

SECTION ONCHOCERCOSE

ETUDE CYTOTAXONOMIQUE DU COMPLEXE  
SIMULIUM DAMNOSUM EN AFRIQUE OCCIDENTALE

I TECHNIQUES D'ETUDE - PREMIERS RESULTATS

par

D. QUILLEVERE<sup>1</sup> et B. PENDRIEZ<sup>2</sup>.

169/Oncho du 3 Novembre 1972

- 
1. Chargé de Recherches de l'ORSTOM
  2. Technicien d'Entomologie médicale de l'ORSTOM

12 DEC. 1972

Section Onchocercose B.P. 171 Bobo-Dioulasso - Haute-Volta.

O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

n° 582.1 Ent. Med.

## I. INTRODUCTION.

### 1.1. Historique.

Depuis 1923, année où BLACKLOCK découvrit le rôle de Simulium damnosum Theo. dans la transmission de l'Onchocercose, de nombreux travaux à travers l'Afrique montrèrent la grande variabilité de comportement du vecteur. Dès lors plusieurs chercheurs é mirent l'hypothèse de l'existence d'un complexe d'espèces indifférenciables morphologiquement. Seule l'étude précise des chromosomes géants trouvés dans les glandes séricigènes des larves, permit en 1966 à DUNBAR d'entamer l'étude cytotaxonomique du complexe S.damnsum. Parmi les larves que MAC CRAE lui avait expédiées d'Ouganda il déterminait quatre types cytologiques différents. En 1969, DUNBAR reconnaît 9 types cytologiques, 8 en Afrique de l'Est et 2 en Afrique Occidentale (Nile étant commun aux deux). En 1971 DUNBAR et VAJIME fixent à 17 le nombre des cytotypes, 11 "spécifiques" de l'Afrique de l'Est, 5 de l'Afrique Occidentale et 1 (Nile) se trouvant dans toute l'Afrique. Enfin, en 1972, VAJIME (correspondance) donnant ses derniers résultats regroupait les 7 cytotypes Ouest-Africains en 4 espèces: Bandama - Soubre, Yah-Bille, Nile-Sirba, Dieguera. Les deux premières espèces étant "forestières" et les deux dernières de "savane". Il précisait aussi que ces quatre espèces et ces 7 cytotypes formaient en réalité 10 populations ou sous-populations différentes.

### 1.2. But du travail.

Il apparut rapidement nécessaire de faire la relation entre les cytotypes et les différences de comportement observées. Ceci ne pouvait être fait que sur le terrain au sein d'une équipe spécialisée depuis de nombreuses années dans l'étude écologique et épidémiologique de S.damnsum. C'est pourquoi, début 1972, nous avons entamé ce travail car il devenait désormais impossible de mener à bien un travail de recherches sur S.damnsum sans tenir compte des découvertes cytotaxonomiques. S.damnsum ne pouvait plus être considérée comme une seule et unique espèce mais comme un complexe d'espèces jumelles. Dans un premier temps nous avons dû mettre au point ou modifier les techniques d'étude puis ensuite déterminer les différents cytotypes présents dans notre zone d'étude.

.../...

## 2. TECHNIQUES D'ETUDE.

### 2.1. Récolte du matériel.

Les larves sont récoltées si possible avec leur support (branches, herbes, feuilles, pierres) et sont aussitôt enfermées dans des sachets de plastique avec une fiche indiquant le lieu et la date de la récolte. Les sacs plastiques sont placés à leur tour au contact de la glace dans une boîte thermostatique facilement transportable sur le terrain. Si les gîtes larvaires ne sont pas trop éloignés du laboratoire, on y ramène la glacière afin de trier les larves. On conserve les larves de S.dannosum du dernier stade (ébauches branchiales bien visibles). Si les gîtes sont trop éloignés ou si la tournée dure plusieurs jours, on se contente de fixer les larves en les plongeant directement avec leurs supports, bien égouttés, dans le fixateur. Les piluliers contenant les larves fixées sont conservés en glacière.

### 2.2. Fixation du matériel.

L'un des meilleurs fixateurs pour l'étude des noyaux cellulaires et en particulier des chromosomes est le fixateur de Carnoy dont la formule classique est :

- 6 parties d'alcool absolu
- 3 parties de chloroforme
- 1 partie d'acide acétique cristallisable à rajouter au moment de l'emploi.

DUNBAR emploie un Carnoy modifié comme suit :

- Alcool absolu 2 parties (ou 3 parties)
- Acide acétique cristallisable (1 partie).

