

Impact de l'éthanol dans la conservation et le montage des ailes par une étude de morphométrie géométrique : cas des ailes de *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy, 1830)

Bi Tra Dieudonné TA^{1,2*}, Geneviève Lydie ACAPOVI-YAO², Dramane KABA¹, Vincent DJOHAN^{1,2}, Philippe SOLANO³ et Jean-Pierre DUJARDIN³

¹ Unité de Recherche Glossines et Trypanosomoses, Institut Pierre Richet / INSP,
01 BP 1500 Bouaké, Côte d'Ivoire

² Université Félix Houphouët-Boigny, UFR Biosciences, Laboratoire de Biologie et Santé,
01 BP 582 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

³ IRD, UMR INTERTRYP IRD, CIRAD, University of Montpellier, F-34398 Montpellier, France

* Correspondance, courriel : tabitradieudonne@gmail.com

Résumé

Ce travail porte sur l'étude des ailes de *Glossina palpalis palpalis* conservées dans l'éthanol à 70°. Les musées utilisent en général l'éthanol pour la conservation des organismes biologiques, en particulier des collections biologiques. Cette étude a pour but d'évaluer l'effet de l'éthanol à 70° sur la conservation des ailes et de montage des ailes à l'aide de la MG. Un total de 43 glossines mâles et femelles (*Glossina palpalis palpalis*) ont été capturées à l'aide des pièges "Vavoua". Les ailes ont été posées sur une lame, puis numérisées et montées entre lame et lamelle et numérisées à nouveau. Les mêmes ailes ont été conservées dans l'éthanol séchées, numérisées sans lamelle puis montées entre lame et lamelle et numérisées à nouveau. Les résultats obtenus montrent que l'éthanol et les lamelles augmentent la taille des ailes. En plus, l'étude de l'analyse discriminante (AD) montre une séparation du groupe dont les ailes ont été conservées dans l'éthanol. L'étude des distances de Mahalanobis (MD) sont en générale grande avec une différence significative ($p < 0,05$). Les résultats de cette étude ont permis de montrer que la conservation des ailes de glossines dans l'éthanol et la pression que les lamelles exercent sur les ailes ont un effet sur les propriétés physiques des ailes. Les systématiciens, les chercheurs devraient tenir compte de ces résultats pour éviter de donner des conclusions erronées.

Mots-clés : *morphométrie géométrique, Glossina palpalis palpalis, analyse discriminante.*

Abstract

Impact of ethanol in the conservation and mounting of the wings by geometric morphometry study : case of the wings of *Glossina palpalis palpalis* (Robineau-Desvoidy, 1830)

This work concerns the study of the wings of *Glossina palpalis palpalis* preserved in ethanol at 70°. Museums generally use ethanol for the conservation of biological organisms, in particular biological collections. The purpose of this study is to assess the effect of ethanol at 70° on wings conservation and mounting using MG. A total of 43 male and female tsetse flies (*Glossina palpalis Palpalis*) were captured using the "Vavoua" traps. The wings were digitized placed on a digitized blade then mounted within slides and coverslips and

scanned again. The same wings were kept in dried ethanol, scanned without coverslips, then mounted within slides and coverslips and scanned again. The obtained results show that ethanol, and the coverslips increase the size of the wings. In addition, the study of discriminant analysis (DA) shows a separation of the group whose wings have been preserved in ethanol. The study of Mahalanobis Distance (MD) are generally large with a significant difference ($p < 0.05$). The results of this study make it possible to show the conservation of the tsetse wings in ethanol and the pressure that the coverslips exert on the wings have an effect on the physical properties of the wings. Systematicians, researchers should take these results into account to avoid giving erroneous conclusions.

Keywords : *geometric morphometry, Glossina palpalis palpalis, discriminant analysis.*

1. Introduction

La nervation des ailes d'insecte sont des marqueurs morphométriques connus depuis plusieurs années et utilisés pour l'identification de différents insectes [1 - 3]. Ces marqueurs ont été utilisés sur des matériaux de collections et sur les ailes d'autres insectes pour répondre à des questions taxonomiques grâce à la morphométrie [4 - 6]. Cet outil est largement utilisé dans plusieurs domaines de la biologie. Elle permet d'identifier des variations biologiques de forme grâce à des statistiques multivariées [3, 7, 8]. Cette science est définie comme l'étude de l'analyse de la forme et de la taille d'une structure biologique ou non [9]. En recherche biologique, les études morphométriques sont devenues très attrayantes grâce aux nouveaux outils statistiques [10, 11]. Pour la conservation de certains échantillons de prototypes dans les musées, l'éthanol à 70 % ou le formaldéhyde à 10 % sont souvent utilisés pour conserver des prototypes. En effet, l'éthanol est un liquide capable de prévenir le changement dans les tissus et de maintenir la rigidité et l'intégrité des échantillons fixés en vue d'une exposition à long terme, pour des études morphométriques d'identification ultérieure [12]. Les lamelles sont de petites plaques de verre minces utilisées pour couvrir les objets, pour un examen microscopique. Des études ont été réalisées pour montrer des variations de taille et de forme après la conservation des échantillons dans de l'éthanol [13]. Plusieurs liquides peuvent être utilisés pour la conservation d'un échantillon, chacun présentant des avantages et des inconvénients. L'alcool à 70 % (éthanol) est très utilisé par les systématiciens pour la conserver les organes biologiques. La conservation des ailes de glossines dans l'éthanol à 70 % pourrait-elle modifier la taille, la forme voir la systématique des glossines ? *G. p. palpalis* [14] est une espèce trouvée dans la moitié sud de la Côte d'Ivoire [15] et est vecteur de la trypanosomiase humaine africaine et de la trypanosomose animale africaine. *G. p. palpalis* sont les principaux vecteurs des trypanosomes responsables de la maladie du sommeil. Ces vecteurs sont généralement présents dans les végétations situées à proximité des zones humides (points d'approvisionnement naturel d'eau), à la périphérie des villages. Ils colonisent parfois les plantations de cacao, café et de noix d'acajou etc [16]. Les études de morphométrie géométrique sont capables d'identifier de petites variations sur la forme et la taille des organes lorsqu'ils sont conservés dans des liquides de conservation comme l'éthanol à 70 %. Ce liquide pourrait avoir un impact important sur ces organes qui pourrait induire des modifications importantes sur leur systématique. Ainsi, cette étude vise à quantifier l'impact de l'éthanol et de la lamelle sur la morphologie des ailes de glossines.

