

CENTRE ORSTOM-BRAZZAVILLE  
SECTION ENTOMOLOGIE MEDICALE  
ET PARASITOLOGIE

PC/098/70 du 18-II-70

APPLICATION DES METHODES CYTOMORPHOLOGIQUES A LA DIFFERENCIATION  
DES ESPECES A ET B DU COMPLEXE ANOPHELES GAMBIAE GILES

par

P. CARNEVALE (1)

*Rapport de stage.*

(1) - P. CARNEVALE Chargé de Recherche stagiaire de l'ORSTOM

- 3 AOUT 1973

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

Collection de Références

n° B6255E.v.111

## AVANT PROPOS

Ce document est un rapport rédigé à l'issue d'un stage d'une semaine effectué par l'auteur auprès du Professeur M. COLUZZI (Institut de Parasitologie, Faculté des Sciences, Rome). Durant ce séjour nous avons pu nous initier aux méthodes pratiques d'études des chromosomes polytènes et leur application dans la différenciation des représentants du complexe Anopheles gambiae.

Le Professeur COLUZZI nous a montré les techniques qu'il a mis au point et utilisé pour ses travaux de "cartographies" des chromosomes. En mettant à notre disposition sa série de microphotographies et ses lames de référence, il nous a permis de nous habituer à reconnaître rapidement chaque bras des autosomes et à différencier les "têtes" des hétérosomes X A et X B.

Qu'il nous soit permis ici de remercier vivement le Professeur COLUZZI pour son accueil sympathique qui n'a d'égal que son enseignement remarquable et ses connaissances approfondies.

Nous tenons aussi à remercier Monsieur J. HAMON Président du Comité Technique d'Entomologie médicale, Parasitologie et du Microbiologie qui a encouragé et permis une telle mission.

J'espère que ce document pourra rendre service à mes collègues entomologistes médicaux de L'ORSTOM qui se heurtent souvent à ce délicat problème du complexe Anopheles gambiae et qui n'eurent point le bonheur de "voir" les préparations et suivre les cours du Professeur COLUZZI.

## A- ASPECT GENERAL DU PROBLEME

La détermination spécifique des Culicides présente souvent de grandes difficultés et elle devient particulièrement délicate lorsqu'on s'adresse aux représentants du complexe Anopheles gambiae Giles.

La diagnose est établie en fonction de différents critères d'ordre morphologique, mixiologique, cytotaxonomique, biométrie et écologique.

Selon le biotope larvaire on distingue :

- les "espèces" d'eau douce : A, B, C.
- les "espèces" d'eau salée : A.melas Theobald  
A.merus Donitz.

Nous centrerons cette étude sur les 3 "espèces cryptiques" A, B et C.

L'espèce C, "zoophile et exophile" semble n'avoir aucune importance épidémiologique (DAVIDSON, 1967).

Les imagos des espèces A et B peuvent occuper des biotopes sensiblement différents.

A peuple principalement les zones forestières humides tandis que dans les zones sub-désertiques B est proportionnellement plus abondant que A. Pour COZ (com. pers.) "le facteur important intervenant dans la distribution géographique paraît être le déficit de saturation : une humidité relative élevée défavoriserait la forme B".

Largement répandues dans la région éthiopienne, ces deux espèces revêtent une importance capitale dans la transmission du paludisme bien que leur "pouvoir vecteur" semble inégal. B présente en effet un développement discontinu lui permettant de

vivre dans des zones à longue saison sèche ou froide, tandis que, dans les zones où le développement de Anopheles gambiae est quasi continu on ne trouve que "du A."

L'espèce B peut survivre quelques mois dans des conditions défavorables grâce à un phénomène de quiescence avec dissociation gonotrophique (COLUZZI, com. pers.).

Les mécanismes provoquant la "levée de quiescence" sont encore inconnus, d'après COLUZZI (com. pers.) il y aurait deux types de facteurs :

- photopériode
- "excursion" de la température et de l'humidité relative.

Cette différence de développement entre A et B a, évidemment, une grande importance épidémiologique ; les imagos vivants en saison sèche ont une longévité accrue de ce fait la "transmission de P. ovale et P. malariae pourrait être liée à des moustiques en quiescence" COLUZZI (com. pers.).

