

OFFICE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE OUTRE - MER

CENTRE DE BRAZZAVILLE

Service d'Entomologie médicale

Etude de la Cytogénétique et la génétique des Culicidae et des Simuliidae

RAPPORT DE STAGE

Par P. CARNEVALE

Chargé de Recherches stagiaire

RAPPORT DE STAGE

ETUDE DE LA CYTOGENETIQUE ET LA GENETIQUE
DES CULICIDAE ET DES SIMULIIDAE

Basée sur un séjour de 45 jours dans les
laboratoires des Professeurs

- J.B. KITZMILLER, Department of Zoology,, Urbana.
University of Illinois, U.S.A.
- G.B. CRAIG Jr., Department of Biology,
University of Notre-Dame,
Notre-Dame, Indiana, U.S.A.
- K.H. ROTHFELS, Department of Botany,
University of Toronto,
Toronto, Ontario, CANADA.

CYTOGENETIQUE DES Culicidae ET DES Simuliidae

I- CYTOGENETIQUE DES ANOPHELES

I-I- Elevage des Anophèles

I-I-I- Elevage des larves pour l'étude des chromosomes.

I-I-2- Elevage des mutants d'A. albimanus.

I-I-3- Quelques techniques utiles.

a- Technique d'isolement des femelles

b- Technique de comptage des oeufs

c- Technique de copulation forcée

d- Technique de ponte forcée

I-2- Préparation des chromosomes

I-2-I- Produits utilisés

a- Fixateur

b- Colorant

c- Milieux de montage

I-2-2- Dissection des larves

I-2-3- Obtention des chromosomes

a- "Squash technic"

b- "Tap technic"

I-2-4- Préparation permanente

I-3- Observation et cartographie des chromosomes polytènes

I-3-I- Rappel succinct

I-3-2- Matériel

a- Préparations personnelles

b- Collections mises à notre disposition

I-3-3- Lecture et interprétation des chromosomes polytènes

I-4- Aberrations chromosomiques

I-4-I- Rappels succincts

I-4-2- Matériel

I-4-3- Observations

I-4-4- Intérêt des aberrations chromosomiques.

II - CYTOGENETIQUE ET GENETIQUE D'AEDES AEGYPTI.

II-I- Cytogénétique d'Aedes aegypti

II-I-1- Elevage des larves pour l'examen des chromosomes polytènes.

- a) Méthodes de MESCHER (1963)
- b) Remarques personnelles.

II-I-2- Chromosomes polytènes

- a) Dissection des larves et préparation des glandes salivaires.
- b) Résultats et observations des chromosomes polytènes.
 - b1) Observations personnelles
 - b2) Travaux de MESCHER (1963) et RAI
- c) Discussion et perspectives.

II-I-3- Chromosomes mitotiques

- a) Principales techniques
- b) Observations.

II-2_ Génétique d'Aedes aegypti.

II-2-1- Elevage des mutants et maintien des souches.

- a) Souches et observations personnelles
 - Matériel
 - Remarques
- b) Elevage de routine des mutants
- c) Conservation des souches

II-2-2- Cartes géniques

- a) Rappels succincts
 - a1) Phénomène ~~de~~ linkage
 - a2) Caractères liés au sexe
 - a3) Phénomène de crossing-over
- b) Location d'un gène
 - b1) Croisements
 - b2) Interprétation des résultats

II-2-3- Cartes de linkage et génétique formelle d'Aedes aegypti.

II-3-1 - Intérêt pratique de ces études

II-3-1 a) Lutte biologique

a - Principes

b - Techniques

A- Stérilisation des insectes

A1- Chimiostérilisations

A2- Irradiation

B- Manipulations génétiques

B1- Distorsion du sex-ratio

B2- Translocations chromosomiques

B3- Contrôle génétique des vecteurs de
filaires

c - Premiers résultats

d - Perspectives

II-3-2 - Cytotaxonomie.

III - CYTOTAXONOMIE DES SIMULIIDAE

III-I - Techniques de préparation des chromosomes.

III-I-1 - Dissection des larves

a) Technique "push and pull" de NEWMAN

b) Technique de DUNBAR

c) Technique "ouvrir et tirer"

III-I-2 - Préparation des glandes et des chromosomes

a) Technique de ROTHFELS et DUNBAR : "Feulgen
technique"

b) Technique de NEWMAN : "lacto-acetic orcéine
technique"

III-I-3 - Montages permanents

a) Technique de NEWMAN

b) Technique de ROTHFELS

c) Technique de DUNBAR

III-2 - Observations

III-2-1 - Observations personnelles : chromosomes géants de
Prosimulium fuscum.

III-2-2 -- Cytotaxonomie

- a) Le complexe Simulium damnosum
- b) Les espèces jumelles
- c) Le problème du chromosome sexuel
- d) Polyploïdie et Parthénogénèse
- e) Le problème des hybrides
- f) Rameaux phyl~~l~~étiques.

CONCLUSION ET CONSIDERATIONS PERSONNELLES

Le développement des phénomènes de résistance et la pollution sans cesse croissante du milieu ont déterminé, pour remplacer l'emploi massif d'insecticides, la recherche de nouvelles techniques permettant le "contrôle" des insectes, dits nuisibles, sans modifications essentielles du biotope.

Tout d'abord, il faut rayer de notre vocabulaire le terme d'éradication. D'un point de vue pratique, l'éradication d'une espèce d'insecte est déjà bien souvent utopique ou nécessite des moyens très importants. Et d'un point de vue écologique, quelles sont les conséquences de la disparition d'une espèce ? C'est là un problème que les plus modernes ordinateurs ne peuvent résoudre car la "loi de la nature" ne peut être mise en fiches. De ce fait, au lieu de tenter, grossièrement et chimiquement, d'éliminer une espèce, ne serait-il pas préférable d'essayer de la "contrôler" en limitant le nombre de ses représentants ou en réduisant son importance en tant que nuisance.

Ainsi, pourquoi ne pas laisser vivre les moustiques en ôtant leur pouvoir vecteur d'affections parasitaires pour l'homme et les animaux ? Stopper la transmission d'organismes pathogènes tout en maintenant, dans la mesure du possible, le biotope intact, tel doit être le but principal de tous les travaux actuels.

La génétique des populations ouvre un chapitre capital dans l'histoire des relations entre l'homme et son environnement. Ce type d'étude est appelé à prendre une place prépondérante dans la science qui nous intéresse.

Mais avant de manipuler le pool génique d'une population culicidiennne, encore faut-il parfaitement connaître le génotype non seulement de l'espèce considérée mais encore de chaque souche. Ce travail de base, indispensable avant toute utilisation pratique, nécessite une étude précise de la cytogénétique et de la génétique des insectes vecteurs de maladies. Partageant cette conception de lutte biologique, et voulant améliorer nos connaissances dans cette nouvelle orientation des problèmes entomologiques, nous avons effectué un stage de 45 jours dans les laboratoires du Professeur KITZMILLER d'abord, puis du Professeur CRAIG et enfin du Professeur ROTHFELS.

Ce stage nous a permis d'étudier successivement :

- la cytogénétique des anophèles,
- la cytogénétique et la génétique d'Aedes aegypti,
- la cytogénétique des simulies.

En outre, pendant notre séjour, nous avons eu plusieurs conversations avec différents chercheurs travaillant sur d'autres aspects du problème général "relations hôte-vecteur-parasite".

Notre stage a été essentiellement consacré à l'aspect pratique de la cytogénétique, toutes les informations théoriques étant clairement exposées dans le livre "Genetics of Insect Vectors of Diseases" de WRIGHT et PAL (1967).

I- CYTOGENETIQUE DES ANOPHELES

Du 16 mars au 3 avril 1972 nous avons suivi un stage de cytogénétique dans les laboratoires du Professeur JAMES B. KITZMILLER (Department of Zoology, University of Illinois, Urbana, Illinois, 61801, U.S.A.).

Selon KITZMILLER (com. pers.) on peut dire, qu'à de rares exceptions près, toutes les espèces d'anophèles actuellement décrites d'Amérique du Nord, sont, en réalité, des complexes d'espèces jumelles. Ceci est également valable pour les espèces d'Amérique du Sud (Anopheles darlingi, A. muneztovari).

Ces problèmes de complexes d'espèces jumelles se posent donc en termes aussi délicats en Amérique qu'en Afrique et justifient les importants travaux qui s'y rattachent.

Ces travaux font appel à des techniques de plus en plus élaborées et notamment en cytogénétique. La première étape a consisté, et consiste encore, à établir pour chaque espèce la cartographie des chromosomes polytènes, des glandes salivaires des larves. (KITZMILLER, 1953 ; COLUZZI et SABATINI, 1967; KITZMILLER et al., 1967) ou des cellules nourricières des ovarioles (COLUZZI, 1968). Cette étape se poursuit tout naturellement par l'étude des aberrations chromosomiques naturelles ou provoquées : mutations, inversions, translocations... Cette étude est très importante et permet de reconnaître et séparer différentes populations naturelles d'une

même espèce, d'envisager la mise en évidence et l'utilisation pratique de "gènes marqueurs" d'expression phénotypique. En outre, une étude biochimique est à l'ordre du jour (TREBATOSKI et HAYINES, 1969 ; NARANG et KITZMILLER, 1971).

L'étude des différents enzymes, et plus particulièrement des estérases, a déjà permis de déceler les loci de certains gènes marqueurs d'expression biochimique.

Pour notre part, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux deux premières étapes, en l'occurrence cartographie des chromosomes et étude des aberrations chromosomiques.

Dresser la "carte" d'un chromosome ne se fait pas uniquement en rivant son oeil à un microscope.

Un certain nombre de phases précèdent l'observation des préparations :

- élevage méticuleux des larves :
 - densité optimale par bac,
 - quantité et qualité de la nourriture offerte journalièrement,
- choix des larves - il faut prélever les larves lorsqu'elles ont atteint le stade adéquat. En effet, les chromosomes ne sont bien "lisibles" que dans les glandes salivaires des larves d'anophèles au début du quatrième stade.

Quelques heures d'écart peuvent avoir une grande influence sur l'aspect des chromosomes qui, trop âgés ou trop jeunes, ne peuvent alors être correctement interprétés.

- préparation soignée des glandes salivaires :
 - dissection, fixation et coloration,
 - première observation,
 - écrasement ("squash technic")
 - montage permanent si les chromosomes sont bien déroulés,
 - lecture précise du "banding-pattern" de chaque bras de chromosome. Ce point est particulièrement délicat et nécessite la "lecture" d'un grand nombre de lames si l'on veut faire une :
 - bonne interprétation de l'agencement des bandes donc
 - une cartographie correcte.

A partir de cette carte de référence on peut alors obser-

ver les chromosomes d'autres souches et remarquer les inversions ou les translocations particulières qu'elles présentent. C'est cette séquence de travail que nous avons suivi pendant notre séjour à Urbana.

I-1- Elevage des anophèles

Nous avons élevé trois espèces maintenues en insectarium depuis plusieurs générations :

- Anopheles albimanus
- Anopheles quadrimaculatus
- Anopheles atroparvus

Anopheles albimanus a fait l'objet d'une attention plus particulière dans la mesure où la souche maintenue en élevage présente une mutation naturelle. Les mutants sont sélectionnés pour une étude fondamentale, à la fois génétique et cytogénétique (RABBIANI, com. pers.).

I-1-1- Elevage des larves pour l'étude des chromosomes

KITZMILLER (com. pers.) a remarqué que les chromosomes des espèces halophiles étaient généralement plus faciles à lire que ceux des espèces dulçaquicoles.

Partant de cette observation, les larves des espèces d'eau douce ont été élevées dans un milieu légèrement salé ; les bras des chromosomes se déroulent alors plus aisément et les "bandes" sont plus nettes.

Afin de bien "voir" l'efficacité de cette méthode, nous avons élevé nos larves dans deux types de milieu :

- eau douce dé-ionisée,
- eau douce dé-ionisée (trois parts) + eau de mer (une part).

Pour chaque espèce nous avons préparé 4 bacs, deux bacs d'eau douce et deux bacs d'eau salée. Notre élevage se composait donc de douze bacs, chacun contenant environ une centaine d'oeufs pour un litre d'eau. Les larves du premier stade ne recevaient aucune nourriture. A partir du second stade les larves sont nourries avec une poudre composée, à parts égales, de blé, maïs et levure. Mélange dont on saupoudrait la surface de l'eau afin que toutes les larves puissent

absorber à peu près la même quantité et se développent de façon homogène. Ces larves sont maintenues dans le même insectarium où sont élevés les adultes, cette pièce est à 75-80 % d'humidité relative et 25° C. La lumière est dispensée par des tubes néon réglés pour une photopériode de 12 heures d'éclairage et 12 heures d'obscurité.

Pour cet élevage on utilise des bacs "émaillés" dont la paroi intérieure est tapissée d'un papier filtre de 4,5 cm de largeur. Selon KITZMILLER (com. pers.) ce n'est pas la quantité d'eau qui importe mais la surface disponible. De ce fait les larves ont à leur disposition un bain de 2 à 3 cm de profondeur.

La limitation de leurs mouvements et une alimentation toujours disponible font que les larves seront bien développées et les chromosomes n'en seront que plus nets.

Ceci pourrait être comparé aux oies que l'on gave de force et que l'on maintient dans un espace restreint puis que l'on sacrifiera pour prélever un foie hypertrophié. Il est évident que l'on ne peut nourrir de force les larves de moustiques mais on arrive à un résultat similaire en maintenant ces larves en contact le plus étroit possible avec la poudre vitaminée servant d'aliment.

I-1-2- Elevage des mutants d'A. albimanus.

La souche d'A. albimanus mise à notre disposition présente une mutation naturelle qui est sélectionnée au cours des générations successives. Cette mutation a deux expressions phénotypiques, de ce fait les imagos peuvent être classés en trois "catégories" :

- la forme sauvage qui présente des tarsi postérieurs entièrement blancs à l'exception d'un anneau sombre sur la région proximale du cinquième article tarsal,

- la forme "bisignatus" : présente un anneau sombre supplémentaire sur le troisième article tarsal,

- la forme "trisignatus" : présente un deuxième anneau sombre supplémentaire sur le second article tarsal.

Dans une cage ordinaire nous avons mis en élevage des mâles et des femelles "sauvages" d'A. albimanus.

Ces imagos s'alimentent sur un tampon d'eau sucrée et, deux fois par semaine nous introduisons, dans la cage, un cobaye, immobilisé dans un petit bac à l'aide de rubans adhésifs. La face

dorsale du cobaye, exposée aux piqûres des anophèles, est rasée chaque fois.

Un petit gobelet en carton, dont la paroi intérieure est recouverte de papier filtre, sert de pondoir. Les oeufs récoltés sont maintenus deux jours sur le papier filtre humide avant d'être mis normalement à éclore dans un bac. L'élevage larvaire standard demande moins de précautions que celui destiné à obtenir de "belles larves" pour l'étude des chromosomes. Cependant il est recommandé de ne pas mettre plus de 200 larves dans le même bac. A noter qu'il est préférable, ici aussi, que l'eau soit à niveau assez bas. Toujours adapter la quantité de nourriture à donner en fonction de la taille des larves.

Les nymphes sont quotidiennement prélevées et réunies dans un gobelet en carton fermé par un tulle moustiquaire. Les imagos néonates sont endormis à l'éther, examinés et classés, selon le sexe et le phénotype.:

- sauvages,
- bisignatus
- trisignatus
- "deformed hind tarsus" : individus dont les tarses postérieurs présentent diverses malformations,
- bi ou trisignatus dont les zones sombres supplémentaires ne sont représentées que par quelques écailles.

Les individus de type sauvages sont séparés tandis que l'on conserve, dans une même cage, les mutants bi et trisignatus plus ceux n'ayant que quelques écailles signalant la mutation. Dans une seconde cage on place les individus présentant des malformations.

La cage ne contenant que des mutants est alors suivie attentivement. De générations en générations on suit le développement de cette mutation. Le décompte des individus de chaque catégorie :

- mâle-femelle
 - sauvage-mutant
 - mutant à anneau complet-mutant à anneaux plus ou moins représentés
 - tarses postérieurs normaux-tarses postérieurs déformés
- permet d'établir l'expressivité et la pénétrance du gène mutant dans le pool génique de la souche d'A. albimanus considérée. Il est à noter

que les premiers imagos qui éclosent sont les mutants et, autre fait remarquable démontrant l'importance des conditions d'élevage, aux plus "belles" larves correspondent des imagos présentant le phénotype mutant le mieux marqué.

Nous ne pouvons nous étendre très longuement sur ce sujet car il fait actuellement l'objet d'un important travail fondamental. Travail dont les résultats définitifs doivent être prochainement publiés par M. RABBIANI et J.B. KITZMILLER, dans la revue Mosquito News.

I-1-3- Quelques techniques utiles.

a) Technique d'isolement des femelles.

Technique très utile pour suivre l'évolution de la maturation ovarienne et étudier facilement la ponte de chaque femelle. Ceci est très important lorsqu'on fait une série de croisements entre les représentants de différentes populations, on peut alors établir le degré d'interfécondité entre les deux souches considérées.

Isoler, dans un tube Borel, une femelle âgée de cinq jours. De préférence isoler une femelle semi-gravide, qui a pris son repas de sang la veille. Le fond du tube est tapissé d'un papier filtre d'environ 2 cm. de largeur ; ce papier filtre est maintenu sec pendant deux jours puis légèrement humecté, de telle sorte que seul le papier soit humide, sans qu'il y ait d'eau en excès au fond du tube. Pendant ces deux jours, pour limiter les mouvements de la femelle, descendre le tampon de coton qui ferme le tube, laissant un espace disponible d'environ 2 à 3 cm. Attendre la ponte et compter le nombre d'oeufs.

b) Technique de comptage des oeufs.

Les oeufs ainsi obtenus sont mis normalement à éclore dans l'eau, après avoir été soigneusement comptés. Quarante huit heures après la mise en eau, reprendre le bac, ôter, précautionneusement (et compter) toutes les larves stade I et stade II. Recueillir tous les oeufs restant sur un papier filtre quadrillé, les carreaux ayant 1/2 cm. de côté. Nous recommandons l'emploi d'un fin pinceau pour "ramener" tous les oeufs sans les abîmer.

Compter alors tous les oeufs carré par carré en classant les oeufs selon trois catégories :

- oeufs normalement éclos,

- oeufs vides : c'est-à-dire non embryonnés,
- oeufs non éclos : c'est-à-dire avec une larve stade I à l'intérieur.

Pour reconnaître ces deux dernières catégories on presse légèrement sur l'oeuf, soit l'oeuf éclate et montre un intérieur absolument vide, soit la paroi se déchire et, l'on peut alors facilement voir une petite larve à l'intérieur. Pour plus de précaution il est recommandé de ne pas jeter le papier filtre, mais le remettre dans l'eau et attendre encore 48 heures puis recommencer les comptages si d'autres larves ont éclos. Comparer alors les résultats :

$$\text{Nombre de larves} = \text{Nombre total d'oeufs} - (\text{Nb. d'oeufs non embryonnés} + \text{Nb. d'oeufs non éclos}).$$
$$\text{Nombre total d'oeufs} = \text{Nb. d'oeufs normalement éclos} - (\text{Nb. d'oeufs non embryonnés} + \text{Nb. d'oeufs non éclos}).$$

Ces données permettent de savoir exactement quel est le degré d'interfécondité de deux souches. Rappelons que l'on considère comme stérile une femelle dont la ponte, apparemment normale, ne donne, en réalité aucune larve viable.

c) Technique de copulation forcée.

Cette technique s'emploie couramment pour maintenir les élevages d'A. punctipennis, A. quadrimaculatus, A. earlei et A. albimanus. Chez ces espèces on note "un gradient d'eurygamie" (KITZMILLER, com. pers.). Pour la copulation, choisir des femelles âgées de trois à quatre jours et des mâles âgés de quatre à cinq jours. Il faut prévoir deux fois plus de mâles que de femelles à féconder. Ces mâles sont préparés très rapidement quelques minutes avant "l'emploi". Leur transpercer le thorax (au niveau des pleurites) à l'aide d'une minutie montée ; couper les pattes, les ailes et la tête. Anesthésier alors très légèrement une femelle et la disposer face ventrale vers le haut.

Mettre en contact les genitalia du mâle avec la région homologue de la femelle. Il est recommandé de manipuler sous une loupe binoculaire. Faire "passer" plusieurs fois les terminalia du mâle au niveau de l'extrémité de l'abdomen de la femelle. Au moment où

les claspers du mâle "accrochent" et qu'intervient alors la copulation, relever légèrement le mâle, la femelle doit alors s'élever dans le même mouvement. Lorsque la "pumping motion" a eu lieu, le mâle détend ses claspers libérant ainsi la femelle qui "choit" fécondée. Il est recommandé de renouveler l'expérience afin d'être bien sûr de la fécondation (un mâle pouvant accidentellement être stérile). Un point délicat est celui de l'anesthésie de la femelle qui doit être suffisamment endormie pour ne pas se réveiller pendant l'accouplement mais se réveiller ensuite. Les femelles ainsi fécondées sont ensuite placées dans des cages d'élevage, nourries sur eau sucrée pendant 24 heures, puis alimentées sur cobaye.

d) Technique de ponte forcée.

Cette méthode est employée pour les élevages d'A. munctipennis et A. quadrimaculatus. Il arrive parfois que les femelles convenablement gorgées et fécondées n'effectuent pas leur ponte. Cette rétention des oeufs est gênante dans la mesure où elle peut fausser l'interprétation d'un croisement ou faire penser à quelques problèmes d'élevage. On a alors recours à la technique de ponte forcée, qui est très simple. Elle consiste à prendre une femelle 48 heures après son repas de sang et, très délicatement, lui couper les ailes au niveau de leur insertion thoracique. La femelle ainsi privée d'ailes, est ensuite isolée dans un tube de Borel contenant un ruban de papier filtre humide. Généralement, la femelle dépose sa ponte dans les deux heures qui suivent sa mutilation.

I-2- Préparations des chromosomes.

I-2-1- Produits utilisés

a) Fixateurs

Pour accélérer le rythme des préparations la dissection est faite dans le fixateur.

Deux milieux sont couramment utilisés ; leur choix est fonction de l'habileté du manipulateur.

- Acide acétique à 45 %

Avantage : fixation meilleure et plus rapide des tissus.

Inconvénient : dissout rapidement les glandes salivaires.

Pour pallier cet inconvénient on peut utiliser le citrate de sodium à 1 % qui sert de révélateur. Une goutte de ce produit est déposée au niveau des glandes salivaires dès que le thorax est ouvert. La région proximale des glandes prend rapidement une couleur blanchâtre qui autorise une localisation rapide.

- Carnoy modifié :

une part d'un mélange constitué à parts égales d'alcool éthylique et d'acide acétique + 19 parties d'eau

Avantage : meilleure conservation des glandes donc permet une dissection plus lente.

Inconvénient : fixation plus lente.

Ce milieu est utilisé lorsqu'on n'est pas astreint à un grand rythme de travail ou lorsqu'on n'arrive pas à extraire les glandes salivaires en quelque 60 secondes.

b) Colorant.

Le colorant utilisé est une solution d'orcéine acéto-lactique à 0,5 % préparée de la façon suivante :

- Mesurer 2 gr d'orcéine en poudre et introduire ces 2 gr dans un flacon de 100 ml.

- Ajouter lentement 50 ml d'acide acétique glacial et dissoudre la poudre en remuant le flacon.

- Ajouter alors 50 ml d'acide lactique et finir de dissoudre toute la poudre.

Ce mélange représente la solution mère qui est filtrée puis conservée à 5°C (ne pas la placer dans un endroit réfrigérant).

- Le colorant lui-même est obtenu en additionnant 25 ml de cette solution mère à 75 ml d'une solution aqueuse d'acide acétique à 45 %.

Il est recommandé de préparer ce colorant que peu avant son emploi, cette solution peut cependant être conservée quelques jours mais toujours dans un réfrigérateur.

c) Milieux de montage.

Il existe deux types de montage de chromosomes :

- montage temporaire

Dans un premier temps les chromosomes sont observés peu après leur préparation, ils sont encore dans leur milieu de coloration. Ceci implique deux inconvénients :

- le colorant continue à agir et on risque très rapidement d'avoir des préparations surcolorées donc illisibles.

- la conservation de telles lames est réduite : trois à six mois représentent le délai maximum au delà duquel les préparations ne sont plus lisibles.

- Montage permanent.

La technique de préparation permanente sera signalée ultérieurement, notons déjà que le milieu recommandé est le Zeiss L.15.

I-2-2- Dissection des larves.

Il faut prélever les larves ayant atteint le début du quatrième stade. Reconnaître ce stade est essentiellement une question d'habitude car aucune particularité morphologique ne le caractérise.

- Faire sécher la larve choisie en la déposant quelques instants sur un papier filtre.

- Sur une lame, dont la face inférieure est noircie, mettre une goutte de fixateur.

- Placer la larve dans cette goutte et disposer cette larve face dorsale vers le haut.

- Avec une aiguille montée presser fortement au niveau des 4 ou 5ème segments abdominaux. Ceci fait cesser les mouvements brusques de la larve.

- A l'aide des deux minuties montées ouvrir le thorax médio-dorsalement et rabattre latéralement les deux parties ainsi séparées.

- Les glandes apparaissent alors dans la région antérieure du thorax, de part et d'autre de l'oesophage. Leur partie proximale, arrondie, permet généralement de les reconnaître rapidement.

- Oter ces glandes et les placer, chacune, dans une goutte de colorant préalablement disposée sur une lamelle siliconée.

Observations

Différentes variantes ont été apportées à la technique de base décrite précédemment et utilisée par le Pr. KITZMILLER. Nous les signalons pour mémoire mais chacun adapte sa propre technique.

- Lorsque la larve est placée dans la goutte de fixateur couper la tête et retirer les coecas digestifs avant d'ouvrir le thorax. Les glandes salivaires apparaissent plus facilement.

- les glandes salivaires d'A. albimanus étant situées au niveau de l'épaule une technique consiste à découper obliquement cette zone puis presser délicatement pour en faire sortir les glandes.

- l'utilisation d'une lame noire est intéressante si l'on dispose d'un éclairage épiscopique. Pour notre part nous préférons un éclairage hyposcopique qui permet de mieux mettre en évidence le contraste entre les glandes et les tissus adipeux environnants. Comme nous l'avons signalé plus haut, ces techniques sont des modifications personnelles, l'essentiel est d'obtenir rapidement des glandes intactes.

I-2-3- Obtention des chromosomes

Lorsque des glandes sont restées 2 à 3 minutes dans le colorant, recouvrir délicatement la lamelle, où sont situées les 2 gouttes, avec une lame normale très propre. Noter au crayon gras la position des glandes puis rapidement retourner l'ensemble lame plus lamelle (cf. schéma 1).

Observer au microscope à faible grossissement l'état de déroulement et de coloration des chromosomes. En fonction procéder à un écrasement plus ou moins accentué. Rappelons que le milieu de montage étant encore l'orcéine acétique les chromosomes prennent toujours la coloration.

a) "Squash technic"

Les bras des chromosomes étant en général enroulés sur eux-mêmes il faut procéder à leur étalement et ceci est "plus un art qu'une science" (KITZMILLER com. pers.).

Placer l'ensemble lame plus lamelle entre deux morceaux de papier filtre et appuyer fortement au niveau des tissus en faisant bien attention à ne pas faire glisser la lamelle.

Pour cette opération, différentes techniques sont employées suivant les utilisateurs :

- écrasement avec le pouce,
- écrasement avec la paume de la main,
- écrasement en maintenant entre le pouce et l'index le papier filtre recouvrant la lamelle et appuyer avec l'extrémité de l'index de l'autre main.

Toutes ces techniques, et leurs dérivés personnels, sont au choix du manipulateur, l'important est d'obtenir des bras de chromosomes bien déroulés et intacts. Pour cela suivre au fur et à mesure le déroulement de ces bras en observant la préparation au microscope après chaque écrasement.

b) "Tap technic"

D'aucuns préfèrent cette technique à celle que nous venons de décrire. Cette méthode consiste à tenir les bords de la lamelle entre le pouce et l'index de la main gauche et tapoter, plus ou moins fortement, la lamelle avec l'index de la main droite.

Pour une série de coups plus ou moins nombreux et accentués on obtient, généralement, un bon déroulement des chromosomes. Cette technique est légèrement plus "fine" que la précédente dans la mesure où on peut mieux doser l'intensité de l'impact et choisir l'endroit où on l'applique.

Il arrive en effet qu'une préparation présente des noyaux bien éclatés et des chromosomes déjà assez bien déroulés tandis que des noyaux alentours, ou bien la seconde glande montre encore des chromosomes imparfaitement étalés.

Un écrasement global de la préparation pourrait entraîner une rupture de certains bras sans pour cela que les autres chromosomes se soient montrés "coopératifs" (KITZMILLER com. pers.).

Là aussi, toutes ces techniques n'ont pour but que l'obtention de bras de chromosomes bien étalés et aucune n'est valable à 100 %. A titre anecdotique nous signalerons qu'avant chaque écrasement, le Pr. KITZMILLER fait le signe de croix accompagné d'une petite prière et que "God helps us".

C'est ici que la méthode d'élevage montre déjà son intérêt dans la mesure où les chromosomes des larves élevées en eau salée se déroulent plus facilement sans qu'il soit nécessaire d'appuyer ou de taper très intensément sur la lamelle.

D'autre part, il est indispensable d'avoir des lames et des lamelles parfaitement propres car toute poussière entraîne la formation de bulles d'air à l'écrasement.

I-2-4- Préparation permanente

Les lames de chromosomes peuvent être obtenues à une grande cadence (15 à 20 préparations à l'heure). L'observation par contre demande beaucoup plus de temps.

Les lames préparées selon la technique précédemment décrite ont une conservation limitée qui n'excède pas 3 à 6 mois. Ce délai permet de faire des préparations sur le terrain et de les observer au retour au laboratoire. Cependant ces préparations se détériorent et ne peuvent servir de référence. Lorsque l'on obtient de très belles préparations il est nécessaire de les avoir fort longtemps à notre disposition.

Pour conserver ces lames de façon permanente il y a différentes techniques, celle que nous avons employée est celle-ci :

- placer les lames "sélectionnées" sur un bloc de carboglace,
- laisser ces lames 30 minutes au minimum,
- lorsque la lame est "blanchie", l'ôter et rapidement à l'aide d'une lame de rasoir que l'on fait glisser sous un angle de la lamelle, la faire sauter d'un mouvement du poignet,
- passer alors la lame successivement dans deux bains d'alcool éthylique :

C₂H₅OH à 95 % 5 minutes

C₂H₅OH à 100 % 5 minutes

- sécher légèrement la lame sur un papier filtre,
- déposer sur la préparation une goutte de ZEISS L 15, on peut aussi utiliser l'Euparal comme milieu de montage mais le L 15 est préférable (KITZMILLER, com. pers.),
- recouvrir d'une lamelle ordinaire,
- laisser sécher dans une étuve environ 24 heures.

Les préparations ainsi faites peuvent être conservées quasi indéfiniment.

I-3- Observation et cartographie des chromosomes polytènes.

I-3-1- Rappel succinct.

Les Anophelini possèdent 3 chromosomes {

- le chromosome 1 ou chromosome sexuel ou hétérosome,
- le chromosome 11) autosomes
- le chromosome 111)

Rayonnant à partir du centromère on peut observer 5 "bras":

- le chromosome sexuel ou chromosome X (avec un bras long bien visible et un bras court souvent peu ou prou représenté),
- les bras droit et gauche du chromosome 11,
- les bras droit et gauche du chromosome 111.

Ces bras sont d'inégales longueurs et l'hétérosome métacentrique, toujours le plus petit, est facilement reconnaissable à faible grossissement.

A noter que, selon les lames, ce chromosome sexuel peut être aussi large que les autosomes ou moitié moins large. Ceci est dû au fait qu'un chromosome ne représente pas un tout mais l'association (synapse) des deux chromosomes homologues parentaux. Pour le chromosome sexuel, selon que la larve sera de sexe mâle ou femelle, sa formule sera XX ou XY.

Si nous avons disséqué une larve femelle le chromosome XX que nous observons sera de largeur égale à celle des autosomes.

Si nous avons disséqué une larve mâle le chromosome X euchromatique est visible tandis que Y constitué, en majeure partie, de matériel hétérochromatique n'est pratiquement pas observable.

I-3-2- Matériel

a) Préparations personnelles.

Nous avons préparé, de façon permanente, deux séries de cinquante lames pour les espèces suivantes :

- A. albimanus
- A. atroparvus
- A. quadrimaculatus

Pour chaque espèce une série de lames était faite à partir des larves élevées en eau douce et une autre à partir de larves élevées en eau salée. Ces lames ont été ramenées en France et déposées au Centre de faunistique du laboratoire O.R.S.T.O.M. de Bondy.

Ayant élevé nos larves selon la méthode classique et la méthode du Professeur KITZMILLER, nous avons pu comparer les résultats par l'observation de chaque lot.

Il s'avère effectivement que les chromosomes des larves élevées en eau salée :

- se déroulent plus facilement : point très intéressant dans la mesure où il n'est pas nécessaire d'appuyer très fortement sur la lamelle pour que les bras se déroulent pratiquement totalement.

Auparavant, pour obtenir le même résultat, on était obligé de presser avec force sur la lamelle. Cette forte pression s'accompagnait, bien souvent, de la rupture de nombreux chromosomes, les préparations devenaient alors inutilisables.

- se lisent plus facilement : en effet, les chromosomes des larves élevées en eau salée semblent "mieux nourris", ces chromosomes sont plus "développés" et les bandes sont mieux marquées que sur les chromosomes des larves élevées normalement.

Nos lames étant en dépôt toutes ces observations peuvent être constatées par tout un chacun. D'autre part, l'étude cytogénétique de ces espèces a été faite par KITZMILLER (1961, 1967) et KLASSEN et al. (1965) aussi il n'est pas utile que nous revenions sur l'agencement des bandes sur les chromosomes de ces anophèles.

b) Collections mises à notre disposition :

Le Professeur KITZMILLER nous a prêté ses meilleures lames de chromosomes d'A. (Nyssorhynchus) darlingi et A. (Nyssorhynchus) nuneztovari.

Sur ces deux espèces nous avons pu remarquer et dessiner :

- les homologues autosomales,
- la différence essentielle sur le chromosome sexuel : il existe une inversion fixe sur l'hétérosome qui permet de reconnaître chaque espèce.

- l'important polymorphisme chromosomique présenté par A. darlingi.

Possédant les lames de référence et les cartes qui en avaient été dressées nous avons pu nous familiariser avec les techniques de cartographie cytogénétique.

I-3-3- Lecture et interprétation des chromosomes polytènes

L'observation des chromosomes nécessite coup d'oeil, connaissance et patience (KITZMILLER, com. perso). Il faut se rappeler que les chromosomes sont enroulés sur eux-mêmes à l'intérieur du noyau. En appuyant sur la lamelle on fait éclater la membrane nucléaire et dérouler plus ou moins les chromosomes. Or, il est très rare que les bras soient parfaitement déroulés, généralement ils sont encore plus ou moins repliés sur eux-mêmes ou se chevauchent les uns les autres. De ce fait "suivre" un chromosome, et toujours le même chromosome, sur toute sa longueur n'est pas toujours tâche facile. C'est là qu'intervient le facteur connaissance dans la mesure où il ne faut pas confondre les artefacts de préparation (bras se chevauchant) avec des aberrations chromosomiques naturelles (translocations).

D'autre part, il faut se rappeler que les chromosomes ont une structure cylindrique, de ce fait, l'écrasement, pour important qu'il ait été, ne permettra jamais d'obtenir une figure absolument plane.

L'observation devra intéresser plusieurs plans et ce particulièrement dans la lecture des bandes. La cartographie du "banding pattern" est essentiellement arbitraire. Dans un premier temps, il faut retranscrire chaque bande selon sa coloration. Pour cela, et arbitrairement, l'intensité de la coloration a été divisée en 4 catégories, chacune se traduisant par un symbolisme particulier (cf. dessin 2'). La bande "notée 1" est la plus sombre et la "4" la plus claire. Mais les tissus ne prennent pas tous la coloration de façon égale et l'on remarque de grandes variations d'une préparation à l'autre voire d'un noyau à l'autre. Aussi c'est avec beaucoup de patience qu'il faut examiner les régions homologues d'un grand nombre de chromosomes avant de les schématiser.

Le schéma doit montrer :

- la forme du chromosome en notant tout particulièrement les zones élargies ("puff") les constrictiones et autres particularités,

- l'agencement des bandes : pour bien respecter les distances séparant chaque bande il est recommandé de procéder à toute une série de photographies pour chaque bras,

- la coloration de chaque bande : nous avons signalé la nécessité d'observer un grand nombre de lames avant d'attribuer un degré de coloration à chaque bande,

- l'intégrité et la forme de chaque bande. Plus ou moins épaisse, en "trait plein" ou en "pointillé", "droite" ou "courbe", il existe un grand nombre de possibilités dans l'allure présentée par chaque bande. Chacune doit être minutieusement observée et tout spécialement les bandes "4" qui peuvent être "oubliées".

- les "weak points" ou "zones faibles" : on peut noter la présence de zones où les bandes sont nulles ou faiblement représentées (coloration "4"). Ces zones sont à observer et retranscrire avec précision car elles sont généralement le "point de départ des inversions" (KITZMILLER, com. pers.).

Cartographier un chromosome se fait donc par l'observation directe au microscope d'un grand nombre de lames sélectionnées et par l'observation d'une série de clichés pris pour chaque portion de chromosome.

Lorsque chaque bras aura été dessiné intervient alors la désignation arbitraire de chaque zone. Chaque bras est en effet divisé en un certain nombre de zones qui sont numérotées. Numérotage qui s'effectue de la façon suivante :

- chromosome X : de l'extrémité distale au centromère,
- chromosome 2D: de l'extrémité au centromère,
- chromosome 2G: du centromère à l'extrémité distale,
- chromosome 3D: de l'extrémité distale au centromère,
- chromosome 3G: du centromère à l'extrémité distale.