Il n'emploie donc pas de chloroforme mais, en contre partie, pratique une incision dorsale de la partie postérieure de l'abdomen afin "de mettre à nu" les glandes séricigènes. Nous pensons qu'en utilisant le chloroforme cette précaution est superflue. Nous avons obtenu d'excellentes fixations des glandes séricigènes et des tubes de Malpighi en utilisant du Carnoy formé de :

- 3 parties d'alcool absolu
- 1 partie de chloroforme
- 1 partie d'acide acétique cristallisable.

.../...

et en plongeant directement les larves vivantes dans le fixateur sans dissection préalable. Cette méthode permet sur le terrain de récolter un matériel bien plus abondant.

Nous avons testé également la méthode de DUNBAR consistant à ouvrir les larves avant de les fixer dans le Carnoy sans chloroforme. Les résultats obtenus ont été tout à fait similaires aux nôtres.

La durée de la fixation pour les larves non disséquées est de 2 à 3 heures, pour une température comprise entre 0 et 5°C. On peut également conserver les larves dans le fixateur durant plusieurs mois mais à condition de les maintenir à basse température (0 à 5°C). Nous avons personnellement obtenu de bonnes préparations avec des larves conservées depuis 3 mois dans le fixateur; cependant l'étalement des chromosomes se fait plus difficilement qu'avec des larves fraîchement fixées.

### 2.3. Coloration.

Nous avons testé quatre méthodes différentes de coloration :

- coloration de Feulgen
- coloration à l'orcéine acéto-lactique
- coloration au violet de Cresyl
- coloration au carmin acétique.

#### 2.3.1. Coloration de Feulgen.

La coloration nucléaire de Feulgen nous a donné d'excellents résultats.

Les larves sorties du fixateur et ouvertes ventralement sont placées dans une solution d'acide chlorhydrique à 10% à froid durant 1 minute, puis dans une solution identique préalablement chauffée à 60°C durant 5 à 10 minutes; on les repasse alors dans la solution à froid durant 30 secondes et on les lave à l'eau distillée. On sèche rapidement les larves sur du papier filtre, on les plonge dans la leucofuschine basique et on place le tout au réfrigérateur entre 0 et 5°C.

La durée de la coloration est très variable et dépend beaucoup de la fixation. Certaines larves se colorent suffisamment en 10 - 15 minutes, d'autres en 2 ou 3 heures. La durée moyenne est

.../...

1 heure ou 1 heure et demie. On lave ensuite dans trois bains successifs d'eau sulfurée et dans trois bains d'eau du robinet, chaque bain durant 5 minutes environ. On conserve les larves avec leur glandes séricigènes colorées dans le dernier bain de lavage jusqu'au moment du montage provisoire.

### 2.3.2. Coloration à l'orcéine acéto-lactique.

Cette coloration est couramment utilisée pour l'étude cytologique des moustiques par exemple. Son avantage sur la coloration de Feulgen est qu'elle ne nécessite pas d'étuve ou de bain-marie pour l'hydrolyse préalable, de plus elle est plus rapide et nécessite moins de manipulations. Les résultats obtenus sont bons mais les bandes chromosomiques n'apparaissent pas aussi nettement, au contraste de phase, qu'avec la coloration de Feulgen.

Les larves sorties du fixateur sont ouvertes ventralement. On sépare alors les glandes séricigènes du corps de la larve, ce dernier étant placé en attente dans de l'acool à 70° en vue de l'étude morphologique.

Les glandes séricigènes sont alors placées dans une goutte d'orcéine acéto-lactique déposée sur une lame propre. On laisse le colorant agir 3 à 5 minutes puis on recouvre d'une lamelle et on procède à l'écrasement.

Avec cette coloration qui ne nécessite pas, comme le Feulgen, une hydrolyse préalable, les glandes séricigènes contiennent une masse de soie rendue dure et compacte par le fixateur. Cette soie rend parfois impossible l'écrasement des cellules et l'étalement des chromosomes. Deux solutions sont alors possibles: ou bien on dissèque les glandes séricigènes elles-mêmes afin de retirer la masse de soie interne, ou bien on ramollit suffisamment la soie en procédant à une hydrolyse préalable.

La première solution n'est guère satisfaisante car on détruit, du moins en partie, beaucoup de cellules et de noyaux. La seconde solution rend cette coloration aussi peu pratique que la coloration de Feulgen. Nous avons donc pris un moyen terme en réalisant une simple "hydrolyse" à froid dans une solution d'acide chlorhydrique à 10% durant une minute. Ceci suffit à ramollir suffisamment

.../...

la soie pour permettre un bon étalement des chromosomes et ne nécessite pas l'utilisation d'une étuve ou d'un bain-marie.

