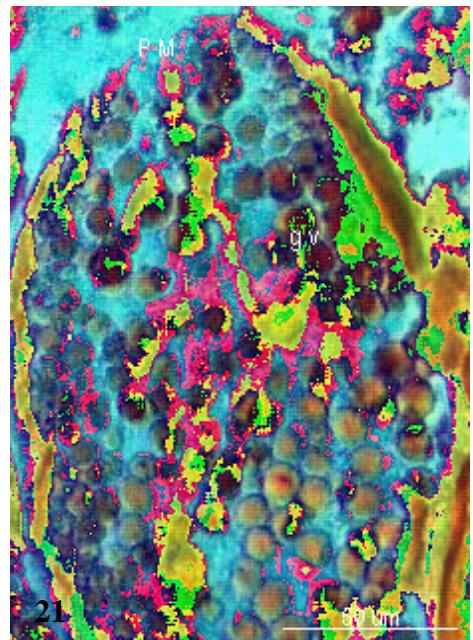
**Figure 21 :** L'Epithélium folliculaire est absent au niveau du pôle correspondant au pôle micropylaire (PM). Les cellules situées au niveau du pôle micropylaire ne participent pas à la formation de l'enveloppe de l'œuf.

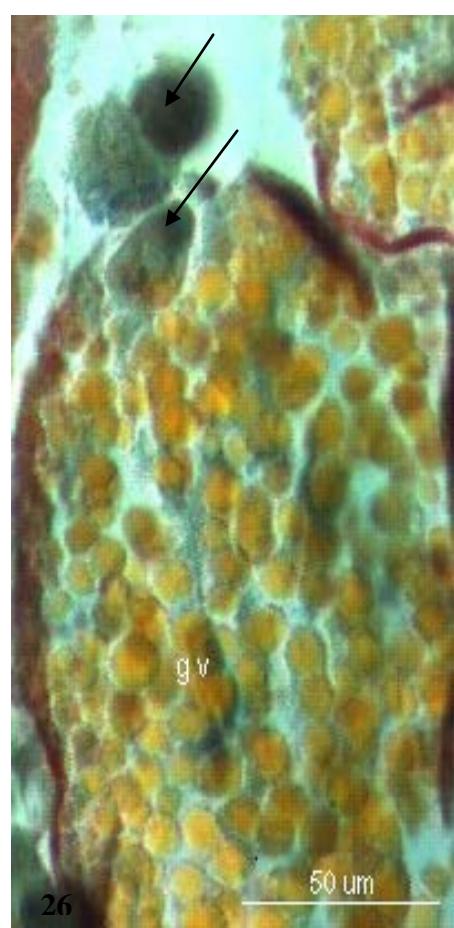
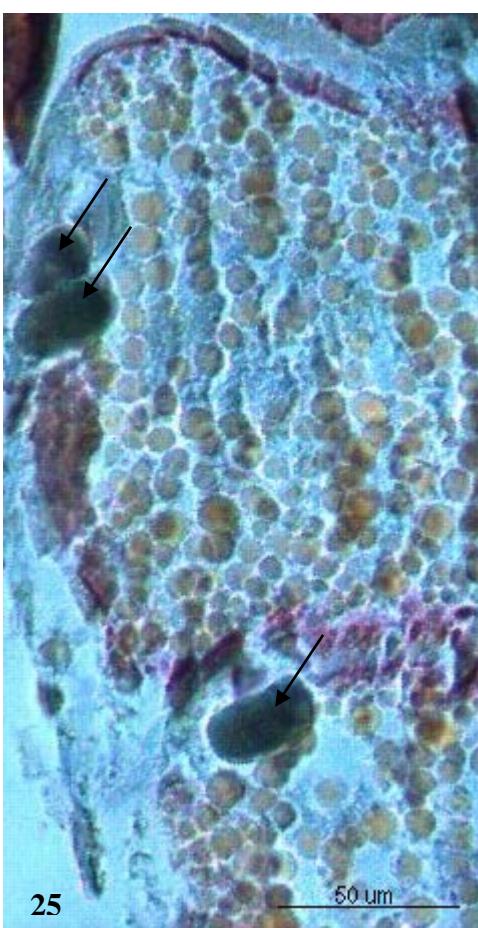
**Figure 22 :** L'ovocyte postvitellogénétique est entouré de deux couches nommées endochorion (EN) et exochorion (EX). Les deux couches sont séparées par une membrane de pellicule continue (tête de flèche).