Nous donnons plus loin un exemple d'une telle cartographie (fig.3). Chaque zone est ensuite, toujours arbitrairement, divisée en 3 ou 4 parties désignées par les lettres A, B, C, D.

Toutes ces divisions et subdivisions du chromosome sont faites en prenant pour "limites" des "zones remarquables" : constriction, double bande, "weak point"... , ce qui demande une certaine pratique des chromosomes.

Les principales étapes de la cartographie d'un chromosome sont donc l'examen minutieux et la retranscription schématique de

- la morphologie externe des chromosomes,
- l'agencement des bandes,

- la coloration et forme de chaque bande, puis la division arbitraire en zone (1, 2, 3) et sous zone A,B,C.. en fonction des caractéristiques remarqués au cours des étapes précédentes.

Lorsque la carte est établie pour une souche, on peut alors s'intéresser aux autres souches de la même espèce et noter les analogies et les différences. Il ne faut pas oublier qu'il y a un important polymorphisme chromosomique "à l'intérieur" de chaque espèce. En effet il existe des "inversions flottantes" dont la présence doit être mise en évidence pour chaque population d'une même espèce mais qui ne constituent pas un critère de spéciation (DUNBAR, com. pers.).

C'est là un point de cytomorphologie qui est actuellement sujet à discussion dans la mesure où la cytotaxonomie n'est pas encore universellement admise.

L'observation initiale des chromosomes sera donc longue, précise, et rigoureuse. Leur cartographie sera aussi minutieuse qu'arbitraire dans sa traduction symbolique et sa représentation chiffrée. Cette carte initiale doit être considérée comme une "épure" à partir de laquelle différentes modifications pourront être apportées. Chaque souche sera ensuite étudiée, dessinée, et rapportée au modèle initial.

Se posera alors l'éternel problème de "l'espèce" tel qu'on l'a signalé plus haut et que nous discuterons ultérieurement.

I-4- Aberrations chromosomiques

L'étude des aberrations chromosomiques est aussi intéressante qu'importante pour essayer de comprendre les mécanismes génétiques d'un pool adaptatif et par là même, les mécanismes de spéciation.

I-4-1- Rappels succints

Notre propos n'est pas de faire un cours théorique de génétique formelle mais plutôt de rappeler les principales aberrations chromosomiques et leur importance pratique, les connaître pour mieux les reconnaître.

- déficience ou délétion.

C'est le type le plus simple d'aberration chromosomique : perte d'un segment de chromosome (fig. 4a) donc perte des gènes portés dans cette partie. Une déficience intéressant une grande partie du chromosome peut être remarquée dans les conditions d'hétérozygotie (fig. 4b). Les 2 régions homologues des chromosomes s'apparient laissant la portion "non déficiente" en surnombre et cette portion forme alors une boucle ("loop").

Si des gènes étaient présents sur le segment manquant, les allèles de ces gènes sont exprimés dans des conditions d'homozygotie. En pratique cela permet d'identifier un groupe de linkage dans un chromosome connu.

- duplication.

Ajout d'un segment surnuméraire ; les gènes qu'il porte se trouvent répétés deux fois dans un lot haploïde de chromosomes.

- inversion.

A la suite d'une rotation de 180° une portion de chromosome est inversée par rapport à la séquence normale (fig. 5). Lorsqu'un individu est hétérozygoté pour un type d'inversion il y a formation d'une boucle d'inversion ("loop") caractéristique. Naturelles ou provoquées, les inversions ont une grande importance notamment dans leur rapport avec les phénomènes de crossing-over.

En fonction de la position du crossing-over il existe deux types d'inversion :

- inversion péricentrique (fig. 6) :

Tous les chromatides possèdent un centromère mais le crossing-over entraîne des distributions anormales des portions de chromosomes. Deux chromatides montreront duplication et déficience ce qui, dans la majorité des cas, donne des gamètes non viables. Un chromatide sera normal et le quatrième présentera un segment inversé.

- inversion paracentrique (fig. 7) :

A la suite d'un crossing-over dans la boucle d'inversion on obtiendra :

- deux chromatides non affectés par le crossing-over : l'un sera normal et l'autre avec un segment inversé. Ces 2 chromatides possèdent un centromère et fonctionnent pour la production des gamètes.

- deux chromatides anormaux : un dicentrique et l'autre acentrique ; aucun ne peut entreprendre une mitose normale.

En conséquence, une inversion supprime effectivement le crossing-over entre gène à l'intérieur d'une boucle.

Les généticiens ont utilisé l'impact de cette information pour planifier des expériences où l'on désire éliminer le crossing-over dans des segments inversés. Le crossing-over donne des gamètes non viables. Dans le cas de double crossing-over, la relation normale I-I centromère chromatide est restaurée et procure des gamètes viables. Cependant la fréquence de double crossing-over est faible. Ainsi, il est évident qu'une inversion n'empêche pas le crossing-over mais essentiellement rend non viable les chromatides présentant ce crossing-over.

"On peut donc considérer l'inversion comme étant le supprimeur le plus efficace du crossing-over" (CRAIG, com. pers.).

- Translocation : échange de segments entre chromosomes non homologues. Si deux chromosomes non homologues sont rompus et que ces segments vont rejoindre les "paternels non correspondants" nous nous trouvons dans une situation où tous les loci des gènes sont présents mais montrent une distribution anormale. L'appariement des chromosomes réalise alors des figures anormales :

- en croix au stade pachytène,
- en anneau à la diakinèse,
- en 8 à la métaphase.

Les translocations représentent d'admirables marqueurs génétiques lorsque la translocation hétérozygote a un effet phénotypique (CRAIG, com. pers.).

I-4-2- Matériel.

RABBIANI (com. pers.) effectue, actuellement une étude systématique et fondamentale des translocations chez Anopheles albimanus après irradiation aux rayons X. Les rayons X sont moins pénétrants que les rayons gamma. Ils produisent, à dose élevée, non seulement des mutations géniques mais provoquent aussi de nombreuses ruptures de chromosomes suivies d'aberrations chromosomiques.

Des mâles âgés d'un à quatre jours reçoivent une dose de rayons X de 4000 rads, puis ils sont croisés avec un lot de femelles âgées de un à quatre jours. Les descendants mâles et femelles de la F.1 sont ensuite croisés entre eux. De même pour les descendants de la F.2 qui sont croisés entre eux.

A la F.3 il faut :

- isoler les femelles gravides pour obtenir les pontes,
- élever séparément les larves de chaque "famille" de translocation,
- examiner les chromosomes des glandes salivaires de cinq larves de chaque "famille" de translocation.

Les détails de cette technique seront exposés par RABBIANI dans sa prochaine publication.

I-4-3 - Observations.

Par cette méthode, RABBIANI (com. pers.) a obtenu toute une série de translocations que nous avons pu observer sur ses préparations de référence.

Ces translocations ont été soigneusement notées, elles intéressent aussi bien les hétérosomes que les autosomes.

Pour notre part, grâce aux lames mises à notre disposition, nous avons pu observer les translocations suivantes :

- A 11 : T (2R-3L) zones de rupture : 10B-42A
- A 8 : T (X-2L) zones de rupture : 4C-25A
- A 9 : T (2L-3R) zones de rupture : 19A-33C
- M 7 : T (X-3R) zones de rupture : 1E-26B
- M 9 : T (2R-3R) zones de rupture : 7A-29B
- M 18 : T (Y-2R) zones de rupture : 14A
- K 18 : T (X-3R) zones de rupture : 5B-27A
- K 9 : T (X-3L) zones de rupture : 2A-44A
- K 14 : T (2R-3L) zones de rupture : 13C-40C.

Schémas et photographies de ces translocations sont inclus dans l'article de RABBIANI et KITZMILLER (sous-presse).

I-4-4- Intérêt des aberrations chromosomiques.

Les variations génotypiques dues aux aberrations chromosomiques (s.s.) portent non sur le nombre de chromosomes mais sur le nombre et l'agencement des gènes dans les chromosomes.

L'étude des aberrations chromosomiques permet l'établissement des cartes cytologiques et notamment la localisation précise des gènes.

Il est possible de positionner les gènes par un "repérage direct" en établissant une corrélation entre l'expression d'un caractère et la présence d'une anomalie chromosomique visible.

On peut aussi effectuer un repérage indirect ainsi que nous l'avons signalé dans les cas de délétions. Chez un individu hétérozygote pour une certaine déficience, les allèles des gènes manquant peuvent s'exprimer même s'ils sont normalement de type récessifs (phénomène de pseudo dominance).

L'ordre des gènes repérés sur les cartes cytologiques (et traduit par le "banding-pattern" des chromosomes polytènes) est identique à celui établi pour les cartes génétiques et basé sur les pourcentages de crossing-over.

Chaque méthode peut être employée seule mais elles sont complémentaires dans l'étude du pool génétique d'une souche d'une espèce considérée.

Les cartes cytologiques permettent d'identifier les différences de fréquence des gènes entre les différentes populations d'une même espèce, ainsi que les fluctuations géniques d'une génération à l'autre au sein d'une même population.

Elles constituent ainsi le support d'une explication génétique aux phénomènes de spéciation (phénomène de dérive génétique) ainsi qu'aux relations intra et interspécifiques (cas des espèces jumelles).

L'étude des aberrations chromosomiques est donc intéressante :

- d'un point de vue théorique par la connaissance des gènes et de leurs allèles, ce qui permet l'établissement des cartes cytologiques traduisant l'agencement des gènes dans les chromosomes,
- d'un point de vue pratique : par l'utilisation cytotaxonomique des cartes cytologiques ("ainsi, l'examen des chromosomes

permet de distinguer, en moins de deux secondes, les sous-genres Cellia, Nyssorhynchus et Anopheles "KITZMILLER, com. pers.).

- par l'utilisation des gènes sélectionnés dans le cadre d'un programme de lutte biologique (gènes marqueurs, gènes conditionnant susceptibilité à l'infection, gènes responsables de la résistance à certains insecticides, stérilité complète ou semi-stérilité...).

II - CYTOGENETIQUE ET GENETIQUE D'Aedes aegypti

Cette étude fut amenée du 10 au 22 avril 1972 dans les laboratoires du Professeur G.B. CRAIG Jr. (Department of Biology, University of Notre-Dame, Indiana, U.S.A.). Ces deux semaines de stage étaient, évidemment, trop courtes pour entreprendre un important travail personnel pratique, aussi avons nous principalement observé les activités essentielles du laboratoire et les techniques couramment utilisées.

Pendant ce séjour nous avons pu avoir des conversations très intéressantes avec le Professeur TRPIS qui étudie actuellement l'éthologie d'un moustique carnassier (Toxorhynchites brevipalpis) dans le cadre de la lutte biologique contre Aedes aegypti. Nous avons suivi une conférence faite par le Professeur RAI sur la cytogénétique d'Aedes aegypti et ses essais de lutte biologique aux Indes par lâchers de mâles semi-stériles. Nous avons assisté à quelques expériences faites par les étudiants du Professeur CRAIG, ainsi nous avons pu noter les conditions de travail et la méthodologie employée.

Tous les renseignements concernant la génétique d'Aedes aegypti sont regroupés dans le chapitre "Genetics of Aedes aegypti" de CRAIG et HICKEY (in WRIGHT et PAL, 1967). Nous nous contenterons de rapporter ici nos observations, nos informations et un résumé de nos conversations.

II-I-Cytogénétique d'Aedes aegypti

MATTINGLY (1957-1958) note l'importance des recherches génétiques pour une meilleure compréhension de la biologie, le rôle vecteur et le contrôle d'Aedes aegypti. "Cytogenetic studies would be of great benefit implementing the information being gained through other genetic procedure" MESCHER (1963).

La cytogénétique d'Aedes aegypti se heurte à un problème matériel dans la mesure où il est très difficile d'obtenir de bonnes préparations de chromosomes. Pourtant depuis SUTTON (1942) les essais furent aussi nombreux que variés mais aucun n'a permis l'observation correcte et complète des chromosomes polytènes. ALDIGHERI (1961) et MESCHER (1963) purent faire des photographies de portion de chromosomes relativement bien déroulés mais ne purent dresser les cartes complètes du banding-pattern de chaque bras.

II-I-1- Elevage des larves pour l'examen des chromosomes polytènes.

a) Méthode de MIESCHER (1963)

Pour l'étude cytomorphologique d'Aedes aegypti, MIESCHER (loc. cit.) élève ses larves dans une eau maintenue à 18°21°C. Comme nourriture ces larves reçoivent journallement un mélange de "Liver powder + RNA powdered + brewer yeast powdered". Ces bacs présentent tous une faible densité larvaire, comme pour les anophèles. (100 à 150 larves pour des bacs d'environ 1,5 litre de contenance.

b) Remarques personnelles

KITZMILLER (com. pers.) nous avait fait remarquer l'amélioration apportée aux préparations de chromosomes lorsque les larves étaient élevées en milieu légèrement salé.

Nous avons préparé cinq bacs à larves avec la "souche ROCK"

- 1 bac d'eau normale

- 4 bacs d'eau salée :

3/4 eau normale + 1/4 eau salée Cl Na 7,5 %

3/4 eau normale + 1/4 eau salée Cl Na 10 %

3/4 eau normale + 1/4 eau salée ClK 7,5 %

3/4 eau normale + 1/4 eau salée ClK 10 %

Ces bacs étaient tous maintenus à la même température et la nourriture était dispensée de la même façon.

Nous avons remarqué une modification de l'évolution larvaire en fonction du milieu

+ Cl Na 7,5 % l'évolution des larves est apparemment ralentie par rapport à la souche témoin élevée en eau normale.

+ Cl Na 10 % évolution larvaire ralentie par rapport à la souche témoin. Lorsque le lot témoin présente une nymphose complète le lot élevé dans ce milieu n'a montré aucune nymphe.

+ Cl K 7,5 % l'évolution est accélérée par rapport à la souche témoin. La nymphose est ici d'environ 90 % lorsque le lot témoin présente une nymphose de 50 % environ.

+ Cl K 10 % évolution similaire à celle observée dans le lot précédent.

II-I-2- Chromosomes polytènes

a) Dissection des larves et préparation des glandes salivaires.

Pour l'observation des chromosomes il est préférable de disséquer les glandes salivaires des larves au "milieu du 4ème stade".

La dissection (cf. fig. 8) comporte les phases suivantes :

- Prélever les larves choisies en fonction de leur taille.
- Placer la larve dans une goutte d'eau physiologique face dorsale vers le haut.
- Découper la cuticule de la région antérieure du thorax.
- Tirer délicatement la tête tout en pressant légèrement sur le thorax afin de mieux faire sortir les glandes.
- Séparer ainsi entièrement l'ensemble tête + glandes salivaires du reste du corps que l'on jette.
- Mettre l'ensemble dans une goutte d'acide à 0,15 N pendant trois minutes.
- Passer ensuite l'ensemble tête + glandes salivaires dans une goutte d'acéto-orcéine additionnée de chloroforme (orcéine à 1 % + acide acétique à 45 % + quelques gouttes de chloroforme). Cette coloration dure de 3 à 5 minutes.
- Séparer les glandes salivaires de la tête et placer les glandes dans une goutte d'acide acétique à 45 %, recouvrir d'une lamelle.

La préparation est ainsi prête pour l'observation initiale. Cette méthode a reçu diverses variantes, une autre technique fait passer les glandes successivement de l'acide au mélange acéto-orcéine chloroforme puis orcéine acétolactique.

Pour notre part nous avons utilisé la technique fixation-coloration de FRENCH et al. (1962) employée pour l'étude des chromosomes d'anophèles (cf. chapitre précédent).

Contrairement aux anophèles les glandes salivaires d'Aedes aegypti se composent :

- d'une partie distale arrondie possédant quelques 6 noyaux à chromosomes "étudiables".
- d'une partie proximale allongée, avec de nombreux noyaux dont les chromosomes ne sont pas "lisibles".

b- Résultats et observations des chromosomes polytènes.

b1 - Observations personnelles.

Ne connaissant pas précisément la durée de chaque stade larvaire et cette évolution étant apparemment accélérée lorsque les larves sont élevées dans un milieu salinifié au chlorure de potassium, nous n'avons pu observer les chromosomes des "lots ClK" ; nos dissections ont été faites trop tardivement et ces chromosomes montraient déjà des signes d'histolyse.

Par contre les observations, que nous avons pu faire sur les préparations des larves élevées en eau salée au chlorure de sodium, se sont montrées "satisfaisantes et encourageantes" RAI (com.pers.), surtout par rapport à celles faites avec le lot témoin.

Nous avons pu obtenir quelques belles portions de chromosomes bien déroulées et montrant des bandes bien colorées.

N'étant pas spécialiste en cytomorphologie d'Aedes aegypti, nous n'avons pu essayer d'établir la cartographie et l'interprétation de ces chromosomes qui, à prime abord, semblent beaucoup plus difficiles à lire que ceux des anophèles. Cependant notre "amélioration" a été estimée par le Professeur RAI qui a décidé d'approfondir et étudier systématiquement cette technique. Nos préparations ont été ramenées à Bondy et laissées à la disposition de toute personne s'intéressant aux chromosomes d'Aedes aegypti.

b2 - Travaux de MESSCHER (1963) et RAI.

Selon les observations de RAI (com.pers.) et MESSCHER (loc.cit.) de nombreux facteurs conditionnent l'obtention de bonnes préparations de chromosomes. Il y a une certaine corrélation entre le nombre de noyaux dans la portion distale des glandes et la taille des chromosomes ; plus le nombre de noyaux est faible plus les chromosomes sont grands.

Il existe aussi des variations selon les souches : les noyaux de certaines souches éclatent plus facilement que d'autres, les chromosomes de certaines souches sont plus "discrètes" que d'autres. Les souches les plus favorables ont semblé être : Miniature, New-Orléans, Texas D, Texas Y, India, Israel.

Les auteurs ont aussi remarqué une "relation évidente" entre la longueur des chromosomes polytènes et celle des chromosomes mitotiques des cerveaux de larves. De ce fait, certaines espèces ont pu être classées en fonction de la taille des chromosomes.

L'étude de l'évolution de ces chromosomes a permis de mieux saisir leur structure lors des observations cytomorphologiques.

Le développement des chromosomes polytènes chez Aedes aegypti peut être facilement suivi. D'abord filaments faiblement colorés (chez les larves du stade I) et contenant quelques granulations sombres, les chromosomes s'apparient graduellement. Les granules sont alors suffisamment larges pour apparaître sous forme de bandes.

Les synapses ne sont jamais complètes avant le 3ème stade ou le début du 4ème stade larvaire. Le degré de fusion des chromosomes homologues varie le long du chromosome et d'une préparation à l'autre.

Les "meilleurs" chromosomes sont observables au début ou au milieu du 4ème stade larvaire, lorsque les synapses sont complètes.

Chez Aedes aegypti il n'y a pas de chromocentre évident bien que les chromosomes soient généralement rattachés les uns aux autres en des endroits précis (plus ou moins précisés d'ailleurs). Ce point ne doit guère nous étonner puisque, pour d'autres espèces de culicinae aussi, l'existence d'un chromocentre n'a pas été rapportée (KITZMILLER et FRIZZI, 1954 ; KITZMILLER et KEPPLER 1961). Les chromosomes d'Aedes aegypti sont habituellement rattachés les uns aux autres par leur partie terminale et, tout au plus, peut-on distinguer deux terminaisons dans un noyau intact. En outre ces adhésions terminales demeurent présentes même après l'écrasement, phénomène déjà rencontré chez d'autres diptères (HINTON et ATWOOD, 1941). Ces adhésions constituent évidemment un problème dans la mesure où une trop forte pression effectuée en vue d'obtenir un meilleur déroulement entraîne, en fait, une rupture des chromosomes. Il est donc très difficile de suivre un chromosome unique vu les nombreuses cassures et les attachements latéraux qu'il présente. Ces attachements latéraux se font au niveau des régions hétérochromatiques, régions qui sont "dispersées" le long des chromosomes, entre les régions donnant des bandes (SUTTON, 1942). La possibilité d'obtenir de "bons chromosomes" bien lisibles et bien déroulés est, en partie, fonction de leur

longueur. De toutes les espèces culicidiennes actuellement étudiées les chromosomes d'Aedes aegypti sont parmi les plus longs. Ils contrastent fortement avec ceux des anophèles qui se déroulent beaucoup plus facilement et présentent une longueur égale au 1/3 de ceux d'Aedes aegypti.

En outre le fait que ces chromosomes présentent des inversions hétérozygotes se traduisant par des régions "twisted" ou des boucles ajoutent à la difficulté d'obtenir de bonnes préparations.

c) Discussion - Perspectives.

Les nombreuses difficultés (signalées plus haut) présentées par les chromosomes d'Aedes aegypti ont retardé l'étude cytomorphologique et aucune carte n'a pu, à ce jour, être dressée. SUTTON (loc. cit.) a remarqué que l'agencement des bandes est interrompu par des "weak spots", certaines parties sont reliées par des filaments atténués et les chromosomes cassés tendent à adhérer aux autres parties rompues. Cet auteur conclut que, bien qu'il soit possible d'établir la carte du banding-pattern de courtes régions, il est fort douteux que la séquence de tout un chromosome puisse être déterminée.

MESCHER (1963) a pu surmonter une partie de ces difficultés et obtenir des préparations avec chromosome entier et bien déroulé.

Certaines régions ont ainsi pu être reconnues d'une préparation à l'autre et les chromosomes ont alors pu être identifiés individuellement. Cependant "it seems unlikely that the polytene chromosome of Aedes aegypti will ever be as useful to cytogenetists as, for example, those of Anopheles or Drosophila" MESCHER (loc. cit.). Il faut cependant poursuivre dans cette voie car il est nécessaire d'obtenir les cartes des glandes salivaires d'Aedes aegypti.

D'ores et déjà, une grande quantité d'informations sur les linkages et les mutations ont été accumulées par de nombreux laboratoires travaillant sur cette espèce. Des progrès ultérieurs dans la compréhension des mécanismes génétiques seraient grandement facilités par des observations directes sur les chromosomes (RAI, com. pers.).

II-I-3- Chromosomes mitotiques.

L'examen des chromosomes somatiques est intéressant dans la mesure où il complète l'observation des chromosomes polytènes (KITZMILLER, com. pers.). Cet examen est essentiel pour certaines espèces, tel Aedes aegypti, dont les chromosomes polytènes n'ont pu, jusqu'à présent, être cytologiquement "utilisables". Une délétion, voire une translocation, est facilement observable sur les chromosomes somatiques.

Ici aussi nous n'avons pas la prétention de faire un résumé des principaux travaux relatifs aux chromosomes mitotiques d'Aedes aegypti. Cependant le Professeur RAI, l'auteur de la majorité des études sur les karyotypes de moustiques (RAI, 1961 ; 1963a) a bien voulu nous accorder quelques conversations et nous faire observer des préparations de tels chromosomes.

a) Principales techniques.

Les principales techniques à utiliser pour obtenir de bonnes préparations de chromosomes mitotiques sont indiquées dans le chapitre "Techniques for the study of cytogenetics and genetics of vectors" (RAI, in WRIGHT et PAL, 1967).

Le Professeur RAI nous a donné un document ronéotypé concernant la méthode qu'il emploie habituellement :

- choisir une larve du début du 4ème stade (à ce stade les trompettes respiratoires ne sont pas encore développées).

- fixer la larve pendant 2 à 5 minutes dans une solution ainsi composée :

+ Méthanol	6 parts
+ Chloroforme	3 parts
+ Acide propionique	2 parts

Cette solution agit à la fois comme fixateur et milieu de conservation, elle doit être préparée peu avant l'emploi.

Les larves plongées dans un tel milieu et placées au réfrigérateur peuvent être ainsi conservées plusieurs mois et donner ensuite de bonnes préparations. Un autre fixateur est aussi couramment employé, il s'agit du Carnoy modifié (1/3 chloroforme, 1/3 acide acétique glacial, 1/3 alcool absolu).

- ôter le cerveau de la capsule céphalique
différentes techniques sont utilisées pour "sortir" le cerveau de la tête et, comme pour toute dissection chacun adapte sa technique personnelle. L'essentiel est toujours d'ôter rapidement l'organe à étudier, en l'occurrence le cerveau, et de l'ôter sans le léser.
- colorer le cerveau pendant 10 à 15 minutes dans une solution d'orcéine acéto-lactique à 2 %.
- recouvrir d'une lamelle et presser très lentement et de façon uniforme ; contrairement aux anophèles où il faut appuyer très fortement, pour Aedes aegypti parfois le simple poids de la lamelle peut suffire à faire écarter les chromosomes.
- luter la préparation avec du vernis à ongle incolore.

Ainsi préparées les lames peuvent être conservées au réfrigérateur pendant plusieurs années. Ces préparations peuvent être montées de façon permanente, la technique est la même que pour les glandes salivaires des larves d'anophèles (cf. chapitre I-2-4, p. 14).

b). Observations.

Nous avons effectué (selon la méthode de FRENCH et al., 1962) des préparations de glandes salivaires pour essayer d'obtenir des chromosomes polytènes. Au cours de nos premières dissections nous avons prélevé d'autres tissus avec les glandes salivaires et lors de l'examen microscopique nous avons eu la chance d'observer dans ces tissus, non déterminés, de très beaux chromosomes mitotiques. Avec l'aide du Professeur RAI nous avons approfondi notre examen et aussi remarqué que le karyotype d'Aedes aegypti était représenté par trois chromosomes : 2 ayant la même longueur et un 3ème plus petit. Nous avons pu "voir" des figures intéressantes : métaphase en vue latérale, métaphase en vue polaire, télophase avec reconstitution du matériel génétique dans chaque cellule fille. Les chromosomes mitotiques étaient larges, bien colorés et le Professeur CRAIG nous a certifié (gentillesse de sa part ?) que c'était la première fois qu'il voyait de tels chromosomes. Montée de façon temporaire cette lame n'a pu, malheureusement, être conservée, elle nous a cependant donné la possibilité d'avoir une première entrevue avec le Pr. RAI. Entrevue qui fut suivie de quelques entretiens au cours desquels le Pr RAI nous a expliqué ses travaux.

Etudiant les chromosomes des glandes salivaires et améliorant la technique, d'écrasement, SUTTON (1942) indique que le nombre de chromosomes somatiques est de $2n = 6$.

RAI et CRAIG (1961) et BRELAND (1961), pratiquement en même temps, confirment que le nombre diploïde de chromosome dans les cellules cervicales d'Aedes aegypti est de 6. Si ce nombre de $2n = 6$ est bien fixé par contre de nombreuses controverses se sont élevées quant au détail de ce karyotype (RAI, com. pers.). Il est cependant admis que deux paires de chromosomes sont relativement grandes tandis que la 3ème est plus petite.

Selon RAI (1963a) une des paires de grande taille est légèrement submétacentrique tandis que les deux autres sont métacentriques. En se basant sur la taille et la position du centromère les chromosomes peuvent donc être individuellement reconnus, ils ont reçu la désignation I, II, III.

Dans les tissus du cerveau ces chromosomes mesurent approximativement 5, 4 ; 6, 9 et 7, 6 microns respectivement à la métaphase.

AKSTEIN (1962) a trouvé un autre "marqueur" en montrant qu'il existait une constriction secondaire sur un des grands chromosomes.

La possibilité de distinguer les 3 paires de chromosomes se montre particulièrement utile dans les études ayant pour but la corrélation entre les groupes de linkages et les chromosomes visibles (RAI, com. pers.).

II-2- Génétique d'Aedes aegypti.

Nous n'allons pas reprendre ici l'article de CRAIG et HICKEY (in WRIGHT et PAL, 1967) sur ce sujet mais signaler nos observations et faire un résumé de nos conversations centrées sur cet important chapitre.

Si la morphologie, la biologie, la physiologie d'Aedes aegypti (LINNÉE, 1762) ont été bien étudiées (CHRISTOPHERS, 1960 ; CLEMENTS, 1963) par contre la génétique de cette espèce n'était, jusqu'à un passé très récent, que fort peu connue "No mutant forms appear to have been described in Aedes aegypti" (CHRISTOPHERS, loc. cit.).

Le développement des phénomènes de résistance, l'importance économique et médicale et l'élevage facile de cette espèce ont stimulé les travaux consacrés à la génétique d'Aedes aegypti (MATTINGLY, 1957, 1958 ; ROZEBOOM et KITZMILLER, 1958 ; MAC CLELLAND, 1962a, b, c, d ; DAVIDSON et WASON, 1963 ; CRAIG et HICKEY, 1961, 1967 ; BHALLA et CRAIG, 1970).

La majorité de ces recherches fut consacrée à l'isolement et la caractérisation des mutants et mutations. Quelques 82 mutations ont ainsi pu être étudiées, principalement par le Pr. CRAIG et son équipe qui reconstituent un "puzzle" (CRAIG, com. pers.).

En janvier 1972 quelques 163 souches de 26 espèces de moustiques étaient disponibles, pour toutes sortes d'études, au "WHO International Reference Center of Aedes", NOTRE-DAME, INDIANA.

II-2-1- Elevage des mutants et maintien des souches

a) Souches et observations personnelles.

al- Matériel.

Afin d'expérimenter par nous-même les techniques d'élevage des mutants (CRAIG et VANDEHEY, 1962) puis d'observer certains phénotypes mutants le Pr. CRAIG a mis à notre disposition 9 souches d'Aedes aegypti.

- + souche ROCK forme type = Aedes aegyrti aegypti
- + souche DHOW forme pâle = Aedes aegypti var queenslandensis
- + souche BWAMBA forme sauvage, primitivement : Aedes aegypti
formosus provenance : Ouganda
- + souche BZ-WH bronze - white eye
- + souche RE-RU-SMA red-eye, rust eye, small antenna
- + souche DSA-WART dark scutum
spot abdomen
wart palp
yellow larva
- + souche SASI sable-sooty (abdomen noir d'encre)
silver mesonotum
- + IXSBPD black pedicel
spot abdomen
intersex

+ souche MIN-BLT miniature
black tarsus.

a2) Remarques :

Toutes les explications sur ces mutations, et leur groupe de linkage, sont décrites dans le chapitre de CRAIG et HICKEY (1967). Cependant le fait d'avoir ces souches d'une part, les conseils du Pr. CRAIG, d'autre part, nous a permis de faire quelques observations sur ces mutants.

- Bronze : larves, nymphes et adultes sont affectés par cette mutation. L'allèle bronze est de type récessif. Pour maintenir la souche il faut effectuer le croisement mâle bronze par femelle hétérozygote pour ce caractère. Les femelles homozygotes bronze sont stériles, elles pondent mais les embryons meurent dans les 12 heures qui suivent l'oviposition. Les mâles homozygotes bronze sont entièrement fertiles. Nous avons croisé les mâles bronze avec les femelles hétérozygotes et obtenu une série de pontes ramenée aux laboratoires de Bondy.
- White eye : Caractère très intéressant car les larves sont aussi affectées. Il a été obtenu toute une gradation dans l'intensité de la coloration des yeux des imagos : du blanc au rouge pourpre.
- Red-eye : Cette mutation présente une pénétrance complète mais une expression variable. Ce caractère explique les variations de couleur citées précédemment et obtenues en fonction des gènes associés.
- Rust-eye : Le degré de coloration des yeux des individus affectés par cette mutation, est, ici aussi, variable. En associant les deux caractères red-eye et rust-eye (souches que nous avons) les imagos obtenus présentent des yeux roses ("pink-eye) qui, avouons-le, paraissent assez étonnants.
- Small antenna : Ce caractère est visible dans les deux sexes ; les antennes sont vraiment réduites et leur taille est approximativement le 1/3 de celle des antennes de type sauvage.

- Dark-scrutum : Il y a toute une série de facteurs affectant les "cordes de la lyre" (CRAIG et HICKEY, loc. cit.). Pour notre part nous avons la mutation "dsi" qui, sur un thorax au fond noir, ne laisse apparaître que les bandes antérolatérales en forme de croissant. Les bandes médianes et postérolatérales sont absentes.
- Spot abdomen : Ce caractère est très variable (MAC-CLELLAND, 1962). Notre souche présentait des taches latérales très petites, quasiment absentes.
- Wart palp : Ce caractère nous a semblé bien visible chez les femelles qui montraient des écailles blanches à l'extrémité des palpes. Palpes d'ailleurs affectés dans leur forme puisque conique ou en forme de "club" à leur partie distale. Les palpes des mâles montrent une zone élargie entre les segments 2 et 3.
- Y = yellow larva : Caractère éminemment intéressant et de très grand intérêt pratique. Ces larves jaunâtres ou pâles sont immédiatement séparables des larves de type sauvage. Cet allèle peut donc être considéré comme un très bon marqueur.
- Sable-sooty : Les adultes affectés par cette mutation présentent un abdomen absolument noir, d'un "noir d'encre" ou "noir de fumée" (CRAIG, com. pers.).
- Silver : Toutes les caractéristiques de cet important, et pratique facteur sont indiqués par CRAIG et HICKEY (1967). La souche que nous avons élevée présentait un mesonotum entièrement argenté.
- Black pedicel : Le torus, à la base de l'antenne, est entièrement noir, ne présentant aucune écaille argentée.
- Intersex : Gène très intéressant à étudier et dont l'effet est fonction des conditions d'élevage larvaire :
+ température de l'eau de bac : 27°C : mâles et femelles normaux et fertiles.
+ température de l'eau 35°C pendant tout le développement larvaire : les mâles sont féminisés

ces individus génotypiquement mâles et phénotypiquement femelles se comportent comme des femelles notamment quant à l'alimentation sanguine.

+ température du bac élevée pendant les deux premiers stades larvaires puis les larves sont replacées dans les conditions normales. Les mâles apparaissent alors avec une seconde série d'appendices génitaux situés sur le 8ème segment abdominal. Ces mâles sont fertiles. Nous avons rapporté cette souche à Bondy où de telles conditions d'élevage peuvent être reprises et les résultats observables par toute personne intéressée.

- Miniature Mutation très importante et de grand intérêt pratique, dans la mesure où ces mutants peuvent servir de matériel d'étude parfait sans qu'il y ait aucun risque de contamination à l'extérieur du laboratoire. En cas d'évasion accidentelle de quelques spécimens ceux-ci ne peuvent survivre dans les conditions naturelles. Tout le corps de l'adulte ainsi que de la nymphe est affecté par cette mutation.

- Black tarsus Les tarses, surtout de la 3ème paire de patte, sont entièrement noirs, les bandes blanches étant quasiment absentes.

Ainsi que nous l'avons signalé à plusieurs reprises toutes ces souches, que nous avons élevées et observées à NOTRE-DAME, ont été ramenées en France où de telles expériences peuvent être reprises.

b) Elevage de routine des mutants

Les 110 souches d'Aedes aegypti ne sont pas élevées en permanence : les locaux et le personnel du laboratoire n'y pourraient suffire. Aussi les souches sont conservées (cf. chapitre suivant) et tous les six mois environ elles sont "relancées". Sont aussi élevées les souches faisant l'objet de travaux fondamentaux de la part des étudiants du Professeur CRAIG (cf. plus loin).

En élevage de routine, les oeufs sont conservés 48 heures à sec puis placés dans un bac contenant de l'eau déoxygénée ou bouillie. Ce manque d'oxygène accélère l'éclosion qui peut être complète en une dizaine de minutes. L'éclosion est hâtée et uniforme si l'on fait passer un faible courant d'ozone au-dessus de la coupelle contenant tous les oeufs d'une ponte (TRPIS, com. pers.). On peut soit placer les oeufs dans le bac et ajouter de l'eau, soit mettre l'eau en premier et les oeufs ensuite. Autre méthode, mettre un peu d'eau dans le bac, placer les oeufs et, après l'éclosion rajouter de l'eau. Le nombre d'oeufs par bac (33 cm de \emptyset , 8 cm de profondeur, environ 1,5 litre d'eau) doit être inférieur à 500 pour avoir des conditions d'élevage favorables.

Dès le premier jour les larves sont nourries avec du "Liver powder" (foie en poudre mélangé à de l'eau en plus ou moins grande quantité selon que l'on désire une nourriture riche ou pas). Ce "Liver powder" entraîne un développement des microbes qui utilisent l'oxygène de l'eau ce qui accélère encore l'éclosion larvaire. Le pourcentage d'éclosion larvaire varie entre 80 et 90 % selon les souches. La durée de vie larvaire est de 5 à 6 jours, et le pourcentage de nymphose est de 100 %.

Les nymphes sont triées, mâles (les plus petits) d'un côté, femelles de l'autre. Les nymphes sont ensuite placées dans un gobelet de carton dont la moitié inférieure est remplie de coton humide surmonté d'un papier filtre. Sur ce gobelet s'adapte une petite cage, aussi en carton, qui sert à recueillir les imagos néonates. Environ 48 heures après l'isolement des nymphes, toutes les éclosions imaginaires ont eu lieu et les adultes sont alors placés dans des cages d'élevage, en fonction de l'expérimentation voulue. Ces cages sont représentées par des cylindres en carton, contenance 1 gallon, la face supérieure est constituée de tulle moustiquaire, un trou prolongé par un manchon est pratiqué le long de ce cylindre et permet la manipulation des moustiques.

Il est recommandé de ne placer qu'environ 200 adultes par cage. La cage contient un petit récipient servant de pondoir. L'alimentation glucosée est obtenue à partir d'un cube de sucre ou d'une tranche de pomme bouillie déposée sur la paroi supérieure de la cage.

L'alimentation sanguine est obtenue à partir d'une souris anesthésiée placée sur la cage. Le rythme des repas de sang est variable selon l'élevage que l'on désire : élevage de routine ou intensif. Normalement les femelles d'Aedes aegypti sont nourries tous les 4 à 5 jours. Les oeufs doivent être ramassés tous les deux jours, quatre jours après le repas de sang représentant le délai maximum. Il faut bien veiller à ce qu'aucune éclosion larvaire n'ait lieu dans la cage d'élevage des adultes.

Les pontes, nous l'avons signalé plus haut, sont conservées 2 jours "à sec" afin que toutes les éclosions soient simultanées. Cet élevage est pratiqué dans un insectarium maintenu à 28° C et 80 % d'humidité relative.

c) Conservation des souches.