2. Matériel et méthodes

2-1. Zone d'étude

Boblénou est village situé à environ 10 kilomètres de la ville de Bouaké, à $7^{\circ} 45'23''$ de latitude nord et à $4^{\circ} 59'50''$ de longitude ouest (**Figure 1**). Ce village est situé dans une zone de transition climatique avec 2 ou 4 saisons. Les pluies sont généralement réparties sur 10 mois, de février à novembre. La précipitation annuelle moyenne et la température au cours de l'année étaient respectivement de 981,80064 mm et de $26,2^{\circ}\text{C}$ (SODEXAM, 2015). Le village Boblénou bénéficie d'une végétation conservée avec la présence d'une forêt galerie. La forêt galerie est composée de bois de Tecks (*Tectona grandis*) et bois d'acacias (*Cassia siamea*). Les porcs vivent en divagation dans le village. Tous ces facteurs cités offrent aux glossines un biotope idéal et des sources en protéine pour leur développement.

2-2. Échantillonnage des glossines

Les glossines de cette expérience ont été capturées à Boblénou en décembre 2015 à l'aide de 28 pièges Vavoua (**Figure 1**) pendant deux jours consécutifs. Une seule espèce (*Glossina palpalis palpalis*) a été capturée avec un total de 43 individus dont 23 femelles et 20 mâles. Les ailes de chaque individu ont été numérisées à sec (c'est-à-dire sans alcool sans lame puis entre lame et lamelle). Ce qui a permis de former quatre groupes : 1: Avec alcool avec lamelle, 2: Sans alcool avec lamelle, 3: Avec alcool sans lamelle, et 4: Sans alcool sans lamelle. Les mêmes ailes numérisées à sec ont été introduites dans des tubes Eppendorf (1,5 mL), puis de l'éthanol à 70° y a été ajouté. Les ailes y sont restées pendant deux mois. À la fin des deux mois, les ailes ont été enlevées et séchées (**Figure 2**) à température ambiante pendant cinq jours.

