

WHO/Ma1/296
12 juin 1961

ORIGINAL : ANGLAIS



ETUDES SUR L'AGENCEMENT DES CHROMOSOMES CHEZ ANOPHELES ATROPARVUS ET A. LABRANCHIAE
AINSI QUE SUR L'IRRITABILITE ET LA SENSIBILITE DE CES ANOPHELES¹

par le

Professeur G. d'Alessandro, Directeur
M. Mariani, C. Bruno-Smiraglia et N. Caravaglios
Istituto d'Igiene e Microbiologia
Université de Palerme, Italie

Le présent rapport rend compte des recherches suivantes menées de
juillet 1959 à décembre 1960 :

1. Continuation d'une étude sur l'agencement des chromosomes chez les anophèles, notamment parmi des colonies anophéliennes soumises à une pression sélective par des insecticides.
2. Etude des effets irritants observés chez les anophèles mis en contact avec des surfaces traitées par les insecticides.
3. Etude de la sensibilité initiale aux insecticides chez les anophèles vecteurs en Sicile. Application et comparaison de la méthode Busvine-Nash et de la méthode standard de l'OMS.
4. Application de toutes les méthodes indiquées ci-dessus à l'étude de la résistance et de la sensibilité aux insecticides organo-phosphorés des colonies d'espèces anophéliennes élevées à l'insectarium et études sur le mécanisme de cette résistance.

Les études ont été réalisées sur les souches suivantes d'Anopheles :

- A. La souche italienne d'A. atroparvus originaire de Ferrare, Italie. A cette colonie furent adjointes certaines pontes d'A. atroparvus provenant

¹ Etudes réalisées grâce à une subvention de recherche de l'OMS.

de captures effectuées dans d'autres zones en 1946, avant le début de la campagne de lutte antipaludique au DDT. Nous entretenons cette colonie dans notre laboratoire de Palerme depuis novembre 1955.

B. La souche sensible de Hambourg, originaire du nord de l'Allemagne (souche 2) procurée par le Bernhard Nocht Institut für Tropenkrankheiten (Hambourg) le 5 décembre 1958 et élevée depuis lors dans notre laboratoire.

C. La souche IV dérivée de la souche italienne qui avait été exposée pendant 39 générations sous les formes larvaire et adulte à l'action sélective du DDT (d'Alessandro & Mariani, 1958).

1. Etude de l'agencement des chromosomes chez les souches d'anophèles

Les recherches précédemment menées dans notre laboratoire (d'Alessandro, Frizzi & Mariani, 1957 et 1958) et dont les résultats ont été confirmés par d'autres auteurs (Mosna, Rivosecchi & Ascher, 1958; Mosna, Palmieri, Ascher & Rivosecchi, 1959), ont montré que la pression du DDT sur une population larvaire d'A. atroparvus dont l'agencement chromosomique est hétérogène (standard, homozygote inverti et hétérozygote) favorise nettement la survivance des individus à disposition hétérozygote. D'autres recherches ont donné les résultats suivants :

A. Chez la souche italienne d'A. atroparvus, entretenue depuis 1955 dans notre laboratoire à une température relativement constante ($26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) on a observé un accroissement régulier "spontané" du nombre des hétérozygotes qui ont fini par constituer 50 % des populations. Ce point atteint un équilibre qui a paru s'établir entre les larves à disposition hétérozygote et celles qui présentent un agencement standard (à peu près 50 % de chaque sorte).

B. La souche A. atroparvus de Hambourg, élevée par nous en laboratoire dans les mêmes conditions depuis décembre 1958, s'est comportée de manière analogue. En fait, la colonie qui comprenait initialement (aussitôt après son arrivée à notre laboratoire) 90 % de standards et 10 % d'hétérozygotes, est actuellement composée comme suit : homozygotes standards 57,5 %, hétérozygotes 41,5 % et homozygotes invertis 1 %.

C. L'action du DDT ne paraît pas modifier le rapport des standards aux hétérozygotes dans la souche italienne d'A. atroparvus lorsque le point d'équilibre des agencements chromosomiques a été atteint (standards 50 %, hétérozygotes 50 %).

En revanche, chez la souche de Hambourg, le traitement de la population larvaire par le DDT favorise la survivance des individus à agencement hétérozygote et met en évidence les rares homozygotes invertis. En fait, les proportions des agencements chromosomiques qui, avant le traitement, étaient les suivants : standards 57,5 %, hétérozygotes 41,5 %, invertis 1 %, devenaient après le traitement : standards 39 %, hétérozygotes 52 % et invertis 9 %.

D. Les modifications des taux des dispositions chromosomiques semblent être accompagnées par une réduction de la sensibilité au DDT des larves appartenant à la souche italienne d'A. atroparvus. En effet, au cours d'expériences effectuées en septembre 1956, il a fallu 0,5 p.p.m. de DDT et 15 minutes de contact¹ pour obtenir une mortalité de 50 % parmi une population de larves comprenant : standards 62 %, hétérozygotes 37 % et invertis 1 %. Lors de tests effectués en octobre 1960, la population larvaire étant composée de : standards 46 % et hétérozygotes 54 %, il avait fallu pour obtenir la même mortalité (50 %) employer du DDT à 5 p.p.m., c'est-à-dire à une concentration dix fois plus forte.