Les souches des "mutants" sont conservées dans une "banque" représentée par une série de grandes étuves maintenues à 80 % d'H.R. et 16°C. Les oeufs sont placés sur un papier filtre introduit dans de petits gobelets en carton. Il faut remarquer que le pourcentage d'éclosion est fonction du temps de conservation. Après six mois il n'y a plus qu'environ 50 % d'éclosion, pourcentage qui devient très faible après un an. Le maintien des souches nécessite donc de les "relancer" tous les six mois comme nous l'a bien recommandé le Pr. CRAIG.

II-2-2- Cartes géniques.

L'établissement des cartes géniques ("chromosome mapping") est de première importance en génétique formelle mais aussi dans le cadre des programmes de contrôle des vecteurs.

L'étude cytomorphologique ne permettant pas la localisation des gènes, celle-ci est établie, génétiquement, par l'étude de la descendance de certains croisements.

La transmission des caractères peut être de deux types :

- liée au sexe
- autosomale.

Des 82 mutations jusqu'à présent signalées, 28 loci ont ainsi pu être déterminés (fig.9). 10 gènes se sont montrés être de type "lié

au sexe" et, de ce fait, considéré être du groupe de linkage I tandis que les 18 autres sont de type autosomal et furent placés dans les groupes II et III. Ces trois groupes de linkage correspondent aux trois paires de chromosomes mis en évidence et étudiés par BRELAND (1961) ; AKSTEIN (1962) et RAI (1963a).

Nous avons demandé au Pr. CRAIG quelle était la méthodologie pour déterminer le groupe de linkage et la position d'un gène. Le Pr. CRAIG nous alors confié "aux bons soins" d'un de ses étudiants, PETERSEN, qui étudie actuellement la position du gène "palpantennate". L'adulte affecté par une telle mutation est un "mutant homéiotique" dont les palpes présentent les caractéristiques morphologiques des antennes : segmentation, ornementation... Cependant, avant de relater le travail de notre camarade PETERSEN, nous pensons qu'un rappel succinct des phénomènes génétiques et leur utilisation en "chromosome mapping" n'est pas inutile.

a) Rappels succincts

al) Phénomène de linkage.

Les gènes montrant une ségrégation non due au hasard sont localisés dans un unique chromosome ; ils tendent à rester ensemble dans la descendance (linkage) et sont agencés selon une série linéaire. Deux gènes proches dans cette série linéaire montrent une association plus étroite que deux gènes éloignés l'un de l'autre (MORGAN, 1911). Nul mieux que cet auteur ne peut, évidemment, décrire et expliquer ces phénomènes de linkage aussi nous citerons, in extenso, un extrait de sa publication originale que nous avons pu lire à NOTRE-DAME. "We find coupling in certain character and little or no evidence at all of coupling in other characters, the difference depending on the linear distance apart of the chromosomal materials that represent the factors. Such an explanation will account for all of the many phenomena that I have observed and will explain equally, I think, the other cases so far described. The results are a simple mechanical result of the location of the materials in the chromosomes and of the method of union of homologous chromosomes, and the proportions that result are not so much the expression of a numerical system as the relative location of the factors in the chromosome. Instead of random segregation in Mendel's sense we find asso-

ciation of factors that are located near together in the chromosome" (MORGAN, loc. cit.). Cette dernière phrase est d'un intérêt capital pour l'établissement des cartes chromosomiques.

a2) Caractères liés au sexe.

Dans la majorité des espèces à reproduction sexuée, une association complète (linkage) entre les gènes d'un même chromosome est rare ; quand elle est présente elle n'apparaît que dans le sexe hétérogamétique (BAKER et RABBANI, 1970).

Chez les Culicinae la détermination du sexe est le fait d'une paire unique d'allèles ou d'une portion de chromosome pour laquelle le mâle est hétérozygote M-m et la femelle homozygote m-m. Il en est ainsi pour les représentants du complexe Culex pipiens (LAVEN, 1957 ; WILD, 1963 ; VAN DE HEY, 1967) et pour Aedes aegypti (MAC CLELLAND, 1962, 1966 ; BHALLA et CRAIG, 1967 ; BHALLA, 1968). Contrairement aux Anophelini, qui présentent un chromosome I hétéromorphe, les Culicinae n'ont pas de chromosome sexuel sensu stricto ; chez Aedes aegypti le sexe est déterminé par une paire d'allèles portée par une portion du chromosome I, le mâle est hétérogamétique et la femelle homogamétique. De ce fait le locus sexuel est utilisé comme marqueur génétique pour les études de linkage des caractères portés par le chromosome I (groupe de linkage I).

Les gènes de ce groupe présentent un mode de transmission particulier : de type "lié au sexe ou "sex-linked inheritance". Le chromosome Y, composé essentiellement d'hétérochromatine ne recèle ni les mutants récessifs ni les allèles dominants d'aucun des gènes. De ce fait, les mâles XY présentent un phénotype déterminé par les gènes du chromosome X, constitué principalement d'euchromatine. Les gènes, de caractère récessif, liés au sexe sont donc régulièrement transmis, à la F1 de la mère à l'enfant de sexe mâle et jamais du père à l'enfant ; ces gènes ainsi transmis s'expriment dans les conditions d'hémizygotie (cf. diagramme des croisements, planches 10a, b et c). Les femelles issues de tels croisements peuvent être homozygotes ou hétérozygotes pour n'importe quel gène lié au sexe tandis que le mâle n'ayant qu'un représentant du gène "sex-linked" est dit "hémizygoté".

a3) Phénomène de Crossing-over

Le crossing-over, ou enjambement, est un phénomène qui se produit à la méiose et qui consiste en un échange de segments entre chromosomes homologues (fig. 11). Cet échange de segments entraîne un réarrangement de l'agencement des gènes dans chaque chromosome concerné (fig. 6 et 7).

S'il n'y a pas de crossing-over deux gènes d'un même chromosome demeurent indéfiniment associés. Ce phénomène de crossing-over est donc très important dans l'histoire de l'évolution des espèces. Il permet à chaque gène d'un chromosome de participer à la reconstitution d'un pool génique de la même façon que les gènes portés par des chromosomes différents, étendant ainsi le bénéfice évolutionnaire de la reproduction sexuée aux gènes d'un même chromosome.

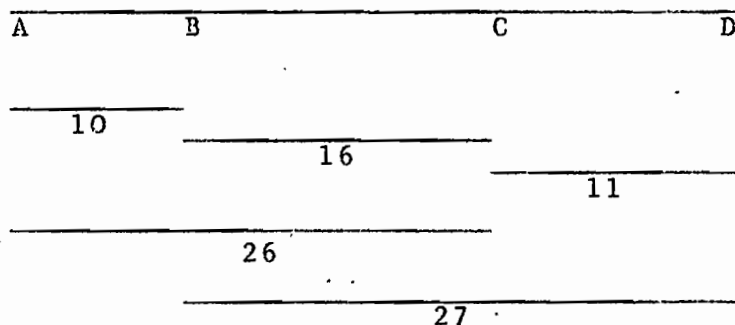
Si un crossing-over se produit en un point quelconque le long d'un chromosome, deux gènes peuvent être séparés, très rarement s'ils sont proches mais plus fréquemment s'ils sont éloignés.

En observant la fréquence de recombinaison de plusieurs gènes il est possible d'établir une carte de l'agencement des gènes ("linkage map") et de préciser la position (location) de ces gènes dans un groupe de linkage. Si un crossing-over entre les gènes a et b est deux fois plus fréquent qu'un crossing-over entre les gènes c et d, on peut raisonnablement en déduire que a et b sont deux fois plus éloignés dans le chromosome que ne le sont c et d (CRAIG, com. pers.). Ainsi il est possible de "situer" la position respective des gènes selon leurs "distances" exprimées en "unités de crossing-over".

Etudions, par exemple, la location respective des 4 gènes A, B, C, et D, présentant les pourcentages de recombinaison suivants :

- entre A et B : 10 %
- entre B et C : 16 %
- entre A et C : 26 %
- entre C et D : 11 %
- entre B et D : 27 %.

On peut alors établir la carte montrant la position respective de ces gènes, traduite linéairement :



Il faut bien noter que les "distances" de cette carte sont exprimées en "unités ou pourcentage de crossing-over".

Ainsi une carte montrant deux gènes éloignés l'un de l'autre de 15 unités signifie qu'il y a 15 % de combinaison entre les deux gènes. Les distances représentées sur une carte chromosomique sont proportionnelles aux distances réelles des loci seulement si les crossing-over ont lieu avec une fréquence égale sur toutes les régions du chromosome ce qui, en fait, n'est pas le cas. Cependant l'ordre des gènes est correct et les "distances" approximativement valables. Cette idée que les gènes sont agencés linéairement le long du chromosome et que la distance qui les sépare peut être mesurée en terme de valeur du c crossing-over a été développée par MORGAN et son école entre 1910 et 1916. Avant de passer à l'interprétation pratique de ce phénomène il faut remarquer deux faits :

- si on fait un test de crossing-over pour deux gènes très éloignés dans le chromosome, un ou plusieurs double crossing-over peuvent ne point être détectés. De ce fait, le pourcentage de recombinaison entre 2 gènes distants peut être sous-estimé sur la carte.

- deux gènes éloignés dans le chromosome de telle sorte qu'ils semblent indépendants l'un de l'autre ont 1 valeur de recombinaison de 50 %.

b) Location d'un gène.

Actuellement une étude est en cours pour situer le gène palpan-tenate (groupe de linkage I) affectant la morphologie des palpes des adultes.

PETERSEN, responsable de ce travail nous a expliqué la chronologie des expériences à faire pour déterminer la position relative d'un gène. Nous ne pouvons citer ces résultats puisque ceux-ci doivent faire l'objet d'une prochaine publication. Retenons cependant la méthodologie à suivre.

b1) Croisements.

Pour déterminer la position relative du gène considéré on utilise 2 autres gènes marqueurs (sexe et white-eye) dont on connaît la position dans le groupe de linkage I.

Le 1er croisement intéresse des parents homozygotes pour les gènes considérés (de caractère récessif).

Pour être sûr d'avoir des parents homozygotes il faut les prélever d'une lignée pure ou inbred lines ou lignées d'inbreeding.

Nous rappelons brièvement qu'une inbred line est obtenue après:

- 1 croisement unique
- croisement entre 1 frère et sa soeur de cette descendance
- attendre au moins dix générations en effectuant toujours le croisement entre un frère et sa soeur (fig. 12).

Il est capital d'avoir un mâle d'une telle lignée car un "mâle de type sauvage +++" pourrait en réalité être un hétérozygote possédant des gènes récessifs masqués par l'allèle sauvage dominant. Ces gènes récessifs pourraient s'exprimer (après crossing-over) et perturber la descendance rendant impossible toute interprétation correcte des résultats.

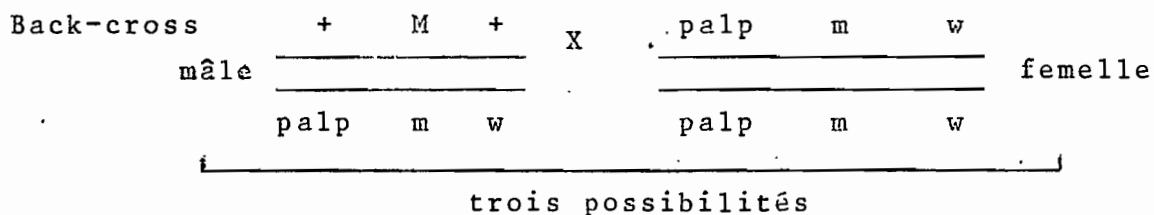
Le croisement de base est effectué entre individus homozygotes

	femelle	mâle																		
Parents :	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">palp</td> <td style="text-align: center;">m</td> <td style="text-align: center;">w</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="border-top: 1px solid black;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">palp</td> <td style="text-align: center;">m</td> <td style="text-align: center;">w</td> </tr> </table>	palp	m	w				palp	m	w	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">M</td> <td style="text-align: center;">+</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="border-top: 1px solid black;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">M</td> <td style="text-align: center;">+</td> </tr> </table>	+	M	+				+	M	+
palp	m	w																		
palp	m	w																		
+	M	+																		
+	M	+																		
	X																			
F.1	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">M</td> <td style="text-align: center;">+</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="border-top: 1px solid black;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">palp</td> <td style="text-align: center;">m</td> <td style="text-align: center;">w</td> </tr> </table>	+	M	+				palp	m	w	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">M</td> <td style="text-align: center;">+</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="border-top: 1px solid black;"></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">palp</td> <td style="text-align: center;">m</td> <td style="text-align: center;">w</td> </tr> </table>	+	M	+				palp	m	w
+	M	+																		
palp	m	w																		
+	M	+																		
palp	m	w																		

Ces gènes mutants (palpentennate et white-eye) étant de caractère récessif ils n'apparaissent pas à la première génération et ces hybrides sont tous phénotypiquement, de type sauvage.

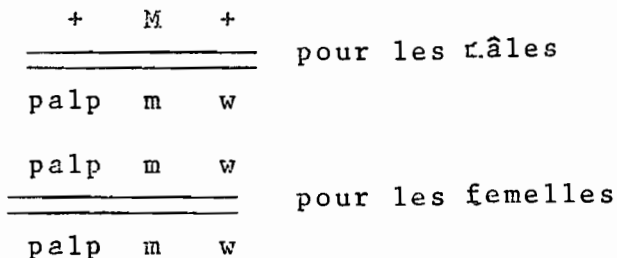
Pour faciliter l'interprétation des résultats ultérieurs il est préférable d'effectuer alors un croisement en retour ("back-cross") plutôt que des croisements entre individus de la F1 et suivre leur descendance (CRAIG, com. pers.).

Ce croisement de retour intéresse les mâles hétérozygotes de la F1 avec la mère homozygote récessive.



1- pas de crossing-over :

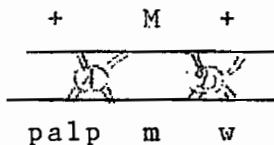
à la méiose il y aura réappariement normal des chromosomes homologues et la descendance sera génotypiquement des deux types parentaux :



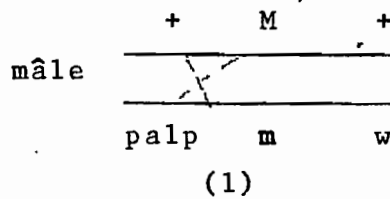
2- Un crossing-over simple :

Deux zones de rupture peuvent être intéressées par ce crossing-over :

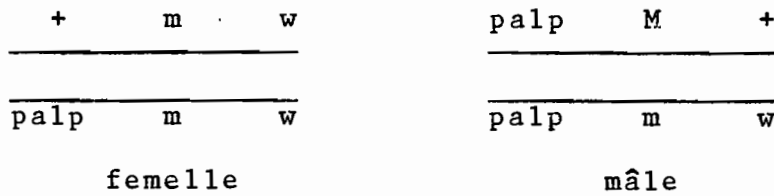
- soit entre les gènes palpentennate-caractère sexuel:1
- soit entre les gènes oeil blanc-caractère sexuel : 2



a) le crossing-over intervient en position 1



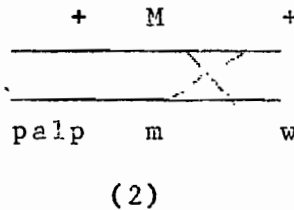
la descendance sera représentée par 2 génotypes :



les mâles obtenus présentent :

- des palpes modifiés
- des yeux de type sauvage

b) le crossing-over intervient en position 2



la descendance sera composée de 2 génotypes

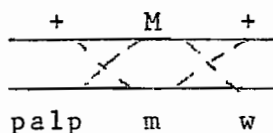


les mâles obtenus présentent :

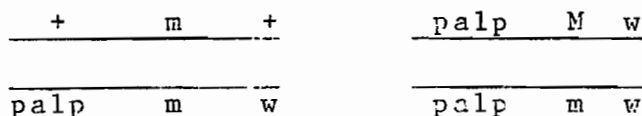
- des palpes de type sauvage
- des yeux blancs traduisant la mutation.

A l'issue d'un crossing-over affectant le père, hétérozygote pour les caractères étudiés, quatre génotypes possibles peuvent apparaître dans la descendance du croisement effectué entre ce mâle hétérozygote et une femelle homozygote pour les dits caractères.

3 - Un double crossing-over



Un tel double crossing-over entraîne la production des deux génotypes.



Les mâles obtenus présentent :

- des palpes modifiés
- des yeux blancs

A l'issue du croisement en retour : mâle hybride de la FI par femelle parentale homozygote on peut donc obtenir :

- des mâles de type parental, phénotypiquement de type sauvage
- des mâles avec palpes modifiés et yeux de type sauvage
- des mâles avec palpes modifiés et yeux blancs.
- des mâles avec des palpes de type sauvage et yeux blancs.

Le point intéressant est que ces quatre génotypes, obtenu en fonction de la nature et la position du crossing-over, ont une traduction phénotypique permettant la séparation de ces quatre classes.

b) Interprétation des résultats.

Les résultats de ces croisements peuvent différer de ceux attendus et un phénotype peut ne pas être quantitativement représenté selon les lois de la génétique.

Ceci peut être dû à un effet lethal du gène et il faut alors déterminer à quel moment cette action se manifeste donc observer tous les stades de la descendance : éclosion larvaire, développement larvaire, éclosion imaginale (BHALLA et CRAIG, 1967). On pourra ainsi compter très exactement les représentants de la classe possédant le gène considéré. Les résultats du croisement pourront être alors analysés correctement et le rôle et la position du dit gène pourront être déterminés. Le nombre de représentants de chaque phénotype est fonction de la fréquence du crossing-over donc de la position relative

de chaque gène. Cette "distance" entre les gènes est établie en "unité de crossing-over". Nous ne pouvons citer ici les résultats déjà obtenus par PETERSEN quant au positionnement du gène palpantennate puisque les travaux sont toujours en cours et doivent être prochainement publiés par leur auteur. De toutes façons l'analyse des résultats entraînent dans le cadre d'une étude théorique et les modalités d'analyse se retrouvent dans tout livre de génétique fondamentale.

Pour mémoire nous citerons les méthodes couramment utilisées : celle de IMMER (1930) ou "PRODUCT METHOD" basée sur l'étude des résultats à la F2 et celle de BHALLA et CRAIG (loc. cit.) basée sur l'étude des croisements de retour.

Cette dernière méthode est couramment pratiquée par l'équipe du Professeur CRAIG pour déterminer la position des gènes dans les chromosomes d'Aedes aegypti (BHALLA et CRAIG, 1970).

II-2-3- Cartes de linkage et génétique formelle d'Aedes aegypti.

Le Professeur CRAIG nous a mené devant une grande carte résumant les connaissances acquises "up to date" sur les "linkage-map" des trois "groupes", c'est-à-dire la position respective des gènes, connus, de chaque chromosome d'Aedes aegypti. Cette carte reproduite dans l'article de CRAIG et HICKEY (in WRIGHT et PAL, 1967) mais depuis cet article les travaux se sont poursuivis pour Aedes aegypti (BHALLA et CRAIG, loc. cit.) mais aussi pour d'autres espèces tel Aedes albopictus (QUINN et CRAIG, 1971). Le Professeur CRAIG nous a précisé que cette carte devait être considérée non comme une structure définitivement établie mais plutôt comme un modèle pouvant servir de base et d'aide aux autres chercheurs.

Cette carte d'ailleurs est sujette à quelques réarrangements car il faut souligner la grande variabilité des résultats des croisements et, par la même, l'interprétation quant aux distances relatives de chaque gène (BHALLA et CRAIG, loc. cit.).

Le Professeur CRAIG nous a montré un tel exemple de différence de résultats (tableau III, page 97 et 98 du chapitre 3 "Genetics of

Aedes aegypti" in WRIGHT et PAL, 1967). Ces différences seraient dues à des problèmes d'inversions (MAC DONALD et SHEPPARD, 1965).

Sur cette carte on peut remarquer que le chromosome I porte, outre la portion déterminant le sexe et le gène "Distorter" utilisé en lutte génétique, les trois gènes affectant la couleur de l'oeil (voir plus haut) et les deux gènes qui affectent la couleur du corps.

Les gènes affectant la couleur du thorax et surtout ceux conditionnant la résistance aux insecticides (D.D.T., Dieldrine) sont portés par le chromosome II.

Le chromosome III présente essentiellement les gènes responsables des mutations des appendices.

Actuellement la distance totale de la carte ("total map distance") est estimée être de 110 unités (43 + 37 + 30 respectivement). CRAIG et HICKEY, 1967).

La connaissance de cette répartition des gènes pour chaque groupe de linkage est évidemment d'un intérêt capital aussi bien pour les études théoriques futures (positionnement d'autres gènes) que pour l'utilisation pratique qui peut en être faite (sélection de gènes marqueurs, obtention de lignées composées pratiquement que de mâles...).

"Cytogenetic studies of mosquitoes and other vectors provide important and basic information. Any genetic manipulation of field population must be based on such information" (RAI, 1968). La facilité d'élevage, toutes les possibilités de recombinaison des caractères génétiques mais aussi l'importance médicale et économique de cette espèce font d'Aedes argypti "le véritable rat blanc" des laboratoires de génétique formelle et appliquée (CRAIG, com. pers.).

II-3- Intérêts pratiques de ces études

II-3-1- Lutte biologique.

Le contrôle génétique des populations a été défini comme "the use of any condition of treatment that can reduce the productive potential by altering or replacing the hereditary material". WHO Scientific group (1964). Le planning familial des moustiques (CRAIG, 1968) a fait l'objet de moults travaux que nous n'aurons point la prétention de résumer ici. Cependant nous avons assisté, le 4 avril 1972, à une

conférence donnée à l'Université de NOTRE-DAME, par le Professeur RAI et consacrée :

- aux principes
 - différentes techniques
 - premiers résultats
- et perspectives d'avenir du contrôle biologique des populations.

Nous rapporterons ici les propos du Pr. RAI ainsi qu'un résumé des conversations que nous avons pu avoir sur ce sujet avec cet auteur et le Professeur CRAIG.

a) Principes du contrôle génétique.

Ces principes ont été résumés par KNIPPLING (1967).

Le principe de base est d'utiliser des "facteurs" qui mènent à une disparition du pouvoir reproductif d'une population naturelle.

Le contrôle génétique doit être considéré comme un complément indispensable du traitement insecticide classique. Utilisées isolément ces deux méthodes ne peuvent suffire à "éradiquer" une population d'insectes mais employées judicieusement elles peuvent fournir une arme efficace dans la lutte contre les grandes endémies.

Dans un premier temps les populations considérées doivent être réduites et ceci par un traitement chimique. Il faut noter que le traitement insecticide est plus efficace lorsque la population est importante tandis que c'est l'inverse pour le contrôle génétique. Ce dernier mode de contrôle doit être considéré comme "a final weapon in eradication campaign where the target is the last residium of a population" CRAIG (1968).

Avant d'attaquer son ennemi avec quelques chances de succès il faut avoir des munitions et être sûr d'en disposer constamment (CRAIG, com. pers.). Aussi il faut que l'espèce étudiée présente un pouvoir reproductif important et utilisable en laboratoire, il faut pouvoir produire "massivement" les insectes qui vont servir à contrôler la population naturelle.

Ces insectes, que l'on va lâcher dans la nature, doivent être compétitifs pour que leur action soit effective. Ni leur longévité, ni leur fécondité ne doivent être altérés par le traitement qu'ils auront subi. C'est là un des points essentiel et qui fut la cause de certains échecs.

Quatrième point, qui présente lui aussi une grande importance : il faut bien connaître tous les aspects de la biologie du vecteur en cause notamment la dynamique des populations (cf. point I) et son comportement sexuel. Cette partie du programme nécessite des études complètes aussi bien sur le terrain qu'en laboratoire.

Le contrôle génétique des populations doit donc être considéré comme une petite guerre où la stratégie joue un rôle primordial.

Bien connaître les forces de son ennemi, lui porter massivement de rudes coups, puis lorsque son potentiel est nettement affaibli, tenter de l'exterminer en empêchant qu'il ne renouvelle sa population et pour cela de nombreux moyens sont bons notamment envoyer des émissaires "qui vont "désagréger" son pouvoir reproductif.

C) Techniques.

A) Stérilisation des insectes

A1) Chimio-stérilisation.

Dans un premier temps la lutte biologique était centrée sur des lâchers de mâles stériles, il était donc important de tester différentes techniques pour obtenir de tels individus. L'une d'elle faisait appel aux chimio-stérilisants (thiotépa, apholate..) leur résultat ne s'étant pas avéré satisfaisant dans le cadre de la lutte génétique une étude importante a été entreprise pour comprendre leur action notamment au niveau des chromosomes.

Les femelles d'Aedes aegypti sont monogames (CRAIG, 1967 ; SPIELMAN et al., 1967). Après une copulation "positive" d'où il en est résulté une insémination effective, la femelle est réfractaire à toute autre insémination pour le reste de sa vie. C'est une hormone, nommée "matrone" (FUCHS et al., 1968), qui, produite par les glandes accessoires du mâle, est transférée à la femelle par le liquide séminal et empêche toute autre insémination (GWADZ et al., 1971)

Les larves d'Aedes aegypti élevées dans un milieu contenant de l'apholate, donnent naissance à des mâles stériles. Mais ces mâles stériles présentent des glandes accessoires inibées, de ce fait, l'accouplement de ces mâles traités avec des femelles normales ne sera pas unique. La femelle pourra de nouveau s'accoupler et être fécondée par un mâle normal.

RAI (1964a et b) a montré que l'apholate modifie la physiologie des chromosomes et provoque certaines ruptures des chromosomes somatiques. Ruptures qui paraissent être plus fréquentes dans la région de la constriction secondaire d'un des grands chromosomes.

Les chimiostérilisants peuvent inhiber et voire empêcher complètement la production des gamètes chez les insectes ("infecundity"). La stérilité sexuelle obtenue après un traitement chimique résulte probablement de l'induction d'importantes aberrations chromosomiques dans le sperme et les ovaires (RAI (1965). Les différentes techniques utilisées pour l'étude cytologique et cytogénétique de l'action des produits chimiques sur Aedes aegypti sont réunies dans l'article de RAI (1967).

A2- Irradiation des chromosomes.

Aedes aegypti a fait l'objet de plus de travaux concernant les problèmes d'irradiation que toutes les autres espèces culicidiennes (RAI, 1963b, 1967).

Pour étudier les effets des radiations sur l'activité mitotique RAI (1963a) a compté le nombre de cellules du cerveau des larves du quatrième stade, après exposition à différentes doses de rayons X (500, 1000, 2000, 4000 rads). Dans un premiers temps toutes les doses suppriment l'activité mitotique pratiquement totalement. Puis il y a une grande augmentation des divisions cellulaires ; le lot irradié à 500 ou 1000 rads présente une division égale à plus du double par rapport au lot témoin. Les rayons X causent certaines aberrations des chromosomes des cellules somatiques : délétions, anneaux, ponts dicentriques...

Récemment, ASMAN et RAI (1965 et com. pers.) ont réussi à induire certains changements chromosomiques héréditaires : translocations réciproques et trisomie dans les cellules des gonades. Ces aberrations seront très utiles notamment pour la localisation des gènes dans les chromosomes. Il faut noter la résistance aux radiations présentée par certaines souches (ASMAN, 1966). Une souche hybride, montre un taux de mitose plus élevé que les souches parentales et cette accélération de la mitose reparerait les dommages causés par les radiations.

Par la technique d'irradiation des chromosomes ASMAN et RAI (1966) ont pu induire une translocation intéressante entre les chromosomes I et II. Cette translocation permet d'obtenir, dans la descendance, un important degré de stérilité.

Un autre croisement intéresse les mâles irradiés et les femelles de type sauvage, ce croisement procure des individus de la FI de type trisomique $2n = 7$.

B) Manipulations génétiques

Le contrôle biologique des insectes n'est pas limité à l'emploi d'insectes stérilisés par des traitements physiques ou chimiques (KNIPPLING et al., 1968). D'autres mécanismes, connus des généticiens, sont utilisables et peuvent être adaptés à la lutte contre les vecteurs.:

- incompatibilité cytoplasmique (LAVEN, 1967a et 1967b).
- hybrides stériles (DAVIDSON et al., (1967).
- dérive génétique ("meiose drive").
- distorsion du sex-ratio (HICKEY, 1970 ; HICKEY et CRAIG, 1966a et b).
- incorporation de facteurs léthaux...

Nous signalons ici les méthodes dont nous parlèrent les Professeurs CRAIG et RAI.

B-1- Distorsion du sex-ratio.

Ce phénomène est dû à un facteur génétique qui modifie la ségrégation du chromosome "sexuel" pendant la méiose, il en résulte que la descendance est principalement constituée de mâles.

Ce facteur, "Distorter", n'agit que sur les mâles et il est transmis à la descendance mâle.

Les diverses souches présentent des degrés dans l'expression du caractère distorsion, la meilleure donne naissance à une progéniture composée à 90-95 % de mâles.

Différentes proportions d'individus "Distorter" et de mâles normaux ont été relâchés dans des cages d'expériences. Un sex-ratio de 90 % de mâles a ainsi pu être obtenu pendant plus d'un an tandis qu'une autre population a pu être éradiquée (au laboratoire) en 42 semaines.

Associé à d'autres caractères, tel le gène "Bronze" (BHALLA et CRAIG, 1967) responsable de la stérilité des femelles, ce gène "Distorter" peut être considéré comme très "prometteur" dans le cadre du contrôle génétique des populations.

B-2 - Translocations chromosomiques.

La technique des lâchers de mâles stérilisés présente le désavantage de sa caractéristique essentielle, en l'occurrence ces mâles stériles ne transmettent évidemment pas ce caractère à la génération suivante. Pour maintenir le contrôle de la population considérée il est nécessaire d'effectuer de nombreuses et constantes réintroductions.

Il était intéressant d'envisager le problème sous un autre angle, de voir comment un caractère génétique sélectionné en laboratoire, pourrait s'incorporer au pool génique d'une population naturelle et comment ce caractère allait évoluer sous l'effet de la pression de sélection.

Dès 1940, SEREBROVSKII envisage une "nouvelle méthode génétique" de contrôle des vecteurs, mais ce n'est que depuis une décennie que l'accent est mis sur ce type d'étude.

L'utilisation d'une "semi-stérilité transmissible", associée à certaines translocations chromosomiques, semble avoir une perspective prometteuse dans le cadre général de la lutte biologique.

Chez Aedes aegypti quelques 40 translocations ont pu être induites et analysées cytogénétiquement quant à leur point de rupture. Ont aussi été étudiées la fertilité et la fécondité des mâles et leurs caractéristiques génétiques (ASMAN et RAI, 1965 ; RAI et ASMAN, 1968 ; RAI et al., 1970 ; RAI et MAC DONALD, 1971).

Théoriquement, un seul lâcher d'individus homozygotes pour la translocation peut suffire à éradiquer une population (CURTIS, 1968).

Ces insectes "transloqués" n'ont subi aucun traitement physique ou chimique à la génération du lâcher, ni leur génotype, ni leur phénotype n'est "essentielle" affecté par le système de translocations, points essentiels pour maintenir la compétitivité de ces mâles.

En effet, la réduction de la compétitivité sexuelle était bien souvent un important facteur limitant dans les essais d'obtention d'une létalité à caractère dominant induite par les agents mutagènes (RAI, 1969).

Des simulations sur ordinateur, basées sur des résultats utilisables pour Aedes aegypti, ont indiqué le rôle potentiel des différents types de translocations, liées au sexe ou autosomales pour le contrôle génétique, en fonction des différentes "stratégies" des lâchers (MAC DONALD et RAI, 1971).

En 1971, aux Indes (Research Unit on Genetic Control of Mosquitoes) le Professeur RAI et son équipe ont expérimenté, sur le terrain, cette nouvelle méthode de lutte biologique.

Ils ont étudié l'incorporation génétique dans une population naturelle d'une translocation liée au sexe, ainsi que le maintien de cette translocation dans le pool génique pendant plusieurs générations après la fin des lâchers. Les lâchers consistaient en une seule génération d'individus traités (RAI et al., 1972). C'était la première démonstration d'un tel type d'étude pour Aedes aegypti. LAVEN (1967a, 1969, 1971) a aussi étudié l'incorporation à un pool génique d'une population naturelle de Culex pipiens fatigans, d'une translocation liée au sexe.

Ces expériences ont montré qu'avec des manipulations appropriées, il était possible d'utiliser les translocations chromosomiques dans le cadre du contrôle génétique des populations.

Actuellement les travaux se poursuivent parallèlement en laboratoire (à l'Université de Notre-Dame) et sur le terrain (station W.H.O. unit, DELHI et Notre-Dame field, MOMBASA, KENIA). LORIMER, et al., (1972) viennent d'isoler 2 translocations homozygotes chez Aedes aegypti qui pourraient augmenter considérablement la potentialité de la méthode des translocations chromosomiques pour le contrôle génétique des populations.

Ainsi que nous l'avons signalé plus haut le Professeur RAI est revenu de DELHI quelques jours après notre arrivée à l'Université de Notre-Dame, nous avons ainsi pu avoir les dernières informations réunies sur ce travail. Nous avons retranscrit ces informations mais tous les détails des techniques utilisées et des résultats obtenus peuvent se retrouver dans les publications citées (faites et sous presse).

B-3 Contrôle génétique des vecteurs de filaires.

La connaissance de l'agencement des gènes dans les chromosomes autorise la manipulation du pool génique et la "constitution" de certaines souches sélectionnées pour des caractères d'intérêt pratique.

Ainsi on sait "où se trouve" et "comment agit" le gène "fm" (récessif, lié au sexe) conditionnant la possibilité, pour Aedes aegypti de développer et transmettre des filaires (MAC DONALD, 1962 a et b, 1963a et b, 1967 ; RODRIGUEZ, 1972 et com. pers.).

A l'Université de Notre-Dame, le Professeur RODRIGUEZ s'occupe actuellement des "variations génétiques dans la susceptibilité à l'infection filarienne pour différentes souches géographiques d'Aedes aegypti". Lors d'une conférence, donnée le 10 avril 1972 au Département d'Entomologie puis lors d'un entretien privé dans son laboratoire personnel, le Professeur RODRIGUEZ nous a exposé ses travaux et les résultats déjà obtenus.

Il faut tout d'abord se rappeler que "ability to transmit disease can be a characteristic of individuals or population as well as species" (CRAIG, 1971).

43 souches géographiques d'Aedes aegypti, 6 lignées inbreed et une colonie de laboratoires ont été testées pour déterminer leur susceptibilité à l'infection par Brugia pahangi. Les femelles d'Aedes aegypti, âgées de 4 à 5 jours, se nourrissent sur gerbilles (Meriones unguiculatus) infectées. Les gerbilles affectées par cette filaire présentent une paralysie du train arrière. Les femelles de moustiques sont disséquées 10 à 14 jours après la prise de repas infectant.

Sont considérés comme "susceptibles" les moustiques qui "produisent" des filaires infectantes viables. Nous avons pu observer de telles filaires au cours des dissections faites par le Professeur RODRIGUEZ.

Lors de chaque test, le Professeur RODRIGUEZ utilise pour souche témoin la souche d'inbreeding "REFM" (dérivée d'une colonne de laboratoire et où sont associés les gènes red-eye et le gène fm).

Des 43 souches géographiques, 30 se sont montrées absolument réfractaires à l'infection. Remarquons qu'il en est ainsi pour les 7 souches d'Afrique de l'Ouest testées.

Les 13 autres souches permettent une susceptibilité variant de 2 % (souche américaine) à 53 % (souche d'Ouganda).

La souche homozygote pour le gène "filarial susceptibility" (ou "fm") a montré une susceptibilité de 95 %.

En se basant sur les résultats ainsi obtenus il a été possible d'estimer la distribution du gène "fm" dans les populations naturelles.

Un tel type d'étude est éminemment intéressant et permet d'envisager un nouveau et efficace moyen de contrôle d'une endémie en n'affectant point le cycle biologique naturel. En effet le "vecteur"... ne serait plus vecteur bien que sa population n'ait pas été altérée.

c) Premiers résultats.

Nous ne ferons point ici un récapitulatif des nombreuses tentatives réussies ou non, effectuées dans le cadre du contrôle génétique des populations d'insectes. (LA CHANCE et KNIPPLING, 1962 ; KNIPPLING, 1964, 1967). Notons cependant que les premières tentatives d'éradication de populations naturelles de moustiques se sont, hélas, soldées par des échecs. Les essais furent tentés avec :

- Aedes aegypti (MORLAN et al., 1962).
- Anopheles quadrimaculatus (WEIDHAAS et al., 1963).
- Culex pipiens fatigans (KRISHNAMURTHY et al. 1963 ; LAVEN, 1967, 1969).
- Anopheles gambiae (DAVIDSON et al., 1970).

Les causes de ces échecs sont multiples ; trop grande hâte des manipulateurs, connaissance insuffisante de la biologie, et notamment de la "biologie sexuelle" du vecteur considéré, insuffisance quantitative des mâles lâchés, mais aussi insuffisances qualitatives de ces mâles : longévité, compétitivité réduites...

A la suite de ces insuccès d'aucuns conclurent trop hâtivement, que le contrôle génétique n'était que peu ou prou applicable, "this conclusion is premature" (CRAIG, 1968 et com. pers.).

Deux points paraissent particulièrement importants :

- la connaissance précise des divers aspects de la biologie du vecteur en cause.
- l'incorporation, au pool génique naturel, du ou des gènes devant avoir le rôle limitatif.

Ces points peuvent être, en partie, élucidés génétiquement, par l'utilisation des gènes marqueurs. FAY et CRAIG (1969) ont ainsi relâché des mâles présentant un marqueur génétique semi dominant non stérile : "Silver Mesonotum" (CRAIG et HICKEY, 1967) dans des populations naturelles d'Aedes aegypti à Meridian (Mississippi). Notons au passage que le Professeur CRAIG parle souvent de cette expérience réussie qui représente un stimulant pour les travaux ultérieurs. En effet les oeufs récoltés dans les gîtes naturels et dans les pondoirs pièges (FAY et GLIASON, 1966) ont été élevés et ont donné naissance à des imagos présentant le caractère mutant. D'autres gènes marqueurs avaient aussi été introduits : "yellow larva" et "spot abdomen" (eux aussi du groupe de linkage II) mais ces caractères sont récessifs, donc pas visibles chez les individus hétérozygotes. Il s'est avéré que le gène marqueur "silver Mesonotum" avait été largement répandu traduisant l'insémination effective des femelles sauvages par les mâles relâchés et l'incorporation de ce gène au pool génique naturel.