**Figure 23 :** Début de fragmentation de la partie supérieur de l'exochorion (flèches). Ces fragments donneront les futures ornements caractéristiques des œufs de chaque espèce.

**Figure 24 :** En plus de la présence de globules vitellins (g v), le cytoplasme de la cellule renferme de grosses granulations (G).

**Figures 25 & 26 :** Apparition de structures globuleuses colorées en gris (flèches) au niveau du pôle micropylaire. Leur localisation est toujours la même dans toutes les cellules observées.





### III. DISCUSSION

La technique classique de fixation au Bouin alcoolique ou au Carnoy II nous ont donné des résultats satisfaisants en microscopie photonique. Cependant, les techniques de coloration *in toto* à l'orcène pour l'étude du système génital des moustiques ont l'avantage de donner des résultats variés, permettant d'étudier la morphologie générale de l'appareil reproducteur ainsi que les structures anatomiques le constituant. La gonade prend bien la coloration et apparaît en orangée. Il est possible de distinguer plus ou moins clairement à l'intérieur de celle-ci, la disposition des cellules sexuelles. Les résultats obtenus correspondent en générale à ceux décrits par Ndiaye *et al.*, 1996, sur la gaméto-génèse mâle des moustiques.

Chez les moustiques, chaque testicule contient un seul follicule dans lequel les cystes sont légèrement obliques voire transversaux de rôle nutritif. Selon Cruz-Landim & Ferreira (1981), les cellules cystiques joueraient un rôle de digestion des résidus cytoplasmiques.

Chez les moustiques, le testicule est télogonique, c'est-à-dire que l'évolution cytologique au cours de la spermatogenèse s'effectue de l'extrémité apicale du testicule vers l'extrémité postérieur en suivant un gradient progressif d'évolution et de maturation. La spermatogenèse est généralement classique. Tous les stades cellulaires de la spermatogenèse sont présents chez le mâle adulte. Dans nos travaux, nous avons pu distinguer différentes catégories cellulaires. L'existence de ces différentes types de cellules s'explique par le fait que ces cellules se répartissent généralement en plusieurs générations, les unes reliées aux autres par des rapports de filiation directe. La distribution des cellules germinales à l'intérieur du testicule rappelle celle décrite par Bairati (1967) et Tokuyasu *et al.* (1972).

De plus, l'existence de différentes catégories cellulaires chez un insecte est loin d'être un fait nouveau. En effet, des spermatogonies I et II ont été rapportées chez la drosophile par Tates (1971). A cause de la grande ressemblance entre ces deux types cellulaires, l'auteur ne fait état dans ses figures que des spermatogonies secondaires. Nous remarquons qu'il existe un nombre très élevé de spermatozoïdes dans les vésicules séminales. L'hypothèse la plus probable est qu'il existe très peu de cellules souches pour un nombre très élevé de spermatozoïdes.

Cela pourrait témoigner d'une intense activité mitotique à l'intérieur du testicule. Nous avons pu remarquer également que des modifications morphologiques interviennent lors du cheminement des spermatozoïdes dans les voies génitales mâles.

Au niveau du spermiducte, les spermatozoïdes immatures sont disposés suivant le grand axe de celui-ci. Cette disposition facilite leur migration vers les vésicules séminales. La vésicule séminale joue également un rôle important dans la spermiogenèse chez les moustiques. A ce niveau, les spermatozoïdes sont disposés en spirales concentriques. Nous assimilons toutes ces transformations à un processus de maturation des spermatozoïdes des moustiques. Selon Ndiaye *et al.*, 1997), les cellules somatiques rencontrées dans les vésicules séminales, semblent jouer un rôle dans la nutrition des spermatozoïdes.

Généralement chez les moustiques l'ovogenèse se déroule pendant les stades trophiques. Elle nécessite l'accumulation de réserves, principalement protéiques, pour assurer le développement des œufs. Les insectes qui ne parviennent pas à stocker suffisamment des protéines pendant les stades larvaires ne peuvent se reproduire a moins qu'ils n'acquièrent, à l'âge adulte, assez de protéines. Les insectes de cette dernière catégorie, dont font partie les culicidés, sont qualifiés d'anautigènes (Ndiaye 1996 ; Soumaré et Ndiaye 2004). Chez la grande majorité des moustiques, les protéines reproductives sont fournies par des vertébrés homéothermes, principalement des oiseaux et des mammifères.