Cependant, "nos connaissances sur les divergences écotypiques entre les espèces A et B demeurent en grande partie limitées par le fait des difficultés rencontrées pour l'identification de ces deux espèces" COLUZZI et SABATINI (1967). Pour séparer ces deux "cryptic espèces", les auteurs s'intéressèrent d'abord aux caractères morphologiques dont l'indice palpal (COLUZZI, 1964). CHAUVET (1969) réalise une très intéressante étude biométrique portant sur la chetotaxie des larves mais elle ne permet pas l'identification d'un exemplaire unique.

Les résultats des recherches basées sur les caractères taxinomiques conventionnels se révèlent en grande partie négatifs (DAVIDSON et al., 1967).

DAVIDSON et JACKSON (1962) séparent A et B en les croisant expérimentalement ; ils obtiennent des mâles hybrides (F 1) stériles démontrant ainsi une "stérilité génique intraspécifique typique".

Dans la nature les phénomènes d'isolement reproductifs maintiennent ces populations isolées (COLUZZI, com. pers.).

COZ et HAMON (1964) trouvent quelques mâles stériles dans la nature mais sont ce bien des hybrides ?

Pour PATTERSON (1963) les espèces sont bien isolées par différents comportements sexuels (vol nuptial).

L'emploi de méthodes biométriques est plus simple que celle des croisements mais plus long et difficile que l'emploi de méthodes cytogénétiques.

Les études cytogénétiques des espèces A et B et de leurs hybrides ont un intérêt scientifique et pratique évident. Elles portent d'abord sur les chromosomes géants des glandes salivaires des larves stade IV.

FRIZZI et HOLSTEIN (1956) établissent la "carte" concernant les chromosomes de l'espèce A. MASON (1964) compare les espèces A et B mais ses préparations manquent de netteté.

COLUZZI (1966) compare l'hétérochromosome X des espèces A et B et dresse la "carte" de la "succession des bandes" particulières à chaque espèce.

L'étude cytogénétique et cytomorphologique des représentants du complexe A. gambiae a démontré la possibilité d'identifier chaque espèce par l'examen des chromosomes polytènes des glandes salivaires des larves. L'hétérosome X présente un "banding-pattern" caractéristique pour chaque espèce. Mais cette méthode ne

s'adresse qu'aux larves de IVème stade ; le problème de la détermination des imagos demeure irrésolu. COLUZZI (1968) étend cette méthode cytomorphologique à l'étude des chromosomes polytènes des cellules nourricières des ovaires.

## B- MATERIEL ET METHODE

### 1°- Chromosomes des glandes salivaires

#### a) Elevage des larves.

La structure somatique du chromosome est très influencée par les conditions de développement cellulaire (croissance, quantité de matériel disponible pour la cellule...).

Ceci explique l'importance de bonnes conditions d'élevage des larves dans la qualité des préparations obtenues, donc dans les possibilités d'étude des chromosomes.

Placer environ 200 à 300 larves pour 3 litres d'eau dans chaque bac, les larves sont maintenues à une température de 22-24°; elles sont nourries de Farax.

#### b) Technique de sortie et préparation des glandes salivaires.

##### - Dissection - Fig. 1

Placer la larve dans une petite goutte d'eau physiologique face dorsale vers le haut.

Séparer le thorax de l'abdomen

Inciser le thorax le long de la ligne médio-dorsale jusqu'au niveau de la tête

Ecarter les deux moitiés du thorax

Repérer les glandes salivaires. Celles-ci sont situées à la limite tête-thorax, de part et d'autre de l'axe du corps.

Sectionner au niveau de chaque canal salivaire.

Une autre technique plus simple consiste à détacher délicatement la tête et par simple pression sur le thorax faire sortir les glandes salivaires.

- Coloration - fig. 2

On aura au préalable, justaposé à la lame où s'effectue la dissection, une lame très propre.

Sur cette dernière placer une lamelle siliconée.

Sur celle-ci déposer côte à côte une goutte de fixateur et une goutte de colorant, séparées par un intervalle suffisant pour éviter toute diffusion.

Laisser les glandes salivaires 30" à 1' dans le fixateur, puis 2 à 3' dans le colorant.

Réunir les 2 gouttes (faire en sorte que les glandes salivaires soient situées au centre de la lamelle).

Retourner la lamelle sur la lame.

Il est préférable d'opérer sur une surface froide pour éviter une évaporation trop rapide du colorant.