L'utilisation des gènes marqueurs permet aussi de connaître les phénomènes naturels de dispersion des populations. En 1969, et toujours à MERIDIAN, HAUSERMANN et al. (1971) ont utilisé 6 types de gènes marqueurs pour mesurer la "dispersion des oeufs", déposés par les femelles "marquées", différentes périodes après la date des lâchers. Les résultats obtenus se sont montrés, par certains côtés, très satisfaisants et ont permis de confirmer "l'amplitude de vol possible" d'Aedes aegypti.

Nous avons aussi noté l'emploi du gène RE (red-eye) associé au gène fm ("filarial susceptibility") pour déterminer et suivre génétiquement la capacité vectorielle des différentes souches. Ces réussites pour Aedes aegypti associées à "l'historique succès" de LAVEN (1967a) à OKPO sur Culex pipiens fatigans doivent être considérés comme des stimulants et encourager d'autres tentatives aussi bien sur le terrain qu'en laboratoire.

d) Perspectives.

Le concept de contrôler les insectes vecteurs en "manipulant" le pool génique vecteur a été "reçu" avec "interest and enthusiasm" (CRAIG, 1963, 1971 ; KNIPPLING et al., 1968).

Jusqu'alors les réussites ne furent pas à la hauteur des espérances mais le potentiel est toujours digne d'exploration (CRAIG, 1971 et com. pers.).

Depuis 1970 le Professeur RAI et son équipe mènent toute une série d'expériences dans les environs de DELHI pour suivre l'intégration à un pool génique naturel (population locale) d'un certain nombre de gènes mutants sélectionnés en laboratoire : "Silver Mesonotum" et une translocation liée au sexe T (1 : 2) M affectant les mâles.

Dans un premier temps il a été montré que les adultes sauvages et les hybrides de F1 : +.Si, ne présentaient aucune différence significative quant au taux de survie des stades préimaginaux. De plus les mâles hétérozygotes sont, expérimentalement, compétitifs sexuellement. (RAI, 1971).

Sur le terrain il s'est avéré que le gène marqueur "silver" ainsi que la translocation ont été incorporés aux populations naturelles. En outre ces caractères se sont maintenus dans les populations plusieurs générations après la fin des lâchers.

Dans son rapport, comme dans sa conférence, le Professeur RAI souligne "This is the first demonstration of its type with any vector species and augurs well for application of genetic methods for population control".

Le Professeur RAI tient à mettre en exigence le maintien de l'intégrité du biotope.

En effet, si, dans un biotope déterminé, on arrive à éradiquer tous les représentants d'une certaine espèce, la disparition de cette espèce entraîne la libération d'une niche écologique. Cette niche pourra être réoccupée par une autre espèce, espèce qu'on ne peut prévoir d'une part mais surtout dont on ne peut prévoir les caractéristiques biologiques donc son "importance" aussi bien dans la chaîne trophique que dans ces rapports avec les humains.

La manipulation génétique des populations permet d'envisager un moyen plus "astucieux" et moins dangereux de contrôle des vecteurs.

Si un gène sélectionné, introduit dans une population locale, permet à celle-ci de continuer à vivre sans altération essentielle qu'une limitation de ses effectifs, ce gène pourra s'inclure dans le pool génique de la population considérée. Cette étape a été franchie avec succès aussi bien au laboratoire que sur le terrain nous venons de le voir.

De plus la mise en évidence du caractère génétique conditionnant la capacité vectorielle d'une souche (MAC DONALD, 1967) constitue une étape capitale en entomologie médicale.

On peut alors envisager ce type de séquence :

- lâchers appropriés d'individus sélectionnés pour le gène "réfractaire" à l'infection,
- intégration de ce caractère au pool génique de la population sauvage,
- arrêt de la transmission de l'infection par dégénérescence du parasite à l'intérieur du vecteur.

Le biotope n'est aucunement modifié mais l'espèce considérée n'a plus aucun rôle en temps que vecteur de maladie humaine.

Cette méthode peut être affinée par le lâcher, et l'adaptation, d'une souche présentant certains caractères génétiques, tel "Proscipedia" (QUINN et CRAIG, 1971), déterminant une modification phénotypique telle que les insectes hématophages ne puissent plus piquer ; de ce fait, ces insectes ne représentent même plus une nuisance pour l'homme. La survie de cette espèce pouvant se faire par le phénomène d'autogénèse dont on peut aussi sélectionner le caractère génétique.

Comme on peut le voir les perspectives du contrôle génétique des populations sont immenses et cette technique s'affine et s'améliore constamment.

Aux lâchers de mâles stérilisés a succédé une technique plus efficace consistant à lâcher des mâles semi-stériles et, du moins expérimentalement, la population s'éteint d'elle-même en quelques 6 à 8 générations.

Il faut pouvoir produire une quantité suffisante de tels mâles, et là encore la génétique intervient en permettant de sélectionner des souches présentant une descendance composée à 95 % de mâles.

Améliorant ces potentialités on peut imaginer, nous l'avons souligné, la possibilité d'obtenir des vecteurs qui ne seraient plus vecteurs, et des insectes hémato-phages qui ne piqueraient plus.

Avant d'en arriver à de tels résultats il faut encore approfondir nos connaissances aussi bien sur la génétique que sur la physiologie et la biologie naturelle des espèces considérées (RAI, com. pers.).

Cependant les perspectives et les potentialités sont grandes et le contrôle génétique des populations représente un vaste champ d'investigation prometteur mais où "the need for expanded research on mosquito genetics" (CRAIG et HICKEY, 1967) justifie la phrase habituelle du Professeur KITZMILLER (1967, et com. pers.) "more labourers in the vineyard".

b) - Cytotaxonomie.

De nombreux entomologistes médicaux pensent encore en termes "linnéens", l'espèce étant un concept abstrait ou type, auquel tous les autres devraient se conformer, ou encore "once a vector, always a vector". Cette pensée est complètement étrangère à la biologie moderne, où l'espèce est considérée comme une collection de pools géniques (populations locales) qui sont capables d'échanger du matériel génique. Ce concept reconnaît une énorme variation à l'intérieur de chaque espèce. Il réalise que chaque population et chaque individu est différent (CRAIG, 1971).

La cytomorphologie et la cytogénétique ont donné le jour à une nouvelle modalité de classification : la cytotaxonomie.

Contrairement à la systématique classique cette classification est essentiellement dynamique. Il n'est pas question d'opposer ces deux "façons de penser" mais au contraire de les interpréter en terme de complémentarité.

La morphologie des chromosomes constitue un apport important voire peut prendre la relève de la morphologie externe classique.

En entomologie médicale notamment cet apport fut capital pour l'étude des complexes d'espèces jumelles :

- Anopheles maculipennis FRIZZI, 1953

KITZMILLER et al., 1967.

- Anopheles gambiae COLUZZI, 1966

COLUZZI et SABATINI, 1967.

L'étude génétique et cytogénétique a aussi permis la compréhension du complexe Culex pipiens fatigans (LAVEN, 1967b) ainsi que le "démembrement" du complexe Anopheles gambiae (DAVIDSON, 1964 ; PATERSON, 1964). Pour Aedes aegypti la morphologie externe des imagoes a, dans un premier temps permis la division en 4 catégories taxonomiques :

- Aedes aegypti aegypti
- Aedes aegypti ssp. formosus
- Aedes aegypti ssp. mascarensis
- Aedes aegypti var. queenslandensis

MATTINGLY (1957), l'auteur de cette classification, tend cependant à souligner "a considerable degree of genetic plasticity" chez Aedes aegypti.

Cette plasticité génétique fut démontrée et analysée par CRAIG et al. (1961), ses diverses études et démarches sont regroupées dans le chapitre 3 "Genetics of Aedes aegypti" in WRIGHT et PAL (1967).

Pour les Simuliidae et notamment Simulium damnosum les travaux de ROTHFELS (1956) à DUNBAR (1971), ont permis non seulement la caractérisation de 9 "sibling species" mais aussi une meilleure compréhension de l'épidémiologie de l'onchocercose.

L'examen des chromosomes polytènes des Anohelini a montré que des espèces "closely related" (KREUTZER et KITZMILLER, 1971) ainsi que des espèces "jumelles" pouvaient être "reconnues" et séparées par le mode d'agencement des bandes (donc des gènes) dans ces chromosomes (KITZMILLER et al., 1967).

Mais il faut utiliser ce critère de différenciation avec grande prudence (KITZMILLER com. pers.).

Un "banding pattern" semblable et la présence d'inversions identiques est un argument certain pour affirmer un lien étroit entre deux "souches" présentant ces caractères. Cependant l'identité du "banding pattern" ne signifie pas obligatoirement des affinités génétiques. Ceci doit être confirmé par l'étude du degré d'interfécondité et le degré de synapsie des chromosomes de la Fl.

D'autre part, il faut remarquer, et nous l'avons noté à plusieurs reprises, l'important polymorphisme chromosomique d'un pool génique adaptatif (KITZMILLER, 1967).

A cet égard il faut prendre en considération une aberration chromosomique très utilisée en cytotaxonomie en l'occurrence le phénomène d'inversion.

Deux situations peuvent se présenter :

- l'inversion est fixe
- l'inversion est flottante.

Si une inversion se retrouve d'une façon systématique entre 2 "populations" celles-ci doivent être considérées comme des espèces (ou sous-espèces) différentes (DUNBAR com. pers.).

Les inversions flottantes traduisent la plasticité génétique du pool génique considéré.

Ces inversions flottantes peuvent aussi se retrouver entre plusieurs populations, elles traduisent alors le passage ou l'échange de matériel génique ("gene flow") possible entre ces populations. Il faut noter, et c'est là un point encourageant, que certaines corrélations peuvent être faites entre certains types d'inversions et certaines conditions écologiques (KITZMILLER, loc. cit.).

La possession et le mode d'action de certains gènes, par exemple le gène conditionnant la possibilité de transmettre une affection parasitaire, peut aussi être considéré comme un critère de population aussi bien que comme un critère d'espèces. Les études, tant biologiques que génétiques ont d'ailleurs mis en évidence ces différences intraspécifiques.

Il faut bien retenir que dans les populations naturelles "heterozygosity is the rule and polymorphism are everywhere" (CRAIG, 1971).

On en arrive donc au grand problème, celui de la définition de l'espèce et des mécanismes de spéciation. Loin de nous toute idée d'intervenir, actuellement, dans les nombreuses contreverses, discussions, hypothèses, théories... qui se sont élevées sur ce sujet. Nous donnons (planche 13) le schéma proposé par KITZMILLER pour expliquer les mécanismes de spéciation. Nous avons partagé cette conception moderne et dynamique de la notion d'espèce. Bien que non

encore admise en systématique classique, la cytotaxonomie a d'ores et déjà permis la compréhension de nombreux phénomènes épidémiologiques (dont le fameux "anophélisme sans paludisme") et par là même elle montre toute son importance et son intérêt pratique.

Nous avouons par contre être plus sceptique quant à son utilisation pour la constitution des rameaux phyllétiques et des "relations de descendance", dans ce domaine les hypothèses sont parfois "hardies" et les "rameaux" déjà établis sont constamment soumis à modifications (DUNBAR, 1971).

L'étude des chromosomes permet de reconnaître les différentes populations d'une même espèce, les espèces étroitement apparentées et les espèces jumelles.

Elle permet d'envisager les relations intra et extra spécifiques. Elle complète l'étude classique de la morphologie externe mais elle doit être complétée par l'étude génétique et notamment les possibilités et résultats des croisements.

III - CYTOTAXONOMIE DES SIMULIIDAE

Initialement nous devions nous rendre à New-London (ONTARIO) auprès du Professeur DUNBAR pour compléter la mission du Dr OVAZZA. En fait le Pr. DUNBAR s'était rendu à l'Université de Toronto, répondant à l'invitation du Pr. ROTHFELS qui organisait, du 22 avril au 29 avril 1972 un meeting consacré aux Simulies, chromosomes et Acides Nucléiques. Sur l'invitation du Pr. ROTHFELS nous nous sommes rendu à Toronto où nous avons pu nous initier aux techniques de préparation et montage des chromosomes polytènes de Simulies. Dans le même temps nous avons eu divers entretiens avec les Professeurs DOWNES, NEWMAN et PETERSON. Nous avons assisté aux exposés du Pr. HU sur les chromosomes humains, du Pr. WOOD "Is Gymnopais a primitive Black-fly?", du Pr. DOWNES sur la biologie des Simulies arctiques (Gymnopais holopticus, G. dichopticus, Prosimulium mixum..) et les phénomènes d'autogénèse.

Le 26 avril le Pr. NEWMAN a donné une lecture particulièrement intéressante faisant état de ses premiers résultats (non publiés)

sur l'analysè cytomorphologique des différentes populations du complexe Prosimulium onychodactylum, peuplant la Columbia river Georges. NEWMAN, sur la base de la fréquence de certaines inversions, considère ce complexe comme constitué de 10 espèces, chacune présentant en outre une phénologie particulière. Ces travaux devant faire l'objet d'une prochaine publication nous ne pouvons exposer le détail des études mais il était intéressant de noter ce type de recherches qui permet la compréhension du problème posé par les espèces jumelles sympatriques.

Nous ne nous attarderons pas sur le détail de chaque exposé puisqu'un compte rendu complet doit en être fait, sous la direction du Pr. ROTHFELS, par l'Université de Toronto.

Pour notre part nous avons appris les techniques principales d'obtention des chromosomes ainsi que les données de base utilisées en cytotaxonomie des Simuliidae.

III-1 - Techniques

III-I-1- Dissection des larves de Simulies.

Le but de cette dissection est d'ouvrir la larve pour extirper les glandes salivaires.

Comme toute dissection les modalités opératoires sont multiples et fonction du manipulateur.

Pour notre part nous avons noté les 3 techniques couramment employées :

a) Technique "Push and Pull" de NEWMAN (fig. 14a)

- + la larve étant placée horizontalement, le côté gauche sur la lame
- + avec l'index de la main gauche presser l'extrémité abdominale
- + dans le même temps saisir la tête avec des pinces et tirer longuement
- + sortent alors, reliés à la tête, les glandes salivaires et le tractus digestif
- + plonger immédiatement l'ensemble (tête + glandes salivaires + Tractus digestif) dans le fixateur.

b) Technique de DUNBAR (fig. 14b).

- + la larve est positionnée verticalement, côté gauche sur la lame
- + rapprocher l'extrémité abdominale de la tête pour "plier" la larve au maximum
- + avec une pince tenue de la main gauche faire une large entaille sur la face dorsale des segments abdominaux
- + presser l'abdomen
- + les glandes salivaires et le tube digestif sortent alors en formant une large "boucle"
- + plonger immédiatement l'ensemble (larve ouverte + glandes salivaires et tractus digestif à demi extrait) dans le fixateur.

c) Technique "ouvrir et tirer" (fig. 14c)

- + la larve est positionnée verticalement, la face gauche sur la lame
- + la larve est étendue au maximum contrairement à la technique précédente
- + avec deux aiguilles montées déchirer les segments abdominaux
- + séparer largement chaque "moitié" de la larve en "tirant" l'extrémité abdominale vers le bas; entre les deux lèvres de l'entaille ainsi agrandie on note le tube digestif et les glandes salivaires
- + plonger toute la larve immédiatement dans le fixateur

III-I-2- Préparations des glandes salivaires.

a) "Feulgen technique".

Nous exposons ici la technique couramment employée par le Pr. ROTHFELS et son équipe pour leur étude des chromosomes de Prosimulium fuscum.

Fix - Fixation

Nous l'avons noté précédemment, dès que la larve est "ouverte" et que les glandes salivaires sont en partie "sorties" il faut immédiatement plonger l'ensemble dans le fixateur, en l'occurrence le Carnoy (alcool absolu 3 parts plus acide acétique une part). Le temps de fixation est de 10 minutes.

2mt - Rincer abondamment à l'eau distillée pendant 10 minutes en se plaçant devant une lampe, ce rinçage permettra une meilleure coloration

3mt - Hydrolyse.

Plonger les larves dans l'acide chlorhydrique (Normal) et placer le tout dans une étuve à 60°C pendant 7 à 10 minutes.

Cet acide chlorhydrique normal est préparé ainsi :

HCL 82,5 cc (grav. spec. = 1,18)

Eau distillée = q.s.p. 1 litre

4mt - Coloration.

Pour colorer les chromosomes des glandes salivaires des Simuliidés le Pr. ROTHFELS utilise la "technique de FEULGEN", en préparant la fuschine leuco-basique selon la "méthode longue".

- + dissoudre 2 gr de fuschine basique, en les "jetant", dans 400 cc d'eau distillée bouillante
- + bien secouer et refroidir à 50°C.
- + filtrer et additionner 40 cc d'HCL (N) (à 12 %) au filtrant
- + ajouter 2 gr de Métabisulfite de Potassium ($K_2 S_2 O_5$)
- + bien secouer et laisser reposer dans une bouteille de verre sombre pendant 12 à 18 heures avant de l'utiliser. A conserver dans un endroit sombre et frais
- + à 400 cc de la solution ainsi préparée ajouter une solution constituée par 4 gr de $K_2 S_2 O_5$ + 20 cc d'HCL (N)
- + laisser la solution reposer (devenir limpide) pendant 24 heures et filtrer rapidement (après avoir "secoué" l'ensemble pendant une minute avec du charbon animal si la solution n'est pas limpide)
- + conserver à l'obscurité en flacon de verre sombre et bien bouché.

Pour plus de précaution (colorations ratées que l'on veut reprendre) préparer une solution d'eau sulfurée :

- eau distillée 200 cc

- $K_2 S_2 O_5$ 1 gr

- HCL (N) 10 cc

Conserver cette solution dans un flacon bien bouché pour éviter que le SO_2 ne s'échappe.

A titre indicatif la fuschine leuco-basique peut aussi être préparée selon la "méthode courte" :

- 1 gr de fuschine basique dans 200 cc d'eau distillée et chauffer à $80^{\circ}C$.
- refroidir à $60^{\circ}C$ et ajouter 2 gr de $K_2 S_2 O_5$
- refroidir à $50^{\circ}C$ et ajouter 10 cc d'HCL (N)

Conserver dans un flacon sombre bien bouché pendant 24 heures jusqu'à ce que la solution soit parfaitement limpide.

- filtrer (au besoin après avoir ajouté du charbon animal pour ôter toute couleur résiduelle due aux impuretés) et bien secouer l'ensemble; conserver à l'obscurité dans un flacon sombre bien bouché.

La coloration des chromosomes se fera en plongeant les larves dans la fuschine leuco-basique préparée selon la lère méthode.

Le temps de coloration est de 45 minutes à 1h1/2, l'ensemble est à conserver à l'obscurité.

5^{mt} - laver les "larves" 3 fois 3 minutes dans l'eau sulfureuse puis les conserver au réfrigérateur pendant 15 minutes dans l'eau distillée.

6^{mt} - finir la dissection en séparant et isolant les glandes salivaires. Cette dissection se fait dans une goutte d'acide acétique à 50 %.

Les glandes sont facilement repérables car les noyaux à chromosomes géants sont colorés en rouge.

Oter aussi et conserver, les gonades. Celles-ci sont colorées en rouge de façon uniforme.

Noter sur la lame le sexe de la larve.

7^{mt} - bien nettoyer la préparation en ôtant tous les tissus adipeux et couvrir d'une lamelle non siliconée.

8^{mt} - Ecraser lentement les glandes ainsi "nettoyées" et toujours plongées dans une goutte d'acide acétique à 50 %

Après chaque écrasement observer au microscope l'état de déroulement des chromosomes.

9. Déposer tout autour de la lamelle une goutte de Carmin qui, en séchant permettra de bien lire l'emplacement de la lamelle (pour les montages permanents).

10. Bien étiqueter la préparation en notant :

- l'espèce
- la date de fixation
- le sexe
- le numéro de la préparation.

Les lames sont ainsi préparées de façon provisoire, nous verrons qu'il est possible de préparer les lames de façon permanente.

b) Lacto-acétic orcéine technique.

Cette technique est utilisée par le Pr. NEWMAN dans son étude sur les chromosomes de Prosimulium onychodactylum.

Il faut noter, que le Pr. NEWMAN utilise non pas des lamelles mais des lames siliconées.

- Préparer une solution d'orcéine acétolactique :

2 gr d'orcéine + acide acétique glacial et acide lactique à parts égales

diluer une part de cette solution + 3 parts d'acide acétique glacial à 45 %

- Les glandes extraites de la larve (cf. chapitre précédent) sont fixées dans le Carnoy.

- Finir la dissection des glandes en les séparant du tube digestif et de la tête puis pratiquer

- l'hydrolyse en laissant ces glandes 5 minutes dans l'acide chlorhydrique Normal, ceci est fait à la température de la pièce

- Laver 10 minutes dans du Carnoy

- Colorer 5 minutes à l'orcéine acéto-lactique

- Recouvrir d'une lamelle

- Ecraser, les glandes sont toujours dans le colorant

- Observer au microscope entre chaque écrasement

- Les lames sont ainsi préparées de façon temporaire et peuvent être conservées au réfrigérateur (-5° C) quelques mois.

III-I-3- Préparations permanentes.

Les deux techniques citées précédemment permettent d'obtenir de bonnes préparations mais à durée de conservation limitée. Il est nécessaire de conserver les "bonnes lames" de façon permanente à titre de référence.

a) Technique de NEWMAN

- Placer la préparation sur un bloc de carboglace et laisser ainsi quelques 30 minutes à 1 heure.
- Lorsque la lamelle est blanchie l'ôter d'un coup sec : pour cela introduire une lame de rasoir entre la lame et la lamelle, maintenir la lamelle avec le pouce et d'un mouvement sec du poignet, ôter rapidement la lamelle.
- Plonger la lame dans un bain d'alcool éthylique à 95 % pour nettoyer et déshydrater la préparation.
- Monter dans l'Euparal.

b) Techniques de ROTHFELS.

Ces techniques ont été décrites en détail par leurs auteurs et par OVAZZA aussi nous n'y reviendrons que brièvement. Deux méthodes sont couramment employées :

+ sans carboglace

- Placer les préparations, lamelles en dessous, dans une boîte de Pétri remplie d'alcool éthylique à 95 %
- Attendre une nuit ; en principe la lamelle est tombée d'elle-même sinon l'ôter, lentement, avec une lame de rasoir.
- Eliminer l'excédent d'alcool en plaçant quelques instants la lame sur un papier filtre.
- Avant que tout l'alcool soit séché déposer une goutte d'Euparal et recouvrir la préparation d'une lamelle normale.

+ Avec carboglace

Si l'on dispose de cubes de carboglace placer les préparations temporaires, lamelles en dessous, sur un cube et attendre environ une heure.

A l'aide d'une lame de rasoir ôter rapidement la lamelle et plonger de suite la préparation dans une boîte de Pétri remplie d'alcool éthylique à 95 %.

Attendre 2 minutes, éliminer l'excédent d'alcool et monter à l'Euparal.

La déshydratation à l'alcool du matériel refroidi minimise le rétrécissement des tissus et permet d'excellentes préparations permanentes.

c) - Technique de DUNBAR.

Le Pr. DUNBAR procède de façon identique au Pr. ROTHFELS sauf sur le dernier point : milieu de montage, l'Euparal est remplacé par une résine Epoxy.

La résine de base est "Epon 812" (Shell chemical Co) à laquelle s'additionnent 2 liquides anhydriques :

- le "DSA" (dodecyl succinic anhydre)
- le "NMA" (nadic methyl anhydride)

Un "accélérateur", amine tertiaire aromatique, est utilisé : le "DMP 30" (2,4,6 - tri (diméthylaminométhyl) phénol).

Ces produits sont utilisés en combinaisons diverses en fonction de la "dureté" de la résine que l'on veut obtenir.

Pour sa part le Pr. DUNBAR utilise la combinaison suivante :

- Milieu 1 = 41,3 cc d'Epon 812 + 66,7 cc de DDSA
- Milieu 2 = 39,5 cc d'Epon 812 + 32,5 cc de NMA

Additionner 6 cc de la solution 1 à 4 cc de la solution 2 et ajouter 7 gouttes de DMP 30. Ce volume sera suffisant pour la préparation d'environ 200 lames.

Remuer pour bien mélanger les 3 produits et attendre quelques instants afin que toutes les bulles disparaissent.

Remplir une seringue en plastique du milieu ainsi constitué et tailler légèrement le bout de la seringue.

Si tout le produit n'est pas utilisé en une seule fois, placer la seringue au réfrigérateur ce qui évitera le durcissement de la résine d'où l'impossibilité de la réemployer.

La résine peut être ainsi conservée plusieurs mois au congélateur.

Ce milieu de montage permet une conservation quasi infinie des préparations sans risque de détérioration (DUNBAR, com. pers.).

Il faut noter cependant que l'Epon 812 et le DMP 30 sont toxiques et peuvent causer de sévères dermatoses. Il faut donc bien se laver à l'eau et au savon si l'on s'est malencontreusement renversé de tels produits sur la peau.

A la température ambiante le durcissement de la résine montée entre lame et lamelle se fera en une à deux semaines environ.

Ce durcissement peut être accéléré : il est effectué en 1 heure à 50°C et 1/2 heure à 100°C.

Attention aux excès d'Epon, les lames doivent être séparées les unes des autres et qu'aucune goutte d'Epon n'adhère au substrat lors du séchage, quelques minigouttes en excès entraîneraient la perte irrécupérable des lames "cimentées" entre elles ou au substrat!!!

III-2- Observations.

N'étant pas un spécialiste de cytotaxonomie des Simulies d'une part et le Dr OVAZZA ayant déjà fait un rapport très complet sur ce problème d'autre part, nous citerons ici nos expériences personnelles et un résumé des conversations que nous avons eu avec les Professeurs ROTHFELS, DUNBAR et NEWMAN.

III-2-1. - Observations personnelles : Prosimulium fuscum.

Le Pr. ROTHFELS a mis à notre disposition une série de lames de référence, des photographies et la cartographie des chromosomes géants de Prosimulium fuscum. Cette espèce présente 3 chromosomes (2n=6) facilement reconnaissables (fig. 15).

Sur les conseils du Pr. ROTHFELS nous avons observé le chromosome III considéré comme le chromosome sexuel et noté deux inversions qui permettent de reconnaître le chromosome X du chromosome Y (fig. 16a).

Nous avons cartographié l'inversion 75-80 (fig. 16b).

Pour nous démontrer le polymorphisme autosomal le Professeur ROTHFELS nous a aussi fait remarquer une inversion importante présentée par le chromosome I (fig. 17a) et les 3 possibilités présentées par les chromosomes quant à cette inversion : homozygote standard
homozygote inversé
hétérozygote s/i.

Cette inversion est importante pour suivre les différentes populations (ROTHFELS, com. pers.) et nous avons pu la cartographier (fig. 17b).

Sur le chromosome II, toujours sur les recommandations du Pr. ROTHFELS nous avons observé l'inversion, entre les zones 49 et 53, qui intéresse l'anneau de Balbiani (fig. 18a et b).

Deux bandes fortes au début de la zone 49 constituent un bon "marqueur" permettant de retrouver rapidement la configuration standard ou inversé. Toujours sur le chromosome II mais intéressant le bras long nous avons pu voir une figure particulière traduisant l'appariement de 2 chromosomes, l'un présentant une configuration standard et l'autre un segment inversé (fig. 18c) et la boucle d'inversion se traduit ici par cette figure remarquable.

La présence à nos côtés du Pr. ROTHFELS ainsi que les cartes mises à notre disposition nous ont permis de nous initier à la cytomorphologie des Simuliidae. Il s'avère que les chromosomes des Simulies sont aussi pratiques sinon plus que ceux des anophèles et passer des chromosomes d'Aedes aegypti à ceux de P. fuscum représentent un grand plaisir aussi bien pour l'oeil que pour la compréhension des phénomènes cytogénétiques.

III-2-2- Cytotaxonomie des Simuliidae.

La taille exceptionnelle et l'agencement des bandes, parfaitement visible, des chromosomes des Simuliidae a autorisé un grand nombre de travaux et le développement des études cytotaxonomiques.

De MONTALENTI (1947), KUNZE (1953), ROTHFELS (1956) à BASRUR (1962), ROTHFELS et FREEMAN (1966), ROTHFELS (1970), DUNBAR (1966a, b, c ; 1969), DUNBAR et VAJIME (1971), plusieurs dizaines d'"espèces" de Simulies ont pu être "cartographiées" et "analysées" cytomorphologiquement. Les espèces néartiques ont été les plus étudiées cependant le Pr. DUNBAR s'est tout particulièrement intéressé au grand problème du complexe Simulium damnosum et a bien voulu nous en parler.

III a 1 - Le complexe Simulium damnosum.

Certes bien loin de nous l'idée de vouloir faire un historique de ce problème, DUNBAR (1969) et OVAZZA (1971) l'ont déjà présenté très clairement.

Mais, lors de notre passage à Toronto, un assistant du Pr. DUNBAR, Mr. VAJIME revenait d'une mission d'étude en divers pays d'Afrique et les deux auteurs nous ont montré leurs derniers résultats (DUNBAR et VAJIME, 1971).

Il s'avère que le problème n'est guère simple, OVAZZA (1971) note : "DUNBAR ne peut donc être certain des relations de ces membres du complexe entre eux. Pendant notre séjour il a même en réalité modifié le schéma phylogénétique qu'il donne dans son dernier article (1969)".

Un même phénomène s'est produit pendant notre séjour et le Pr. DUNBAR nous a montré ces 3 derniers essais phylogénétiques.

Nous les retranscrivons pour les intéressés mais (fig. 19 et 20) même le tout dernier diagramme (non encore publié) est sujet à maints changements (DUNBAR, com. pers.). Cette "spéciation" est basée sur l'analyse statistique des inversions flottantes et l'étude des inversions fixes.

Le complexe S. (Edwardiellum) damnosum est actuellement considéré comme constitué de deux "sous-groupes".

- sous-groupe Nile : 9 (ou +) "espèces jumelles"
- sous-groupe Sanje : 7 "espèces jumelles".

Epidémiologiquement 6 "formes" sont concernées par la transmission de l'onchocercose : une du "sous-groupe Sanje" et cinq du "sous-groupe Nile".

Le sous-groupe Nile diffère du sous-groupe Sanje par les inversions IS-1 et IL-3 mais il existe aussi certains caractères morphologiques (DUNBAR, com. pers.).

Pour les spécialistes du problème S. damnosum nous citons ici les tous récents résultats, que DUNBAR et VAJIME ont bien voulu nous communiquer.

- Chromosome I : dans le sous-groupe Sanje la "population" "Kibwezi" présente des inversions "intraspécifiques" entre les sections 4 et 12, "an undetermined complex of perhaps 3 inversions" (DUNBAR com. pers.).
- Chromosome II : Il existe plusieurs inversions interspécifiques dans le sous-groupe Sanje
inversion IIL-5 (changements au niveau du Para Balbiani).

fixe chez "Nkusi" et "Kibwezi", flottante chez "Nyamagasani".

Inversion IIL-1 chez "Sebwe"

Inversion IIL-34 chez "Kibwezi"

Chromosome III; le sous-groupe Sanje présente plusieurs inversions portées par ce chromosome

Inversion IIIIL-20 chez "Sanje"

Inversion IIIIL-21 chez "Kisawani"

Inversion IIIIL-1 chez "Sebwe" et "Kibwezi"

Inversion IIIIL-19 chez "Kibwezi"

Outre ces données VAJIME nous a communiqué ses toutes dernières observations, nous les citerons en espérant que ces résultats serviront d'aide aux entomologistes concernés par le problème S. damnosum. Nous précisons bien que ces renseignements sont entièrement le fait de leur auteur et que nous nous contentons de les retranscrire avec son autorisation.

Principales caractéristiques de chaque "forme" du "sous-groupe Nile :

- Dieguera :

IS-1 ; IL-3-16 ; IIL-8 ; III L-2

Mali, savane. Inversion importante sur IL : IL-3-16. Sympatrique avec la forme Sirba sa plus proche parente phylogénétiquement.

- Sirba :

1 "sous population" en Haute-Volta, Ghana, savane guinéenne

II L-8 prédominant, configuration standard rare

III L-2-6 prédominant, III L-2 pas commun

1 "sous population" au Soudan, savane

II L-8 exclusivement

III L-2-6 exclusivement.

- Nile "sous population" :

En forêt humide et en savane guinéenne méridionale.

"Standard" chez II L. prédominant (S/II L8)

IIL-2 prédominant (IIL-2/IIL-2-6)

- Nile-Sirba "population" : "Nile" modèle de base : IS-1 ; IL-1+3 ; IIL ? ; IIL-2.
"Sirba" modèle de base : IS-1 ; IL-1+3 ; IIL ? ; IIL-2-6.

Il existe des changements dans les proportions de "standard" et IIL-8 ainsi que IIL-2 et IIL-2-6, de la forêt aux zones désertiques.

"Nile form may start up, it is the true S. (E.) damnosum"
VAJIME (com. pers.).

- Soubre "sous population" :
 - en savane
 - IIL-6-7/IIL-6-7 prédominant
 - IIL-2 absent.
- Bandama "sous population" :
 - en forêt humide, Côte d'Ivoire, Liberia
 - IIL-6/IIL-6 prédominant
 - IIL-2 présent.
- Bandama-Soubre "population" :
 - "Bandama" : modèle de base : IS-1 ; IL-3 ; IIL-6 ; IIL-2/IIL-4+2-17
 - "Soubré" : IS-1 ; IL-3 ; IIL-6-7 ; IIL-4+2-17.

Il existe d'importantes fluctuations dans les proportions des inversions IIL-6 et IIL-6-7 des régions humides aux régions sèches.

Présence ou absence de IIL-2 en alternative avec IIL-2-17+4.

- "Yah" : IS-1 ; IL-3 ; IIL-18
Côte d'Ivoire (forêt), Libéria (forêt)
Variations mineures dans le spectre des inversions flottantes.
- "Bille" : IS-1 ; IL-3
Cameroun (forêt et savane) Haute-Volta (savane)
Variations mineures dans le spectre des inversions flottantes.

Toutes ces informations communiquées par l'auteur à titre amical, seront prochainement publiées par VAJIME avec amples détails. D'autre part, nous citons un croquis que nous a fait le Pr. DUNBAR quant à la transmission de l'onchocercose par certaines "formes" et la répartition spatiale de ces formes (fig. 21).

II-b2 - Les espèces jumelles dans la famille des Simuliidae.

Ici aussi nous n'irons pas faire un panorama complet des études cytomorphologiques des complexes d'espèces jumelles. Il faut cependant retenir que la notion d'espèce est basée sur l'étude des inversions :

- une inversion fixe est considérée comme un critère interspécifique
- une inversion flottante est considérée comme intraspécifique.

Le Pr. ROTHFELS nous a parlé du problème des "sibling-species" et notamment des espèces jumelles, Prosimulium fuscum et P. mixtum.

Un examen minutieux de l'agencement des bandes dans les chromosomes salivaires, a permis, dans de nombreux cas, de séparer des espèces jumelles "biologiquement séparées", "à l'intérieur" d'espèces, considérées préalablement comme uniques (ROTHFELS, com. pers.).

La preuve du statut spécifique de ces "espèces biologiques" est fournie par l'étude cytologique en l'occurrence l'absence, ou la présence, d'hybrides.

Prosimulium fuscum et P. mixtum sont 2 espèces jumelles différant par une inversion sur le chromosome II et surtout par l'agencement des bandes sur le chromosome III ou chromosome sexuel (fig. 22).

Trois autres espèces jumelles sont actuellement considérées comme appartenant au même "groupe".

- P. rhizophorum
- P. saltus
- P. mysticum

Ces espèces présentent essentiellement le même agencement des bandes sur les chromosomes exception faite de la région du centromère du chromosome III qui porte les gènes "sexuels".

- P. mixtum - Le chromosome X présente la configuration standard, mais le chromosome Y diffère de ce modèle standard par une inversion péricentrique, moins importante que celle intéressant le chromosome Y de P. fuscum.

- P. rhizophorum : Y et généralement X, ont la configuration standard. X présente souvent une inversion péricentrique faisant "passer" le centromère au niveau du bras court.

- P. saltus: Y est facilement identifiable par une petite inversion intéressant la base du chromosome III L.

Dans le groupe Prosimulium les chromosomes X et Y se différencient par des inversions intéressant les bras long et court du chromosome sexuel. Dans une "série" d'espèces parentes, le modèle général est dû à des "modifications" des segments sexuels au voisinage du centromère. Ceci suggère que même chez les mâles Xo Yo (configuration standard) le locus sexuel est près du centromère du chromosome III. De plus, vu que les quatre espèces de cet ensemble ne montrent pas de différences importantes dans l'agencement des bandes des autres chromosomes il apparaît que la spéciation est conditionnée par l'apparition de nouvelles paires X·Y co adaptées.

Cette étude des inversions et notamment du chromosome sexuel repose le problème de la détermination du sexe chez les Simuliidae.

11-c -- Le problème du chromosome sexuel chez les Simuliidae.

Chez de nombreuses espèces de Chironomidae et de Simuliidae la détermination du sexe est génétique mais les chromosomes X et Y sont indifférenciables même dans l'agencement des bandes des chromosomes polytènes des glandes salivaires. Le "segment" déterminant le sexe est probablement un gène ou une bande unique. Chez un grand nombre de telles espèces un segment différentiel agrandi sur le chromosome X et (ou) Y a été formé à la suite de changements structuraux, généralement des inversions.

C'est le cas de Glyptotendipes où les mâles sont pratiquement tous hétérozygotes s/i pour une inversion du chromosome Y tandis que les femelles sont toujours homozygotes pour la séquence standard. Il a cependant été trouvé, exceptionnellement, un mâle dont le chromosome Y présentait la séquence standard.