L'ovogenèse se déroule au cours de plusieurs phases successives, subdivisées en stades d'après des critères cytologiques et morpho-biométriques.

Notre étude nous a permis de montrer que chez *Aedes aegypti*, les ovaires ont terminé leur développement dès le quatrième et dernier stade larvaire. Chez toutes les espèces considérées, il existe deux ovaires de type méroïstique polytrophique. Les ovogonies évoluent, les uns pour donner des cellules vitellines, les autres pour donner des ovocytes.

Le follicule subit de profondes modifications tant morphologiques que physiologiques au cours de l'ovogenèse.

Pour pouvoir évaluer la maturation ovarienne, Christophers (1911), propose une échelle où il classe les follicules en cinq stades, I, II, III, IV et V suivant leur degré de remplissage par le vitellus. En ultrastructure, Ndiaye (1996) résume ces stades en trois phases majeures : prévitellogenèse, vitellogenèse et postvitellogenèse.

Dans nos travaux, l'utilisation de la microscopie photonique nous a permis de suivre quelques aspects de l'évolution de la gonade en particulier les étapes de la vitellogenèse.

Chez certains insectes, la vitellogenèse se déroule en deux phases. Une première dite endogène pendant laquelle l'ovocyte élabore tout seul des globules vitellins en nombre réduit. Une seconde dite exogène durant laquelle l'ovocyte prélève ses réserves à l'extérieur par un processus de pinocytose (Ganion & Kessel, 1972).

Dans le cas des moustiques, la vitellogenèse se déroule essentiellement de façon classique et débute par la formation de vésicule de pinocytose (Roth & Porter, 1964 ; Schonbaum *et al*, 2000).

Les modifications structurales de l'ovaire observées durant l'ovogenèse résident essentiellement sur l'accumulation de vitellus et la formation de l'enveloppe de l'œuf. Ces modifications de la structure de l'ovaire rappellent celles décrites par Ndiaye (1996).

La prévitellogenèse apparaît comme une phase de différenciation des différentes catégories cellulaires des follicules ovariens. Selon Trabalon *et al.* (1992), c'est une période de préparation. Pendant cette période, un lot de follicules primaires en développement synchrone se détache du germarium (Klowden, 1997). La séparation des follicules secondaires du germarium serait régulée par une enzyme appelée ecdystérone (Beckemeyer & Lea, 1980 cités par Raikhel & Lea, 1991).

La vitellogenèse est une période de synthèse de vitellogénine, la protéine majeure du vitellus, et son accumulation dans l'ovocyte. La synthèse se fait dans le corps gras (Abu Hakima, 1981 cité par Raabe, 1986). Cette vitellogenèse est initiée par l'ingestion d'un repas sanguin par le moustique femelle prévitellogénétique. L'initiation de la vitellogenèse dans les ovocytes n'est effective qu'environ 12 heures après le repas sanguin pour la plupart des espèces que nous avons examinées. Le repas de sang a une double fonction, il est source de réserves métaboliques et constitue un stimulus d'initiation de la vitellogenèse. Le rôle initiateur du repas sanguin serait dû à la présence de cellules endocrines dans l'intestin moyen des moustiques (Klowden, 1997).

La formation de l'espace périovocytaire entre l'épithélium folliculaire et l'ovocyte au moment où les cellules nourricières sont encore liées à l'épithélium, est le premier changement morphologique des cellules épithéliales folliculaires.

La croissance folliculaire se traduisant par l'accumulation de vitellus et la choriogenèse demeurent les deux principaux processus de l'ovogenèse des insectes en général et des moustiques en particulier.

Parallèlement à ce remplissage, les follicules augmentent considérablement de taille. Les globules vitellins deviennent de plus en plus nombreux et se repartissent dans toute la cellule. Au niveau de la partie supérieure du follicule, apparaît une masse de cellules nourricières (trophocytes). En effet, chez le moustique, le follicule s'accompagne de cellules nourricières tout au long de son développement.

Selon Gottanka & Büning (1993), l'existence de plusieurs cellules nourricières qui accompagnent le follicule lors de sa descente dans l'ovariole, est une caractéristique des ovaires meroïstiques polytrophiques des insectes holométaboles en général et des diptères en particulier.