Cette méthode rapide peut être employée pour un travail de routine visant à déterminer les larves, mais dans un premier temps où nous devons avoir des images précises de la succession des bandes nous lui préférons la coloration de Feulgen.

### 2.3.3. Coloration au violet de cresyl.

Cette coloration bien que relativement complexe ne donne pas de résultats intéressants. En particulier elle se prête très mal à l'observation en contraste de phase. Nous la citons donc pour mémoire (AMIRKHANIAN, 1968).

### 2.3.4. Coloration au carmin-acétique.

La coloration au carmin acétique est très proche de la coloration à l'orcéine acéto-lactique. En ce qui concerne les résultats obtenus, les bandes chromosomique colorées par l'orcéine acéto-lactique sont plus nettes, en particulier lors de l'observation en contraste de phase.

## 2.4. Montage provisoire.

### 2.4.1. Après la coloration de Feulgen.

On sort une par une les larves du bain de lavage. Chaque larve est alors placée pour la dissection sur une lame propre, dans une goutte d'acide acétique à 50%. Les glandes séricigènes sont séparées du reste de la larve qui est placé dans de l'acool à 70% en vue d'une étude morphologique ultérieure.

On couvre alors la préparation d'une lamelle. Pour procéder à l'écrasement il est important que la lamelle ne glisse pas et n'enroule pas, ce faisant, les noyaux et les chromosomes. On place donc la lame entre deux morceaux de papier filtre, et on exerce progressivement une pression sur la lamelle et ceci suivant la verticale. (OVAZZA 1971). Très souvent une pression même forte du pouce ne suffit pas à étaler suffisamment les chromosomes. Ne disposant pas de presse spéciale, nous avons placé au dessus de la lamelle, recouverte de plusieurs couches de papier filtre, une simple gomme servant

d'amortisseur et avec quelques coups de marteau nous obtenons un étalement parfait des chromosomes. Il faut évidemment s'assurer que la table ou la paillasse où l'on travaille est absolument plane sinon la lame casse.

#### 2.4.2. Après les autres colorations.

Les glandes séricigènes étant déjà placées sur la lame dans la goutte de colorant, il suffit donc, après le lavage, d'enlever au maximum la soie contenue dans les glandes avant de placer la lamelle et de procéder à l'écrasement comme ci-dessus.

#### 2.5. Montage définitif.

##### 2.5.1. Congélation.

Après s'être assuré au microscope du bon étalement des chromosomes, on place la lame dans le freezer d'un réfrigérateur lamelle en dessous. Après trois ou quatre heures on sort la lame et rapidement on fait sauter la lamelle. Une partie du matériel reste sur la lame, l'autre sur la lamelle.

##### 2.5.2. Déshydratation.

On plonge la lame dans un tube de Borrel contenant de l'alcool absolu et la lamelle correspondante dans une petite boîte de Petri contenant, elle aussi, de l'alcool absolu. Après 2 bains d'alcool absolu et 2 bains de Toluène (5 mn chacun) on procède au montage.

##### 2.5.3. Montage au Baume.

On sort la lame du Toluène et on place à l'endroit où se trouve le matériel une goutte de Baume du Canada. On recouvre avec une lamelle propre. On place alors sur la lame à côté de la lamelle une deuxième goutte de Baume et on recouvre avec la lamelle sortie du Toluène. Chaque lame porte donc deux lamelles, l'une recouvrant le matériel resté sur la lame et l'autre le matériel resté sur la lamelle. La lame, où sont inscrites les indications voulues, est alors placée à l'étuve pour le séchage.

## 2.6. Etude des chromosomes.

### 2.6.1. Observation et photographie.

Les chromosomes sont observés à fort grossissement au contraste de phase. Le contraste de phase donne des images nettement plus contrastées et précises de la succession des bandes que l'observation en fond clair. Signalons à ce propos que la coloration doit être légère. Les chromosomes doivent apparaître rosés à l'optique ordinaire, pour la coloration de Feulgen et l'orcéine acéto-lactique, sinon on observe au contraste de phase un "engorgement" des bandes chromosomiques. Inversement si la coloration est insuffisante on observe en contraste de phase une succession de bandes grisâtres se détachant à peine sur le fond gris.

Pour chaque larve on sélectionne quelques noyaux dont les chromosomes sont nets et bien étalés et on les photographie. Les films sont ensuite tirés sur papier photo format 18 x 24 cm, ce qui donne des chromosomes d'environ 1 cm de largeur.