Chez les Simuliidae, dans chaque genre on connaît des espèces dont certains mâles au moins présentent des chromosomes X et Y ne pouvant être identifiés par l'étude du "banding-pattern".

Dans d'autres espèces, cette condition primitive a disparu et les chromosomes X et Y diffèrent par des changements plus ou moins complexes qui mènent à une différenciation de certains segments sur ces chromosomes.

Chez de nombreuses espèces il existe un important polymorphisme intéressant ce chromosome sexuel, il y a coexistence, parfois sympatrique, parfois plus ou moins allopatrique, des chromosomes X et (ou) Y présentant des degrés variés de complexité.

Chez P. fuscum l'évolution du chromosome sexuel débute avec la condition ancestrale : X et Y indifférenciables cytologiquement. A la suite de plusieurs inversions successives il apparaît des segments différentiels sur les chromosomes X et Y.

Cependant, au cours des étapes intermédiaires, il faut noter la possibilité de réassortiment dans les séquences de X et Y par l'action du crossing-over (fig. 23).

Chez P. fuscum (fig. 24) les séquences X_0 et Y_0 ont pratiquement disparu, leurs structures sont déduites de la phylogénie générale des chromosomes.

Le X le plus fréquent (X_1) est obtenu après une importante inversion portant sur la portion centrale du bras III S.

Le Y le plus fréquent (Y_1) est obtenu après une petite inversion péricentrique.

Ainsi deux segments différenciés sont créés qui, cependant, sont séparés par des portions pouvant s'apparier et où le crossing-over peut se produire.

Que ce crossing-over ait bien lieu est indiqué par la découverte, dans la nature, de rares larves du type $X_0 Y_1$ et même, rarement mais d'une façon concluante, de type $X_1 Y_3$.

Dans chacun de ces types de crossing-over, la détermination du sexe de la larve est due aux "segments différenciés" et non à la "séquence distale". Etant donné que ces larves furent rarement trouvées on peut en déduire que les porteurs de tels chromosomes sexuels affectés par ce crossing-over sont désavantagés dans le jeu de la sélection naturelle.

Dans l'étape finale de l'évolution du chromosome Y à la suite d'une série d'inversions, le segment affecté par le crossing-over a disparu (Y_2) produisant la combinaison $X_1 Y_2$ avec un segment diffé-

rentiel unique comprenant pratiquement tout le bras III S (ROTHFELS, 1956 et com. pers.).

Cette étude de l'évolution et de la différenciation du chromosome sexuel renouvelle la compréhension des phénomènes de polyploidie et parthénogénèse chez les Simuliidae.

d - Polyploidie et Parthénogénèse.

La majorité des espèces de Simulies connues sont diploides, $2n=6$. Cependant il a été remarqué certaines variations dans le karyotype des Simulies. Le complexe Simulium (Ensimulium) aurum présente un nombre haploïde de chromosome $n=2$ (DUNBAR, 1958, 1959, 1965).

DUNBAR (1966c) a montré l'existence de chromosomes accessoires ou "B" chromosomes chez Ensimulium costatum (fig. 25).

D'autre part des 5 genres communs en régions tempérées Nord (Gymnopais, Twinnia, Prosimulium, Cnephia, Simulium), quatre présentent des espèces triploides parthénogénétiques :

- G. holopticus et G. dichopticus
- P. ursinum
- C. mutata
- S. ornatum

Nous citerons ici deux exemples particulièrement intéressants mis en démonstration pendant le colloque de Toronto.

Gymnopais

G. holopticus et G. dichopticus sont tous deux représentés par des populations constituées d'individus diploides des 2 sexes et d'individus triploides tous femelles.

De part l'agencement des bandes dans les chromosomes, G. holopticus est proche du "Prosimulium ancestral-standard".

Les relations entre G. holopticus et G. dichopticus peuvent être ainsi schématisées.

- | | | |
|-----------------|--------------|-------------|
| - <u>G. h.</u> | <u>G. d.</u> | |
| - I S | I S-1,2 |) |
| - II S | II S-1 |) diploides |
| - III L/III L-1 | III L-1 |) |

Les bras non indiqués présentent la séquence standard et l'on peut utiliser les inversions comme "marqueurs" pour différencier les chromosomes I et II.

Deux sortes d'individus triploïdes peuvent être trouvés : "holopticus 3X" et "dichopticus 3X".

"holopticus 3X")deux parties de la garniture chromosomique
)d'holopticus
)+
)une partie de la garniture chromosomique de
)dichopticus.

"dichopticus 3X")deux parties de la garniture chromosomique de
)dichopticus
)+
)une partie de la garniture chromosomique de
)holopticus.

Les individus diploïdes sont confinés dans les refuges glaciales d'Alaska. Les individus triploïdes se sont étendus de l'Alaska au Labrador. Apparemment la combinaison "hétérozygote", due aux espèces hybrides, et toute la descendance femelle due à la parthénogénèse, confère un avantage sélectif dans les conditions exactes de l'environnement arctique. Ceci est intéressant en tant qu'exemple de "sélection mutuelle" pour, au moins, deux pool géniques.

Cnephia mutata

BARSRUR et ROTHFELS (1959) ont découvert le phénomène de polyploidie chez Cnephia mutata et 4 autres espèces. Les femelles triploïdes de C. mutata vivent sympatriquement avec les mâles et les femelles diploïdes mais il n'y a pas d'intercroisements. Les auteurs pensent que cette triploidie se maintient parthénogénétiquement tandis que la diploidie se poursuit par croisements normaux mâles XY femelles XX.

Les populations de Gynopais ou Prosimulium triploïdes sont strictement monomorphiques (c'est-à-dire tous semblables ou ayant une variation clonale) quant à leurs chromosomes et ont, probablement, une parthénogénèse "améiotique".

Par contre C. mutata présente des chromosomes "versatiles" et on peut noter des réassortiments entre les inversions considérées comme "marqueurs" dans la descendance d'une unique femelle. C. mutata triploïde est parthenogénétique mais présente une parthenogénèse "méiotique", les recombinaisons entre les chromosomes des individus femelles peuvent se faire par le jeu des chiasma (fig. 26).

A côté de ces importantes variations quant au nombre des chromosomes DUNBAR (1966c) a trouvé, nous l'avons noté, des "chromosomes accessoires" ou "B chromosome". Chromosomes numéraires dont la présence aussi a été mise en évidence par les auteurs russes (CHUBAREVA, 1968 ; CHUBAREVA et TZAPÏGINA, 1965 ; SHCHERBAKOV et CHUBAREVA, 1965).

Mais il a été aussi remarqué des phénomènes de trisomie ($2n+1$) notamment chez P. multidentatum (fig. 27).

La présence de chromosomes surnuméraires peut être détectée en colorant au "fluorochrome acridine orange" les noyaux à l'interphase.

e) Le problème des hybrides.

Les hybrides ont été rarement notés même dans les zones de sympatrie d'espèces jumelles proches. Cependant on trouve, avec une certaine fréquence, des hybrides de P. multidentatum et P. magnum (fig. 28a et b). La reconnaissance des hybrides entre ces espèces est simple vu que P. multidentatum diffère de P. magnum par au moins une inversion ; d'autre part les chromosomes de P. multidentatum possèdent un chromocentre, ce que n'ont pas les chromosomes de P. magnum. Ces différences spécifiques sont conservées dans les hybrides de première génération (fig. 28c).

En outre, même lorsque l'agencement des bandes semble "homologue", l'appariement des chromosomes est faible chez les hybrides.

Il se produit aussi des croisements de retour et ils peuvent être aussi facilement diagnostiqués par l'examen des chromosomes puisque les hybrides obtenus présentent alors une homozygotie pour un ou plusieurs chromosomes parentaux (fig. 28d).

f) Evolution et rameaux phyllétiques.

Chez les Simuliidae l'étude cytomorphologique des différentes populations d'une même espèce a permis la mise en évidence et la compréhension de nombreux complexes d'espèces jumelles.

En se basant sur les aberrations chromosomiques naturelles, inversions (fixes ou flottantes), translocations, polyploidie, transposition du centromère..., les auteurs ont pu différencier les "espèces associées" et étudier leur lien de parenté. L'examen des chromosomes complète l'étude classique de la morphologie externe mais il s'avère que les résultats ne sont pas identiques ainsi que l'a exposé le 27 avril 1972 le Professeur WOOD (fig. 29).

C'est essentiellement sur la base de l'étude des inversions qu'ont été établis les différents clades.

Outre les relations de phylogénie intéressant les membres du complexe S. damnosum (fig. 19 et 20) nous citerons, à titre indicatif quelques "essais de phylogénie" qui ont été mis en démonstration lors du colloque de Toronto. (planche 30).

Ces tableaux doivent encore être considérés non comme des structures définitivement établies mais plutôt comme des "instruments de travail" améliorables et qu'il faut manipuler avec une certaine réserve si nous nous en référons à l'expérience personnelle du Professeur DUNBAR.

Les études cytomorphologiques des Simuliidae présentent, outre un intérêt scientifique évident, un intérêt pratique revêtant une grande importance. La "reconnaissance" des espèces jumelles sympatriques doit permettre une meilleure compréhension des phénomènes biologiques naturels ainsi qu'une approche plus précise des phénomènes épidémiologiques notamment les modalités de transmission de l'onchocercose.

CONCLUSION ET CONSIDÉRATIONS PERSONNELLES.

En conclusion nous tenons à souligner l'intérêt et l'importance d'un tel stage à l'étranger pour un jeune chercheur.

Cet intérêt peut être considéré sous plusieurs aspects :

- connaissance des méthodes de travail employées dans ces laboratoires, caractérisés par un rendement qualitatif et quantitatif considérable.

- connaissance personnelle de personnalités scientifiques avec lesquelles les relations tant humaines que scientifiques sont d'un apport très riche.

- connaissances scientifiques approfondies dans une spécialité qui n'est encore que peu étudiée en France.

- connaissances qui profitent à tous les entomologistes de l'O.R.S.T.O.M. par l'intermédiaire du rapport et des conversations au retour de ce stage.

Dans un premier temps nous avons été frappé par les conditions de travail dans les différents laboratoires que nous avons pu visiter. Les caractéristiques fondamentales sont : le travail en équipe sur un sujet commun dont chacun étudie un aspect très précis et le brassage permanent d'idées à l'occasion de nombreux exposés que chacun est tenu de faire.

Nous avons pu suivre quelques-uns de ces exposés hebdomadaires et nous avons notamment rapporté les propos du Pr. RAI sur les problèmes de lutte biologique par manipulation du pool génique. Ces conférences sont très enrichissantes aussi bien pour l'auteur que pour ses invités qui émettent librement leur avis et commentaires. Ce qui nous amène à parler des relations humaines dans ces équipes de recherches. Un point fondamental est l'intégration de chacun dans cette équipe mais toujours respect de la liberté individuelle. D'autre part, le chef du service maintient des relations d'ordre égalitaire avec ses collègues comme avec ses assistants et ses élèves.

Travaillant avec les assistants des Professeurs KITZMILLER et CRAIG nous avons pu avoir de nombreuses conversations sur ce sujet qui nous paraît capital pour le rendement d'un laboratoire.

Disposant d'un matériel très important, le Professeur CRAIG par exemple possède deux ordinateurs qui permettent une analyse rapide et complète des résultats des croisements, les "Department" que nous avons visités peuvent effectuer des études théoriques très approfondies. Ces laboratoires possèdent des "field laboratory" aussi bien en Amérique du Sud (Professeur KITZMILLER) qu'aux Indes (Pr. RAI) ou en Afrique de l'Est (Pr. CRAIG), ainsi peuvent être mises en pratique les expériences et hypothèses ayant fait l'objet d'études théoriques importantes.

Sur ce point les Services qui nous ont accueilli sont remarquables par la recherche constante de nouvelles techniques plus rapides et plus efficaces. Ces techniques sont mises à la disposition de tous, et notamment des visiteurs, dans un esprit de coopération intéressant.

Pour notre part, nous avons ainsi pu apprendre de nombreuses techniques et améliorations personnelles des Professeurs qui nous ont reçu ; techniques que nous avons exposées dans notre rapport et qui, nous l'espérons, pourront être très utiles à nos camarades entomologistes.

Bien souvent ces techniques n'ont pas fait l'objet de publications, notamment la méthode d'élevage des larves d'anophèles en eau salée, et pour cela notre rôle est double, nous initier et informer ensuite nos camarades. Il est dommage que les études cytogénétiques n'aient pas encore acquis droit de cité en France, l'O.R.S.T.O.M. d'une part et l'école de Montpellier d'autre part sont les seuls à s'intéresser à la cytomorphologie et la génétique des insectes vecteurs. Il y a donc encore un vaste champ d'investigation dans lequel nous aimerions travailler davantage.

Ce stage fut, hélas, trop court pour que nous puissions entreprendre un important travail personnel pratique ; il nous a cependant permis d'approfondir nos connaissances quant à la morphologie des chromosomes d'anophèles, de nous initier à la génétique d'Aedes aegypti et à la cytotaxonomie des Simuliidae.

Ainsi que nous l'avons noté, nous avons pu ramener au Centre O.R.S.T.O.M. de Bondy une collection de préparations de chromosomes polytènes (A. albimanus, A. quadrimaculatus et A. atroparvus) huit souches mutantes d'Aedes aegypti et des préparations de chromosomes polytènes de simuliés. Cette collection pourra servir aux jeunes élèves et entraîner l'apparition de vocations cytogénétiques, elle pourra aussi servir de matériel de travail pour toute personne intéressée par ces nombreux, et éminemment intéressants, problèmes de génétique des insectes vecteurs d'affections parasitaires.

Ce type d'étude cytogénétique avec son application pratique dans le cadre de la lutte biologique revêt pour nous un grand intérêt et nous aimerions pouvoir mettre en pratique, en région éthiopienne, toutes les informations que nous avons pu apprendre.

C'est dans cet espoir que nous conclurons notre rapport de stage en remerciant tout particulièrement les Professeurs KITZMILLER, CRAIG, RAI, DUNBAR, ROTHFELS et TRPIS qui ont bien voulu nous accueillir et prendre sur leur temps pour nous montrer leurs méthodes et les résultats, souvent non encore publiés, que ces techniques leurs ont permis d'obtenir.

Pour toutes ces données apprises et les perspectives d'avenir qu'elles comportent que Monsieur le Directeur Général de l'Office et Monsieur le Président du Comité Technique d'Entomologie médicale trouvent ici l'expression de mes plus sincères et respectueux remerciements.

Brazzaville, le 8 octobre 1972

P. CARNEVALE

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

AKSTEIN (E.), 1962. -

- The chromosomes of Aedes aegypti, and of some other mosquitoes.

Bull. Res. Coun. Israel, B, 11, 146.

ALDIGHERI (J.), 1961. -

- Contribution à l'étude de la structure des chromosomes salivaires chez Aedes aegypti.

Bull. Soc. Path. exot., 54, 712.

ASMAN (Sr. M.), 1966. -

- Cytogenetic and developmental effects of gamma irradiation in Aedes aegypti.

Ph. D. dissertation

Univer. of Notre-Dame

ASMAN (Sr. M.) et RAI (K.S.), 1965. -

- Radiation induced chromosomal aberrations in Aedes aegypti.

Bull. Ent. Soc. Amer., 11, 172.

ASMAN (Sr. M.) et RAI (K.S.), 1966. -

- Low egg hatch in a new strain of Aedes aegypti.

Bull. Ent. Soc. Amer., 12, 300.

BAKER (R.H.) et RABBANI (M.G.), 1970. -

- Complete Linkage in Females of Culex tritaenorrhynchus Mosquitoes.

Amer. Gen. Ass., 61, (2), 59-61.

BASRUR (P.K.), 1962. -

- The salivary gland chromosomes of seven species of Prosimulium (Diptera : Simuliidae) from Alaska and British Columbia.

Canad. J. Zool., 40, 1019.

BASRUR (V.R.) et ROTHFELS (K.H.), 1959. -

- Triploidy in natural population of the black fly Cnephia mutata (Malloch).

Canad. J. Zool., 37, 571-589.

- BHALLA (S.C.), 1968. -
- White-eye, a new sex linked mutant in Aedes aegypti.
Mosq. News, 28, (3), 380-385.
- BHALLA (S.C.) et CRAIG (G.B.), 1967. -
- Bronze, a female-sterile mutant of Aedes aegypti.
J. Med. Ent., 4, (4), 467-476.
- BHALLA (S.C.) et CRAIG (G.B.), 1970. -
- Linkage analysis of chromosome I of Aedes aegypti.
Can. J. Genet. Cytol., 12, 425-435.
- BRELAND (O.P.), 1961. -
- Studies on the chromosomes of mosquitoes.
Ann. Entomol. Soc. Am., 54, 360-375.
- CHRISTOPHERS (S.R.), 1960. -
- Aedes aegypti (L.) the yellow fever mosquito. Its life history, Bionomics and structure.
Cambridge University Press, 739 pp.
- CHUBAREVA (L.A.), 1968. -
- Triploidy in natural populations of black flies Prosimulium macropyga Lundstr. (Simuliidae : Diptera).
Cytologie, 10, (6), 595-771.
- CHUBAREVA (L.A.) et TZAPYGINA (R.I.), 1965. -
- On the triploids in Natural populations of Odagmia ornata ornata (Simuliidae, Diptera).
Genetics, 166, (3), 576.
- CLEMENTS (A.N.), 1963. -
- The physiology of mosquitoes.
Pergamon Press, Oxford, 393 pp.
- COLUZZI (M.), 1966. -
- Osservazioni comparative sul cromosoma X nelle species A e B del complesso Anopheles gambiae.
R.C. Acad. Lincei, 40, 671-678.
- COLUZZI (M.), 1968. -
- Cromosomi politenici delle cellule nutrici ovariche nel complesso gambiae del genere Anopheles.
Parasitologia, 10, 179-183.
- COLUZZI (M.) et SABATINI (A.), 1967. -
- Cytogenetic observations on species A and B of the Anopheles gambiae complex.
Parasitologia, 9, 73-88.

CRAIG (G.B.), 1963. -

- Prospects for vector control through genetic manipulation of population.

Bull. W.H.O., 29 (suppl.), 87-97.

CRAIG (G.B.), 1967. -

- Mosquitoes : female monogamy induced by male accessory gland substance.

Science, 156, 1499-1501.

CRAIG (G.B.), 1968. -

- Genetic control of Mosquitoes : Progress and Prospects. Acad. Naz. Lincei, 128, conv. Inter. "Nuove prospettive nella lotta contro gli insetti nocivi".

Rome : 16-18 settembre 1968.

CRAIG (G.B.), 1971. -

- Genetic variability in Vectors : Effect on Disease Transmission.

Workshop on Dynamics of the Interaction of Arthropod vector with their hosts and with Infection Agents.

Hamilton, MONTANA

15 septembre 1971. Rap. ronéo.

CRAIG (G.B.) et HICKEY (W.A.), 1961. -

- Genetic plasticity in some African populations of Aedes aegypti.

Bull. ent. Soc. Amer., 7, 174 (Abstr.)

CRAIG (G.B.) et HICKEY (W.A.), 1967. -

- Genetics of Aedes aegypti. Chap. 3 in WRIGHT et PAL. "Genetics of Insect Vectors of Disease".

CRAIG (G.B.) et VANDEHEY (R.C.), 1962. -

- Genetic variability in Aedes aegypti I Mutations affecting color pattern.

Ann. ent. Soc. Amer., 55, 47.

CRAIG (G.B.), VANDEHEY (R.C.) et HICKEY (W.A.), 1961. -

- Genetic variability in populations of Aedes aegypti.

Bull. Wld. Hlth. Org., 24, 527.

CURTIS (C.F.), 1968. -

- A possible genetic method for the control of insect pests, with special reference to tsetse flies (Glossina Spp.).

Bull. Ent. Res., 57, (4), 509-523.

DAVIDSON (G.), 1964. -

- The five mating-types in the Anopheles gambiae complex. Riv. Malar., 43, 167-183.

DAVIDSON (G.) et MASON (G.F.), 1963. -

- Genetics of mosquitoes.

Ann. Rev. Ent., 8, 177.

DAVIDSON (G.), ODETOYINBO (J.A.), COLUSSA (G.) et COZ (J.), 1970. -

- Field attempt to assess the mating competitiveness of sterile males produced by crossing 2 member species of the Anopheles gambiae complex.

Bull. Org. Mond. Santé, 42, (1), 55-67.

DAVIDSON (G.), PATERSON (H.E.), COLUZZI (M.), MASON (G.F.) et MICKS (D.W.), 1967. -

- Anopheles gambiae complex

Chap. 6 in WRIGHT et PAL "Genetics of Insect Vectors of Disease".

DUNBAR (R.W.), 1958. -

- The salivary gland chromosomes of two sibling species of black flies included in Eusimulium aureum Fries.

Canad. J. Zool., 36, 23-44.

DUNBAR (R.W.), 1959. -

- The salivary gland chromosomes of seven forms of black flies included in Eusimulium aureum Fries.

Canad. J. Zool., 37, 495-525.

DUNBAR (R.W.), 1962. -

- Cytotaxonomic studies in Simuliidae.

Ph. D. Thesis, University of Toronto.
Toronto, Ontario.

DUNBAR (R.W.), 1965. -

- Chromosome inversions as blocks to genetic exchange leading to sympatric speciation in black flies (Simuliidae : Diptera):

Proc. Twelfth Int. Congr. Ent., London, 268-269.

DUNBAR (R.W.), 1966a. -

- Four sibling species included in Simulium damnosum Theobald, (Diptera : Simuliidae) from Uganda.

Nature, 209, (5023), 597-599.

DUNBAR (R.W.), 1966b. -

- The salivary gland chromosomes of six closely related Black-flies near Eusimulium congereenarum (Diptera : Simuliidae).

Canad. J. Zool., 45, 377-396.

DUNBAR (R.W.), 1966c. -

- Cytotaxonomic studies in Black flies (Diptera : Simuliidae). Chromosomes to Day, 1, 179-181.

DUNBAR (R.W.), 1969. -

- Nine Cytological Segregates in the Simulium damnosum Complex (Diptera : Simuliidae).

Bull. Org. mond. Santé, 40, 974-979.

DUNBAR (R.W.) et VAJIME (Ch. G.), 1971. -

- Cytotaxonomics Analysis of the Simulium damnosum complex. Bull. WHO/ONCHO. 71-87.

FAY (R.W.) et CRAYG (G.B.), 1969. -

- Genetically marked Aedes aegypti in studies of field population.

Mosq. News., 29, (1), 121-127.

FAY (R.W.) et ELIASON (D.A.), 1966. -

- A preferred oviposition site as a surveillance method for Aedes aegypti.

Mosq. News., 26, (4), 531-535.

FRENCH (W.L.), BAKER (R.H.) et KITZIMILLER (J.B.), 1962. -

- Preparation of mosquito chromosomes.

Mosq. News, 22, 377-383.

- FRIZZI (G.), 1953. -
- Etude cytogénétique d'Anopheles maculipennis en Italie
Bull. Wld. Hlth. Org., 9, 335.
- FUCHS (M.S.), CRAIG (G.B.) et HISS (E.A.), 1968. -
- The biochemical basis of female monogamy in mosquitoes.
I. Extraction of the active principle from Aedes Aegypti.
Life Sciences, 7, 835-839.
- GWADZ (R.W.), CRAIG (G.B.) et KICKEY (W.A.), 1971. -
- Female sexual Behaviour as the Mechanism Rendering Aedes
aegypti Refractory to Insemination.
Biol. Bull., 140, 201-214.
- HAUSERMANN (W.), FAY (R.W.) et HACKER (C.S.), 1971. -
- Dispersal of Genetically Marked Female Aedes aegypti in
Mississippi.
Mosq. News, 31, (1), 37-51.
- HICKEY (W.A.) et CRAIG (G.B.), 1966a. -
Genetic Distorsion of Sex Ratio in a Mosquito, Aedes
aegypti.
Genetics, 53, (6), 1177-1196.
- HICKEY (W.A.) et CRAIG (G.B.), 1966b. -
- Distorsion of Sex Ratio in Populations of Aedes aegypti.
Canad. J. Genetic. Cytol., 8, (2), 260-278.
- HICKEY (W. A.), 1970. -
Factors influencing the distorsion of sex-ratio in Aedes
aegpti.
J. Med. Ent., 7, (6), 727-735.
- HINTON (T.) et ATWOOD (K.C.), 1941. -
- Terminal adhesions of salivary gland chromosomes in
Drosophila.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 27, 491-496.
- IMMER (F.R.), 1930. -
- Formulae and tables for calculating linkage intensities.
Genetics, 15, 81-98.

- KITZMILLER (J.B.), 1953. -
- Mosquito genetics and cytogenetics.
Rev. bras. Malar., 5, 285.
- KITZMILLER (J.B.), 1963. -
- Mosquito cytogenetics : a review of the literature
1953-62.
Bull. Wld. Hlth. Org., 29, 345.
- KITZMILLER (J.B.), 1967. -
- Mosquito cytogenetics.
Chap. 4 in WRIGHT et PAL "Genetics of Insect Vectors
of Disease".
- KITZMILLER (J.B.) et FRENCH (W.L.), 1961. -
- Chromosomes of Anopheles quadrimaculatus.
Amer. Zool., 1, 366.
- KITZMILLER (J.B.) et FRIZZI (G.), 1954. -
- A survey of chromosomal complements in several spe-
cies of mosquitoes (Diptera-Culicidae).
Atti del IX Congresso Internazionale di Genetica,
667-682.
- KITZMILLER (J.B.) et KEPPLER (W.J.), 1961. -
- Salivary gland chromosome maps in Culex pipiens pi-
piens.
Genetics, 46, 875-876.
- KITZMILLER (J.B.), FRIZZI (G.) et BAKER (R.H.), 1967. -
- Evolution and speciation within the maculipennis
complex of the genus Anopheles.
Chap. 5 in WRIGHT et PAL "Genetics of Insect Vectors
of Disease".
- KLASSEN (W.), FRENCH (W.L.), LAVEN (H.) et KITZMILLER (J.B.),
1965. -
- The salivary chromosomes of Anopheles quadrimacula-
tus Say.
Mosq. News, 25, 328-334.
- KNIPPLING (E.F.), 1964. -
- The sterility principle of insect population control.
Proc. Twelfth Inter. Cong. Ent., London.

KNIPPLING (E.F.), 1967. -

- Sterile technique - principles involved, current application, limitations, and future application. Chap. 20 in WRIGHT et PAL "Genetics of Insect Vectors of Disease".

KNIPPLING (E.F.), LAVEN (H.), CRAIG (G.B.), PAL (R.), KITZMILLER (J.B.), SMITH (C.N.) et BROWN (A.W.A.), 1968. -

- Genetic control of insects of public health importance. Bull. Wld. Hlth. Org., 38, 421-438.

KREUTZER (R.D.) et KITZMILLER (J.B.), 1971. -

- Chromosomal similarity between Anopheles perplexens and Anopheles punctipennis. Mosq. News., 31, (3), 409-415.

KRISHNAMURTHY (B.S.), RAY (S.N.) et JOSHI (G.C.), 1963. -

- A note on preliminary field studies of the use of irradiated males for reduction of C. fatigans wild population. WHO. Vector Control., 1/63/14.

KUNZE (E.), 1953. -

- Artunterschiede in Ban der Riesenchromosomen in der Gattung Simulium Latr. Osterr. Zool. Z., 4, 23-32.

LA CHANCE (L.E.) et KNIPPLING (E.F.), 1962. -

- Control of Insect populations through genetic manipulations. Ann. Entomol. Soc. Amer., 55, 515-520.

LAVEN (H.), 1957. -

- Vererbung durch Kernegeue und das problem der ausserkaryotischen Vererbung bei Culex pipiens. II. Ausserkaryotische Vererbung. Z. Vererbungslehre, 88, 478-516.

LAVEN (H.), 1967a. -

- Eradication of Culex pipiens fatigans through cytoplasmic incompatibility. Nature, 216, (5113), 383-384.

LAVEN (H.), 1967b. -

- Speciation and Evolution in Culex pipiens. Chap. 7 in WRIGHT et PAL "Genetics of Insect Vectors of Disease".

LAVEN (H.), 1969. -

- Eradicating mosquitoes using translocations.
Nature, 221, 958-959.

LAVEN (H.), COUSSERANS (J.) et GUILLE (G.), 1971.-

- Inherited semisterility for control of harmful insects.
III. A first field experiment.
Experientia, 27, 1355-1357.

LORIMER (N.), HALLIMAN (E.) et RAI (K.S.), 1972. -

- Translocation homozygotes in the yellow fever mosquito,
Aedes aegypti.
J. of Heredity (sous presse).

MAC CLELLAND (G.A.H.), 1962a. -

- A contribution to the genetics of the mosquito Aedes aegypti
with particular reference to factors determining colour.
Thesis University of London, 267 pp.

MAC CLELLAND (G.A.H.), 1962b.-

- Eye pigments and sex linkage in Aedes aegypti.
Bull. ent. Soc., 8, 162.

MAC CLELLAND (G.A.H.), 1962c.-

- Genetical control of abdominal scale colour in Aedes aegypti.
Bull. ent. Soc. Amer., 8, 163.

MAC CLELLAND (G.A.H.), 1962d.-

- Sex-linkage in Aedes aegypti.
Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg., 56, 4.

MAC CLELLAND (G.A.H.); 1966.-

- Partial sex-linkage at two loci affecting eye pigment in the
mosquito Aedes aegypti (Diptera : Culicidae).
Canad. J. Genet. Cytol., 8, (2), 192-198.

MAC DONALD (P.T.) et RAI (K.S.), 1971.-

- Population control potential of heterozygous translocation as
determined by computer simulation.
Bull. Wld. Hlth. Org., 44, 829-845.

MAC DONALD (W.W.), 1962a.-

- The selection of a strain of Aedes aegypti susceptible to in-
fection with semi-periodic Brugia malayi.
Ann. trop. Med. Parasitol., 56, 363-372.

MAC DONALD (W.W.), 1962b. -

- The genetic basis of susceptibility to infection with semi-periodic Brugia malayi in Aedes aegypti.

Ann. trop. Med. Parasitol., 56, 373-382.

MAC DONALD (W.W.), 1963a. -

- Further studies on a strain of Aedes aegypti susceptible to infection with sub-periodic Brugia malayi.

Ann. trop. Med. Parasitol., 57, 452-460.

MAC DONALD (W.W.), 1963b. -

- A preliminary cross-over value between the gene fm (filarial susceptibility, Brugia malayi) and the sex locus in Aedes aegypti.

Ann. trop. Med. Parasitol., 57, 461-465.

MAC DONALD (W.W.), 1967. -

- The influence of Genetic and Other Factors on Vector Susceptibility to Parasites.

Chap. 19 in "Genetics of Insects Vector of Disease" de WRIGHT et PAL.

MAC DONALD (W.W.) et SHEPPARD (P.M.), 1965. -

- Crossover values in the sex chromosomes of the mosquito Aedes aegypti and evidence of the presence of inversions.

Ann. trop. Med. Parasitol., 59, 74-87.

MATTINGLY (P.F.), 1957. -

- Genetical aspects of the Aedes aegypti problem. I. Taxonomy and bionomics.

Ann. trop. Med. Parasitol., 51, 392.

MATTINGLY (P.F.), 1958. -

- Genetical aspects of the Aedes aegypti problem. II. Disease relationships, Genetics and control.

Ann. trop. Med. Parasitol., 52, 5.

MESCHER (A.L.), 1963. -

- A comparative analysis of the morphology and post-embryonic development of the salivary glands of Aedes aegypti (L.) (Diptera : Culicidae).

Thesis, University of Notre-Dame, Ind., 108 pp.

MONTALENTI (G.), 1947. -

- L'assetto cromosomico e l'interferenza dei chiasmi nelle spermatogenesi di Simulium equinum L. (Diptera, Simuliidae).

R.C. Acad. Lincei, 8, (2), 471-474.

MORGAN (T.H.), 1911. -

- Random Segregation Versus Gametic Coupling in Mendelian Inheritance.

Science, 1911.

MORLAN (H.B.), MAC CRAY (E.M.) et KILPATRICK (J.W.), 1962. -

- Fields tests with sexually sterile males for control of Aedes aegypti.

Mosq. News, 22, (3), 295-300.

NARANG (S.) et KITZMILLER (J.B.), 1971. -

- Esterase polymorphism in a natural population of Anopheles punctipennis. II Analysis of Est-C System.

Can. J. Genet. Cytol., 13, 771-776.

OVAZZA (M.), 1971. -

- Notes sur l'étude cytotaxonomique des Simulies et en particulier de S. damnosum (basées sur un séjour de deux semaines dans le Service du Pr. R.W. DUNBAR, à University of Western Ontario, London, Ontario, CANADA).

PATERSON (H. E.), 1964. -

- Direct evidence for the specific distinctness of forms A, B and C of the Anopheles gambiae complex.

Riv. Malar., 43, 191-196.

QUINN (T.C.) et CRAIG (G.B.), 1971. -

- Phenogenetics of the Homeotic Mutant Proboscipedia in Aedes albopictus.

J. Hered., 62, (1), 2-12.

- RAI (K.S.), 1961. -
- Distinctive karyotypes in some genera of mosquitoes.
Bull. ent. Soc. Amer., 7, 174.
- RAI (K.S.), 1963a. -
- A comparative study of mosquito karyotypes.
Ann. Entomol. Soc. Amer., 56, 160-170.
- RAI (K.S.), 1963b. -
- A cytogenetic study of the effects of X irradiation on
Aedes aegypti.
Caryologia, 16, 595-607.
- RAI (K.S.), 1964a. -
- Cytogenetic effects of chemosterilants in mosquitoes.
I. Apholate-induced aberrations in the somatic chromosomes
of Aedes aegypti (L.).
Cytologia, 29, 346-353.
- RAI (K.S.), 1964b. -
- Cytogenetic effects of chemosterilants in mosquitoes.
III Mechanism of apholate-induced changes in fecundity and
fertility of Aedes aegypti (L.).
Biol. Bull., 127, 119-131.
- RAI (K.S.), 1965. -
- Cytogenetics of chemosterilants-induced sterility in Aedes
aegypti.
Proc. XII Intern. Cong. Entom., London, 255-56.
- RAI (K.S.), 1967. -
- Techniques for the Study of Cytogenetics and Genetics of
Vectors. Chap. 23 in WRIGHT et PAL "Genetics of Insects
Vectors of Disease".
- RAI (K.S.), 1968. -
- Recent advances in cytogenetic studies of the mosquito
Aedes aegypti.
Proc. of XII Int. Cong. Ent., Moscou, 2-9/8/68.
- RAI (K.S.), 1969. -
- Status of the sterile male technique for mosquito control.
Pp 104-114. In "Sterile male Technique for Eradication or
Control of Harmful Insects".
Internat. Atomic Energy Agency Press, Vienna, Austria.

RAI (K.S.), 1971. -

- Studies on genetic manipulation of the mosquito, Aedes aegypti.

Report to the World Health Organisation (Rap. Ronéo.)

RAI (K.S.) et ASMAN (Sr. M.), 1968. -

- Possible application of a reciprocal translocation for genetic control of the mosquito, Aedes aegypti.

Proc. XII Internat. Cong. of Genetics, Tokyo, JAPAN, 1,164

RAI (K.S.) et CRAIG (G.B.), 1961. -

- A study of the karyotypes of some mosquitoes.

Genetics, 46, 891.

RAI (K.S.), GROVER (K.K.) et SUGUNA (S.G.), 1972. -

- Studies on genetic manipulation of the mosquito, Aedes aegypti.

Bull. Wld. Hlth Org. (sous presse)

RAI (K.S.), MAC DONALD (P.T.) et ASMAN (Sr.M.), 1970. -

- Cytogenetics of two radiation-induced; sex linked translocations in the yellow-fever mosquito, Aedes aegypti.

Genetics, 66, 635-651.

RAI (K.S.) et MAC DONALD (P.T.), 1971. -

- Chromosomal translocations and Genetic control of Aedes aegypti. Pp 437-452.

In "the Sterility Principle for Insect Control or Eradication".

Internat. Atomic Energy Agency Press, Vienna, Austria.

RODRIGUEZ (P.M.), 1972. -

- Distribution of Filarial Susceptibility in Field Populations and Laboratory Strains of Aedes aegypti.

Workshop on Development of Filariose in Mosquitoes, UCLA, Los Angeles, 20-22 Mars 1972.

ROTHFELS (K.H.), 1956. -

- Black-flies : Siblings, sex and Species grouping.

J. Hered, 45 (3), 113-122.

ROTHFELS (K.H.), 1970. -

- Cytotaxonomies studies on Simulium venustum and related biting flies.

Interim Report on EMR 5901 (101) du 14 septembre 1970.

- ROTHFELS (K.H.) et FREEMAN (M.), 1966. -
- The salivary gland chromosomes of three North American species of Twinnia (Diptera : Simuliidae).
Canad. J. Zool., 44, 937-945.
- ROZEBOOM (L.E.) et KITZMILLER (J.B.), 1958. -
- Hybridization and speciation in mosquitoes.
Ann. Rev. Ent., 3, 231..
- SEREBROVSKII (A.S.), 1940. -
- On the possibility of a new method for the control of insect pests.
Zool. Zh., 19, 618.
- SHCHERBAKOV (E.S.) et CHUBAREVA (L.A.), 1965. -
- New microchromosomal karyotypes of black flies. (Simuliidae, Diptera).
Genetics, 166, (3), 725-728.
- SPIELMAN (A.), LEAHY (M.G.) et SKAFF (V.), 1967. -
- Seminal loss in repeatedly mated female Aedes aegypti.
Biol. Bull., Woods Hole, 132, 404-412.
- SUTTON (E.), 1942. -
- Salivary gland type chromosomes in mosquitoes.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 28, 268-272.
- TREBATOSKI (A.M.) et HAYNES (J.F.), 1969. -
- Comparison of Enzymes of Twelve Species of Mosquitoes.
Ann. Ent. Soc. Amer., 62, (2), 327-335.
- VANDEHEY (R.C.), 1967. -
- Inheritance of pigmented larval head capsules in Culex pipiens.
Mosq. News, 27, 69-73.
- WEIDHAAS (D.E.), SCHMIDT (CH.) et SEDROOK (E.L.), 1962. -
- Field studies on the release of sterile males for the control of Anopheles quadrimaculatus.
Mosq. News., 22, (3), 283-291.
- WILD (A.), 1963. -
- A red eye colour mutation in Culex pipiens after X- irradiation.
Nature, 200, 917-918.