- Préparation du fixateur.

Carnoy dilué (2 parts)

Acide acétique (1 part)

Carnoy dilué :

1 partie de Carnoy

19 parties d'eau distillée.

- Préparation du colorant :

Orceine à 2 % )  
Acide acétique ) à parts égales  
Acide lactique )

Pour préparer le colorant : dissoudre la poudre naturelle d'orceine d'abord dans l'acide acétique puis dans l'acide lactique.

Observations :

Lorsque la lamelle est retournée sur la lame, effectuer un premier examen des chromosomes.

Selon leur état de déroulement, procéder à un écrasement plus ou moins accentué. Pour se faire, entourer la lame avec un papier filtre, puis écraser avec la paume de la main.

Eviter de faire glisser la lamelle sur la lame.

Examiner alors les chromosomes.

Conservation :

Si les chromosomes sont "lisibles" et bien déroulés la préparation peut être conservée au réfrigérateur (5 à 6 mois maximum). Pour faciliter la lecture, il est préférable de laisser "mûrir" la préparation 5 à 6 jours à 4° C.

Si les chromosomes sont en parfait état on peut rendre permanente la préparation (voir plus loin).

2°) Chromosomes des cellules nourricières des ovaires

a) Elevage des imagos

Les femelles sont maintenues dans les conditions normales d'élevage : 27° C, 70 % H.R.

On isole les femelles "semi-gravidés" c'est-à-dire celles nourries environ 24 heures auparavant.



Ces femelles ont digéré approximativement la moitié de leur repas sanguin.

Les ovaires sont alors au stade III fin - IV début, de Christophers : période d'activité maximale des cellules nourricières que l'on examinera (Fig. 3).

b) Technique de sortie et préparation des ovaires

- Dissection

Placer la femelle sur une lame, face dorsale vers le haut.

L'extrémité de son abdomen plongé dans une goutte d'eau physiologique.

Maintenir la femelle dans cette position à l'aide d'une aiguille montée tenue de la main gauche.

Avec une aiguille lancéolée sectionner un niveau des deux derniers segments abdominaux et tirer délicatement d'un mouvement régulier.

Les deux ovaires apparaissent alors.

Couper au niveau de l'oviducte impair.

- Coloration :

Les techniques de coloration et de conservation sont exactement les mêmes que celles concernant les glandes salivaires.

- Observation :

Comme pour ceux des glandes salivaires, on procédera à un examen préliminaire des chromosomes des cellules nourricières

Selon leur état de déroulement écraser comme précédemment.

3) Technique de préparation permanente des chromosomes - Fig. 4

Laisser quelques instants la préparation sur un bloc de carboglace.

Lorsque la lamelle est "blanche" glisser une lame de rasoir entre la lame et la lamelle.

Oter la lamelle d'un coup sec.

La lamelle étant siliconée aucune partie de la préparation n'y adhère.

La lame est alors passée dans deux bains d'alcool absolu.

Laisser 3 - 4' dans le premier bain

2 - 3' dans le second.

L'alcool deshydrate et éclaircit la préparation.

On retire la lame du second bain d'alcool, on laisse celui-ci s'évaporer.

Lorsque la lame est presque sèche, déposer une goutte d'un milieu de montage (Euparal ou Zeiss L 15).

Recouvrir d'une lamelle non siliconée.

La préparation peut alors être quasi définitivement conservée.

C- ETUDE DES CHROMOSOMES

a) Généralité

Les Culicinae ont un nombre constant de chromosomes  $2n = 6$ . Caractère supplémentaire les différenciant des Dixidae et des Chaoborinae où  $2n = 8$ .

Les chromosomes des Culicini se présentent sous l'aspect de trois paires médiocentriques ; la troisième paire étant plus courte que les deux autres (Fig. 5).

Chez les Culicini il n'y a pas d'hétérochromosome.

Les chromosomes du mâle sont apparemment similaires à ceux de la femelle. La détermination du sexe est fonction de la distribution des gènes sur le chromosome.

Chez les Anophelini les chromosomes se présentent différemment. On note deux paires d'autosomes médiocentriques et une paire d'hétérochromosome subtélocentrique (Fig. 6).

L'apparence diffère selon le sexe :

- chez la femelle : XX : les deux chromosomes sont identiques

Le chromosome X présente :

- un bras long )  
- un bras court ) euchromatiques.