E. La souche IV, après la douzième génération, a manifesté une résistance modérée au DDT; en fait, la CL_{50} initiale, de 1,6 %, (femelles adultes) est passée à une valeur comprise entre 9 % et 10 %. A la douzième génération, la composition génétique se présentait ainsi : standards 21,71 %, hétérozygotes 74,8 % et invertis 3,49 %. Elle s'était donc nettement modifiée par rapport à la composition initiale : standards 79,1 %, hétérozygotes et invertis 20,9 %.

¹ On a adopté une durée d'exposition de 15 minutes afin d'obtenir des résultats qui soient comparables à ceux des études réalisées en 1956 (Bull. Org. mond. Santé, 1957, 16, 859).

Entre la douzième et la trentième génération, la pression sélective n'a provoqué aucune nouvelle augmentation de la résistance de la souche.

A ce point, en vue de renforcer le matériel génétique, la souche étudiée a été croisée avec la souche Hambourg, dans les deux sens ($\overset{\uparrow\uparrow}{oo}$ de IV avec $\overset{\uparrow\uparrow}{oo}$ de Hambourg et $\overset{\uparrow\uparrow}{oo}$ de Hambourg avec $\overset{\uparrow\uparrow}{oo}$ de IV).

A la trente-deuxième génération (la deuxième après le croisement) on a repris l'étude de la sélection de la souche IV en présence de DDT.

Avant la trente-neuvième génération (la neuvième après le croisement) aucun changement du degré de sensibilité au DDT n'a été observé. En revanche, la composition cytogénétique a été modifiée après le croisement : actuellement, l'ancienne souche IV est ainsi constituée : standards 54 %, hétérozygotes 44,5 % et invertis 1,5 %.

F. On a tenté, à diverses reprises, d'obtenir une souche comprenant seulement des sujets à disposition standard. A cet effet, on a prélevé des dépôts d'oeufs isolés et l'on a choisi pour former une colonie les pontes dont, après examen de 50 % des individus, on pouvait présumer qu'elles étaient entièrement constituées d'homozygotes standards. On a pu observer que les souches isolées par la technique décrite comprenaient, lors d'examens effectués après plusieurs générations, un certain nombre d'hétérozygotes.

G. On procède maintenant à des expériences pour étudier l'influence des variations journalières de la température ($\pm 8^{\circ}\text{C}$) et de la salinité sur la composition des souches, en ce qui concerne l'agencement des chromosomes chez les divers sujets.

Des résultats obtenus jusqu'à présent, il paraît ressortir qu'il survit plus de sujets homozygotes standards dans les souches maintenues à des températures variables (de jour $26-27^{\circ}\text{C}$; de nuit $18-20^{\circ}\text{C}$) et en particulier dans l'eau contenant 3 % à 4 % de NaCl. Les souches tendent alors à retrouver la composition cytogénétique qu'elles présentaient avant leur élevage systématique en laboratoire à une température relativement constante et dans de l'eau à faible teneur en NaCl.

Les résultats de cette série d'expériences indiquent que, dans les conditions où A. atroparvus est élevé en laboratoire, les sujets homozygotes (standards et invertis) sont plus sensibles aux microclimats défavorables. En fait, dans la souche italienne d'A. atroparvus composée de : standards 50 % et hétérozygotes 50 %, on devrait, en raison de la probabilité de combinaisons entre des sujets qui présentent des agencements différents, observer dans les générations successives un accroissement du nombre des homozygotes standards et invertis. Si cette prévision ne se réalise pas, c'est parce que la mortalité sera probablement plus forte chez ces sujets que chez ceux dont l'agencement est hétérozygote. Notons que, dans la translocation (crossing over) le segment inverti (zone 44-48 de la branche gauche du troisième chromosome) se comporte comme un tout indivisible. On peut donc supposer que le rapport des divers types d'agencement chez les descendants provenant du croisement et du recroisement d'individus standards et homozygotes invertis doit suivre les lois de Mendel. On est donc autorisé à comparer l'action du DDT et de la dieldrine avec celle de tous les autres facteurs défavorables à la vie de la population larvaire d'A. atroparvus et à considérer comme le résultat d'une tolérance de vigueur fréquente chez les hybrides de nombreuses espèces, la survivance d'un plus grand nombre d'hétérozygotes, à la suite d'une pression de sélection au moyen des insecticides indiqués ci-dessus.

Enfin, étant donné que l'on n'a pas pu entretenir de colonie pure d'A. atroparvus présentant un agencement homozygote standard, on est amené à supposer que le mutant "inverti" peut apparaître spontanément pendant la croissance de la colonie.

2. Etudes sur les effets irritants des insecticides chez les anophèles exposés à des surfaces traitées

Pour réaliser ces expériences, nous avons opéré sur des lots de cinq moustiques, conformément à la technique décrite par Zulueta (1958), qui correspond essentiellement à la variante b) de la méthode de l'OMS (1960), dont la publication a eu lieu après nos expériences.