World Health Organization, 1964. -

- Genetics of Vectors and Insecticide Resistance.
Report of a WHO Scientific group
Genève - WHO Tech. Rep. Ser. : 268, 40 pp.

WRIGHT (J.W.) et PAL (R.), 1967. -

- Genetics of Insect vectors of Disease.
Elsevier Pub. Co., N.Y., 794 pp.

Planche 1

DISSECTION DES LARVES D'ANOPHELES ET PREPARATION DES GLANDES SALIVAIRES

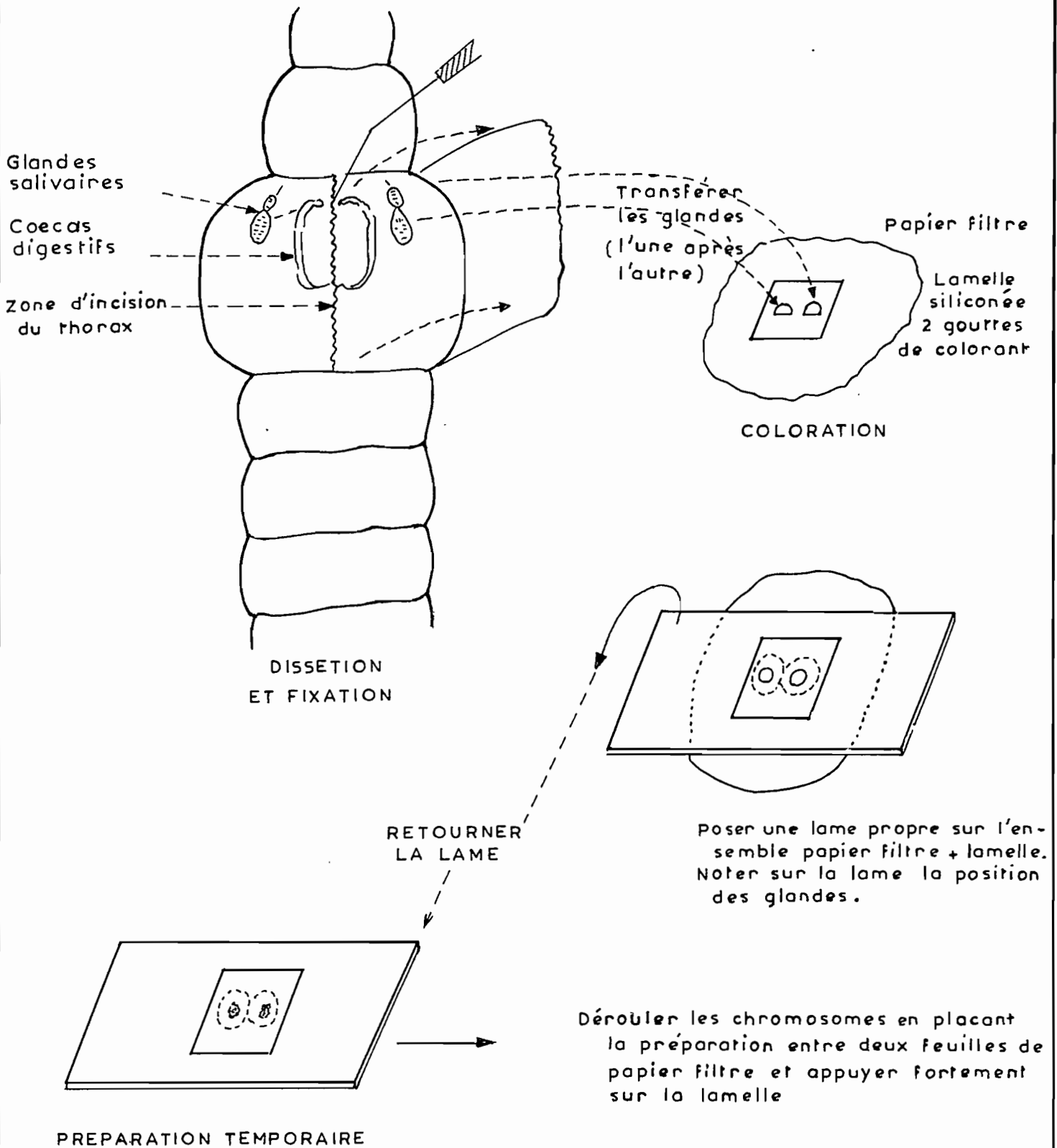


FIG. 3
SALIVARY CHROMOSOME COMPLEMENT OF A PSEUDOPUNCTTIPENNIS



Pseudopunctipennis N. pulcherrima

ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

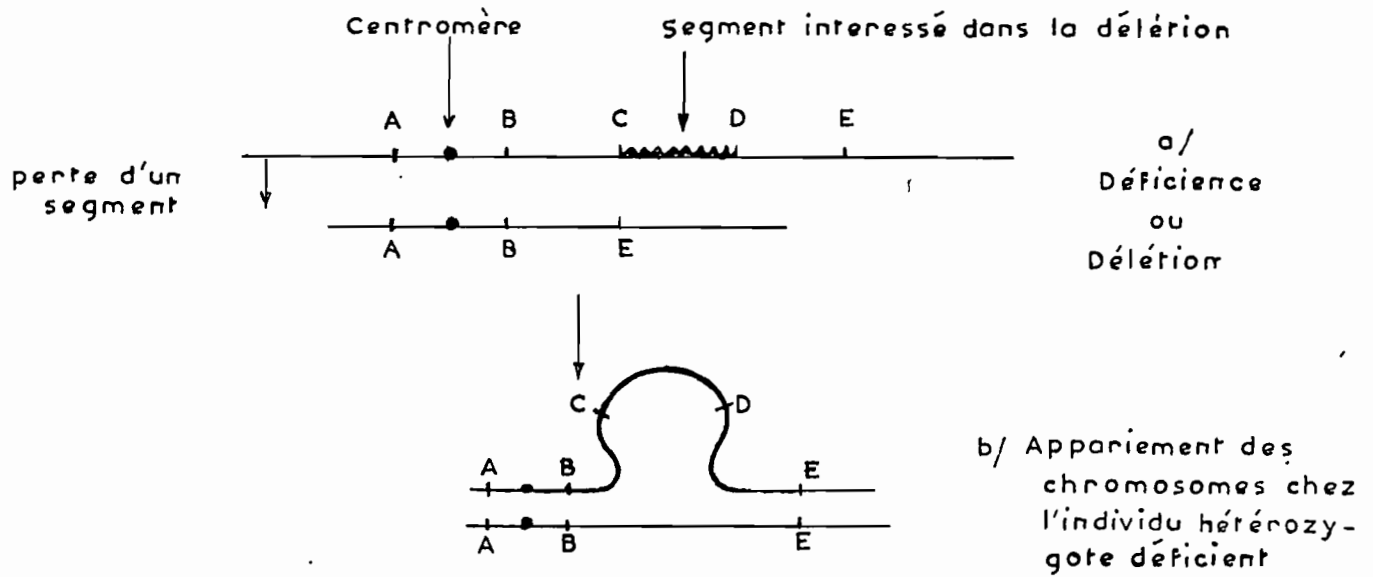


Figure 4 - DELETION

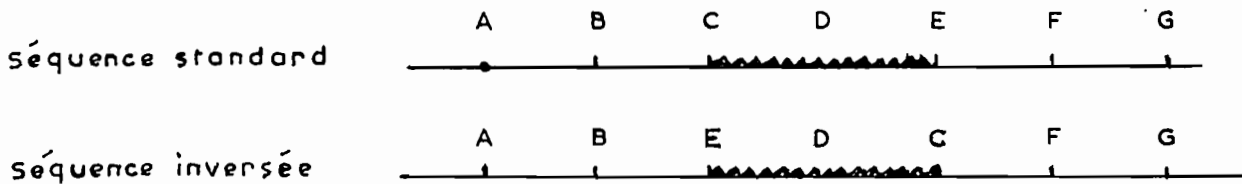
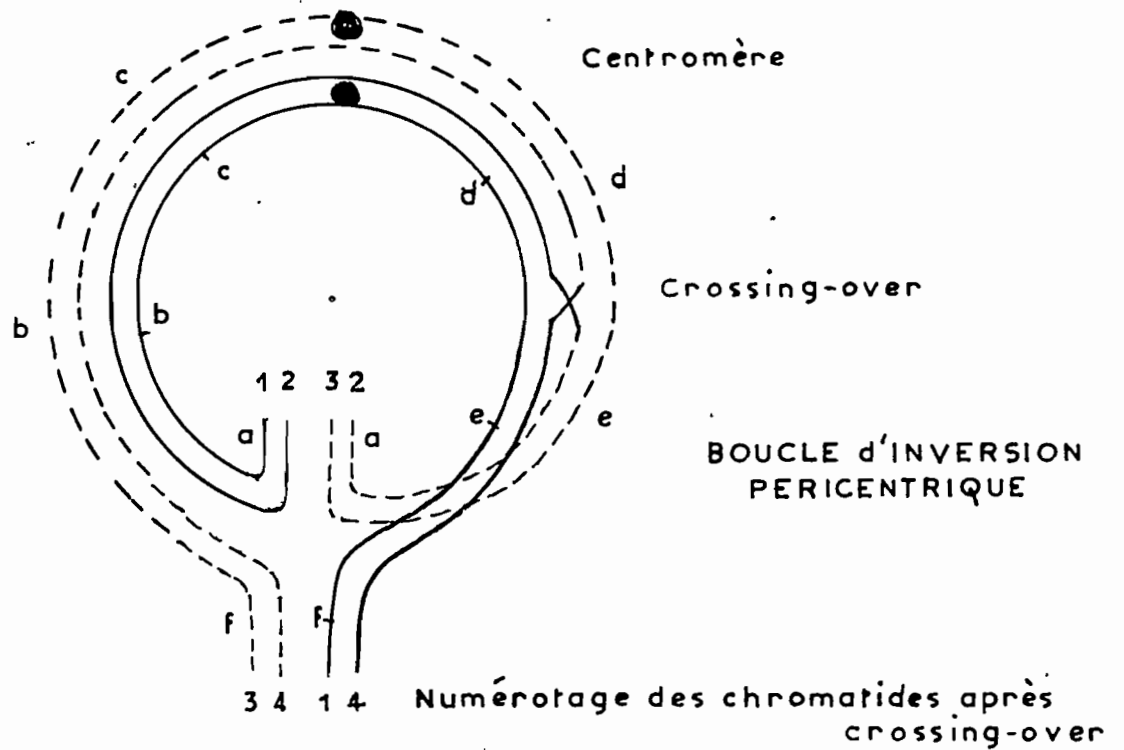


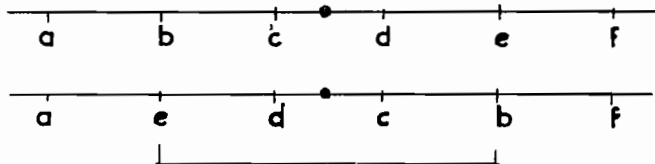
Figure 5 - INVERSION

Planche 6

INVERSION PERICENTRIQUE



Standard
inversé



inversion
péricentrique b-c

INVERSION PERICENTRIQUE

CROSSING-OVER

Chromatide 1 a b c d e f Normal

Chromatide 2 a b c d e a

Chromatide 3 a e d c b f inversé

Chromatide 4 f e d c b f

{ Duplication a
Déficiency f

{ Duplication f
Déficiency a

Planche 7

INVERSION PARACENTRIQUE

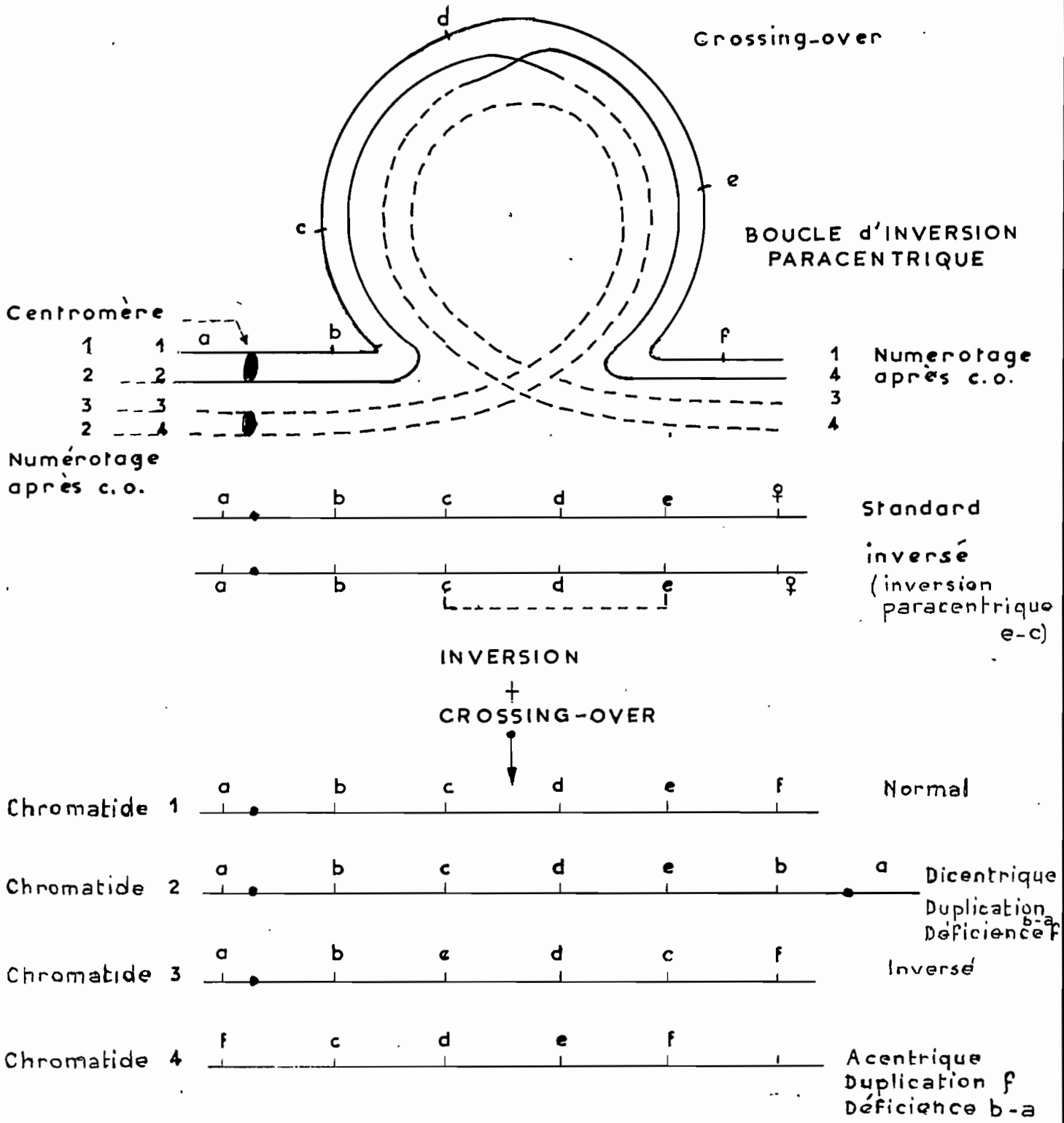


Planche 8

DISSECTION DES LARVES D'AEDES AEPYPTI ET PREPARATION DES GLANDES SALIVAIRES

d'après MESCHER

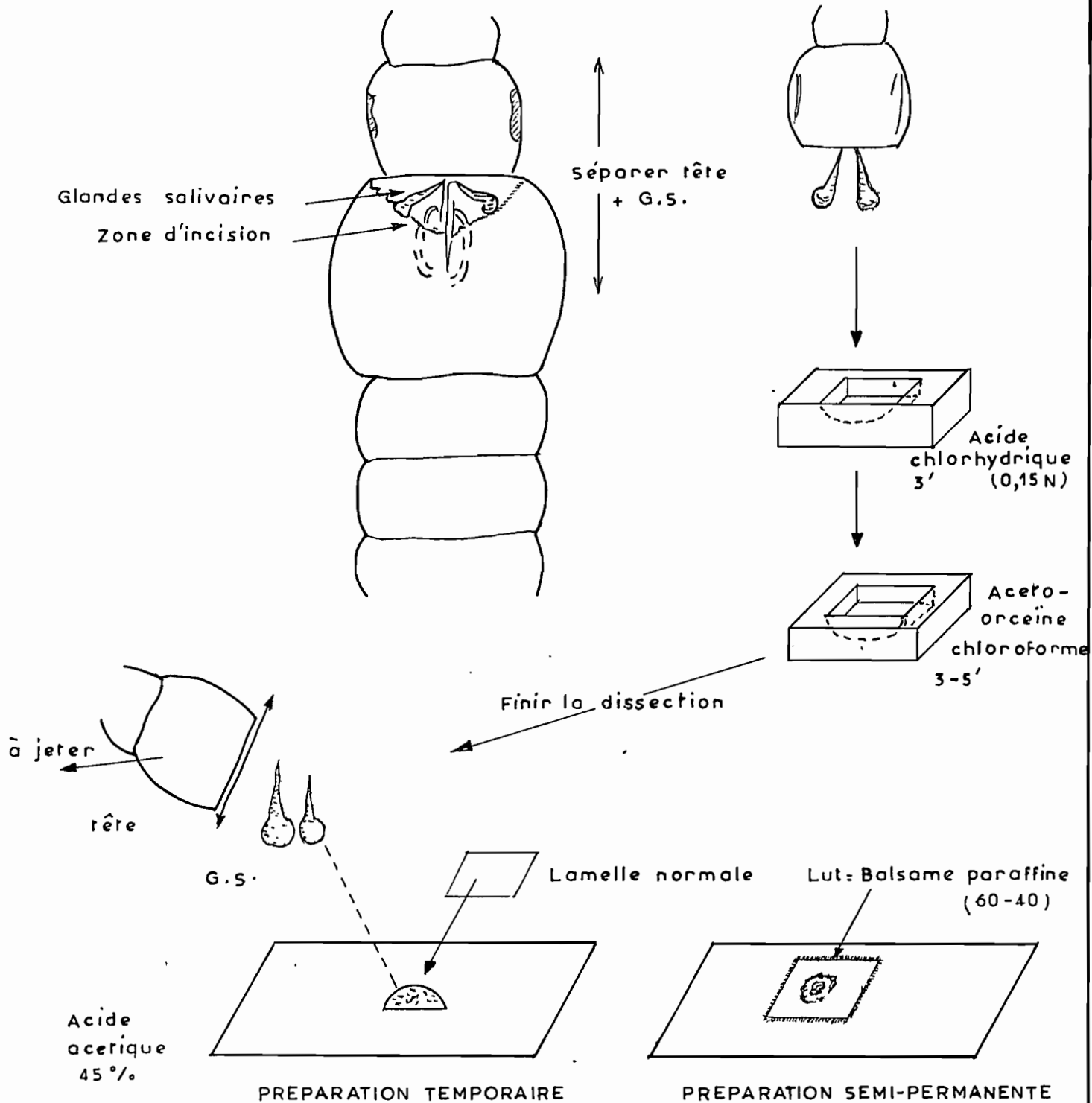
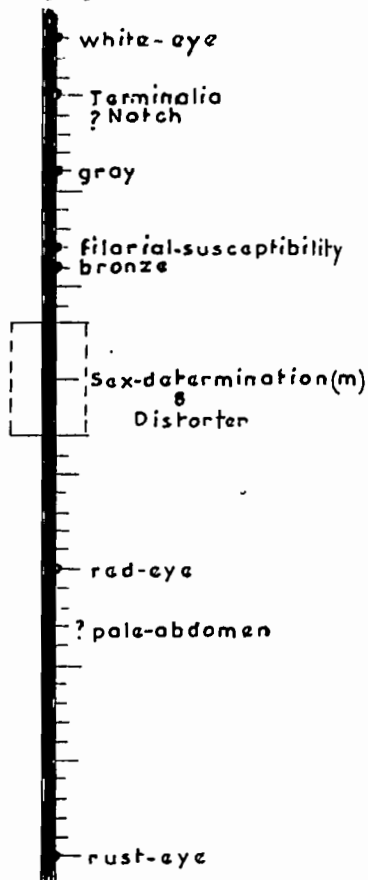


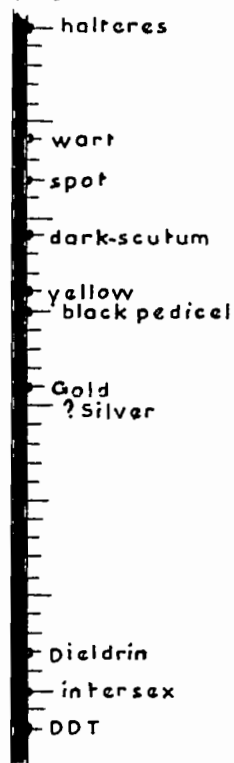
Planche 9

CARTÉ GENIQUE D'AEDES AEGYPTI (d'après GRAIG et HICKEY, 1967)

Linkage groupe 1



Linkage groupe 2



Linkage groupe 3

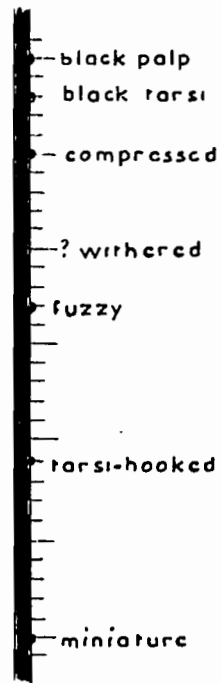
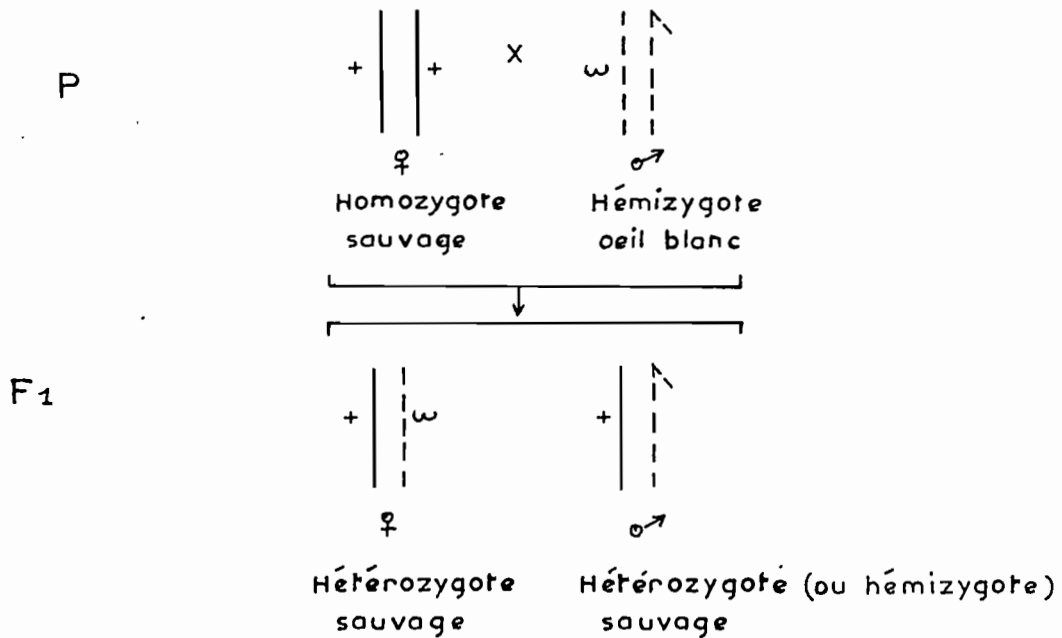
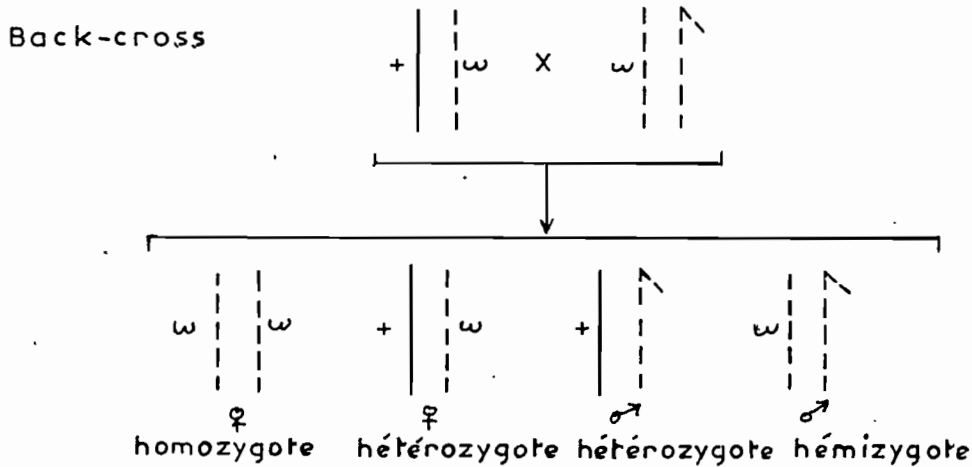


Planche 10 a

TRANSMISSION DES CARACTERES LIES AU SEXE (Sex - Linked inheritance)



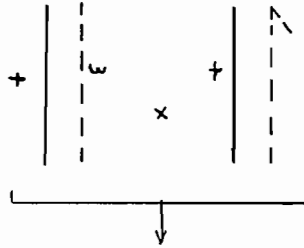
[Le ♂ ne transmet son chromosome X qu'aux descendants ♀]



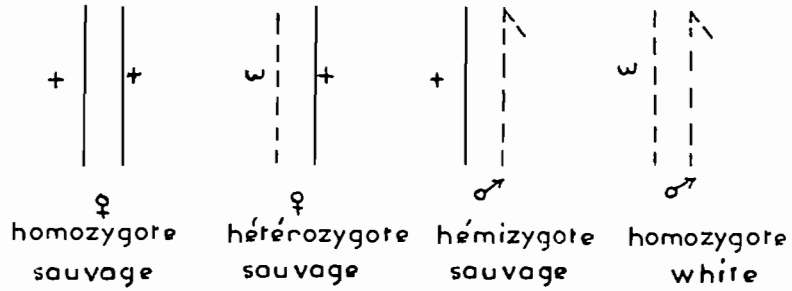
Observations: la ♀ (XX) peut donc être homozygote ou hétérozygote pour n'importe quel gène lié au sexe.

Planche 10b

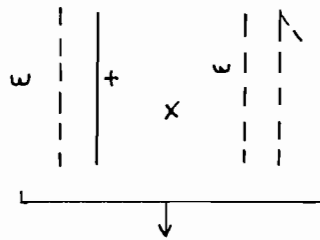
F₁



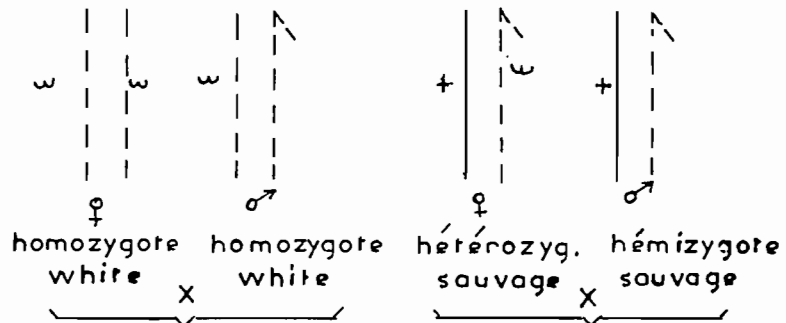
F₂



(Le ♂ hérite toujours souche X de sa mère)



F₃



F₄

individus rous
de type white

Croisement identique à F₁

Planche 10c

TRANSMISSION DES CARACTERES LIES AU SEXE " Sexe - Linked inheritance "

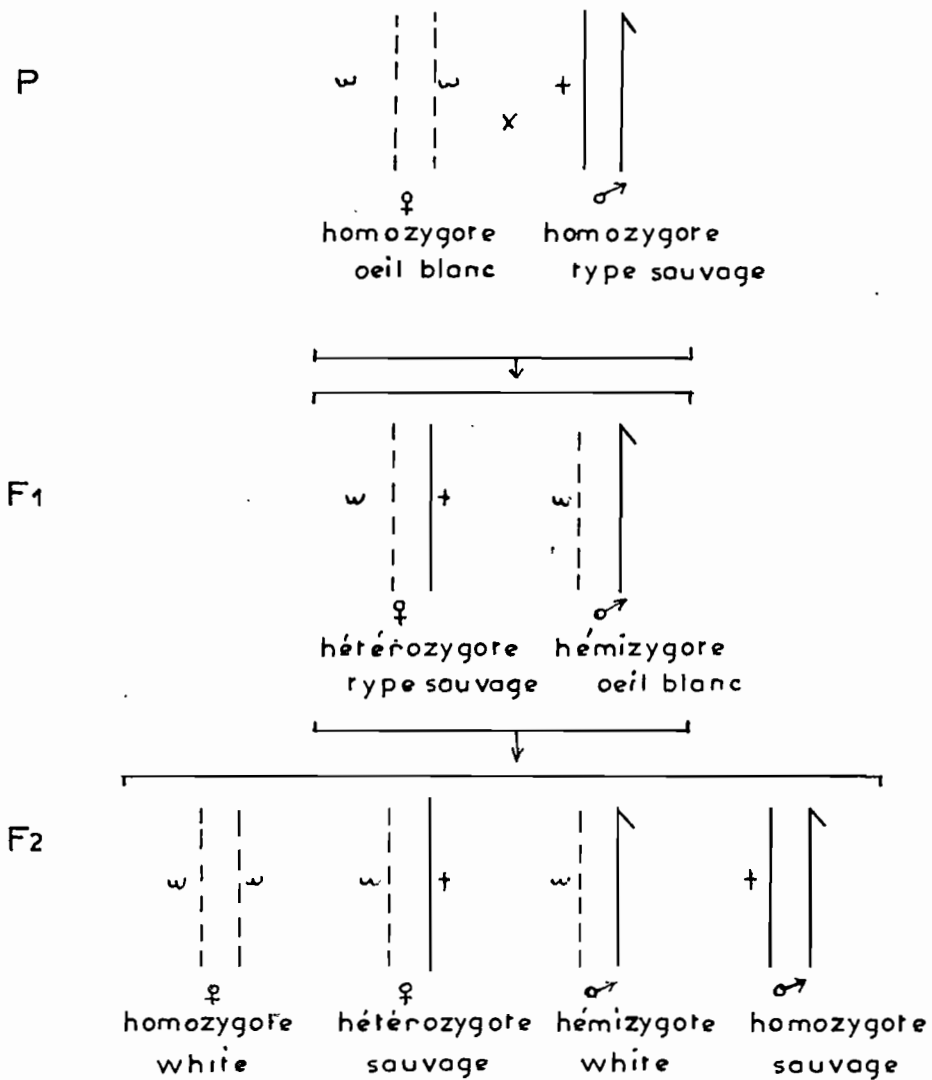
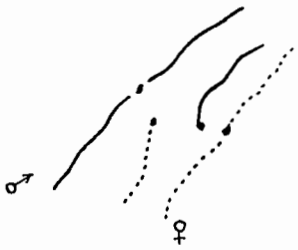
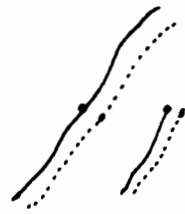


Planche 11

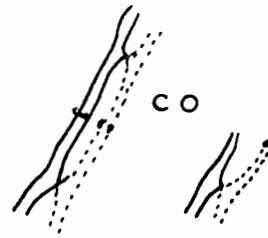
PHENOMÈNE DE CROSSING-OVER



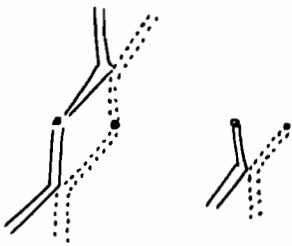
Prophase I
st. Leptotène



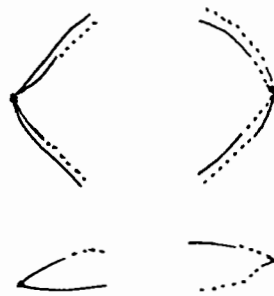
Prophase I
st. Zygotène



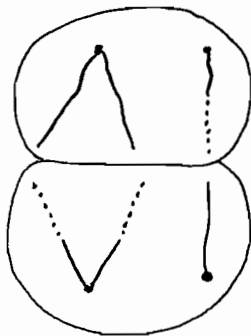
Prophase I
st. Diplotène



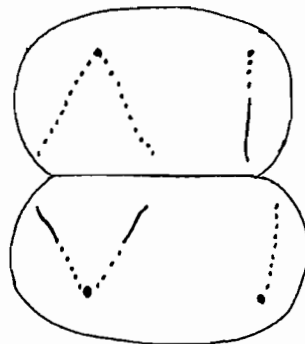
Métaphase I



Anaphase I



Anaphase II



4 Cellules Filles

Planche 12

OBTENTION D'UNE SOUCHE PURE

P	Aa x Aa 100%			Homozygotes AA+aa 0%
F ₁	A A 1/4	Aa 1/2	a a 1/4	50%
F ₂	3/8	2/8	3/8	75%
F ₃	7/16	2/16	7/16	87,5%
F ₄	15/32	2/32	15/32	93,75%
F ₅	31/64	2/64	31/64	96,87%
F ₆	63/128	2/128	63/128	98,45%
F ₇	$\frac{(2^n) - 1}{2^{n+1}}$	$\frac{2}{2^{n+1}}$	$\frac{(2^n) - 1}{2^{n+1}}$	$100 \frac{2^{n+1} - 2}{2^{n+1}}$