Entre les deux chromosomes X il y a synapse somatique complète et l'hétérosome a la même largeur que les autosomes.

- chez le mâle : XY : les deux bras du chromosome Y sont hétérochromatiques.

Le matériel duquel provient cette partie hétérochromatique est l'"interband-material" de ce fait une grande part de l'hétérochromosome n'apparaît pas. L'hétérosome présentera une largeur égale à la moitié de celle de l'autosome.

#### b) Observations des chromosomes

- Aspect des chromosomes

Le chromosome n'est pas une structure fixe mais le résultat d'un développement.

L'épaisseur du bras, la taille et l'aspect de la bande peuvent varier.

Les chromosomes doivent coordonner le métabolisme de la cellule ; ils conditionnent la synthèse des protéines. Pour cette fonction, le groupe génique qui entre en activité diffère selon le stade de développement cellulaire.

Parfois on peut remarquer sur le chromosome une portion très élargie : le "puff". Ce puff correspond à une période d'activité des gènes à cet endroit ("locus").

Ainsi un puff sur un chromosome de cellule de glande salivaire peut être représenté par une bande forte sur le chromosome correspondant des cellules nourricières (cas du chromosome X de l'espèce B).

A l'examen les chromosomes se présentent sous l'aspect de six bras rayonnant autour du centromère.

Le chromosome 2 montre : un bras droit très long : 2 R  
un bras gauche plus petit : 2 L.

Chromosome 3 possède deux bras (3 R et 3 L) caractéristiques, sa longueur est légèrement inférieure à celle du chromosome 2.

Le chromosome X est le plus petit. Son bras court n'est pas lisible.

COLUZZI et SABATINI (loc. cit.) établissent la carte de la succession des bandes sur les différents chromosomes. Ces auteurs distinguent, arbitrairement, un certain nombre de régions. D'autre part, ils mettent en évidence les inversions se retrouvant sur les bras 2 R, 2 L et 3 L.

Le "banding-pattern" de la "tête" du bras long du chromosome X est caractéristique, il permet la différenciation des espèces A et B.

Le problème des inversions

Au sein d'une population normale on peut avoir des inversions chromosomiques.

L'arrangement génique dans le segment inversé est préservé de tout réarrangement.

Lorsqu'il y a inversion il ne peut y avoir de crossing-over dans cette portion inversée.

Lorsqu'un certain arrangement est arrivé au maximum de sa valeur adaptative il peut être conservé par inversion dans l'hétérozygote. COLUZZI (com. pers.)

L'hétérozygote a pratiquement toujours une valeur adaptative supérieure à celle des deux homozygotes. Avec une inversion, l'espèce a donc à sa disposition trois génotypes qu'elle peut "ségréger" en fonction des différentes conditions écologiques (DOBZHANSKY, 1951).

L'espèce B présente un "polymorphisme génétique formidable" (COLUZZI, com. pers.).

L'inversion A sur le bras 2 R est surtout présente chez l'espèce A; elle est fréquente dans les populations naturelles. Par contre on n'y trouve jamais "l'arrangement standard".

Cet "arrangement standard" est le plus fréquent chez l'espèce B : 50 à 60 %. Les génotypes hétérozygotes et inversé sont aussi fréquents. Il y a au sein de l'espèce B une "balance" entre les 3 génotypes.

Standard	: 30 - 40 %
Inversé	: 20 - 30 %
Hétérozygote	: 30 %

Si l'on effectue un croisement A inversé B standard on obtient un zygote avec un chromosome inversé. Mais le problème se pose, quel est exactement le génotype de B utilisé lors du croisement ?

Il est donc nécessaire d'avoir une longue pratique pour "lire" les lames et déceler toutes les particularités.

### Le problème des hybrides

Les hybrides résultant des croisements B x C, B x A ; A x C présentent des différences constantes sur le chromosome X.

Lors des croisements A x B il y a synapse quasi-totale. A l'issue des croisements C x A et C x B les chromosomes peuvent entrer en synapse, on peut alors étudier les homologues entre les chromosomes X respectifs.

Le chromosome X de l'espèce C diffère du chromosome X de l'espèce A par une inversion (4 B - 1 C). De ce fait les hybrides présentent une "loop" ou boucle d'inversion correspondant à cette région et la synapse est en position inversée (Fig. 7).