### 2.6.2. Les cartes chromosomiques.

On découpe les chromosomes sur les photographies obtenues et on les recolle sur papier cartonné en rectifiant au maximum les courbures afin de pouvoir comparer côte à côte les chromosomes correspondants de diverses larves.

On dessine ensuite sur calque à partir du montage photographique obtenu les bandes chromosomiques et on précise leur succession au microscope. On obtient ainsi une carte photographique et une carte dessinée permettant de préciser les bandes apparaissant plus ou moins nettement sur la photo.

### 2.6.3. Numérotation.

Pour étudier plus précisément la succession des bandes on divise la longueur totale des 3 chromosomes d'un noyau en cent parties égales en ayant soin toutefois que chacune des cent parties soit définie par des bandes bien repérables. On numérote ces cent parties de 1 à 100 en débutant par le bras court du chromosome I et en terminant par le bras long du chromosome III. C'est ainsi que le chromosome I est numéroté de 1 à 42, le chromosome II de 43 à 72, le chromosome III de 73 à 100.



Lorsque l'on compare ensuite avec les chromosomes d'une autre larve il est plus commode de repérer les parties homologues et de mettre en évidence les inversions.

### 2.7. Etude morphologique.

Parallèlement à l'étude cytotaxonomique nous avons mené l'étude morphologique des larves. Lors de la dissection des glandes séricigènes, nous avons indiqué précédemment, que le reste du corps de la larve était placé en attente dans de l'alcool à 70°, de là il est placé dans du Marc-André à froid durant 24 heures. Ensuite on dissèque sur lame dans du P.V.A.

En ce qui concerne la capsule céphalique, on dispose sous une lamelle, les prémandibules, les mandibules, les maxilles, l'armature bucco-pharyngée et la capsule céphalique déroulée portant les antennes.

En ce qui concerne le corps de la larve, on en découpe la partie postérieure, afin de placer à plat le sclérite anal et la couronne de crochets postérieure. On déroule également une ébauche branchiale. Sous une troisième lamelle, on place de profil le treste du corps de la larve.

## 3. RESULTATS OBTENUS.

### 3.1. Sur les larves au dernier stade.

En photographiant et en comparant les chromosomes correspondants de larves issues de différents gîtes, nous avons pu préciser la localisation et l'étendue des inversions  $II_1$ ,  $IIII_2$  et  $IIII_6$  de la nomenclature DUNBAR-VAJIME. Ces trois inversions nous ont permis de déterminer les cytotypes Nile, Sirba et Bille dans les différents gîtes étudiés. Le tableau de la page 10 résume les déterminations effectuées.

.../...

Pays	Localité	Rivière	Mois de récolte	Cyto-type	Nbre d'exemplaires
Soudan	Abu - Tin	Nil	Février	Nile	8
	Wau	Bahr-el-Ghazal	Février	Nile	9
Haute-Volta	Samandéni (en amont du pont)	Volta noire	Décembre	Nile	11
			Janvier	Nile	11
				Sirba	9
			Mars	Nile	3
				Sirba	9
	Dédougou (route de Nouna)	Volta noire	Février	Nile	25
				Sirba	7
			Avril	Nile	2
				Sirba	13
	Guéna	Dienkoa	Mars	Bille	15
	Dienkoa (chutes)	Dienkoa	Mai	Bille	32
	Banzo	Volta noire	Mai	Bille Sirba	2 6
	Lanviéra	Plandi	Mai	Bille	9
	Nabéré	Bougouri-Ba	Juillet	Sirba	8
Mali	Farako campe- ment	Farako	Juillet	Sirba	6
	Bamadougou	Farako	Juillet	Sirba	9
	Dougoukourané	Baouléni	Juillet	Sirba	10

Au point de vue morphologique nous n'avons trouvé aucun caractère distinctif constant sur les larves étudiées entre les différents cytotypes.

### 3.2. Sur les nymphes et les adultes.

Chez les adultes nous avons observé les tubes de Malpighi, les glandes salivaires, les ovaires. Nulle part nous n'avons trouvé de chromosomes géants utilisables pour une étude cytotaxonomique. Tout au plus les tubes de Malpighi présentent comme chez les nymphes et les larves de gros noyaux, mais les chromosomes malpighiens dont les bandes sont bien nettes chez les larves, deviennent moins nets chez les nymphes et complètement illisibles chez les adultes.