Les cellules folliculaires adoptent progressivement une disposition plus régulière autour des cellules nourricières et des ovocytes. Les cellules de l'épithélium folliculaire situées au dessus des cellules nourricières ne participent pas au dépôt des enveloppes de l'œuf. L'absence de dépôts chorionique au niveau du pôle où sont rejetées les cellules nourricières suggère que ce pôle est le futur pôle micropylaire de l'œuf. Le rôle des cellules épithéliales polaires n'est pas bien connu. Toutefois leur position suggère une intervention dans la formation de l'appareil micropylaire. En plus de son rôle dans la synthèse et la sécrétion des matériaux précurseurs des dépôts des enveloppes, l'épithélium folliculaire est le lieu d'une biosynthèse d'une hormone appelée ecdysone (Goltzené *et al.*, 1978 cités par Raabe, 1986).

Plusieurs modifications interviennent au cours de la formation de l'enveloppe de l'œuf ou chorion. Les enveloppes sont formées de façon séquentielle durant un processus appelé choriogenèse. La formation du chorion débute au stade vitellogenèse. King (1970) distingue 14 stades dans l'ovogenèse dont 4 stades (11 à 14) représentent la choriogenèse. Margaritis (1986) propose 9 stades coïncidant avec la formation de structures spécialisées en des points spécifiques.

À un stade plus avancé, c'est-à-dire pendant la postvitellogenèse, on note une profonde réorganisation de l'enveloppe de l'œuf. À ce stade, le chorion est différencié en un endochorion et en un exochorion. Il subit une fragmentation de sa partie supérieure. Selon Ndiaye (1996), ces fragments qui s'individualisent progressivement donneront finalement naissance à des ornementations caractéristiques des œufs de chaque espèce. L'apparition de structures globuleuses colorées en gris au niveau du pôle micropylaire est un phénomène tout à fait nouveau en histologie en microscopie photonique.

La signification de ces éléments est encore inconnue à notre connaissance. Cependant, la forme de ses éléments ainsi que leur nombre semble attester l'existence de phénomène de division. Nous remarquons cependant que ces structures n'apparaissent qu'en un moment où il n'y a plus de cellules nourricières dans la cellule folliculaire. Nous assimilons l'existence de ces éléments à un début du processus de formation de l'embryon.

Chez toutes les femelles gravides de moustique, nous avons pu constater que la vitellogenèse s'achevait au bout de 48heures après un repas sanguin suffisant en quantité en même temps que la choriogenèse.

## **CONCLUSION**

L'étude structurale de la gamétogenèse mâle et femelle chez les moustiques nous a permis de comprendre les mécanismes de l'élaboration des gamètes chez les insectes en général et les diptères en particuliers. Les différents événements spermatogénétiques et ovogénétiques se font suivant une chronologie bien définie.

La spermatogenèse suit un processus de synthèse, de différenciation et de maturation des gamètes alors que la synthèse de vitellus et la formation de des enveloppes de l'œuf représentent les événements les plus marquants de l'ovogenèse.

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Cette étude qui porte sur 4 espèces de moustiques nous a permis de comprendre un certain nombre de phénomènes concernant leur bio-écologie et leur reproduction.

Les facteurs environnementaux jouent un rôle primordial dans le cycle de développement des moustiques.

La température est le principal régulateur de croissance et de développement entre les différents stades. Elle détermine la fin d'un stade et le début du stade suivant et règle la longueur du cycle trophogonique. Elle agit principalement pendant le stade de développement des larves.

Les œufs de même que les larves des moustiques sont capables de survivre et d'évoluer pendant un certain temps sur du substrat de terre humide. Ce phénomène peut être une source importante de prolifération des moustiques à partir des habitats nouvellement desséchés.

Les moustiques utilisent également des propriétés chimiques et biologiques pour détecter les gîtes potentiels de ponte. Ceci favorise la dispersion des femelles adultes dans l'espace, qui est un facteur important dans le cycle de recherche des gîtes de ponte.

La fécondité d'une femelle de moustique du genre *Aedes aegypti* décroît en fonction de l'âge. L'étude de la gamétopénie nous a permis de mettre en évidence la structure des appareils génitaux mâle et femelle, ainsi que les modalités de développement des cellules sexuelles.

La gamétopénie mâle de moustique passe successivement par une phase d'immaturité, de maturité puis de sénescence. Le testicule de moustique est constitué d'un seul follicule et les cystes sont disposés suivant un gradient de maturation. La vésicule séminale joue un rôle important dans la maturation des gamètes mâles.

L'ovogenèse se déroule en trois phases : prévitellogenèse, vitellogenèse et postvitellogenèse.