La différenciation est plus complexe entre les espèces B et C.

Sur leur chromosome X respectif on note deux inversions principales (2 B - 2 A et 4 B - 3 B), l'une consécutive à l'autre ; de ce fait le chromosome du zygote prendra une allure en 8 (Fig. 8).

Il y a en outre une réinversion 2 C - 3 A, s'il y a synapse du segment réinversé l'autre partie du chromosome reste asynaptique et asymétrique de part et d'autre du segment réinversé.

Intérêt de l'étude de C.

Avec l'étude chromosomique de l'espèce C on a pu clarifier les aberrations chromosomiques ayant porté sur les réarrangements du chromosome X des trois "espèces jumelles" d'eau douce du complexe A. gambiae (Coluzzi et SABATINI, 1968).

Selon COLUZZI (com. pers.) l'espèce C serait phyllogéniquement intermédiaire entre les deux autres espèces cryptiques A et B.

D- RESULTATS

Les observations effectuées sur les colonies de laboratoire des espèces A et B du complexe A. gambiae ont démontré la présence, dans les cellules nourricières des ovaires, de chromosomes polytènes permettant une étude cytogénétique.

L'analyse détaillée du "banding-pattern" se fait sur les chromosomes des follicules au stade IIIb - IVa,

Les chromosomes des follicules plus jeunes sont trop petits et "en grappe" tandis qu'une rapide dégénération des cellules nourricières a lieu au stade IV b - V.

L'avantage des chromosomes des cellules nourricières vient de leur grande taille, qui permet une étude détaillée ; d'autre part, leur abondance permet un examen complet. Si les chromosomes d'une cellule ne sont pas parfaitement lisibles il est aisé de passer à une autre cellule toute proche.

Cette technique présente toutefois deux difficultés :

- L'écrasement peut provoquer la diffusion de la substance vitelline parmi les chromosomes et de ce fait perturber la lecture.

- la structure du chromosome des cellules nourricières diffère de celle des chromosomes des glandes salivaires des larves.

Aussi il faut faire une "analogie critique" entre les chromosomes des "nurse-cells" et ceux des cellules des glandes salivaires des larves.

Chez l'espèce B, le puff en 1 C du chromosome X des glandes salivaires est absent sur le chromosome homologue des cellules nourricières.

Ce puff excepté la terminaison du bras long de l'hétérochrome X est utilisable et présente sur le chromosome sexuel des cellules nourricières les mêmes différences que sur celui des glandes salivaires.

Les variations morphologiques des chromosomes polytènes dans les cellules traduisent une activité génique à certaines périodes de la différenciation et du métabolisme cellulaire. Dans les cellules nourricières on trouve généralement côte à côte les bras 2 R et 3 L d'une part, 2 L et 3 R d'autre part, tandis que la zone hétérochromatique du centromère est plus évidente et moins fragile que dans les cellules des glandes salivaires.

La nomenclature des bras proposée par FRIZZI et HOLSTEIN (1956) et adoptée par COLUZZI et SABATINI (loc. cit.) ne correspond pas à "l'association réelle des bras des chromosomes" (COLUZZI, 1968).

Si un premier examen des chromosomes des cellules nourricières peut être effectué à l'aide des cartes dressées par COLUZZI et SABATINI (loc. cit.) concernant les chromosomes des glandes salivaires, une analyse détaillée du banding-pattern des chromosomes des "nurse-cells" nécessitera l'établissement d'une nouvelle carte.



- B I B L I O G R A P H I E -

CHAUVET (G.), DAVIDSON (G.) et DEJARDIN (J.), 1969 -

- Validité d'une méthode chetotaxique de distinction des larves des espèces A et B du complexe Anopheles gambiae Giles à Madagascar.

Cah. ORSTOM, sér. Ent. Méd. et Parasitol. VII (1), pp. 51-60.

COLUZZI (M.), 1964 -

- Morphological divergences in the Anopheles gambiae complex.

Riv. di Malarologia, XLIII, (4-6).

COLUZZI (M.), 1966 -

- Osservazioni comparative sul chromosome X nelle specie A et B del complesso Anopheles gambiae.

Rendiconti della Classe di Scienze fisiche, matematiche e naturali, Serie VIII, XL, (4).