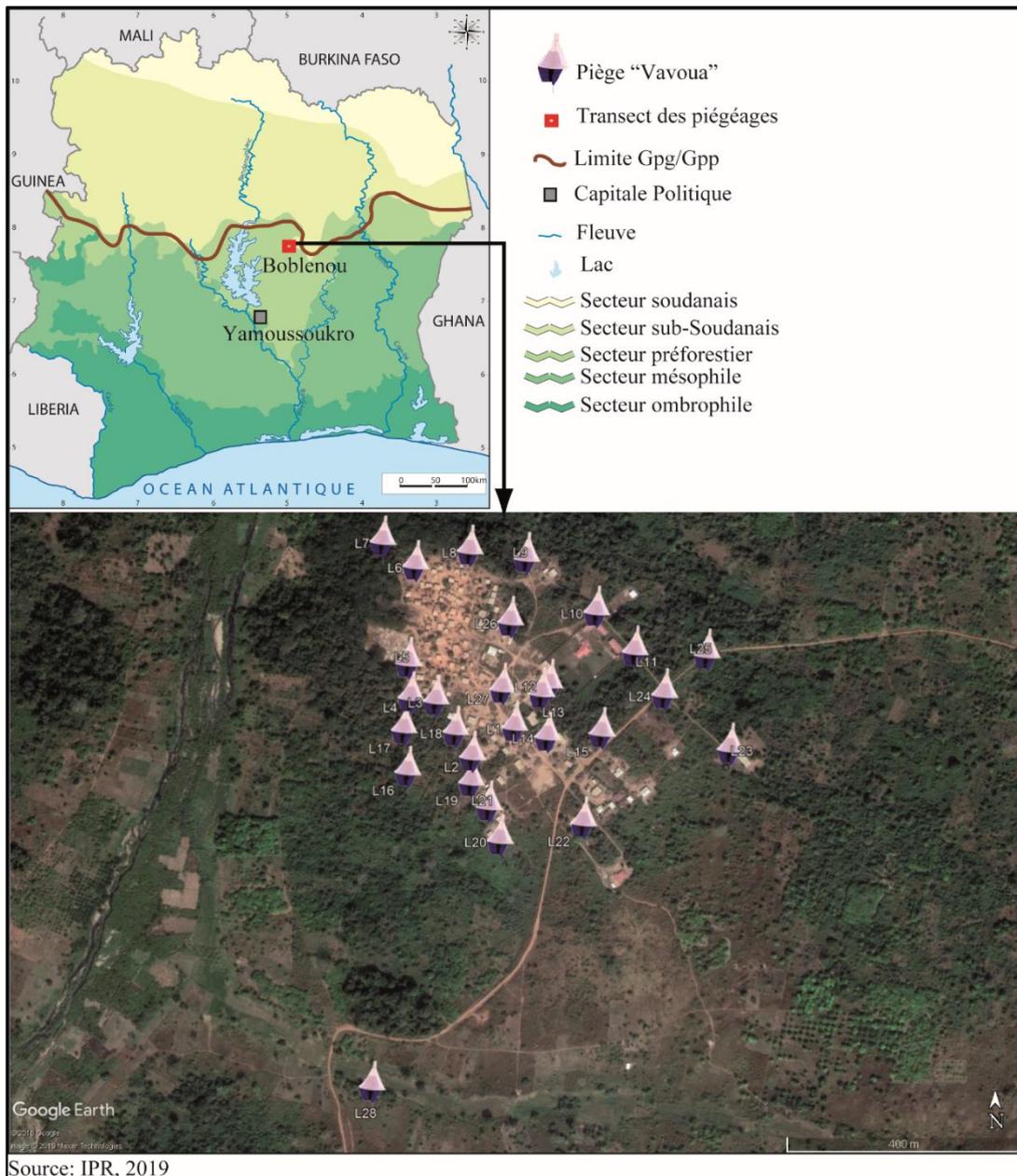


Figure 1 : Zone d'étude

2-3. Méthode de séchage des ailes retirées de l'éthanol à 70 °

Les ailes ont été délicatement retirées de l'éthanol avec une pince et placées sur la paroi interne supérieure des tubes eppendorf (juste au-dessus du niveau de l'alcool) et les tubes ont ensuite été vidés. Les ailes sont restées fixées sur la paroi interne des tubes pendant cinq jours à température ambiante. Elles ont ensuite été récupérées, numérisées d'abord sans lamelle, puis entre lamelle (*Figure 2*). Toutes les ailes ont été numérisées à la résolution 2048 x 1536 pixels à l'aide d'une loupe binoculaire grâce à une caméra (Dino-Lite - AM7023B(R4) www.dino-lite.eu) connectée à un ordinateur et au même grossissement (X 0,7). Les analyses ont été effectuées avec le fichier " coord ... _DB.txt ".

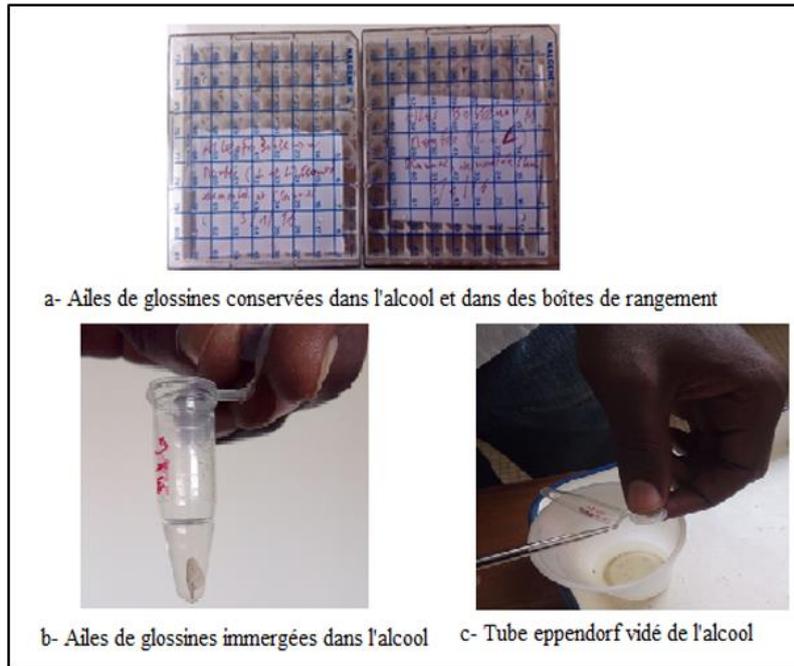


Figure 2 : *Séchage des ailes de tsé-tsé deux mois après immersion dans l'alcool*

2-4. Digitalisation

Pour les ailes, onze points-repères ont été posés aux intersections des nervures [17]. Les coordonnées de chaque points-repères (ailes) ont été converties en millimètre. L'approche la plus largement utilisée en morphométrie géométrique aujourd'hui est l'analyse des conformations par les points-repères [3, 18]. Le choix des points-repères est basé sur les critères d'homologie, c'est-à-dire que chaque point sélectionné sur l'aile doit être repérable de façon certaine sur toutes les ailes inclus dans l'étude [19]. Ces points-repères sont décrits par un ensemble de coordonnées en deux dimension (x, y) ou trois dimensions (x, y, z) [20]. Les points-repères choisis sur les ailes sont tous homologues à toutes les ailes, ils ont été posés aux intersections des nervures alaires dans le même ordre (**Figure 3**). La forme de l'aile était représentée par les projections orthogonales de spécimens alignés sur le plan euclidien tangent à la forme consensuelle, également appelés résidus de Procrustes (analyse de Procrustes généralisée, ou GPA) [21].