Nous avons constaté que les facteurs suivants influent sur les résultats :

- a) nature et intensité de la source lumineuse;
- b) direction des rayons lumineux;
- c) température et humidité du milieu ambiant;
- d) état nutritionnel des Anopheles.

C'est en utilisant une chambre noire et en éclairant la surface recouverte par la chambre conique au moyen d'une lampe à fluorescence alimentée par une batterie d'accumulateurs (lampe "Pozzo") que l'on a obtenu les résultats les plus sûrs. L'éclairage était latéral afin que les mouvements de l'observateur ne produisent pas d'ombre.

On mesurait l'intensité lumineuse au luxomètre Kruss (1 lux = 0,98 lux international = 1,6 lux Helfner = 0,09 foot-candle).

TABLEAU 1. EPREUVE D'IRRITABILITE

Chambres d'exposition coniques, Eclairage 50 lux. Température 20-25°C. Humidité relative 58-60 %
 Lots de cinq moustiques - Anopheles atroparvus, souche italienne

Femelles : à jeun ou 24 heures après un repas de sang

Numéro de série	DDT 4 %		Numéro de série	DDT 8 %		Numéro de série	Témoins	
	Total	Par sujet		Total	Par sujet		Total	Par sujet
1	120	24	1a	85	17	1b	60	12
2	150	30	2a	75	15	2b	30	6
3	50	10	3a	100	20	3b	20	4
4	70	14	4a	175	35	4b	50	10
5	115	23	5a	165	33	5b	80	16
6	60	12	6a	65	13	6b	10	2
7	85	17	7a	80	16	7b	25	5
8	95	19	8a	135	27	8b	20	4
9	90	18	9a	125	25	9b	60	12
10	125	25	10a	155	31	10b	50	10
11	140	28	11a	180	36	11b	55	11
12	125	25	12a	140	28	12b	45	9
13	120	24	13a	110	22	13b	35	7
14	185	37	14a	185	37	14b	105	21
15	120	24	15a	175	35	15b	60	12
Nombre moyen d'envols par moustique (1650:75) = 22			Nombre moyen d'envols par moustique (1950:75) = 26			Nombre moyen d'envols par moustique (705:75) = 9,4		

TABLEAU 2. EPREUVE D'IRRITABILITE

Chambres d'exposition coniques. Lots de cinq moustiques - Anopheles atroparvus, souche italienne
Eclaircissement 50 lux. Température 20°-25°C. Humidité relative 58-60 %
Femelles gorgées au moment indiqué, avant le test

Délai écoulé après le dernier repas de sang (en minutes)	Numéro de série	DDT 4 %		Numéro de série	Témoins	
		Nombre d'envols en 15 minutes Total	Par sujet		Nombre d'envols en 15 minutes Total	Par sujet
5	1	40	8	1a	20	4
5	2	15	3	2a	5	1
30	3	35	7	3a	10	2
60	4	44	9	4a	19	4
60	5	36	7	5a	16	3
60	6	22	4	6a	25	5
60	7	34	7	7a	14	3
60	8	39	8	8a	5	1
65	9	40	8	9a	25	5
75	10	42	8	10a	15	8
120	11	60	12	11a	60	12
120	12	10	2	12a	10	2
180	13	40	8	13a	10	2
180	14	45	9	14a	12	2
240	15	125	25	15a	15	3
Nombre moyen d'envols par moustique (627:75) = 8,3				Nombre moyen d'envols par moustique (261:75) = 3,3		

TABLEAU 3. EPREUVE D'IRRITABILITE

Lots de cinq moustiques - *Anopheles labranchiae* (Catalafimi, Trapani)
 Chambres d'exposition coniques. Eclairément 50 lux. Température 20°-25° C. Humidité relative 58-60 %

Femelles gorgées au moment indiqué, avant le test

Numéro de série	DDT 2 %		Numéro de série	DDT 4 %		Numéro de série	Témoins	
	Nombre d'envols en 15 minutes	Par sujet		Nombre d'envols en 15 minutes	Par sujet		Nombre d'envols en 15 minutes	Par sujet
	a	b	a	b	a	b	a	b
	Total	Total	Total	Total	Total	Total	Total	Total
1	123	25	90	18	1b	50	10	
2	54	11	35	7	2b	20	4	
3	95	19	110	25	3b	50	10	
4	48	10	40	8	4b	30	6	
5	120	24	90	18	5b	60	12	
6	35	7	60	12	6b	50	10	
7	45	9	85	17	7b	40	8	
8	70	14	65	18	8b	60	12	
9	35	7	80	16	9b	60	12	
10	60	12	71	14	10b	53	11	
11	75	15	105	24	11b	40	8	
12	70	14	92	18	12a	70	14	
13	75	15	75	13	13b	50	10	
14	85	17	80	16	14b	65	13	
15	55	11	35	7	15b	55	11	
Nombre moyen d'envols par moustique (1045:75) = 14		Nombre moyen d'envols par moustique (1103:75) = 14,5		Nombre moyen d'envols par moustique (753:75) = 10				

Nous avons constaté que l'éclairage le plus favorable pour réduire le nombre des mouvements est de 50 lux. Une température de 20° à 25°C et une humidité relative de 55-60 % paraissent aussi ramener à un minimum la mobilité naturelle des moustiques.