COLUZZI (M.), 1968 -

- Cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche del complesso Gambiae del genere Anopheles.

Parasitologia, X, (2-3).

COLUZZI (M.) et SABATINI (A.), 1967 -

- Cytogenetic observations on species A and B of the Anopheles gambiae complex.

Ibid. IX (2).

COLUZZI (M.) et SABATINI (A.), 1968 -

- Cytogenetic observations on species C of the Anopheles gambiae complex.

Ibid., X, (2-3).

COZ (J.) et HAMON (J.), 1964 -

- Le complexe Anopheles gambiae en Afrique Occidentale  
Riv. di Malariologia, XLIII, (4-6)

DAVIDSON (G.), 1967 -

- A distribution map of the member species of the  
Anopheles gambiae complex.

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 61, pp. 454.

DAVIDSON (G.) et JACKSON (E.), 1962 -

- Incipient Speciation in Anopheles gambiae Giles.

Bull. W.H.O., 27, pp. 303-305.

DOBSHANSKY (T.), 1951 -

- Genetics and the origine of species.

3rd edition, New York.

FRIZZI (G.) et HOLSTEIN (M.), 1956 -

- Etude cytogénétique d'Anopheles gambiae.

Bull. W.H.O., 15, pp. 425-435.

MASON (G.F.), 1964 -

- The causes of male sterility in Anopheles gambiae A-B  
group - croves.

Riv. Malariologia, 43, pp. 185-190.

PATERSON (H.E.), 1963 -

- Report on studies on the Anopheles gambiae complex on  
Mauritius.

W.H.O. Docum. W.H.O./Mal/416.