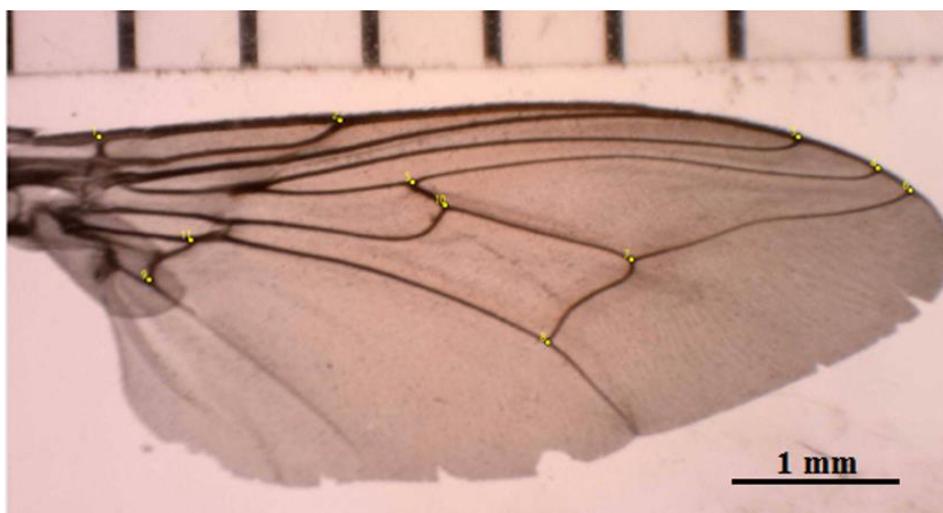


Figure 3 : *Digitalisation des ailes femelles de G. p. palpalis avec 11 points repères*

2-5. Analyse des données

La digitalisation des ailes a été réalisée à l'aide du CLIC 98. L'analyse des données a été réalisée à l'aide du programme en ligne XYOM [22] <https://xyom.io>. Les valeurs moyennes de la taille centroïde des ailes entre les espèces ont été examinées à l'aide de tests de permutation non paramétriques (1000 tours), avec la correction de Bonferroni à $p < 0,05$. La différence de forme entre chaque groupe a été mesurée à partir d'une analyse discriminante, illustrée par une carte factorielle. Les distances de Mahalanobis ont été mesurées entre mâles et femelles deux à deux avec la correction séquentielle de Bonferroni à $p < 0,05$.

3. Résultats

3-1. Variation de la taille des ailes

Dans l'ensemble, l'analyse du **Tableau 1** montre que les individus "Avec alcool avec lamelle" dont les ailes ont été conservées dans l'éthanol ont une moyenne de taille centroïde plus grande que les groupes "Sans alcool avec lamelle", "Sans alcool sans lamelle", cela avec une différence non significative chez les mâles comme femelles (**Tableau 1**). Cependant, chez les femelles le groupe "Avec alcool avec lamelle" avait une moyenne de taille centroïde plus grande que le groupe "Avec alcool sans lamelle" avec une différence significative (**Tableau 1**). En outre le groupe "Sans alcool avec lamelle" a une moyenne de taille centroïde plus grande par rapport au groupe "Avec alcool sans lamelle", le groupe "Sans alcool sans lamelle" a une moyenne de taille centroïde plus grande que le groupe "Avec alcool sans lamelle" avec une différence non significative (**Tableau 1**). Chez les mâles les groupes "Avec alcool sans lamelle" et "Avec alcool avec lamelle" ont une taille centroïde plus grande que le groupe "Sans alcool sans lamelle" avec une différence non significative (**Tableau 1**). De façon générale, l'impact de l'éthanol et la lamelle augmentent la taille des ailes de glossine avec une différence non significative chez les mâles comme les femelles.

Tableau 1 : Comparaison entre les moyennes (M) de la taille du centroïde des ailes de *G. p. palpalis*, entre les groupes suivants : 1 : avec alcool avec lamelle, 3 : avec alcool sans lamelle, 2 : sans alcool avec lamelle et 4 : sans alcool sans lamelle. Correction séquentielle de Bonferroni *, $p < 0,05$

Groupes mâles	M	M	p	Groupes femelles	M	M	p
Entre 1-2	6,956	6,901	0,618	Entre 1-2	7,710	7,647	0,202
Entre 1-3	6,956	6,923	0,764	Entre 1-3	7,710	7,572	0,002*
Entre 1-4	6,956	6,886	0,546	Entre 1-4	7,710	7,629	0,07
Entre 2-3	6,901	6,923	0,834	Entre 2-3	7,647	7,572	0,109
Entre 2-4	6,901	6,886	0,897	Entre 2-4	7,647	7,629	0,710
Entre 3-4	6,923	6,886	0,741	Entre 3-4	7,572	7,629	0,165

3-2. Variation de la forme des ailes

Avant l'étude de l'analyse discriminante, la **Figure 4** des objets moyens de l'analyse généralisée de Procrustes montre un chevauchement imparfait des points-repères dans certaines parties de l'aile, en particulier celles entourées en rouge. La superposition imparfaite montre une différence de forme entre les différents groupes de cette étude. L'étude de l'analyse discriminante effectuée chez les mâles comme les femelles des quatre groupes sont représentées par des polygones de couleurs différentes. Ainsi, les **Figures 5 et 6** montrent quatre groupes représentés par des polygones de couleurs différentes: "Avec alcool sans lamelle" (en rouge), "Avec alcool avec lamelle" (en violet), "Sans alcool avec lamelle" (en jaune) et

“Sans alcool sans lamelle” (en vert). L’analyse de la carte factorielle de l’AD montre que le groupe “Avec alcool sans lamelle” se sépare correctement des trois autres groupes : “Avec alcool avec lamelle”, “Sans alcool avec lamelle” et “Sans alcool sans lamelle”. En plus, les groupes “Sans alcool sans lamelle” et “Sans alcool avec lamelle” se superposent l’un sur l’autre. Les quatre groupes se comportent comme s’ils appartenaient à des taxons différents. Les Distances de Mahalanobis (DM) calculées entre groupes deux à deux chez mâles comme les femelles, et soumises à la correction séquentiel de Bonferroni par le test de permutation à 1000 tours (distances significatives à un risque de 5 % si $p < 0,0083$), sont en générales grandes et significatives entre tous les groupes ($p = 0,0001$). Cette distance de Mahalanobis était petite et non significative ($p > 0,05$) entre les groupes “Sans alcool avec lamelles” et “Sans alcool sans lamelles” chez les mâles comme les femelles (**Tableau 2**). En plus, la DM était petite entre les groupes : “Avec alcool avec lamelle” et “Sans alcool avec lamelle” avec une différence non significative (**Tableau 2**).