### 3.3. Ecologie et épidémiologie des différents cytotypes.

Le but de ce travail de détermination est évidemment, dans un second temps, l'étude comparative de l'écologie et de l'épidémiologie des différents cytotypes. Nous n'avons malheureusement pas eu la possibilité cette année de débiter cette partie du travail, la Section Onchocercose ayant eu à assurer un vaste programme d'essais insecticides par voie aérienne, programme auquel nous avons participé à plein temps à partir du mois d'Août 1972.

## 4. CONCLUSION.

La grande diversité des types cytologiques chez Simulium damnosum (17 cytotypes décrits jusqu'à présent) ne peut s'expliquer uniquement par une recombinaison de gènes lors d'un crossing-over méiotique. Le processus primordial est celui de la dérive génique, continuellement engendrée par la création de sous-populations à partir d'un nombre restreint d'individus isolés de populations plus importantes. Ceci chez S.damnoscum est dû à plusieurs facteurs concomittants tels que la puissance de dispersion des femelles, l'alternance saison des pluies-saison sèche, et aussi artificiellement, les campagnes insecticides (LE BERRE 1966).

Lors de la formation de ces sous-populations, la proportion des différents types géniques responsables de l'adaptation au milieu peut être mauvaise par le seul fait du hasard, la loi des grands nombres ne jouant plus. Le polymorphisme balancé de la sous-population devra donc se reconstituer à partir de quelques individus au

stock génique mal équilibré dans lequel certains des gènes de la population mère sont absents. Les conditions sélectives du milieu ayant en outre toutes chances d'être un peu différentes, d'autres gènes seront sélectionnés et la composition génétique de la sous-population isolée se différenciera de plus en plus de la population mère.

En Afrique de l'Ouest où les conditions écologiques (climat, hydrologie, etc...) permettent, chaque année, le développement d'environ 25 générations de *Simulies*, on peut aisément comprendre la complexité du problème. VAJIME lui-même (correspondance 1972) après avoir défini 7 Cytotypes Ouest-Africains, les regroupait en 4 espèces tout en décrivant 10 sous-populations. Les variations observées et le nombre d'inversions sont considérables. Certains bras de chromosomes possèdent jusqu'à 7 inversions se chevauchant les unes les autres, certaines étant fixes, d'autres flottantes. On peut donc trouver plusieurs combinaisons différentes à l'intérieur d'un même cytotype, de même qu'entre des cytotypes différents. Il paraît également difficile d'établir une carte de répartition des différents types puisque cette carte doit varier selon les mois de l'année et aussi en fonction des phénomènes de dispersion et des campagnes insecticides. Dans la poursuite de ce travail nous devons donc sélectionner des gîtes larvaires purs (un seul cytotype) aussi isolés que possible afin de pouvoir étudier l'écologie et le comportement épidémiologique de la population considérée.

##### 5. REMERCIEMENTS.

Il nous est agréable de remercier ici le Docteur LE BERRE Chef de la Section Onchocercose qui nous a fourni tous les moyens en matériel et en personnel pour ce travail tout en nous faisant profiter de sa longue expérience de *S.damnosum*.

Nous tenons aussi à remercier nos collègues de la Section Onchocercose qui nous ont toujours aidé et soutenu durant ce travail.

6. BIBLIOGRAPHIE.

AMIRKHANIAN, J. D., 1968.

A combined HCL-Acetic - Alcohol fixation and Hydrolysis followed by cresyl violet staining for mosquito chromosome spreads.

Stain Technology, 43, 167 - 170.

BLACKLOCK, D.B., 1926.

The development of O.volvulus in S.dannosum Theo.

Ann. trop. med. Parasit., 20, 1-48.

DUNBAR, R.W., 1966.

Four sibling species included in Simulium dannosum Theobald (Diptera: Simuliidae) from Uganda.

Nature, 209, 597 - 599.

DUNBAR, R.W., 1969.

Nine cytological segregates in the Simulium dannosum complex (Diptera, Simuliidae)

Bull. Org. mond. Santé, 40, 974 - 979.

DUNBAR, R.W., et VAJIME, Ch.G., 1971.

Etude cytotaxonomique du complexe Simulium dannosum

WHO/Oncho/71. 87, 5p.

LE BERRE, R., 1966.

Contribution à l'étude biologique et écologique de Simulium dannosum Theobald, 1903 (Diptera, Simuliidae).

Mémoires ORSTOM, N°17, 204p.

OVAZZA, M., 1971.

Notes sur l'étude cytotaxonomique des Simulies et en particulier de S.dannosum.

Rapport dactylographié, 12 p.