La prévitellogenèse est surtout marquée par une multiplication et une croissance de cellules germinales issues du gremarium. La vitellogenèse est caractérisée par une accumulation de vitellus et la formation de l'enveloppe nucléaire autour de l'œuf. Les globules vitellins se forment essentiellement par un phénomène classique de pinocytose. Les différentes vésicules fusionnent pour donner naissance aux globules vitellins.

L'enveloppe de l'œuf provient essentiellement des cellules folliculaires qui forment une épaisse couche autour de l'œuf. Cette couche se différencie ensuite en endochorion et en exochorion. La ponte a généralement lieu 48 à 72 heures après le repas sanguin.

## **PERSPECTIVES**

Dans nos travaux, un certain nombre de phénomènes a été observé. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires à savoir :

- l'étude de l'influence des facteurs physico-chimiques sur le cycle de développement des larves de moustiques,
- mieux définir les rapports entre la température et la répartition des moustiques afin de mieux cartographier les foyers de risques de prolifération de moustiques,
- faire l'étude sur plusieurs taxa de moustiques pour voir si le choix des surfaces de ponte reflète une diversité dans l'écologie des moustiques vecteurs.
- l'étude ultrastructurale des stades préliminaires de la prévitellogenèse et de la vitellogenèse, de même que l'embryologie des moustiques.

**Titre : Étude de l'influence de certains facteurs écobiologiques sur le développement des stades préimaginaux et gamétogenèse des moustiques (Diptera : Culicidae).**

**Nom du candidat :** Gorgui DIOUF

**Nature du mémoire :** D.E.A. de Biologie Animale.

**Jury: Président:** M. Mady NDIAYE

**Membres:** M. Massamba SYLLA

M. Lassana KONATE

M. Cheikhna DIABAKHATE

Soutenu le 30 novembre 2006

**Résumé :**

Cette étude de la bio-écologie et de la gamétogenèse des moustiques a porté sur 4 espèces de la famille des Culicidae.

Le matériel utilisé est constitué d'œufs, de larves, de nymphes et d'adultes d'*Aedes aegypti*, d'*Anopheles gambiae* ssp, de *Culex quinquefasciatus* et de *Culex tigripes*. Nous avons étudié l'effet de la température de l'eau sur le développement des œufs, des larves et des nymphes chez *Aedes aegypti* et chez *Anopheles gambiae* en utilisant une gamme de température allant de 20 à 37 ° C. La résistance à la dessiccation a été testée sur les 4 stades larvaires d'*Anopheles gambiae*. Pour chaque stade, nous avons déposé 20 larves dans une boîte de Pétri contenant du substrat humide de terre du gîte larvaire et nous avons suivi la mortalité. Pour l'étude de la fécondité, nous avons suivi l'évolution du nombre d'œufs pondus en fonction du nombre de ponte chez *Aedes aegypti*.

Pour l'étude structurale de la gamétogenèse, la gonade extraite est d'abord fixée soit au Carnoy II soit au Bouin alcoolique avant de subir le traitement classique utilisé en microscopie photonique.

Les résultats obtenus ont montré que :

Pour une même température, allant de 20 et 37° C, le temps de développement des stades préimaginaux depuis la mise en éclosion des œufs jusqu'à l'émergence des adultes est plus long chez *Anopheles gambiae* que chez *Aedes aegypti*. Ce temps varie de 7 à 21 jours pour *Anopheles gambiae* et de 5 à 21 jours pour *Aedes aegypti*.

Les larves des stades L1, L2, L3 d'*Anopheles gambiae* peuvent survivre pendant 48 à 72 heures sur du substrat de terre humide alors que les larves de stade L4 peuvent y survivre pendant au moins 92 heures.

La quantité d'œufs pondus par *Aedes aegypti* diminue en fonction du nombre de ponte. Cette quantité, élevée dès les premières pontes (jusqu'à 80 œufs en moyen), elle passe à 30 œufs à la 16<sup>ème</sup> ponte.

Les coupes histologiques réalisées sur les gonades des moustiques nous ont permis d'observer différents types de cellules durant la maturation de la gonade et suivant leur localisation.

Les spermatogonies occupent la région antérieure du testicule, les spermatocytes et les spermatides sont situés dans la région moyenne et les spermatozoïdes sont dans la région postérieure et dans la vésicule séminale.

L'ovogenèse se déroule en trois phases : prévitellogenèse, vitellogenèse et postvitellogenèse. Nous avons identifié ces trois phases en se basant sur la taille des ovocytes, la formation de vitellus et la mise en place de l'enveloppe de l'œuf.