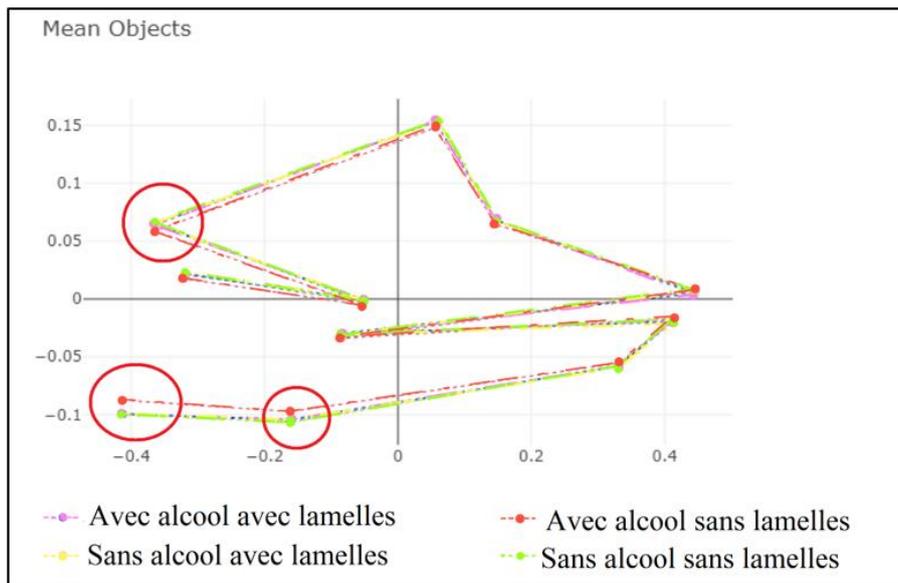


Figure 4 : “Mean objects” obtenus après l’analyse généralisée de Procrustes et montrant la superposition des points-repères