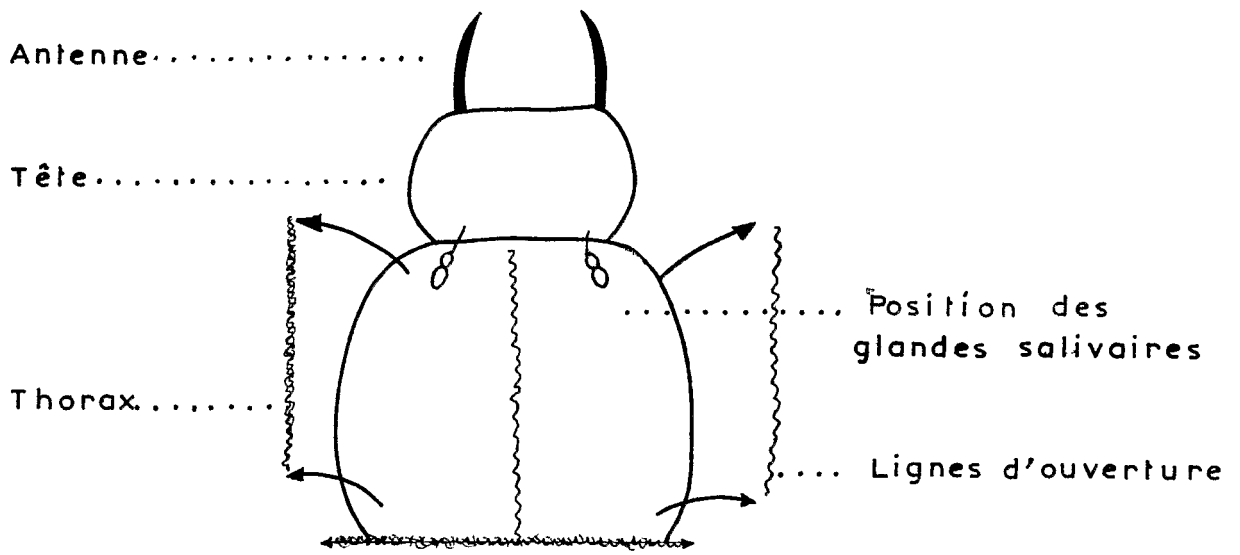


Fig. 1

DISSECTION DES GLANDES SALIVAIRES

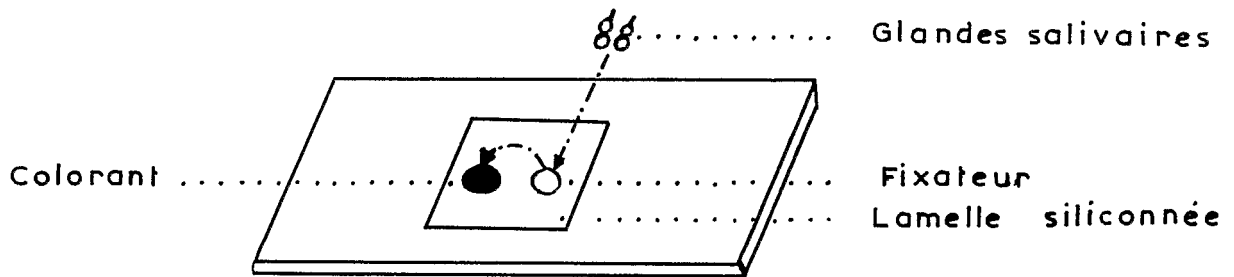


Fig. 2

PREPARATION ET COLORATION  
DES GLANDES SALIVAIRES

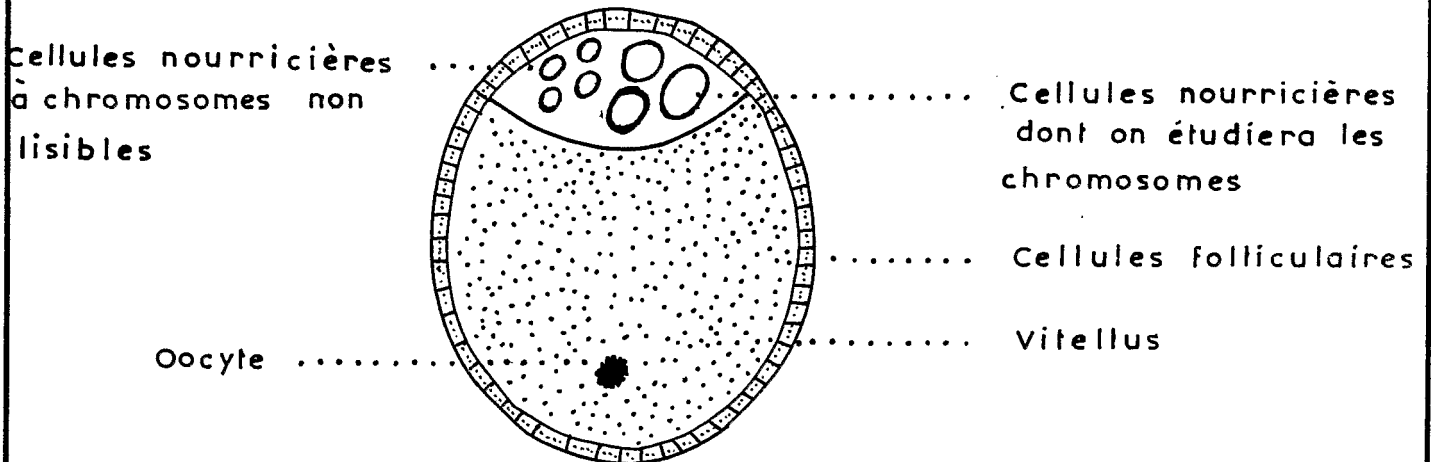


Fig. 3

FOLLICULE AU STADE IIIF-IVd  
DE CHRISTOPHERS

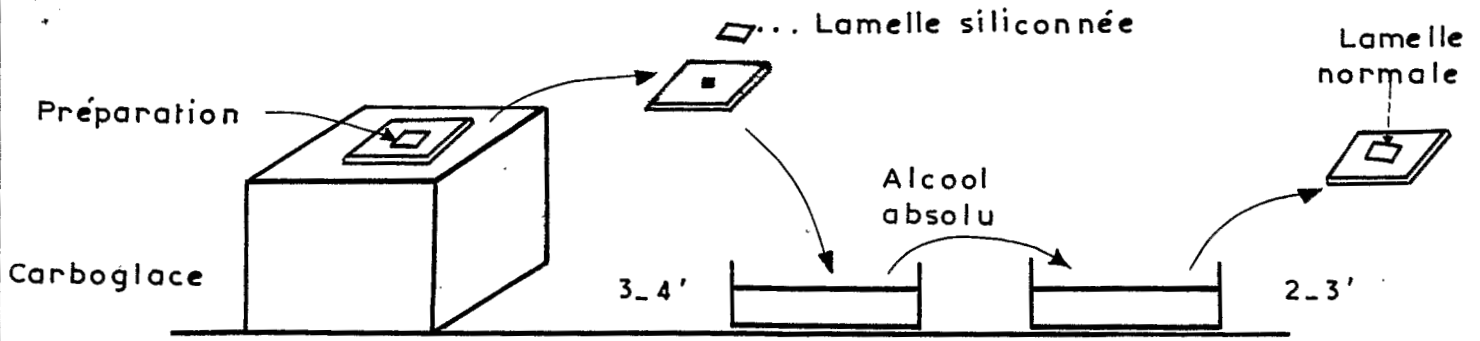


Fig. 4

TECHNIQUE DE PREPARATION PERMANENTE DES CHROMOSOMES

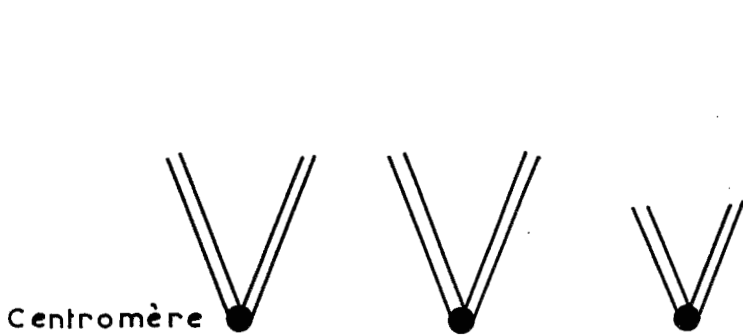