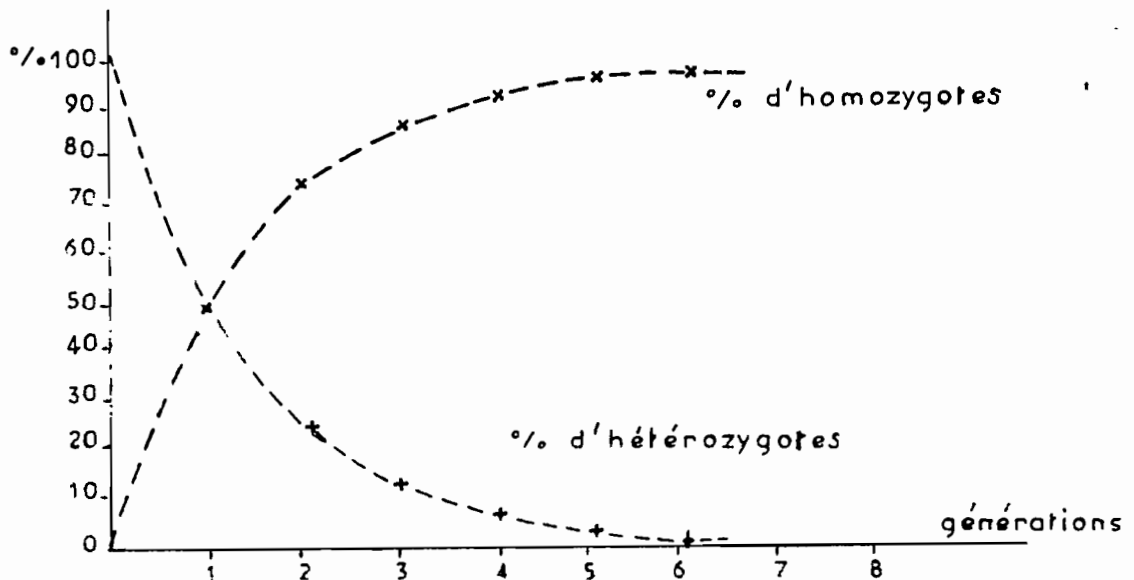


Planche 13

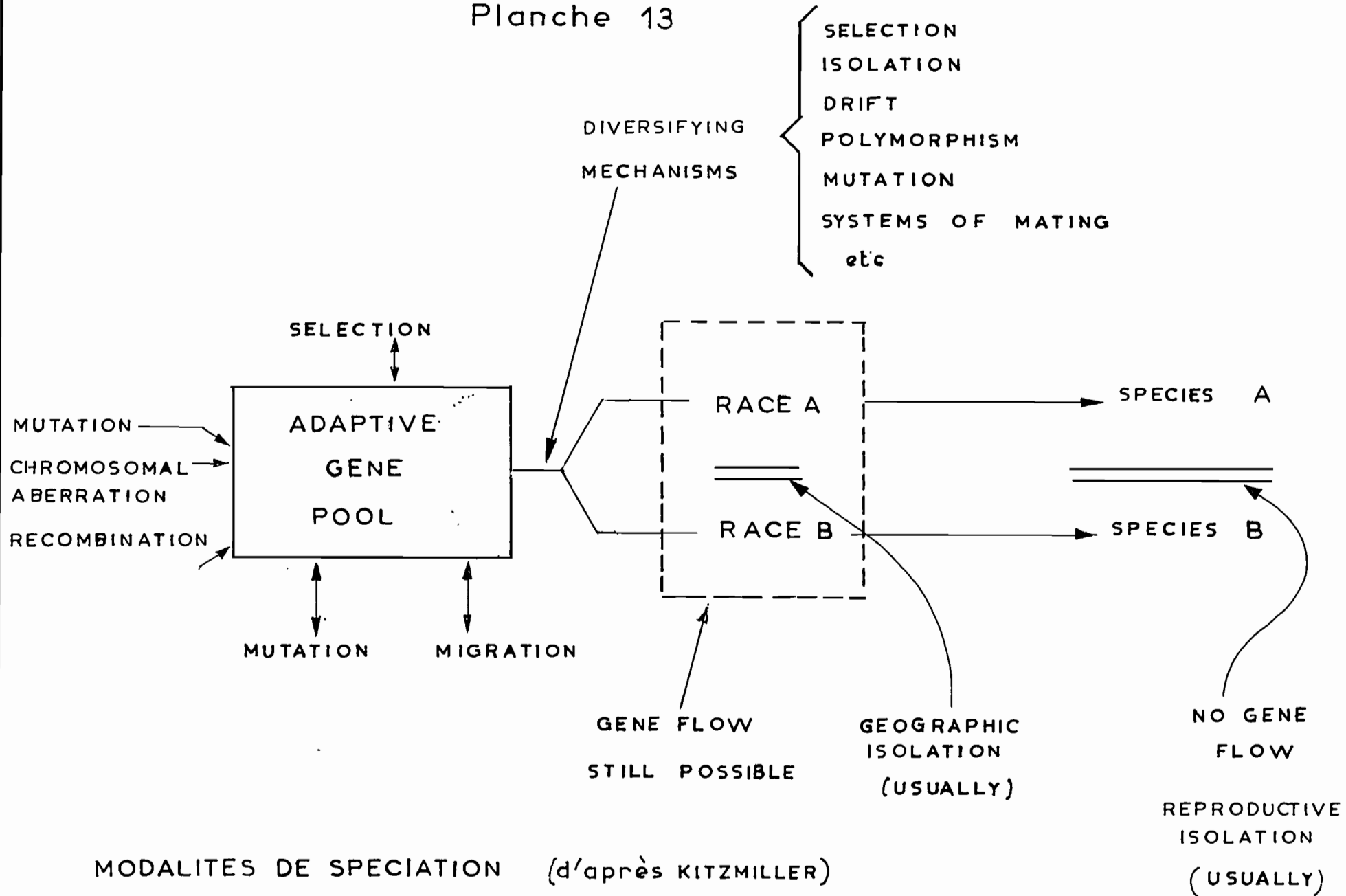
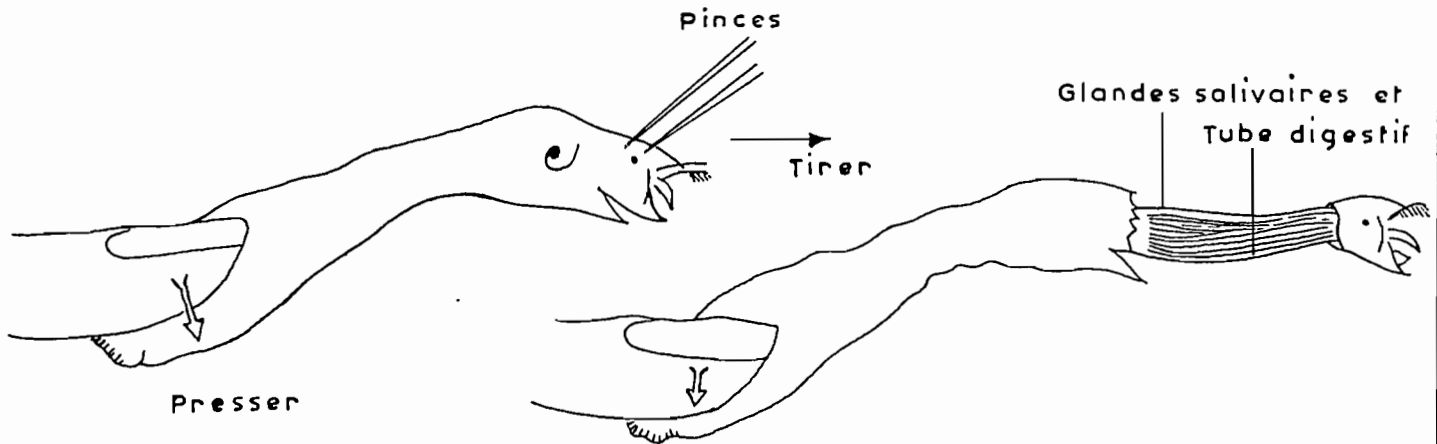
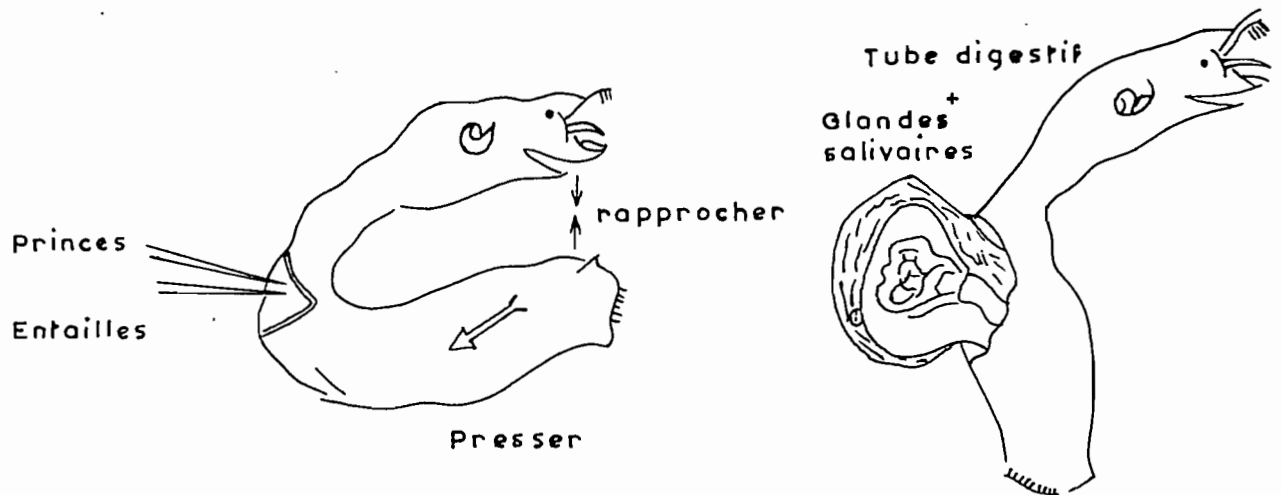


Planche 14

DISSECTION DES LARVES DE SIMULIES

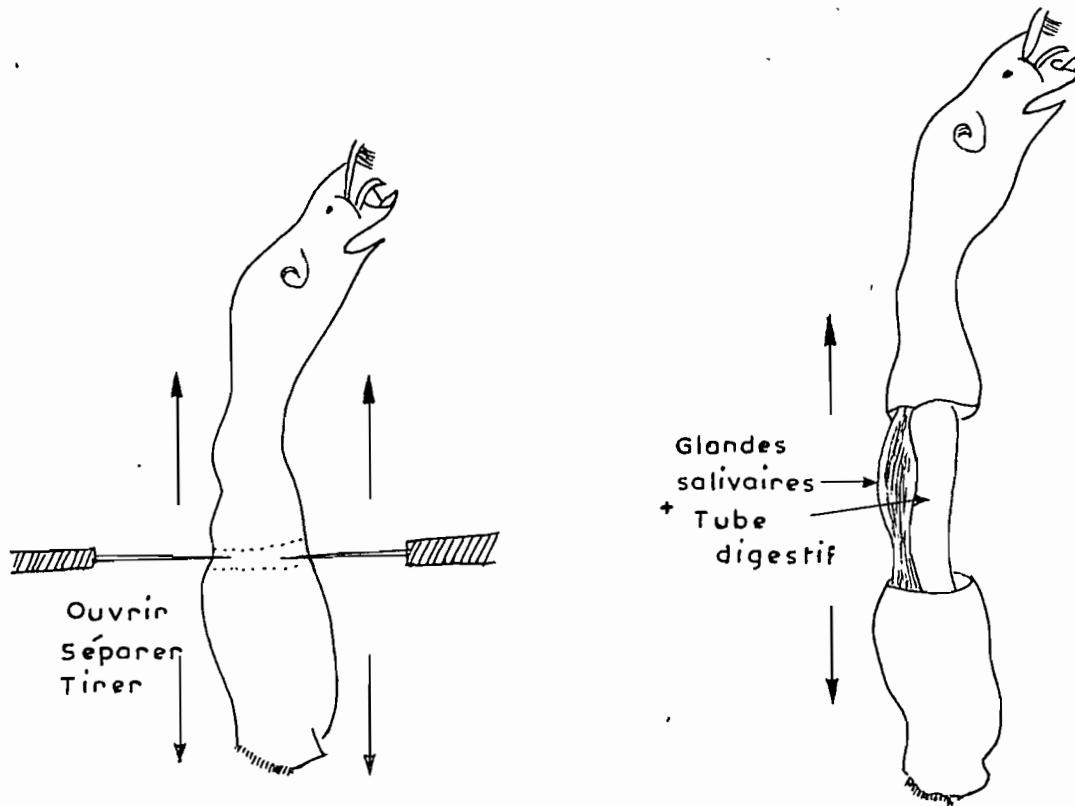


14 a - TECHNIQUE "PUSH AND PULL" DE NEWMAN



14 b - TECHNIQUE DE DUNBAR ET ROTHFELS

Planche 14 (suite)



14 c - TECHNIQUE OUVRIR ET TIRER

Planche 15

REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES 3 CHROMOSOMES
de *Prosimulium fuscum* $n = 3$
(d'après ROTHFELS)

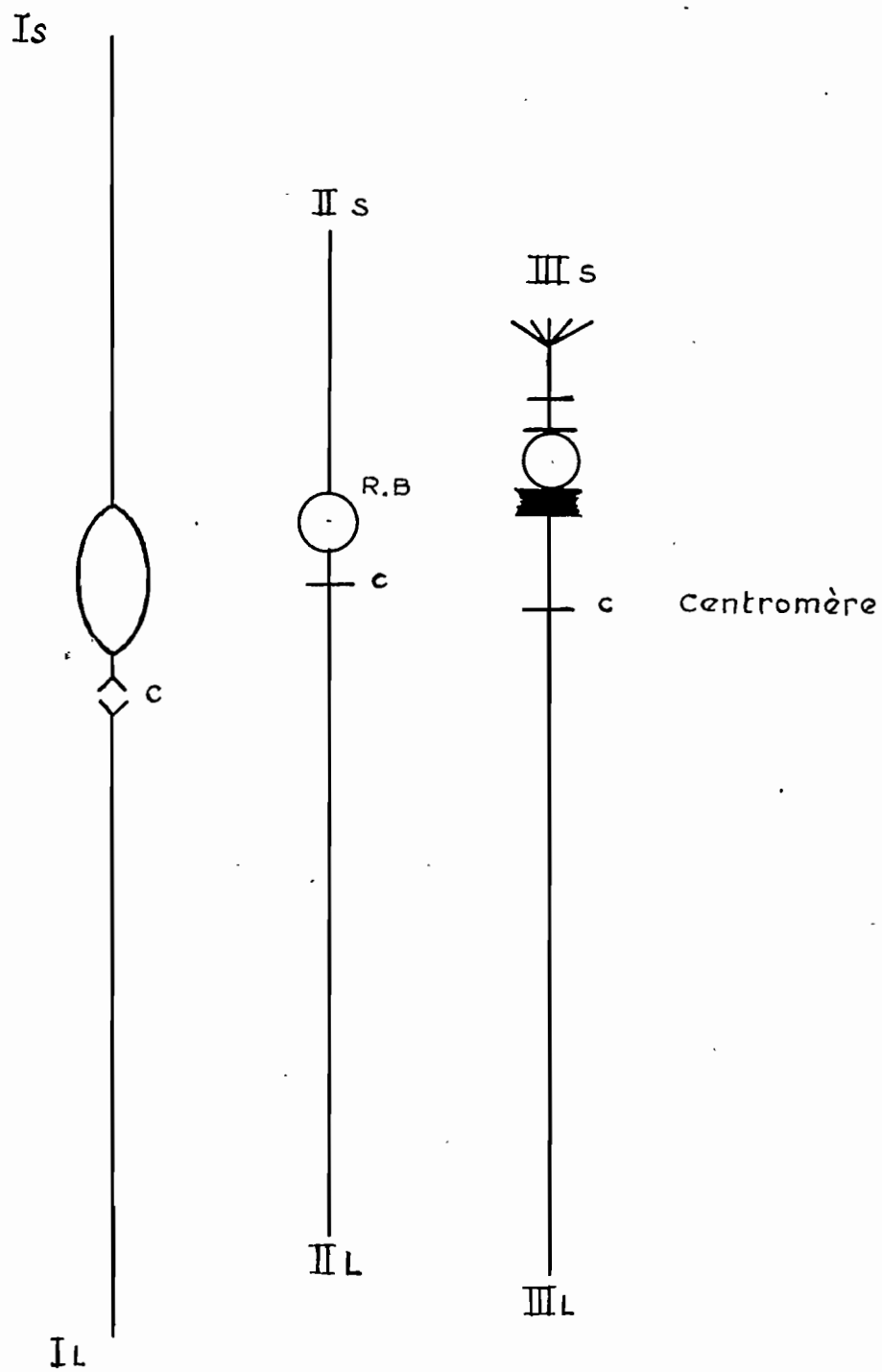
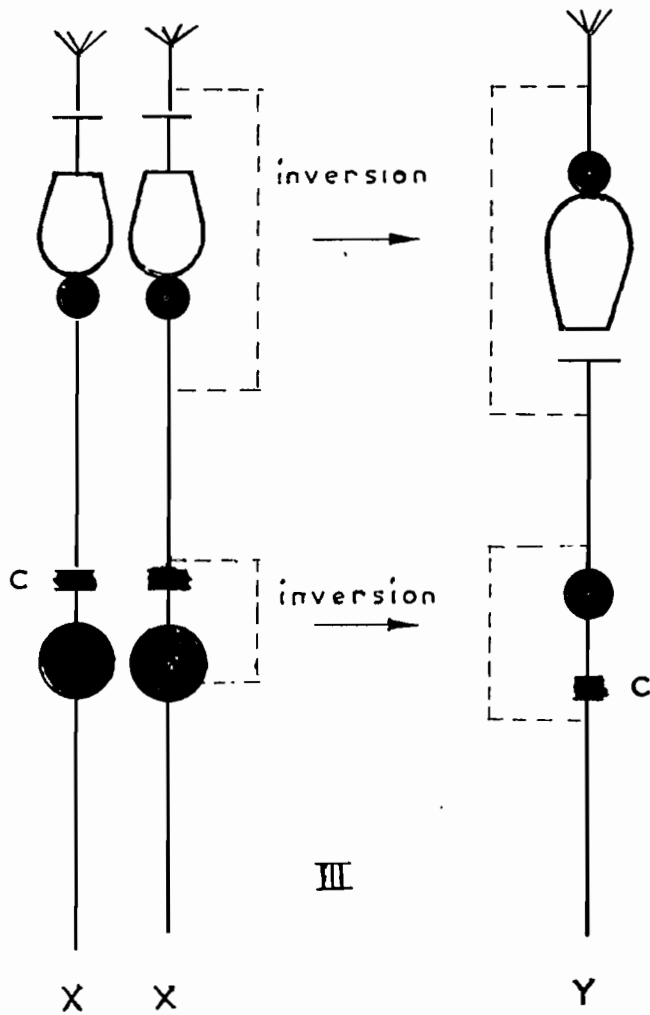


Planche 16

DETERMINATION DU SEXE CHEZ P. fuscum

Chromosome III



♀

SCHEMA DE L'INVERSION
(d'après ROTHFELS)

PL. 16 a

CARTOGRAPHIE DE
L'INVERSION
(observation personnelle)

PL. 16 b

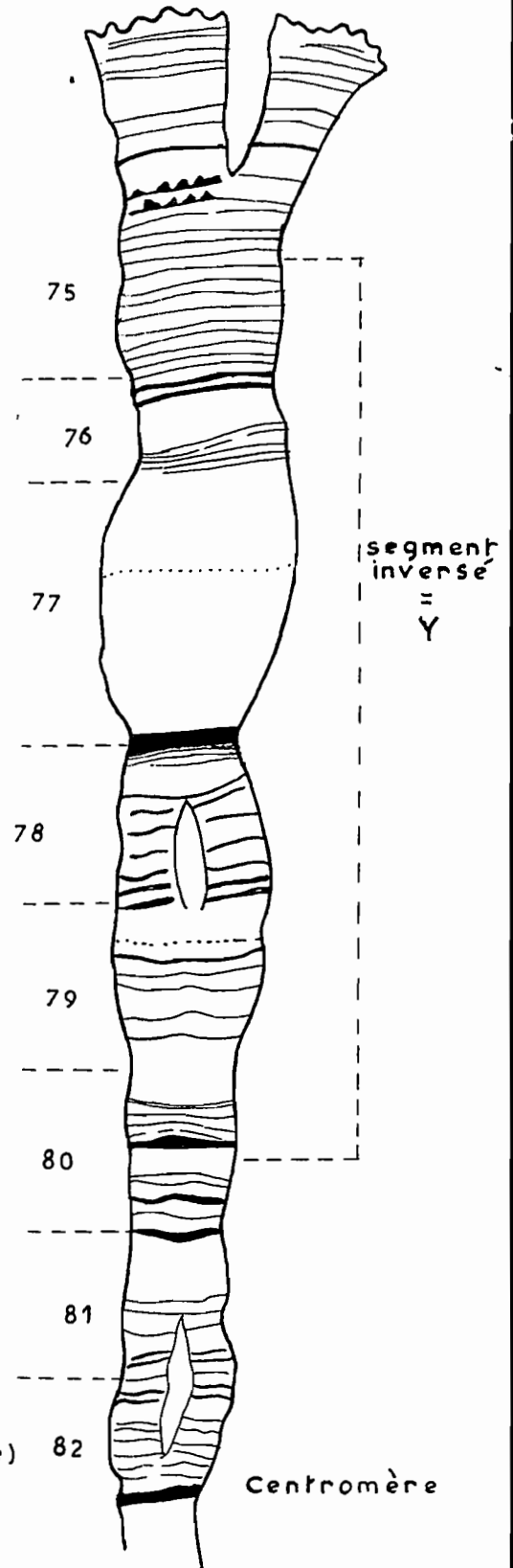
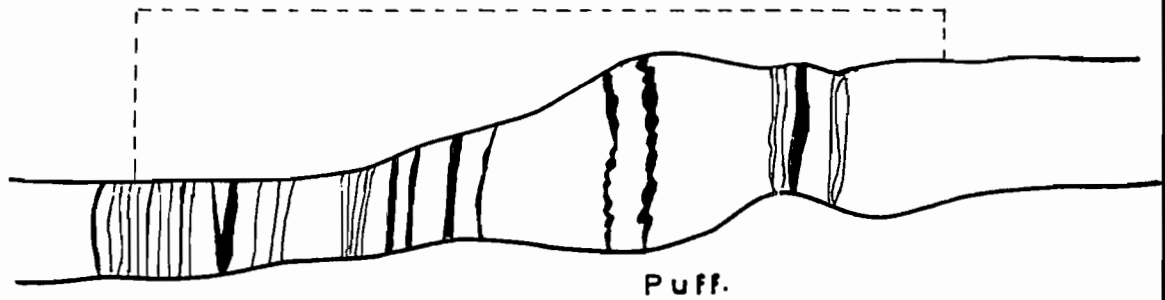


Planche 17

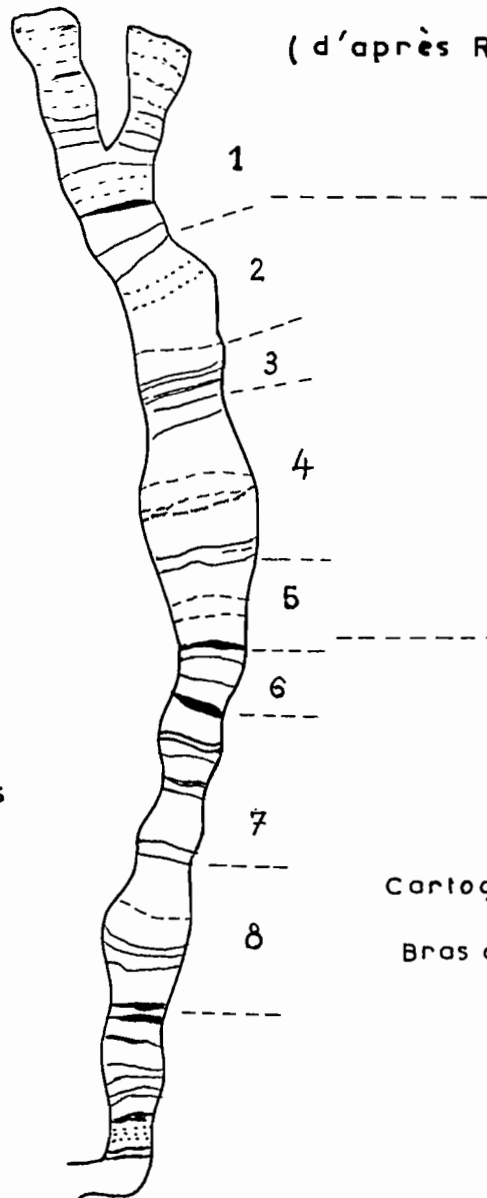
POLYMORPHISME INTERESSANT UNE INVERSION
AUTOSOMALE : chromosome I de P. fuscum

Is



REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU SEGMENT
INVERSE

(d'après ROTHFELS)



Séquence standard

Cartographie de la séquence
standard
Bras court du chromosome I

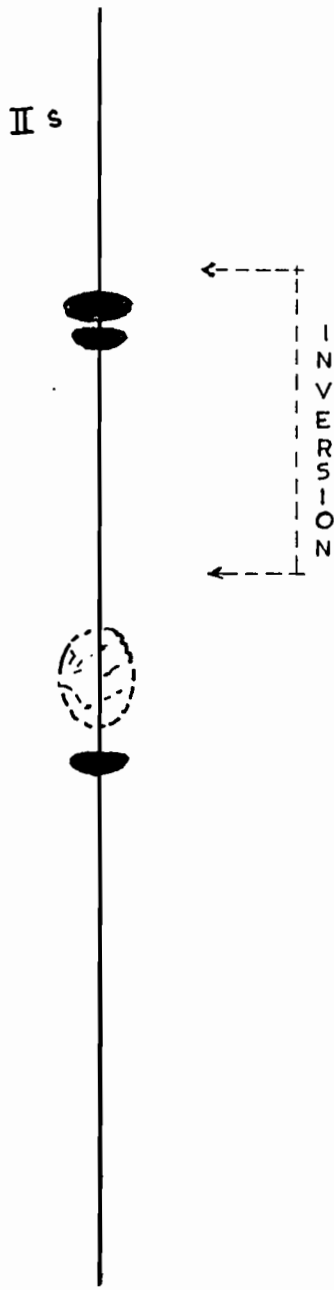
PL. 17b

IL

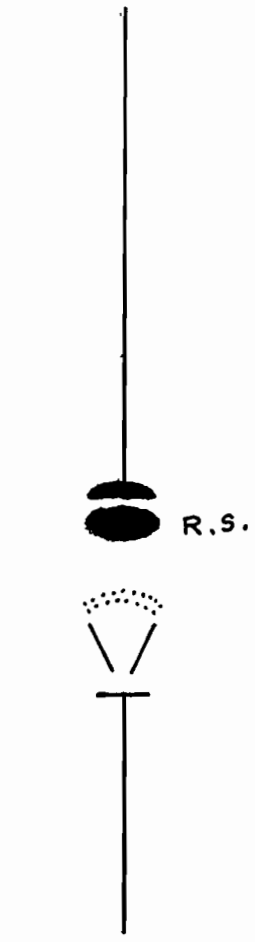
Schema du
chromosome I
Position de l'inversion
PL. 17a

Planche '18 a et b

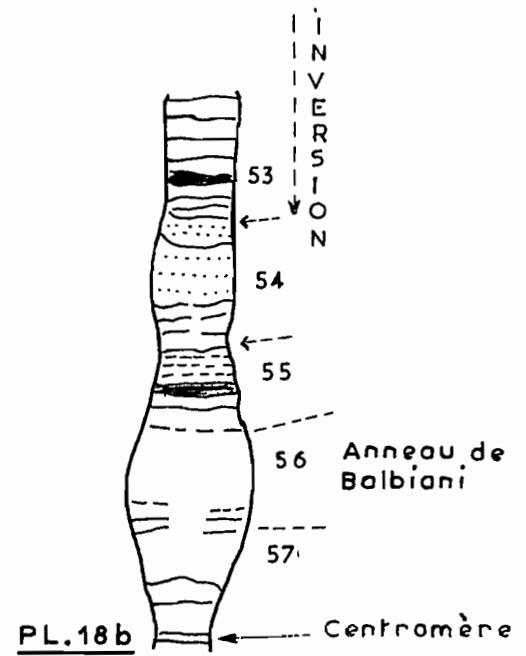
Prosimulium fuscum bras II_s



←
I
N
V
E
R
S
I
O
N
←



Schema du chromosome II non affecté par l'inversion, (d'après ROTHFELS)



PL.18 b

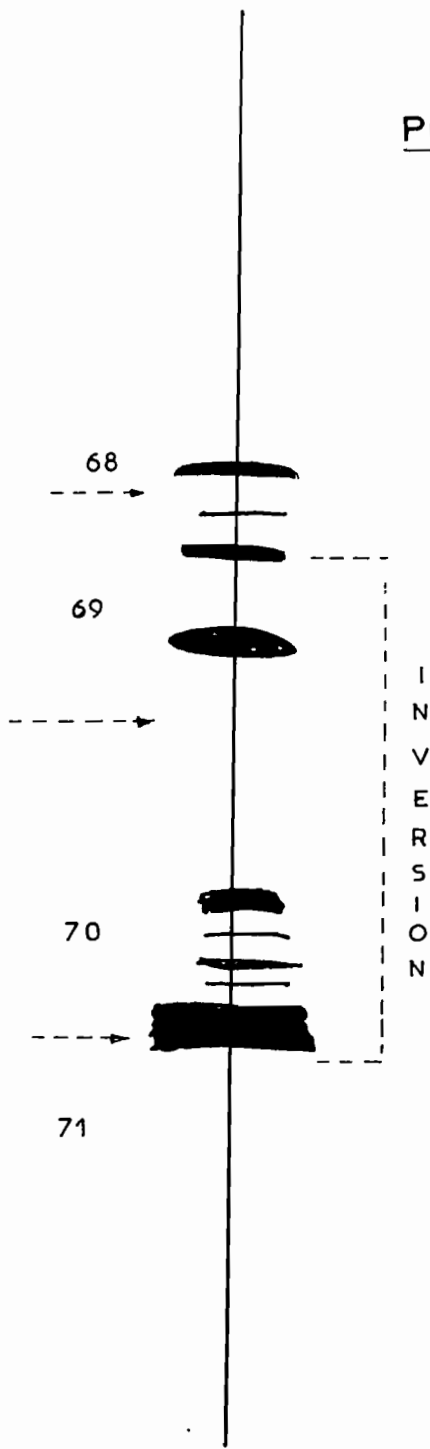
Cartographie d'une portion du bras court du chromosome II avec la fin de l'inversion (séquence standard) et l'anneau de Balbiani

PL.18 a

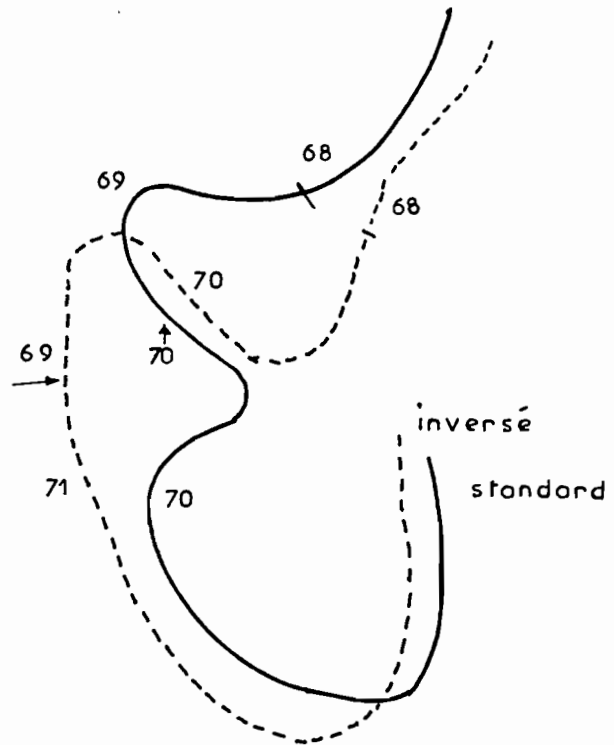
schema du chromosome II
Position de l'inversion
(d'après ROTHFELS)

Planche 18 c

Prosimulium fuscum Bras II L



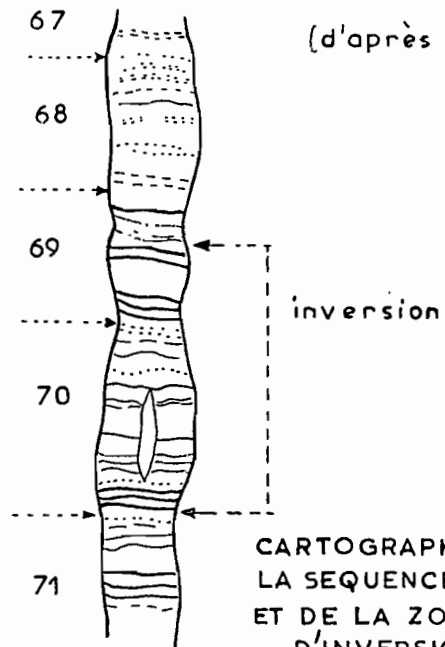
REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU BRAS II L AVEC LA POSITION DE L'INVERSION (d'après ROTHFELS)



Appariement des chromosomes d'un individu hétérozygote pour l'inversion 69-70

REPRESENTATION SCHEMATIQUE

(d'après ROTHFELS)



CARTOGRAPHIE DE LA SEQUENCE STANDARD ET DE LA ZONE D'INVERSION

Planche 19

Le complexe Simulium damnosum

PHYLLOGENIE DU SOUS-GROUPE NILE

(forme Afrique de l'ouest)

(d'après DUNBAR-1972)

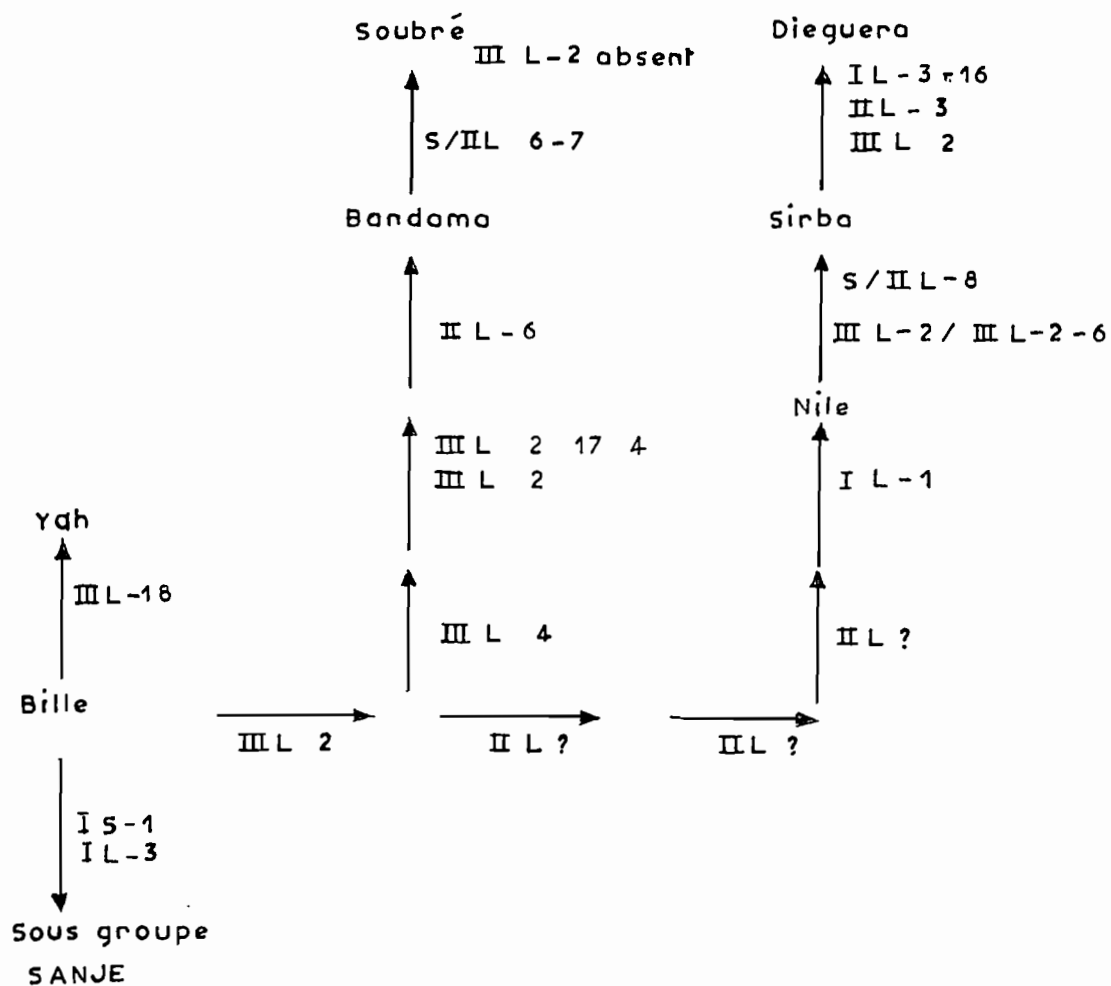


Planche 20

Le complexe Simulium damnosum
Phylogénie du sous-groupe Sanje
d'après DUNBAR, Aout 1971

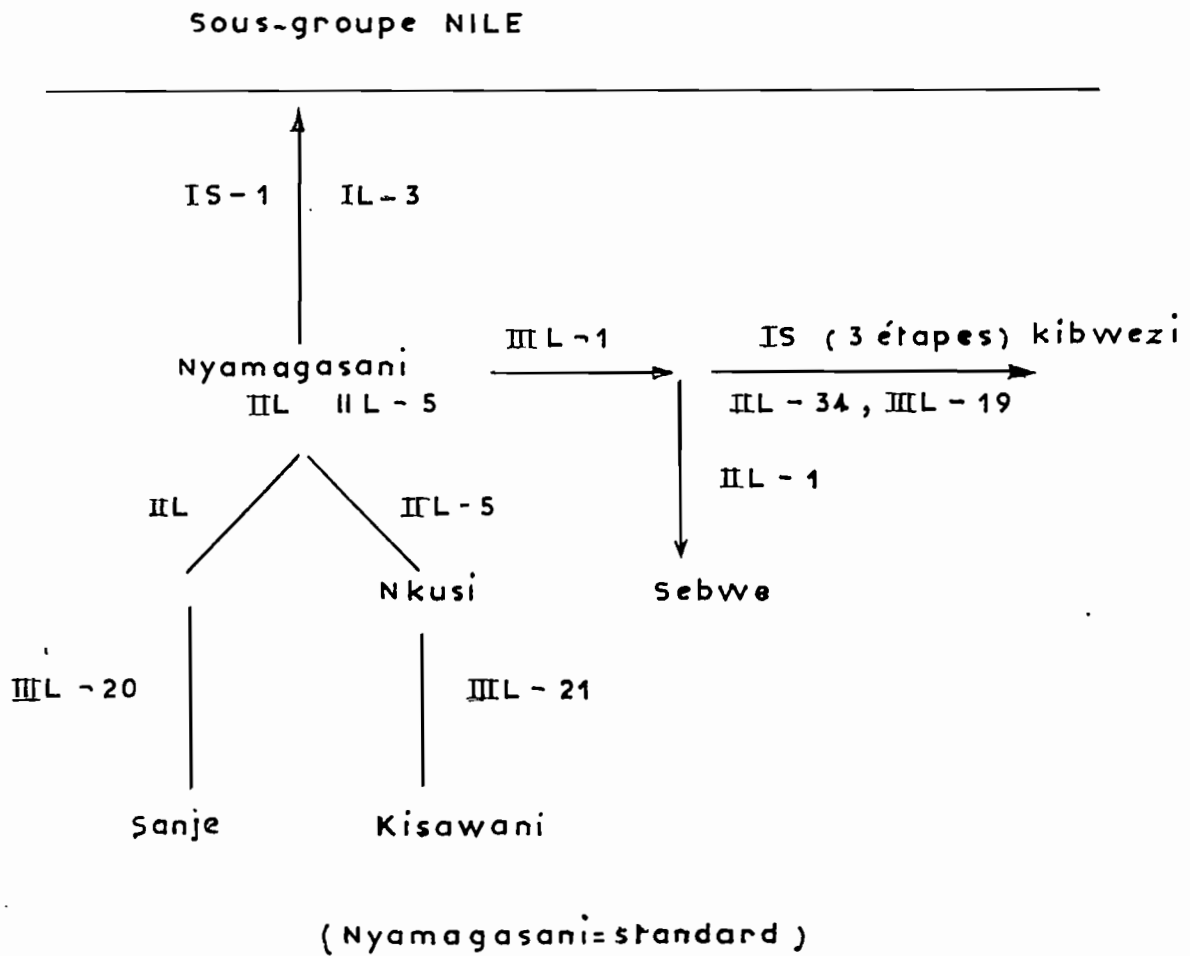
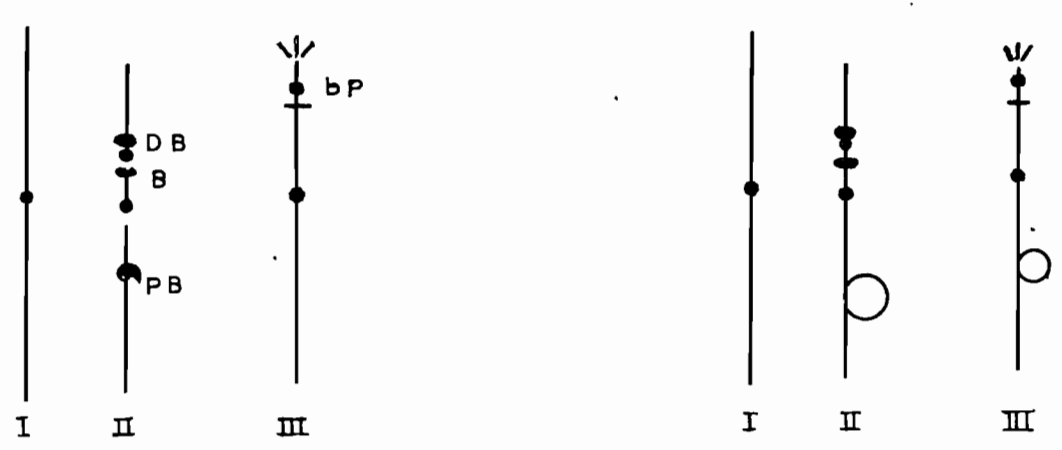
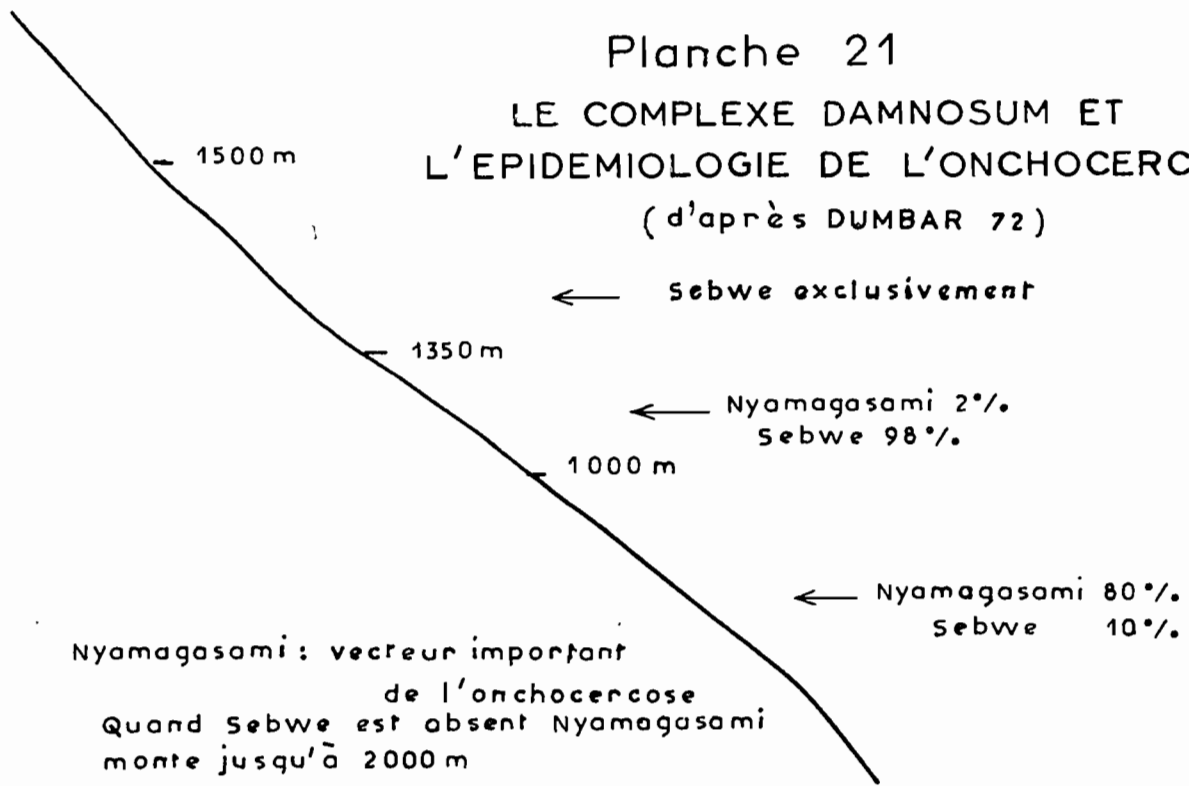