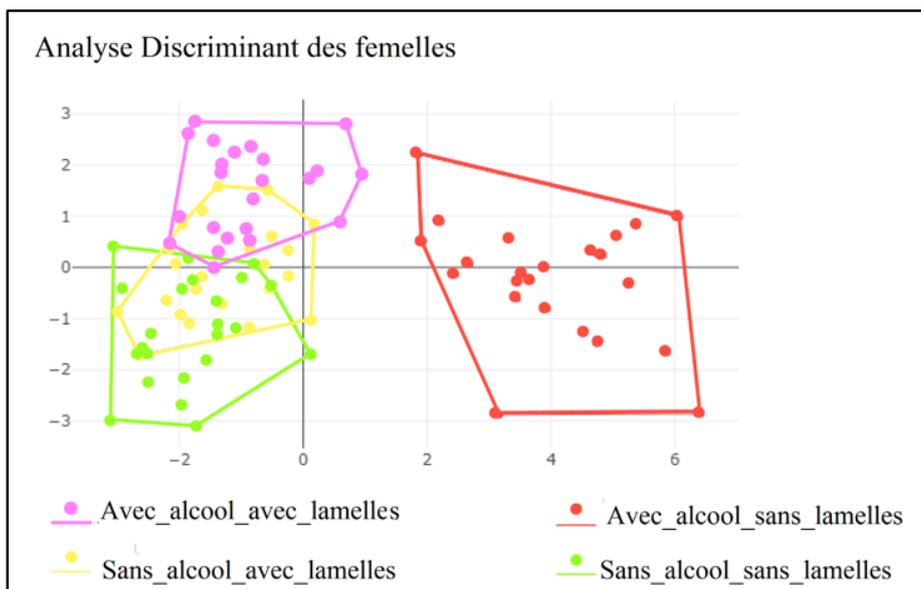


Figure 5 : Carte factorielle de l’analyse discriminante des groupes de femelles

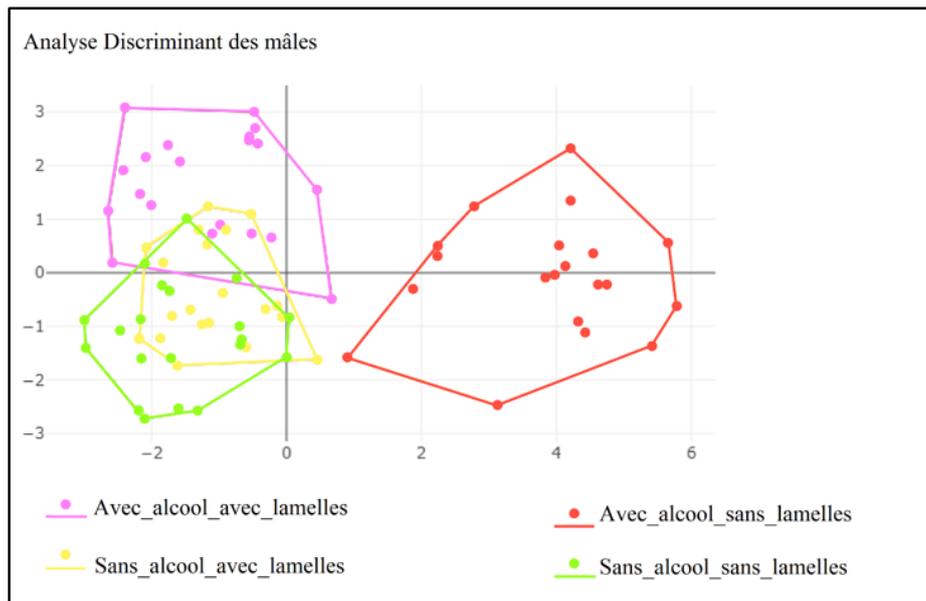


Figure 6 : Carte factorielle de l'analyse discriminante des groupes mâles

Tableau 2 : Distances de Mahalanobis (DM) entre les groupes mâles et femelles, avec correction séquentielle de Bonferroni. 1 : avec alcool et avec lamelle, 3 : avec alcool et sans lamelle, 2 : sans alcool et avec lamelle et 4 : sans alcool et sans lamelle. *, $P < 0,05$

Groupes	Distance de Mahalanobis entre groupes femelles 2 à 2		Distance de Mahalanobis entre groupes mâles 2 à 2	
	DM entre femelles	Test à partir de $p < 0,0083$	DM entre mâles	Test à partir de $p < 0,0083$
Entre 1 et 2	1,89	0,036000	2,27	0,009000*
Entre 1 et 3	5,24	0,000001*	5,35	0,000001*
Entre 1 et 4	2,92	0,000001*	2,86	0,000001*
Entre 2 et 3	5,35	0,000001*	5,03	0,000001*
Entre 2 et 4	1,64	0,155000	1,61	0,368000
Entre 3 et 4	5,95	0,000001*	5,57	0,000001*

4. Discussion

L'impact de l'éthanol et de la lamelle ont été testés en utilisant une approche de morphométrie géométrique appliquée aux ailes de *Glossina palpalis palpalis* appartenant au genre *Nemorhina* (ou groupe *palpalis*). Cette étude a permis de montrer que l'éthanol à 70° et la lamelle couvre-objet modifient la forme et la taille des glossines. Une aile de glossine est formée par la juxtaposition de deux couches épidermiques avec une couche dorsale et ventrale. La couche ventrale est légèrement incurvée (concave) tandis que la couche dorsale est arrondie de l'extérieur (convexe). La conservation des ailes dans l'éthanol pendant deux mois a entraîné une modification de l'aile qui pourrait être à la base de la variation de la forme et de la taille de l'aile. L'éthanol a été testé chez des mammifères pour mesurer son effet sur la reproduction. L'étude a montré que l'éthanol provoque des changements de diamètre dans la structure des tubes séminifères chez le lapin [23, 24], contrairement aux ailes, l'éthanol provoque une atrophie testiculaire et conduit à une infertilité masculine [25]. Cette étude a montré que la conservation des ailes dans l'éthanol modifie la conformation des ailes. L'idée de conserver des ailes dans l'éthanol pourrait affecter les études qui cherchent à identifier ou à établir

la systématique (dimorphisme sexuel, identification d'espèces cryptiques et d'espèces inconnues) des espèces. Les résultats de cette étude sont similaires à ceux publiés par [12, 26 - 29]. Les travaux réalisés par [30, 31] sur *Gadus morhua*, une espèce de poisson au stade juvénile a montré un rétrécissement de la taille des poissons sous l'impact de l'éthanol. Lorsque les ailes de glossines sont isolées, elles ne possèdent pas la propriété d'une feuille de papier rame parfaitement plate sans défaut superficiel. Au contraire, toutes les ailes des glossines sont concaves, c'est-à-dire que la surface présente un intérieur arrondi et convexe de l'extérieur. Cette surface concave et convexe de l'extérieur est similaire pour toutes les ailes de glossines. Une fois l'aile immergée dans l'éthanol pendant une longue période, par exemple deux mois, comme dans cette étude, les ailes ont tendance à se transformer en une surface plane et cette modification de la surface de l'aile est à la base de l'augmentation de la moyenne de la taille centroïde par rapport aux groupes dont les ailes n'ont pas été immergées dans l'éthanol. Les ailes des glossines sont naturellement caractérisées par une surface concave de l'intérieur et convexe de l'extérieur, lorsque les ailes sont montées entre lames et lamelles et fixées à l'aide d'une bande adhésive transparente cela modifie la surface naturelle des ailes qui deviennent plus ou moins planes. Le poids des lamelles sur les ailes serait à la base de l'augmentation de la moyenne de la taille centroïde, mais cette augmentation n'est pas statistiquement significative. Cependant, chez les femelles entre les groupes "Avec alcool avec lamelle" et "Avec alcool sans lamelle" l'augmentation de la taille est significative. L'étude des 'Mean objects' montre une superposition imparfaite des groupes d'espèces, cela serait dû à l'impact de l'éthanol et de la lamelle qui exercent une pression sur les ailes en modifiant leur incurvation naturelle. L'étude de l'analyse discriminante (AD) permet de discriminer les groupes. En effet, le groupe "Avec alcool sans lamelle" se sépare nettement des autres groupes. Cependant, le groupe "Avec alcool avec lamelle" est quant à lui très proche des groupes "Sans alcool sans lamelle" et "Sans alcool avec lamelle" cela serait dû au poids des lamelles sur les ailes.