Fig. 5

CHROMOSOMES MEOICENTRIQUES  
DES CULICINI

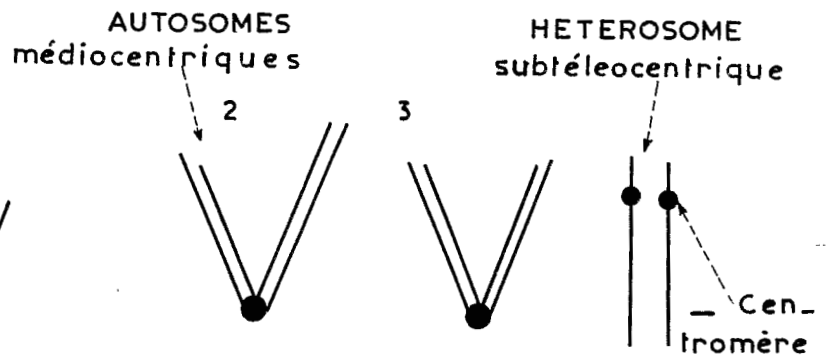


Fig. 6

CHROMOSOMES DES ANOPHELINI

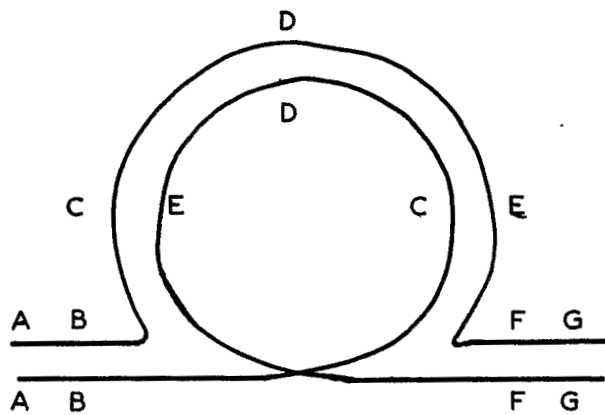


Fig. 7

BOUCLE D'INVERSION  
" LOOP "

(caractéristique du chromosome X du zygote consécutif au croisement A x C)

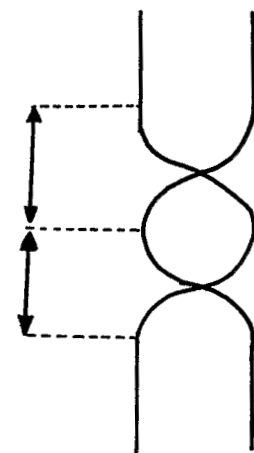


Fig. 8

CHROMOSOME X DU ZYGOTE  
CONSECUTIF AU CROISEMENT  
B x C (DOUBLE INVERSION)