Les résultats de ces expériences figurent aux tableaux 1, 2 et 3. L'examen des renseignements présentés dans les tableaux mène aux conclusions suivantes :

- a) les sujets de A. atroparvus, dans l'heure qui suit un repas de sang, se déplacent, sur des surfaces traitées ou non traitées, beaucoup moins que ceux qui sont à jeun ou qui ont déjà digéré, dans une très large mesure, leur dernier repas de sang.
- b) les sujets de A. atroparvus exposés à des surfaces traitées se déplacent trois fois plus que les témoins (exposés à des surfaces non traitées);
- c) la concentration de la préparation de DDT ne modifie pas de façon notable l'incitation à l'envol;
- d) les sujets de A. labranchiae exposés à des surfaces traitées ne semblent pas se comporter d'une manière sensiblement différente de celle des témoins.

Ces résultats, qui correspondent à ceux qu'a décrit Zulueta (1958),⁹ indiquent qu'A. labranchiae est moins irritable qu'A. atroparvus et que ce dernier même n'est que faiblement irritable, comparé à d'autres espèces.

3. Etude de la sensibilité aux insecticides d'A. labranchiae en Sicile, et évaluation comparative de la méthode de l'OMS et de la méthode Busvine-Nash

On a procédé, sur environ 15 000 A. labranchiae femelles, à l'évaluation comparative de la méthode de l'OMS et de la méthode Busvine-Nash.

La méthode Busvine-Nash¹ donne, chez A. labranchiae, une mortalité moyenne constamment plus élevée que la méthode de l'OMS.^{7,8}

Ce résultat diverge de ceux obtenus par divers auteurs qui ont trouvé les deux méthodes équivalentes en présence d'autres espèces d'Anopheles.

Dans notre laboratoire, nous n'avons également constaté aucune différence entre les deux méthodes en opérant sur A. atroparvus élevé à l'insectarium. Toutefois, compte tenu des résultats fournis par les tests d'irritabilité rapportés ci-dessus, il paraît probable que la différence de mortalité observée entre les résultats des deux méthodes chez A. labranchiae tient au fait que les sujets de cette espèce sont moins irritables et tendent à garder la position qu'ils ont assumée lorsqu'on les a introduits dans les tubes. Il arrive que plusieurs sujets restent sur le grillage métallique (non traité) qui ferme les tubes, sans être dérangés par le vol des autres moustiques et qu'ils évitent ainsi d'entrer en contact avec la surface traitée.

Le tableau 4 présente les données comparatives obtenues en août 1959 avec ces deux méthodes. Les différences sont légères mais constantes. Les tests ont été réalisés simultanément, afin d'éviter les effets des changements saisonniers de sensibilité.

4. Etude de la résistance et de la sensibilité des anophèles aux produits organo-phosphorés

- a) Etude expérimentale de l'action rémanente exercée sur A. atroparvus et A. labranchiae par certains esters phosphoriques

On a étudié l'action insecticide rémanente sur des surfaces murales traitées par des esters phosphoriques utilisés seuls ou associés à des insecticides chlorés.

Afin de supprimer une action éventuelle des traitements précédents, on a d'abord décapés, puis recouvert de peinture à l'eau, les murs des demeures choisies pour ces expériences.

Le 11 novembre 1959, on a traité une seule paroi de chacune des cinq pièces par les préparations suivantes, aux doses prévues (exprimées en produit technique ou en produit actif pur) appliquées au moyen de pulvérisateurs à pression préalable :

- 1) malathion technique 30 %; émulsifiants 20 %; kaolin 50 %; émulsion dans l'eau à 2 %; application à raison de $0,4 \text{ g/m}^2$;
- 2) malathion technique 50 %; solvants et émulsifiants 50 %; émulsion dans l'eau à 2 %; application à raison de $0,66 \text{ g/m}^2$.

TABLEAU 4. SENSIBILITE AU DDT D'A. LABRANCHIAE, DETERMINEE PAR LA METHODE DE L'OMS ET PAR LA METHODE BUSVINE-NASH

District et localité	Méthode de l'OMS					Méthode Busvine-Nash				
	Nombre de moustiques	Concentration du DDT dans l'huile risella				Nombre de moustiques	Concentration du DDT dans l'huile risella			
		0,5 %	1 %	2 %	4 %		0,5 %	1 %	2 %	4 %
Palerme (zone traitée)	3 862	14,3	43,7	74,3	100	500	14,0	32,0	77,0	100
Palerme (zone non traitée)	860	8,0	49,5	90,0	100	480	17,0	55,0	96,5	100
Catane	2 025	50,0	58,3	83,2	100	645	39,0	53,3	85,5	100
Trapani	2 045	41,6	46,5	76,6	100	192	48,0	62,0	83,5	100
Agrigente	1 033	39,0	73,0	87,3	100	150	36,0	66,0	89,0	100
Caltanissetta	1 660	27,0	59,9	87,9	100	525	-	67,0	75,0	100
Syracuse	760	40,0	58,0	83,0	100	560	60,0	72,0	90,0	100
Totaux	12 252	31,4	55,5	83,1	100	3 052	35,6	58,1	85,3	100