**Mots clés :** Moustiques, diptères culicidés, facteurs environnementaux, écobiologie, spermatogenèse, ovogenèse.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmadi A. & McClland G.A. H., 1983. Oviposition attractants of the western treehole mosquito, *Aedes sierensis*. *Mosquito News*, 43: 343-345.
- Bairati A., 1967. Structure ed ultrastruttura dell'apparato genitale maschile de *Drosophila melanogaster* L. Testicolo. *Z. Zellforsch. Microsk. Anat.*, 76: 56-99.
- Bayoh M.N. & Lindsay S.W., 2003. Effect of temperature on the development of the aquatic stages of *Anopheles gambiae* sensu stricto (Diptera: Culicidae). *Bull Entomol Ress.*, 93 : 375-381.
- Beehler J .W. & Mulla M. S., 1995. Effects of organic enrichment on temporal distribution and abundance of culicine egg rafts. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.*, 11: 167-171.
- Beier J.C., Copeland R., Oyaro C., Masinya A., Odago W.O., Oduor S., Koech D.K. & Roberts C.R., 1990. *Anopheles gambiae* complex egg-stage survival in dry soil from larval development sites in Kenya. *J.Am. Mosq. Assoc.*, 6: 105-109.
- Blackwell A. & Johnson S. N., 2000. Electrophysiological investigation of larval water and potential oviposition chemo-attractants for *Anopheles gambiae* s.s. *Ann Trop Med Parasitol.*, 94: 389-398.
- Blaustein L. & Kotler B. P., 1993. Oviposition habitat selection by the mosquito, *Culiseta longiareolata*: Effects of conspecifics, food and green toad tadpoles. *Ecol. Entomol.*, 18: 104-108.
- Bøgh C., Clarke S.E., Jawara M., Thomas C J. & Lindsay S.W., 2003. Localized breeding of the *Anopheles gambiae* complex (Diptera: Culicidae) along the river Gambia , West Africa. *Bulletin of Entomological Research.*, 93: 272-287.

Breeland S.G., Pletsch D.J. & Quaterman K.D., 1970. Laboratory studies on the suitability of mud as an oviposition substrate for *Anopheles albimanus* Wiedeman. *Mosq News*, 30: 81-88.

Charlwood J.D., Vij .R. & Billingsley P.F., 2000. Dry sseason refugia of malaria-transmited mosquitoesin a dry savannah zone of east Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 62: 726-732.

Charmillot J., 2004. Les régulateurs de croissance d'insectes (RCI), mimiques de l'hormone juvénile, en tant que moyen de lutte morphogénétique et ovicide contre les tordeuses des verges. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 51: 59-69.

Christophers S.R., 1911. The development of the egg follicule in *Anopheles*. *Paludism*. 21: 73-87.

Christophers S.R., 1923. The structure and development of the female genital organs and hypogaeum of the mosquito. *Indian J. med. Res.*, 10: 698-720.

Clements A.N., 1956. Hormonal control of ovary developmentin mosquitoes. *J. Exp. Biol.*, 33: 211-223.

Clements A.N., 1992. The biology of mosquitoes: I. Development, Nutrition and Reproduction. Chapman & Hall Ed. London. 530 pp.

Cruz-Landim C. & Ferreira A., 1981. Studies on the fine structure of cyst cells and its relationships with the spermatids on *Myogrillus sp.* (Orthoptera). *Rev. Brasil. Biol.*, 41: 401-406.

Depinay J.O., Mbogo C.M., Killeen G., Knols B., Beier J., Carlson J., Dushoff J., Billingsley P., Mwambi H., Githure J., Toure A.M. & McKenzie F.E., 2004. A simulation model of African *Anopheles* ecology and population dynamics for the analysis of malaria transmission. *Malaria Journal*, 3: 29 p.

Edgerly J.S., McFarland M., Morgan P. & Livdahl T., 1998. A seasonal shift in egg-laying behaviour in response to cues of future competition in a tree hole mosquito. *J. Anim. Ecol.*, 67: 805-818.

Ganian I.R. & kessel R. G., 1972. Intercellular synthesis, in transport, and packing of proteinaceous yolk in oocytes of *Orconectes immunis*. *J. Cell Biol.*, 52: 420-437

Giglioli M.E.C., 1963. The female reproductive system of *Anopheles gambiae* melas. *Riv. Malar.*, 42: 149-176.