En effet, les lamelles exercent une pression sur les ailes ce qui serait à la base de la variation de la forme de l'aile. En plus, les groupes d'individus se comportent comme si l'autre groupe appartenait à un groupe d'une autre espèce. L'étude l'AD montre que l'effet de l'éthanol et des lamelles sur les ailes des mêmes espèces de glossines entraîne des modifications de la forme des ailes des glossines, cela en présentant les groupes comme provenant de taxons différents. Cette observation est similaire aux travaux de [27] qui ont montré que l'effet de l'éthanol à 70 % provoque des variations de forme des poissons par rapport aux poissons qui ne sont pas conservés dans le même liquide. Les distances de Mahalanobis entre groupe mâles et femelles deux à deux dans cette étude sont en générales grandes et significatives sauf entre les groupes "Sans alcool avec lamelle" et "Sans alcool sans lamelle" ; et entre les groupes "Avec alcool avec lamelle" et "Sans alcool avec lamelle". Les résultats des distances de Mahalanobis s'expliquent par le fait que les lamelles et l'éthanol exerceraient une pression sur les ailes ce qui entraîne une variation de la forme des ailes. Le fait que les DM soient grandes avec des différences significatives entre les groupes montrent l'impact de l'éthanol et des lamelles. Cette observation concorde avec l'étude effectuée sur l'appareil reproducteur des lapins [32]. En effet, chaque groupe se présente comme appartenant à des taxons différents. Les résultats obtenus sont très importants dans un contexte d'identification des espèces cryptiques, d'espèces inconnues et pour établir la systématique des organismes. En effet, l'éthanol défait l'incurvation naturelle des ailes sous le poids des lamelles couvre-objet. Aussi, des individus de collections biologiques dans les muséums sont conservés souvent dans des liquides (le formol et l'éthanol etc.) et sont utilisés pour identifier les spécimens parfois difficiles à identifier. Vu l'impact que l'éthanol a sur les ailes de glossines, la morphométrie se présente comme une approche appropriée pour identifier toutes variations de la forme des organismes. Pour ce faire, certaines précautions devraient être prises pour tirer des conclusions sur ce type d'étude. L'entomologiste doit vérifier si les organes ou organismes à identifier ont été conservés dans de l'éthanol.

5. Conclusion

Les résultats obtenus dans cette étude montrent que la conservation des ailes de glossines dans l'éthanol, et la pression que les lamelles exercent sur les ailes ont un impact sur les propriétés physiques des ailes. En effet, l'impact de l'éthanol sur les ailes engendre une modification de la conformation et de la taille des ailes, cette modification a un impact sur la systématique de l'espèce. L'étude de la moyenne de la taille centroïde montre que l'éthanol et les lamelles augmentent la taille normale des ailes de glossines, mais avec une différence non significative de l'ensemble. En plus, l'étude de l'AD et des distances de Mahalanobis montrent que l'éthanol et les lamelles modifient la forme normale des ailes de glossines avec une différence significative. Concernant les lamelles, elles peuvent être utilisées à condition qu'elles soient toutes de la même épaisseur. Pour une bonne identification des espèces de glossines ou d'insectes les résultats de cette étude préconise de conserver les ailes à sec avant toute étude de morphométrie géométrique.

Références

- [1] - A. WRIGHT, A. LEE, K. PEARSON, A Cooperative Study of Queens, Drones and Workers in "Vespa Vulgaris." *Biometrika*, 5 (1907) 407 - 422
- [2] - M. BAYLAC, T. DAUFRESNE, Wing Venation Variability in *Monarthropalpus buxi* (Diptera, Cecidomyiidae) and the Quaternary Coevolution of Box (*Buxus sempervirens* L.) and Its Midge. Springer US., (1996) 285 - 301
- [3] - C. P. KLINGENBERG, N. A. GIDASZEWSKI, Testing and Quantifying Phylogenetic Signals and Homoplasy in Morphometric Data. *Systematic Biology*, 59 (2010) 245 - 261
- [4] - J. P. DUJARDIN, J. COSTA, D. BUSTAMANTE, N. JARAMILLO, S. CATALA, *Deciphering morphology in Triatominae : The evolutionary signals. Acta Tropica*, 110 (2009) 101 - 111
- [5] - J.-P. DUJARDIN, D. KABA, P. SOLANO, M. DUPRAZ, K. D. McCOY, N. JARAMILLO-O, *Outline-based morphometrics, an overlooked method in arthropod studies? Infection, Genetics and Evolution*, 28 (2014) 704 - 714
- [6] - S. SANTILLAN-GUAYASAMIN, A. G. VILLACIS, M. J. GRIJALVA, J.-P. DUJARDIN, The modern morphometric approach to identify eggs of Triatominae. *Parasites & Vectors*, 10 (1) (2017) 55
- [7] - F. L. BOOKSTEIN, *Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. Bltn Mathcal Biology*, 58 (1996) 313
- [8] - M. RUDEMO, *Statistical Shape Analysis*. I. L. Dryden and K. V. Mardia, Wiley, Chichester. No. of pages: xvii+347. Price: £60.00. ISBN 0-471-95816-6. *Statistics in Medicine*, 19 (1998) 2716 - 2717
- [9] - F. L. BOOKSTEIN, *Morphometric Tools for Landmark Data : Geometry and Biology. Cambridge University Press.*, (1991) 435 p.
- [10] - D. C. ADAMS, F. J. ROHLF, D. E. SLICE, Geometric morphometrics : Ten years of progress following the 'revolution.' *Italian Journal of Zoology*, 71 (2004) 5 - 16
- [11] - S. PALANISWAMY, N. A. THACKER, C. P. KLINGENBERG, *Automatic identification of landmarks in digital images. IET Computer Vision*, 4 (2010) 247 - 260
- [12] - J. K. LESLIE, J. E. MOORE, Changes in Lengths of Fixed and Preserved Young Freshwater Fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43 (1986) 1079 - 1081
- [13] - D. P. FEY, Effects of preservation technique on the length of larval fish: methods of correcting estimates and their implication for studying growth rates. *Arch. Fish. Mar. Res.*, 1 (1999) 17 - 29
- [14] - ROBINEAU-DESVOIDY, A New Species of the Genus *Sturmia* Robineau-Desvoidy (Diptera : Tachinidae) Parasitic on the Chestnut Tiger Butterfly, *Parantica sita* (Lepidoptera : Danaidae) in Japan. *Entomological Science*, 5 (1830) 297 - 304