Epreuves effectuées en août 1959

TABLEAU 5. EFFET REMANENT DES INSECTICIDES ORGANO-PHOSPHORES
PULVERISES SUR DES MURS LE 10 NOVEMBRE 1959

Insecticide	Taux de mortalité ^a d' <u>A. atroparvus</u> , après 15 minutes d'exposition										Taux de mortalité d' <u>A. labranchiae</u> , après 15 minutes d'exposition		
	Nombre de mois après le traitement										Nombre de mois après le traitement		
	1	2	3	4	5	6	7	8	8 ^b	10 ^c	8	9	10 ^c
1. Malathion en pâte	100	100	90	90	65	65	65	60	70	20	80	50	35
2. Malathion liquide	100	90	80	70	35	35	65	65	30	20	80	40	30
3. Malathion synergisé	100	100	90	90	52	50	40	80	80	50	100	95	65
4. Dithion 10 Pb.	100	100	80	80	30	30	25	50	60	60	90	90	80
5. Dithion en pâte polyvalente	100	100	100	80	80	70	70	80	40	40	100	100	55

^a Corrigé par la formule d'Abbott.

^b Test exécuté 8 mois après le traitement, mais avec une durée d'exposition de 30 minutes.

^c Test exécuté simultanément sur atroparvus et labranchiae.

- 3) Malathion technique 50 %; lindane 14 %; solvants et émulsifiants 36 %; émulsion dans l'eau à 2 %; application à raison de 0,85 g/m² (malathion 0,665, lindane, 0,185);
- 4) Dithion (o,o-diéthylthiophosphate d'oxy-7 tétraméthylène-3 coumarine) 10 %; Rogor (N-méthylamide de l'acide diméthyl-dithio-phosphoryl acétique) 5 %; excipient inerte 85 %; suspension à 6,66 %; application à raison de 0,61 g/m² (dithion 0,41; Rogor 0,2);
- 5) Dithion 18 %; Rogor 5 %; DDT 54,5 %; diluants et dispersants 22,5 %; émulsion dans l'eau à 6,66 %; application à raison de 3,22 g/m² (dithion 0,75; Rogor 0,2; DDT 2,27).

On a pulvérisé sur 15 m² de surface murale un litre de chaque préparation (66 ml/m²). On a éprouvé l'activité insecticide des parois au moyen des chambres d'exposition coniques (OMS, Série de Rapports techniques, No 153, Genève, 1958, page 9) avec des femelles d'A. atroparvus élevées à l'insectarium. On a également effectué certains tests sur A. labranchiae.

On avait procédé à un test préliminaire pour s'assurer que les murs n'exerçaient aucune action insecticide avant le traitement.

Après les pulvérisations, on a réalisé des épreuves tous les 15 jours, d'abord sur A. atroparvus élevé en laboratoire, puis sur A. labranchiae capturé dans son milieu naturel.

Une exposition de 30 minutes (recommandée dans le rapport technique mentionné ci-dessus), produisant une mortalité de 100 % chez les moustiques, on s'est contenté d'une exposition de 15 minutes pendant toute la durée des expériences. Cependant, au cours des premiers mois suivant le traitement, la mortalité s'est maintenue à 100 %, quel que soit l'insecticide employé.

Le tableau 5 présente les résultats de ces tests. Chaque taux de mortalité y représente la moyenne de trois tests. On a utilisé pour chaque test 10 femelles et, comme témoins, 10 femelles exposées à un mur non traité de la même pièce.

On a également procédé à un nombre limité de tests d'irritabilité sur les murs traités par les insecticides mentionnés ci-dessus en reproduisant la variante b) de la méthode de l'OMS en présence d'A. atroparvus et d'A. labranchiae. Ces tests ont montré que les espèces utilisées manifestent seulement une légère irritabilité à l'égard des insecticides appliqués.

Ces expériences mettent en évidence les faits suivants :

- 1) Les propriétés physiques de l'insecticide exercent une influence indéniable sur la durée de son action. Ce fait est particulièrement notable dans une comparaison entre les insecticides No 1 et No 2. En fait, l'action de l'insecticide No 1, qui ne contenait pourtant que 30 % d'ingrédient actif (malathion) a été plus durable que celle de l'insecticide No 2 qui contenait 50 % du même ingrédient.
- 2) Il est évident que l'action rémanente des insecticides organo-phosphorés sur les espèces atroparvus et labranchiae est assez nette pour revêtir une importance pratique. En fait, si l'on considère qu'après un repas de sang les moustiques restent posés sur les murs des habitations pendant assez longtemps, et toujours plus de 15 minutes, les résultats de ces expériences indiquent qu'il serait suffisant de procéder à un traitement annuel par les insecticides mentionnés.