Gimnig J.E., Ombok M., Kamau L. & Hawley W.A., 2001. Characteristics of larval anopheline (Diptera: Culicidae) habitats in Western Kenya. *Journal of Medical Entomology*, 38: 282-288.

Gimnig J.E., Ombok M., Otieno S., Kaufman M.G., Vulule J.M. & Walker E.D., 2002: Density-dependent development of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larval in artificial habitats. *Journal of Medical Entomology*, 39: 162-172.

Gottanka J. & Büning J., 1993. Mayflies (Ephemeroptera), the most primitive winged insects have telotrophic meroistic ovaries. *Roux's Archiv. Dev. Biol.*, 203: 18-27.

Harbach R. & Kitching I.J., 1998. Phylogeny and classification of the Culicidae (Diptera). *Systematic Entomology*, 13 (4): 327-370.

Holstein M.H., 1954. Biology of *Anopheles gambiae* – Research in French West Africa Geneva. *World Health Organisation*.

Keating J., MacIntyre K. & Mbogo C., 2003. A geographic sampling strategy for studying relationships between human activity and malaria vectors in urban Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68: 357-365.

King R. C., 1970. Ovarian development in *Drosophila melanogaster*. Academic Press, N. Y. et Londres.

Klowden M. J., 1997. Endocrine Aspects of Mosquito Reproduction. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 35: 491-512.

Koenraadt J.M.C., Paaijmans P.K., Githeko K.A., Knols G.J.B. & Takken W., 2003. Egg hatching, larval movement and larval survival of the malaria vector *Anopheles gambiae* in desiccating habitats. *Malaria Journal*. 2: 20 p.

Lu Y.U. & Hagedorn H.N.H., 1986. Egg development in the mosquito *Anopheles albimanus*. *Int. J. Invert. Reprod. Dev.*, 9: 79-94.

Margaritis L. H., 1986. The eggshell of *Drosophila melanogaster*.II. New staging characteristics and fine structural analysis of choriogenesis. *Can. J. Zool.*, 64: 2152-2175.

Martoja R. & Martoja-Pierson M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie. Paris, p. 345.

Menach A.L., McKenzie F.E., Flahault A. & Smith D.L., 2005. The unexpected importance of mosquito oviposition behaviour for malaria: non-productive larval habitats can be sources for malaria transmission. *Malaria Journal*, 4: 23 p.

Millar J. G., Chaney J. D., Beetler J.W. & Mulla M.S., 1994. Interaction of the *Culex quinquefasciatus* egg raft pheromone with a natural chemical associated with oviposition sites. *J. Am. Mosq. Contr. Assoc.* 10: 374-379.

Minakawa N., Githure J.I., Beier J.C. & Yan G., 2001. Anopheline mosquito survival strategies during the dry period in western Kenya. *J. Med. Entomol.*, 38: 388-392.

Muirhead-thomson R.C., 1945. Studies on the breeding places and control of *Anopheles gambiae* and *Anopheles gambiae* var. *melas* in coastal of Sierra Leon. *Bull Entomol. Res.*, 36 : 185-252.

Ndiaye M., 1990. Etude ultrastructurale de la gamétogénèse mâle de *Toxorhynchites brevipalpis* Theobald, 1901 (Diptera, Culicidae, Toxorhynchitinae). Thèse de troisième cycle, U.C.A.D.

Ndiaye M. & Mattei X., 1993. Process of Nuclear Envelope Reproduction in Spermiogenesis of a Mosquito, *Culex tigripes*. *Molecular Reproduction and Development*, 34: 416-419.

Ndiaye M., 1996. Etude ultrastructurale de la gamétogénèse mâle et femelle chez les moustiques (Diptera : Culicidae). Thèse de Doctorat d'Etat, U.C.A.D.

Ndiaye M., Mattei X. & Thiaw O.T., 1996. Spermatogenesis in mosquito (Diptera: Culicidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 28 (3): 375-384.

Ndiaye M., Mattei X. & Thiaw O.T., 1997. Maturation of mosquito spermatozoa during their transit throughout the male and female reproductive systems. *Tissue & cell.*, 29 (6):675-678.

Nunez Von J. A., 1963. Über den Fernbau des spermienstanzes Von *Culex pipiens*. *Biol. Zbl. Band.*, 82: 1-7.

Pawlowski J., Szadziewski R., Kmiecik D., Fahrni J., & Bittar G., 1996. Phylogeny of the infraorder Culicomorpha (Diptera: Nematocera) based on 28S RNA gene sequences. *Systematic Entomology*, 28 (2): 167-178.