- [15] - A. CHALLIER, J.-P. GOUTEUX, M. COOSEMANS, La limite géographique entre les sous-espèces *Glossina palpalis palpalis* (Rob.-Desv.) et *G. palpalis gambiensis* Vanderplank (Diptera : Glossinidae) en Afrique occidentale. *Cahiers ORSTOM. Série Entomologie Médicale et Parasitologie*, 21 (1983) 207 - 220
- [16] - P. SOLANO, S. RAVEL, T. DE MEEUS, How can tsetse population genetics contribute to African trypanosomiasis control? *Trends in Parasitology*, 26 (2010) 255 - 263
- [17] - D. KABA, D. BERTE, B. T. D. TA, J. TELLERIA, P. SOLANO, J. P. DUJARDIN, 'The wing venation patterns to identify single tsetse flies', *Infection, Genetics and Evolution*, 47 (2017) 132 - 139
- [18] - C. P. KLINGENBERG, *MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. Molecular Ecology Resources*, 11 (2011) 353 - 357
- [19] - M. L. ZELDITCH, D. L. SWIDERSKI, H. D. SHEETS, *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer. Academic Press.*, (2012) 489 p.
- [20] - F. J. ROHLF, D. SLICE, Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks. *Syst Biol*, 39 (1990) 40 - 59
- [21] - J. T. RICHTSMEIER, V. B. DELEON, S. R. LELE, The promise of geometric morphometrics. *American Journal of Physical Anthropology*, 119 (2002) 63 - 91
- [22] - S. DUJARDIN, J.-P. DUJARDIN, *Geometric morphometrics in the cloud. Infection, Genetics and Evolution*, 70 (2019) 189 - 196
- [23] - A. SAIHIA, L'effet d'éthanol sur les paramètres hématologiques, biochimiques et les paramètres de la reproduction chez le lapin mâle *Oryctolagus Cuniculus*. (Thèse). UNIVERSITÉ BADJI-MOKHTAR-ANNABA, Algérie, (2014) 125 p.
- [24] - M. MARTINEZ, S. MACERA, G. F. DE ASSIS, P. F. F. PINHEIRO, C. C. D. ALMEIDA, L. F. TIRAPELLI, O. A. MARTINS, W. MELLO-JUNIOR, C. R. PADOVANI, F. E. MARTINEZ, Structural evaluation of the effects of chronic ethanol ingestion on the testis of *Calomys callosus*. *Tissue and Cell*, 41 (2009) 199 - 205
- [25] - M. MANEESH, S. DUTTA, A. CHAKRABARTI, D. M. VASUDEVAN, Alcohol abuse-duration dependent decrease in plasma testosterone and antioxidants in males. *Indian J Physiol Pharmacol*, 50 (2005) 291 - 296
- [26] - J.-H. LEE, K. KODAMA, T. HORIGUCHI, Change in body size of juvenile marbled sole *Pseudopleuronectes yokohamae* after preservation in ethanol. *Ichthyol Res*, 59 (2012) 49 - 52
- [27] - P. A. MARTINEZ, W. M. BERBEL-FILHO, U. P. JACOBINA, Is formalin fixation and ethanol preservation able to influence in geometric morphometric analysis? Fishes as a case study. *Zoomorphology*, 132 (2013) 87 - 93
- [28] - C. J. FOX, Length changes in herring (*Clupea harengus*) larvae : effects of capture and storage in formaldehyde and alcohol. *J Plankton Res*, 18 (1996) 483 - 493
- [29] - M. K. CUNNINGHAM, W. F. GRANBERRY, K. L. POPE, Shrinkage of Inland Silverside Larvae Preserved in Ethanol and Formalin. *North American Journal of Fisheries Management*, 20 (2000) 816 - 818
- [30] - D. P. FEY, Length adjustment of larval and early-juvenile cod (*Gadus morhua*) after up to 3 years of preservation in alcohol. *Journal of Applied Ichthyology*, 28 (4) (2012) 665 - 666
- [31] - J.-H. LEE, K. KODAMA, T. HORIGUCHI, Change in body size of juvenile marbled sole *Pseudopleuronectes yokohamae* after preservation in ethanol. *Ichthyol Res*, 59 (1) (2012) 49 - 52
- [32] - D. H. VAN THIEL, R. LESTER, R. J. SHERINS, *Hypogonadism in alcoholic liver disease: evidence for a double defect. Gastroenterology*, 67 (1974) 1188 - 1199