On a noté que, chez A. labranchiae, la mortalité était régulièrement plus forte que chez A. atroparvus. Il est probable qu'une excitabilité plus prononcée chez atroparvus peut jouer un rôle, mais on ne dispose pas encore, sur l'irritabilité d'A. labranchiae aux insecticides organo-phosphorés, de données permettant de tirer des conclusions.

Il paraît évident qu'il existe un certain degré de tolérance physiologique chez les souches d'A. atroparvus soumises aux tests, mais, certaines indications faisant encore défaut, la discussion n'est pas close.

- b) Recherches sur la procédure à suivre pour déterminer le degré de sensibilité d'Anopheles aux esters phosphoriques

Nous avons suivi d'aussi près que possible les normes techniques énoncées par l'OMS pour déterminer la sensibilité des moustiques aux insecticides chlorés.⁸

Nous y avons néanmoins apporté les modifications suivantes :

1. Les tubes en plastique étant attaqués par les insecticides à base d'esters phosphoriques, ils furent remplacés par des tubes de verre, d'ailleurs plus faciles à laver. On obturait l'ouverture du tube au moyen d'un tulle de coton (maintenu par une bande élastique) au lieu d'un grillage de métal. Les tubes qui contenaient le papier imprégné d'insecticide étaient fermés de tulle également imprégné par immersion préalable dans la solution insecticide.

2. Pendant l'exposition des moustiques (une heure) les tubes étaient maintenus plutôt en position horizontale que verticale. En fait, dans les tubes horizontaux, les anophèles sont beaucoup moins mobiles que dans les tubes verticaux où ils se dérangent mutuellement, vu leur tendance à se diriger vers le tulle qui recouvre l'ouverture.

3. On a eu recours à d'autres solvants que l'huile risella et le trichloréthylène car ceux-ci n'étaient pas satisfaisants pour étudier les produits organo-phosphorés.

4. On préparait directement les solutions des substances actives à la teneur finale désirée, afin d'éviter toute dilution ultérieure.

Les expériences ont été réalisées uniquement avec du malathion, que l'on recevait à l'état pur. Dans le cas des esters phosphoriques, il est indispensable que l'insecticide soit pur car les produits commerciaux sont moins stables et présentent des caractéristiques chimiques variables.

Recherche du solvant de choix. Ce point est crucial dans l'établissement d'une technique destinée à la mesure de la sensibilité des anophèles aux insecticides organo-phosphorés.

Les solvants suivants ont laissé à désirer : huile risella, benzène et stéarate de butyle. L'échec tenait à l'inconstance des résultats, notamment avec l'huile risella et le stéarate de butyle. Dans le cas du benzène, elle tenait à la faible durée d'activité du papier imprégné.

Actuellement, nous envisageons d'utiliser l'huile d'olive comme solvant ainsi que l'a suggéré Davidson; entre-temps, nous présentons certaines indications sur les résultats obtenus avec une solution acétonique de colophane.

Tests réalisés avec des solutions acétoniques de colophane ordinaire

On a tenu pour certain qu'après l'évaporation de l'acétone, la résine retiendrait le malathion sur les murs traités et le libérerait progressivement et régulièrement.

La colophane utilisée était du type jaune pâle qui correspond à la qualité américaine dite "superior M". On a préparé diverses solutions acétoniques de malathion additionnées de 20 % de colophane. Ces solutions ont été conservées à basse température, dans des flacons bouchant à l'émeri.

TABLEAU 6. SENSIBILITE D'A. ATROPARVUS ET D'A. LABRANCHIAE AU MALATHION
DANS LA COLOPHANE

(0,5 % de malathion en solution acétonique additionnée de 20 % de colophane ordinaire)

Papiers imprégnés par 2 ml d'une dilution de la solution à 1:3 dans l'acétone et
conservés 3-jours en sacs de plastique

(Durée d'exposition : 1 heure. Température 26° à 27°C. Humidité relative 65-68 %)

Nombre de sujets éprouvés : 25 ♂ par épreuve, 25 ♂ par essai témoin

Date de l'imprégnation des papiers	Date de l'épreuve	Taux de mortalité corrigé			
		<u>Anopheles atroparvus</u>			<u>A. labran- chia</u> (sauvage)
		Souche italienne	Souche Hambourg	Souche malathion	
17 octobre 1960	9 novembre		70		16
17 octobre 1960	12 novembre			47	
17 octobre 1960	15 novembre		80		32
17 octobre 1960	17 novembre	75		52	
17 octobre 1960	26 novembre	55			25
17 octobre 1960	2 décembre				28
17 octobre 1960	7 décembre		52		
17 octobre 1960	7 décembre		68		

TABLEAU 7. SENSIBILITE D'ANOPHELES ATROPARVUS AU MALATHION
(0,5 % de malathion en solution acétonique additionnée de 20 % de colophane ordinaire)