Petraska J. W. & Fakhouri K., 1991. Evidence of the chemically-mediated response of ovipositing insects to bluegills and green frog tadpoles. *Copeia*. 243-249.

Polovodova V.P., 1949. The determination of the physiological age of the female *Anopheles* by the number of the gonotrophic cycles completed. *Med. Parasit., Moscou.* 18: 352-362.

Raabe M., 1986. Insect Reproduction: Regulation of successive steps. *Adv. Insect Physiol.*, 19: 29-154.

Raikhel A. S. & Lea A. O., 1991. Control of follicular epithelium development and vitelline envelope formation in the mosquito; role of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone. *Tissue and cell.*, 4: 577-591.

Roberts D., 1996. Mosquitoes (Diptera: Culicidae) breeding in brackish water: female ovipositional preferences or larval? *J. Med. Entomol.*, 33: 525-530.

Rodhain F. & Perez C., 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire : Notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs. *Meloine S.A.*

Roth T.F. & Porter K.R., 1964. Yolk protein uptake in the oocyte of the mosquito *Aedes aegypti* L. *J. Cell Biol.*, 20: 313-332.

Roth M., 1980. Initiation à la morphologie, la systématique et la biologie des insectes. Document. Tech. O.R.S.T.O.M. (Paris). 23: 1-332.

Schonbaum C.P., Perrino J.J. & Mahowald A.P., 2000. Regulation of the vitellogenin during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Mol. Biol. Cell.* 11: 511-521.

Scott T.W., Takken W., Knols B.G.J. & Boëte C., 2002. The ecology of genetically modified mosquitoes. *Science*. 298: 117-119.

Sharpe P. & DW D., 1977. Reaction kinetics of poïlotherm development. *J. Theor Biol.*, 64: 649-670.

Shoofield R., PJH S. & CE M., 1981. Non-linear regression of biological temperature-dependent rate models based on absolute reaction-rate theory. *J. Theor Biol.*, 88: 719-731.

Sota T. & Mogi M., 1992. Interspecific variation in desiccation survival time of *Aedes* (Stegomyia) mosquito eggs is correlated with habitat and egg size. *Oecologia*., 90: 353-358.

Soumaré M.L. & Ndiaye M., 2004. Ultrastructural studies of mosquito ovogenesis. *Tissue and Cell.*, 37: 117-124.

Spencer M., Blaustein L. & Cohen J. E., 2002. Oviposition habitat selected by mosquitoes (*Culiseta longiareolata*) and consequences for population size. *Ecology*, 83: 669-679.

Stav G., Blaustein L. & Margalit J., 1999. Experimental evidence for predation risk sensitive oviposition by a mosquito, *Culiseta longiareolata*. *Ecol. Entomol.*, 24: 202-207.

Taken W., 1999. Chimical signals affecting mosquito behaviour. *Invert.Reprod.Dev.*, 36: 67-71.

Takken W. & Knols B.G.J., 1999. Odor-mediated behaviour of Afro-tropical malaria mosquitoes. *Annu Rev Entomol.*, 44: 131-157.

Tates A. D., 1971. Cytodifferentiation during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. An electron microscope study. Thèse 161 pages.

Taylor C.E., Touré Y.T., Coluzzi M. & Petrarca V., 1993. Effective population size and persistence of *Anopheles arabiensis* during the dry season in west Africa. *Med. Vet. Entomol.*, 7: 353-357.

Tokuyasu K. T., Peacock W. J. & Hardy R. W., 1972. Dynamics of spermatogenesis in *Drosophila melanogaster* I. Individualisation Process. *Z. Zellforsch. Microsk. Anat.*, 124: 479-506.

Trabalon M., Bautz A. M., Morinière M. & Porcheron P., 1992. Ovarian development and correlated changes in hemolymphatic ecdysteroid levels in two spiders, *Coeleotes terrestris* and *Tegenaria domestica* (Araneae, Agelenidae). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 88: 128-136.

Williams C.R., Kokkinn M.J & Gilbert K.S., 1999. Special heterogeneity in oviposition preference of the mosquito *Aedes notoscriptus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Adelaide South Australia. *Aust. J. Entomol.*, 38: 354-358.

Wilkinson R.N., Gould D.J., Boonyakanist P. & Segal H.E., 1978. Observations on *Anopheles balabacensis* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *J Med Entomol.*, 14: 666-671.