Papiers imprégnés par 2 ml d'une dilution de la solution à 1:3 dans l'acétone
(Durée d'exposition : 1 heure. Température 26° à 27°C. Humidité relative 65-68 %)

Nombre de sujets éprouvés : 25 ⁰ + par épreuve, 25 ⁰ + par essai témoin

Date de l'imprégnation des papiers	Date de l'épreuve	Taux de mortalité corrigé (<u>A. atroparvus</u>)		
		Souche italienne	Souche Hambourg	Souche malathion
10 octobre 1960	11 octobre 1960		96	
10 octobre 1960	12 octobre 1960		100	
10 octobre 1960	15 octobre 1960		100	
10 octobre 1960	16 octobre 1960		72	
10 octobre 1960	18 octobre 1960		75	
10 octobre 1960	19 octobre 1960		70	
17 octobre 1960	18 octobre 1960		100	
17 octobre 1960	19 octobre 1960		100	
17 octobre 1960	20 octobre 1960		85	
17 octobre 1960	21 octobre 1960		96	
17 octobre 1960	21 octobre 1960			56
17 octobre 1960	22 octobre 1960		95	56
17 octobre 1960	25 octobre 1960		75	
17 octobre 1960	27 octobre 1960		70	
17 octobre 1960	1 novembre 1960		35	
17 octobre 1960	5 novembre 1960		35	
17 octobre 1960	26 novembre 1960	60		
17 octobre 1960	27 novembre 1960	72		
17 octobre 1960	30 novembre 1960		30	
17 octobre 1960	2 décembre 1960		44	
17 octobre 1960	7 décembre 1960		44	

TABLEAU 8. SENSIBILITE D'ANOPHELES ATROPARVUS ET D'ANOPHELES LABRANCHIAE
-AU MALATHION

(0,5 % de malathion en solution acétonique additionnée de 20 % de colophane ordinaire)

Papiers imprégnés par 2 ml de la solution sans dilution ultérieure

Nombre de sujets testés : 25 ⁰ par épreuve, 25 ⁰ par essai témoin

Date de l'imprégnation des papiers	Date de l'épreuve	Taux de mortalité corrigé			
		<u>Anopheles atroparvus</u>			<u>A. labran- chia</u> (sauvage)
		Souche italienne	Souche Hambourg	Souche malathion	
16 novembre 1960	19 novembre 1960		100		33
16 novembre 1960	19 novembre 1960				
16 novembre 1960	21 novembre 1960		62		
16 novembre 1960	24 novembre 1960	93			
16 novembre 1960	27 novembre 1960	80			
16 novembre 1960	30 novembre 1960		67		
16 novembre 1960	2 décembre 1960		72		
16 novembre 1960	7 décembre 1960		80		
16 novembre 1960	8 décembre 1960	68			
10 décembre 1960	14 décembre 1960		70		
10 décembre 1960	14 décembre 1960		70		
10 décembre 1960	16 décembre 1960		100		
10 décembre 1960	17 décembre 1960			50	
10 décembre 1960	18 décembre 1960	80			
10 décembre 1960	4 janvier 1961		96	12	
10 décembre 1960	11 janvier 1961		84		

Les variations de mortalité observées chez la souche Hambourg sont malaisées à expliquer. Les mêmes bandes imprégnées ayant donné une mortalité de 80 % le 7 décembre 1960, le vieillissement des papiers ne saurait être invoqué. On pourrait incriminer de petites variations de température puisqu'on a récemment remarqué que la mortalité était plus forte lorsque la température s'élevait de 1° C entre 25° et 27° C. On étudie actuellement ces facteurs.

On a réalisé deux séries d'épreuves : dans la première, on a dilué les solutions d'insecticide avec deux volumes d'acétone, avant d'en imprégner le papier. Dans la seconde, on a imprégné directement le papier avec la solution de colophane, sans autre dilution. Dans les deux cas, on a traité des rectangles de papier Whatman No 1 par 2 ml de la solution, comme d'ordinaire. Les morceaux de tulle servant à clore les tubes furent immergés dans la solution, égouttés et séchés comme le papier. D'une expérience à l'autre on gardait dans des sacs de plastique les tubes contenant du papier imprégné d'insecticide.

Dans chaque épreuve, on a opéré sur 25 femelles. Des femelles en nombre égal servaient de témoins. On a corrigé les taux de mortalité, par la formule d'Abbott. En général, la mortalité des témoins était nulle.

Les résultats sont présentés dans les tableaux 6, 7 et 8.

Outre les tests réalisés avec du malathion à 0,5 % (tableaux 6, 7 et 8), nous avons également effectué quelques épreuves aux teneurs de 0,25 et 1 %. Nous avons observé qu'à la concentration de 0,25 % la mortalité était très faible ou nulle, alors qu'à la concentration de 1 % elle atteignait 100 % chez toutes les souches que nous avons étudiées.

Les résultats indiqués ci-dessus sont préliminaires : ils montrent qu'il est utile d'ajouter de la colophane à la solution acétonique de malathion. Lorsque cette méthode aura été perfectionnée, il n'est pas impossible qu'on mette au point un procédé permettant de mesurer avec exactitude la sensibilité des anophèles aux produits organo-phosphorés.

Au cours des expériences réalisées avec de la colophane, ont été également effectuées les observations suivantes :

- i) lorsqu'on augmente la teneur en résine, il importe d'accroître également la teneur en malathion dans le même rapport (si l'on double par exemple la proportion de résine il faut également doubler celle du malathion);

- ii) avec les solutions que nous avons utilisées jusqu'à présent, les concentrations successives de malathion suivant une échelle logarithmique ne donnent pas une augmentation régulière de la mortalité, si bien qu'il n'a pas été possible de déterminer la CL_{50} avec précision;
- iii) la durée appréciable de l'activité des papiers employés paraît tenir à la fine pellicule de résine qui enrobe l'insecticide.
- c) Choix d'une souche d'A. atroparvus exposée au malathion.

Nous nous efforçons actuellement de sélectionner une souche d'A. atroparvus résistante au malathion.

A cet effet, nous nous servons de spécimens d'Anopheles ayant survécu à divers traitements par le malathion. Chaque génération de larves et d'adultes est exposée à l'action de l'insecticide. Les larves sont élevées dans une eau contenant 0,035 p.p.m. de malathion, et les adultes sont exposés à des papiers imprégnés d'une solution benzénique de malathion, préparés quatre jours avant chaque expérience. Pour la sélection de la souche nous avons préféré la solution benzénique à la solution acétonique de colophane parce qu'elle permet un calcul plus facile de la CL_{50} . En fait, depuis six générations, on emploie les mêmes papiers pour mesurer la CL_{50} de la colonie exposée à la pression de malathion, de même que pour les souches italienne et Hambourg d'A. atroparvus.

Le tableau suivant indique les taux de mortalité observés sur 500 sujets de chaque souche et les CL_{50} correspondantes.

TABLEAU 9

Concentration de la solution benzénique en malathion	Taux de mortalité d' <u>A. atroparvus</u> après 1 heure d'exposition*		
	Souche italienne	Souche Hambourg	Souche malathion
0,05 %	37 %	14,5 %	0 %
0,1 %	96 %	72 %	21,7 %
0,2 %	100 %	100 %	65 %
CL_{50}	0,058	0,072	0,18

* Dénombrement des morts effectué au bout de 24 heures et corrigé par la formule d'Abbott.

En tout, on a opéré sur 4500 femelles d'atroparvus soit, pour chaque test, sur 350 sujets et 150 témoins.

Il ressort de ce qui précède que la colonie établie par sélection est, en fait, seulement trois fois moins sensible que la colonie initiale (italienne). La réduction de sensibilité ne tient probablement qu'à la tolérance de vigueur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Busvine, J. R. & Nash, R. (1953) Bull. ent. Res., 44, 371
2. D'Alessandro, G., Frizzi, G. & Mariani, M. (1957) Bull. Org. mond. Santé, 16, 859
3. D'Alessandro, G., Frizzi, G. & Mariani, M. (1958) Riv. Parassit., 19, 67
4. D'Alessandro, G. & Mariani, M. (1958) Riv. Parassit., 19, 215
5. Mosna, E., Rivosecchi, L. & Ascher, K. R. S. (1958) Bull. Org. mond. Santé, 19, 297
6. Mosna, E., Palmieri, C., Ascher, K. R. S., Rivosecchi, L. & Neri, I. (1959) Bull. Org. mond. Santé, 20, 63
7. Comité d'experts des Insecticides, huitième rapport (1958) Org. mond. Santé : Sér. Rapp. techn., 153
8. Comité d'experts des Insecticides, dixième rapport (1960) Org. mond. Santé : Sér. Rapp. techn., 191, annexe 1, page 15
9. Zulueta de, J. (1958) Document WHO/AS/130.58

Le but des documents de la Série WHO/Mal est le suivant :

- a) mettre le personnel de l'OMS, les instituts nationaux, les chercheurs et les travailleurs de la santé publique au courant de l'évolution des recherches sur le paludisme et des progrès de l'éradication du paludisme au moyen d'exposés succincts relatifs à quelques problèmes en cause;
- b) distribuer, aux catégories de lecteurs indiquées ci-dessus, les rapports d'opérations et autres communications qui présentent un intérêt particulier, mais qui ne sont pas normalement imprimés dans les publications de l'OMS;
- c) communiquer aux intéressés différents articles qui sont destinés à la publication mais qui, en raison de leur actualité, méritent d'être rapidement connus.

La parution d'un article dans cette série ne constitue donc pas une publication officielle et un tel article peut donc, avec l'accord de l'auteur et de l'OMS, être publié dans un périodique de l'OMS ou ailleurs.

Les articles signés n'engagent que leurs auteurs. La mention des manufactures et des produits commerciaux n'implique pas que ces maisons ou leurs produits soient recommandés ou approuvés par l'Organisation mondiale de la Santé de préférence à d'autres.