Planche 21
 LE COMPLEXE DAMNOSUM ET
 L'ÉPIDÉMIOLOGIE DE L'ONCHOCERCOSE
 (d'après DUMBAR 72)



Nyamagasami
 (arrangement Standard)

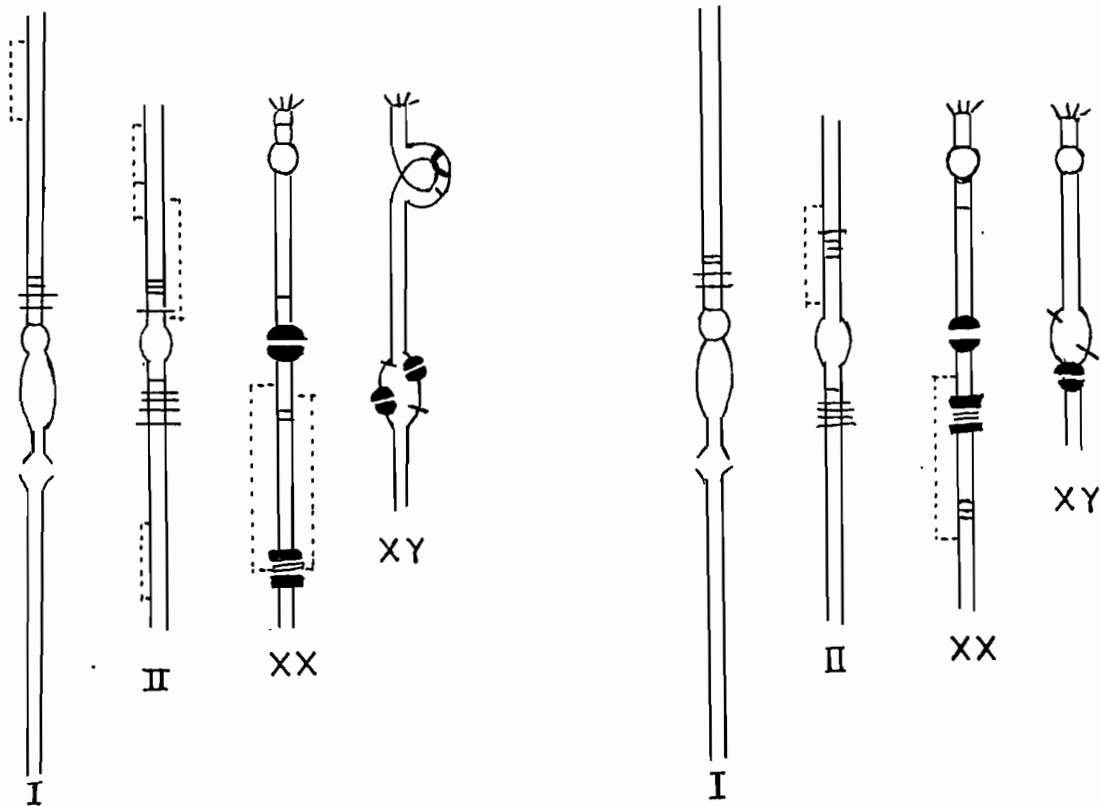
Hybrides: trouvés dans
 la nature et présentant
 la boucle de l'inversion
 ("loop") caractéristique

[Sebwe diffère de Nyamagasami
 par les inversions IIL1 et
 III L1]

- DB = Double Bulle
- B = Anneau de Balbiani
- PB = Para Balbiani
- be = Blister

Planche 22

INVERSIONS ET SPECIATION



REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES CHROMOSOMES DE :

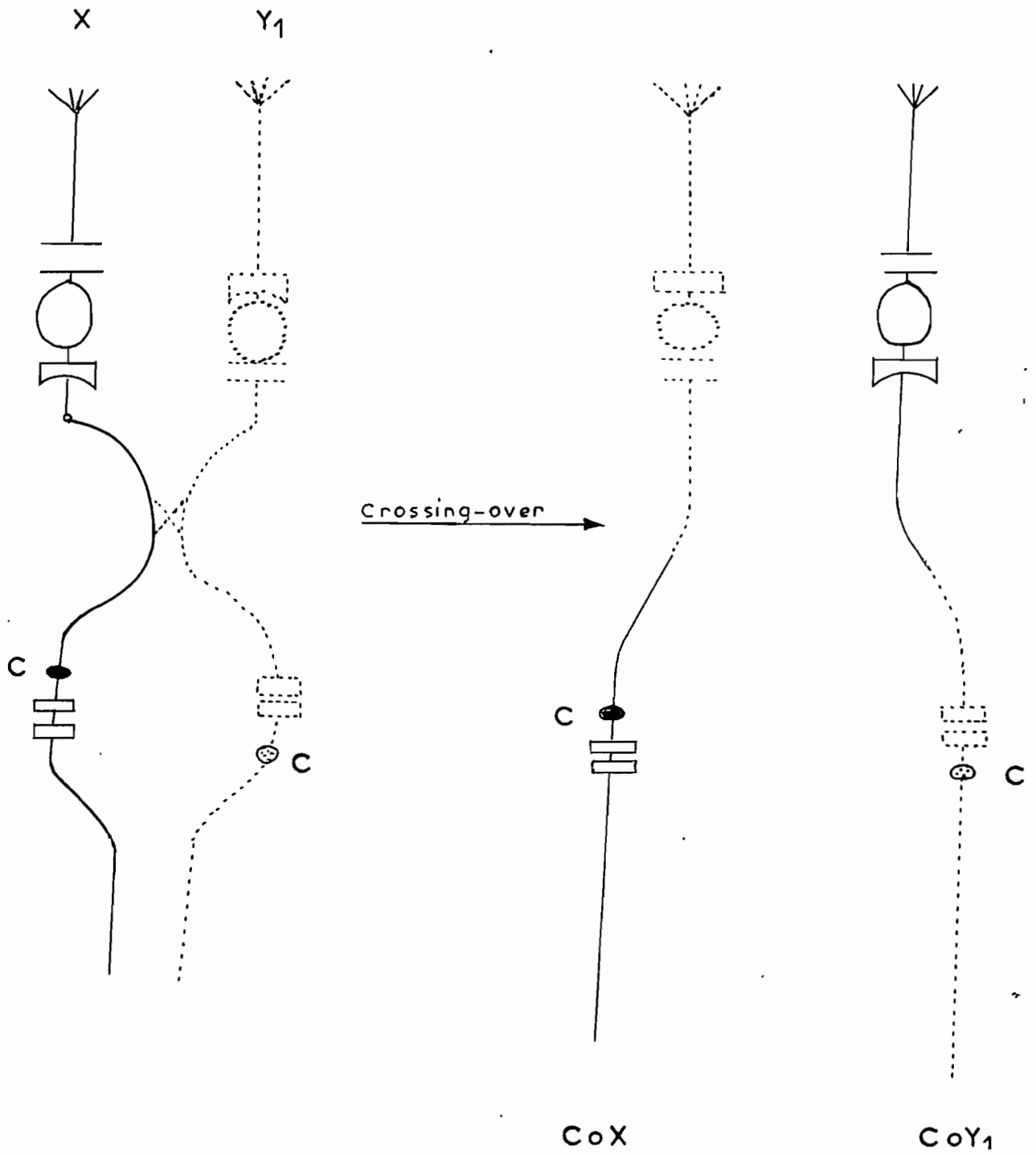
Prosimulium fuscum

Prosimulium mixtum

DEUX ESPECES JUMELLES

Planche 23

PROSIMULIUM FUSCUM



ZYGOTES POSSIBLES

$C o X X = \text{♀}$

$C o X Y_1 = \text{♂}$

$X C o Y_1 = \text{♂}$

Planche 24

PROSIMULIUM FUSCUM

EVOLUTION DU
CHROMOSOME SEXUEL

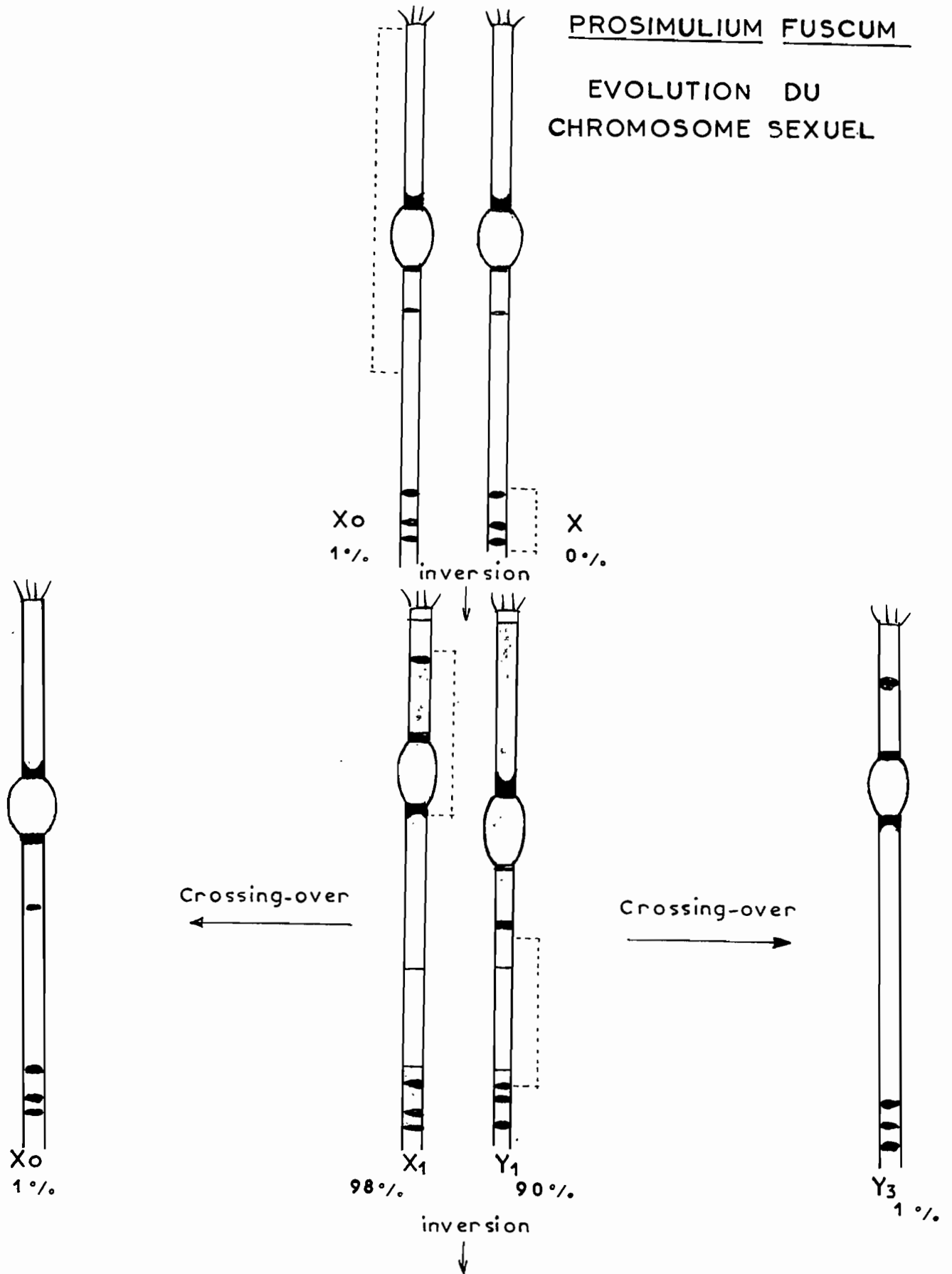
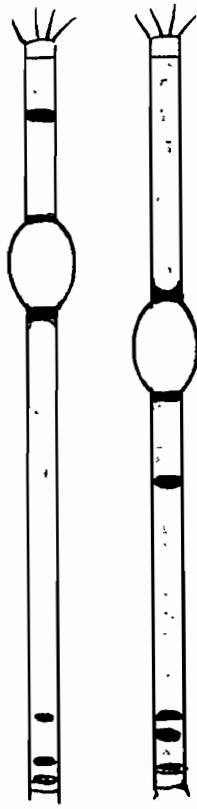


Planche 24 (suite)



X 2

1%

Y 2

9%

Planche 25

B. CHROMOSOME CHEZ EUSIMULIUM COSTATUM

(d'après DUMBAR)

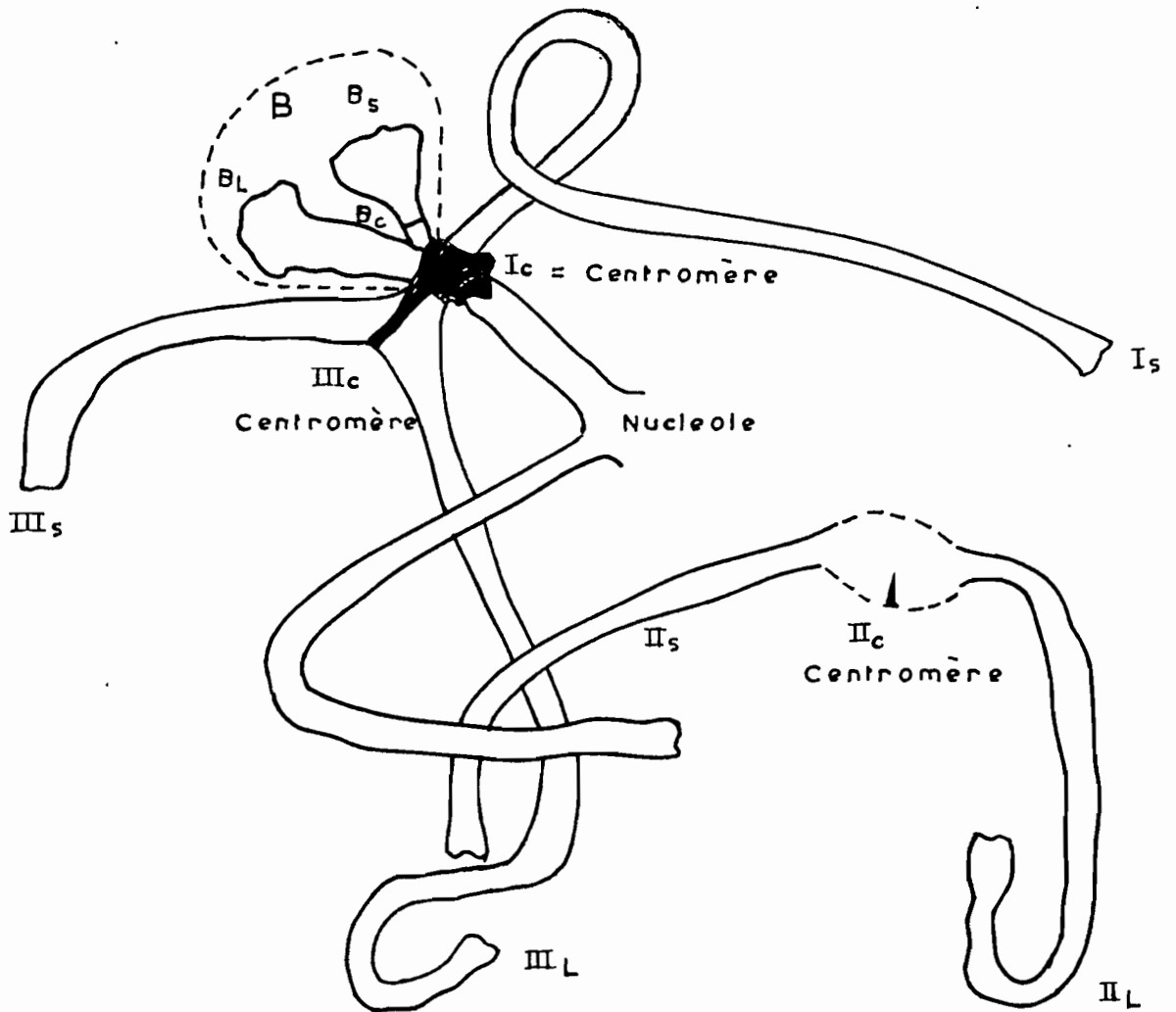
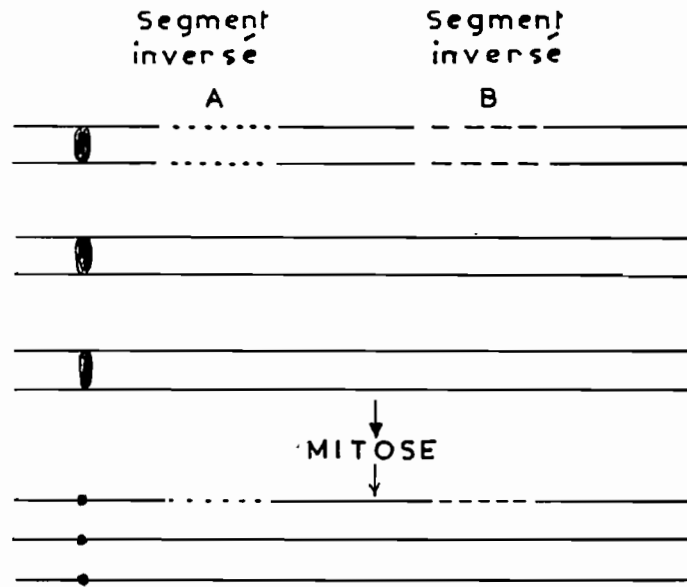


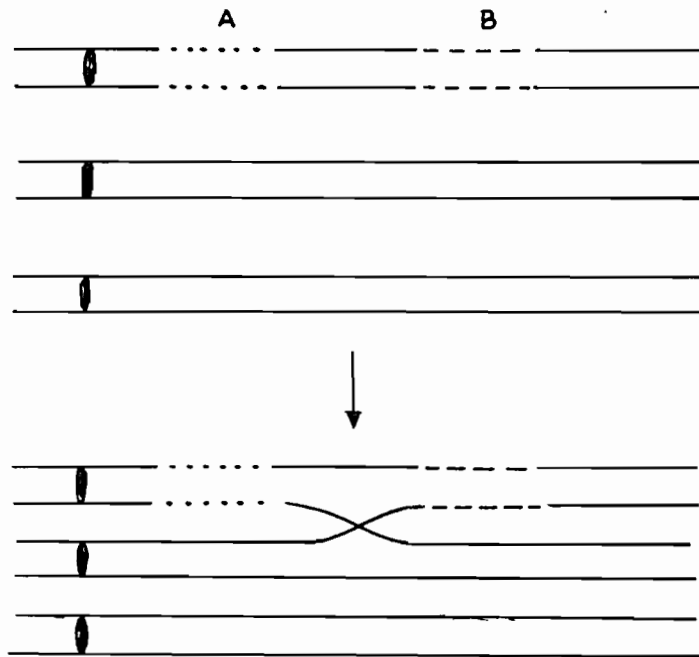
Planche 26

PARTHENOGENESE TRIPLOIDE AMEIOTIQUE



Tous les descendants
sont
semblables entre eux
semblables à leur mère

PARTHENOGENESE TRIPLOIDE MEIOTIQUE



Les chromosomes recons-
titués peuvent présenter
soit :
l'inversion A
soit :
l'inversion B
soit les deux

Planche 27

PHENOMENE DE TRISOMIE CHEZ PROSIMULIUM
MULTIDENTATUM

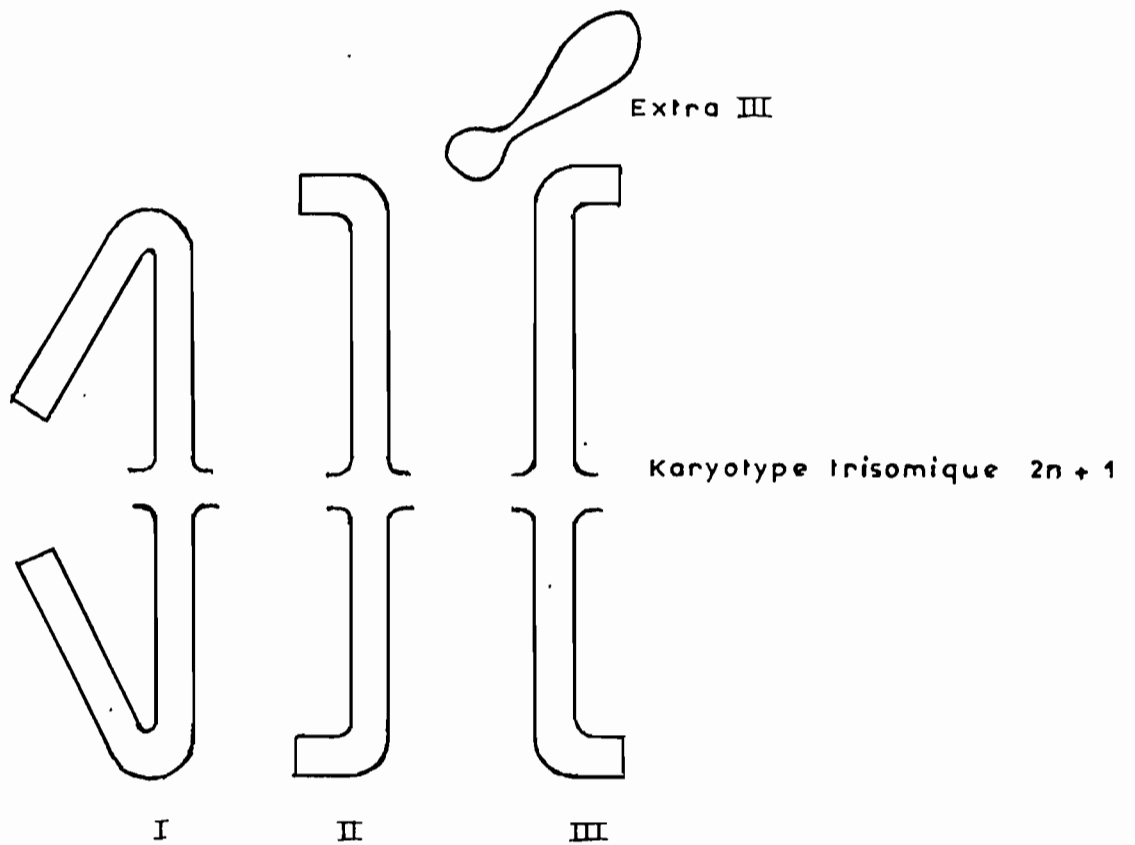
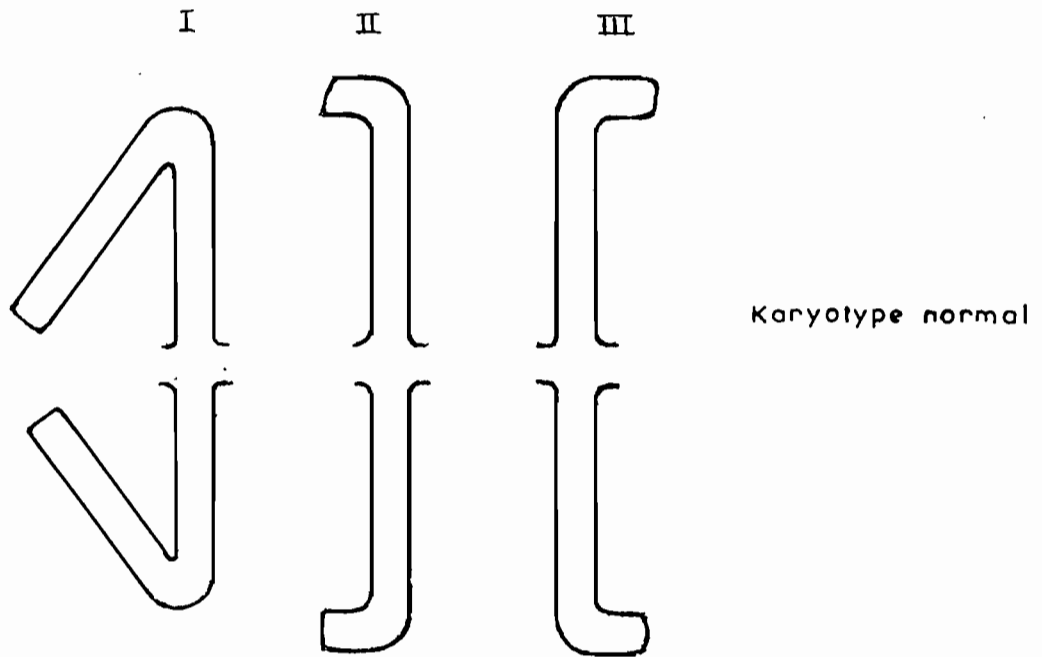


Planche 28

PROSIMILIUM MAGNUM

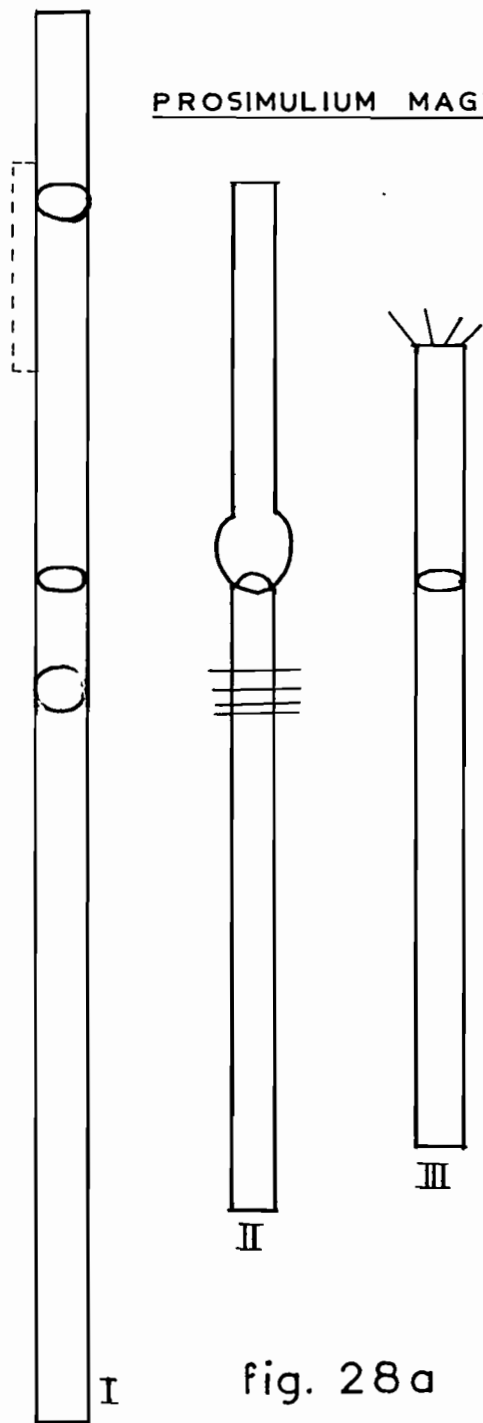


fig. 28a

PROSIMILIUM MULTIDENTATUM

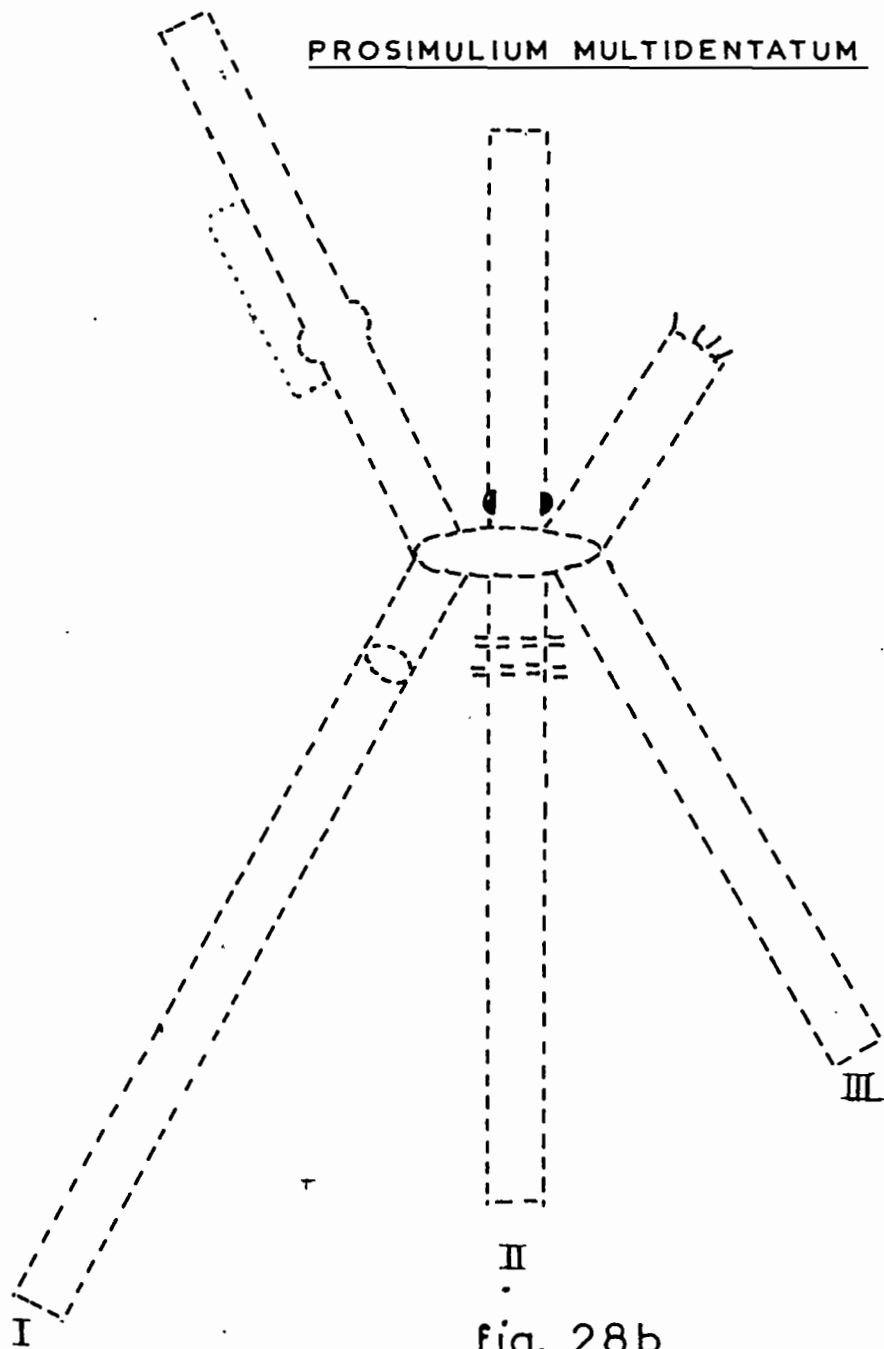
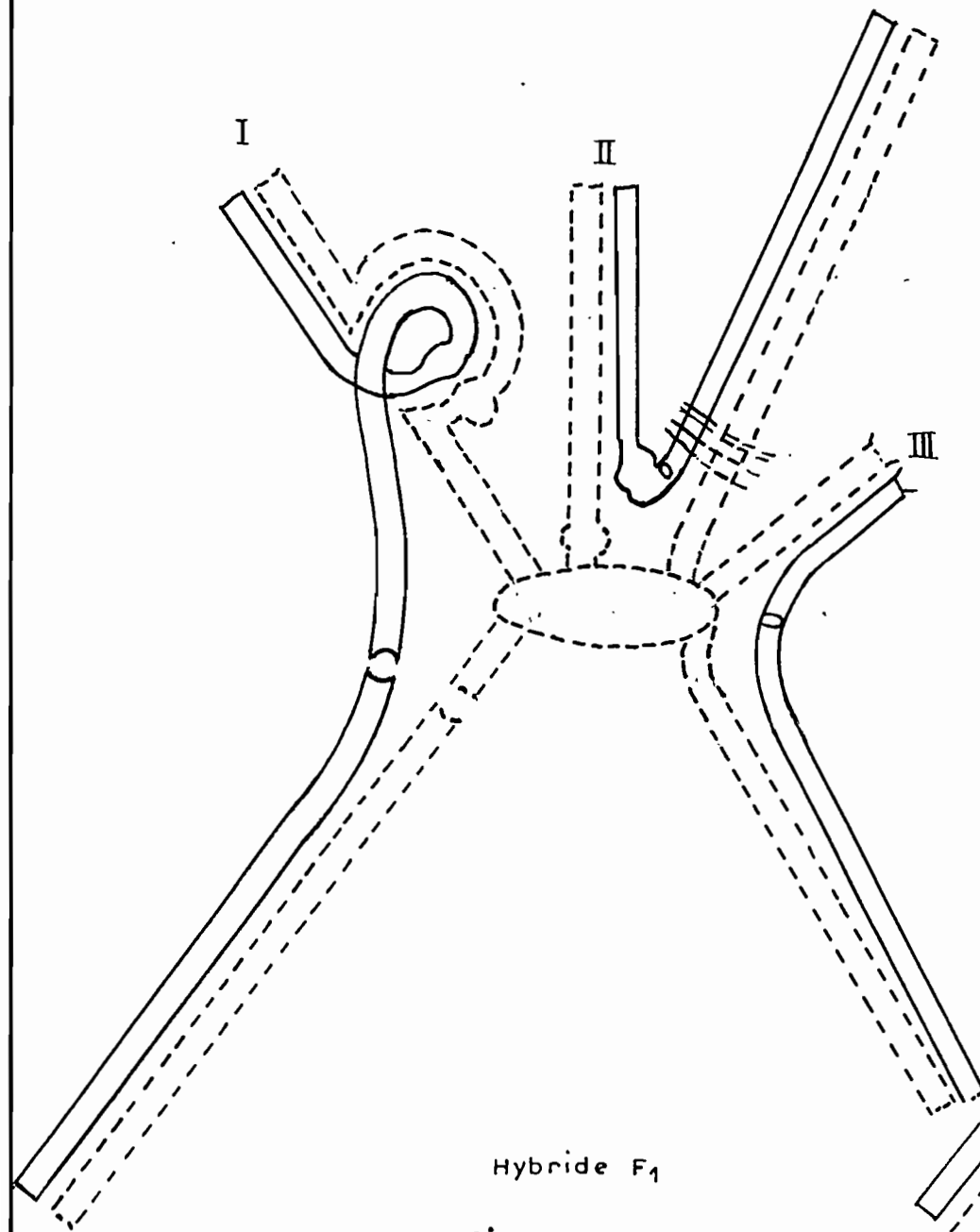


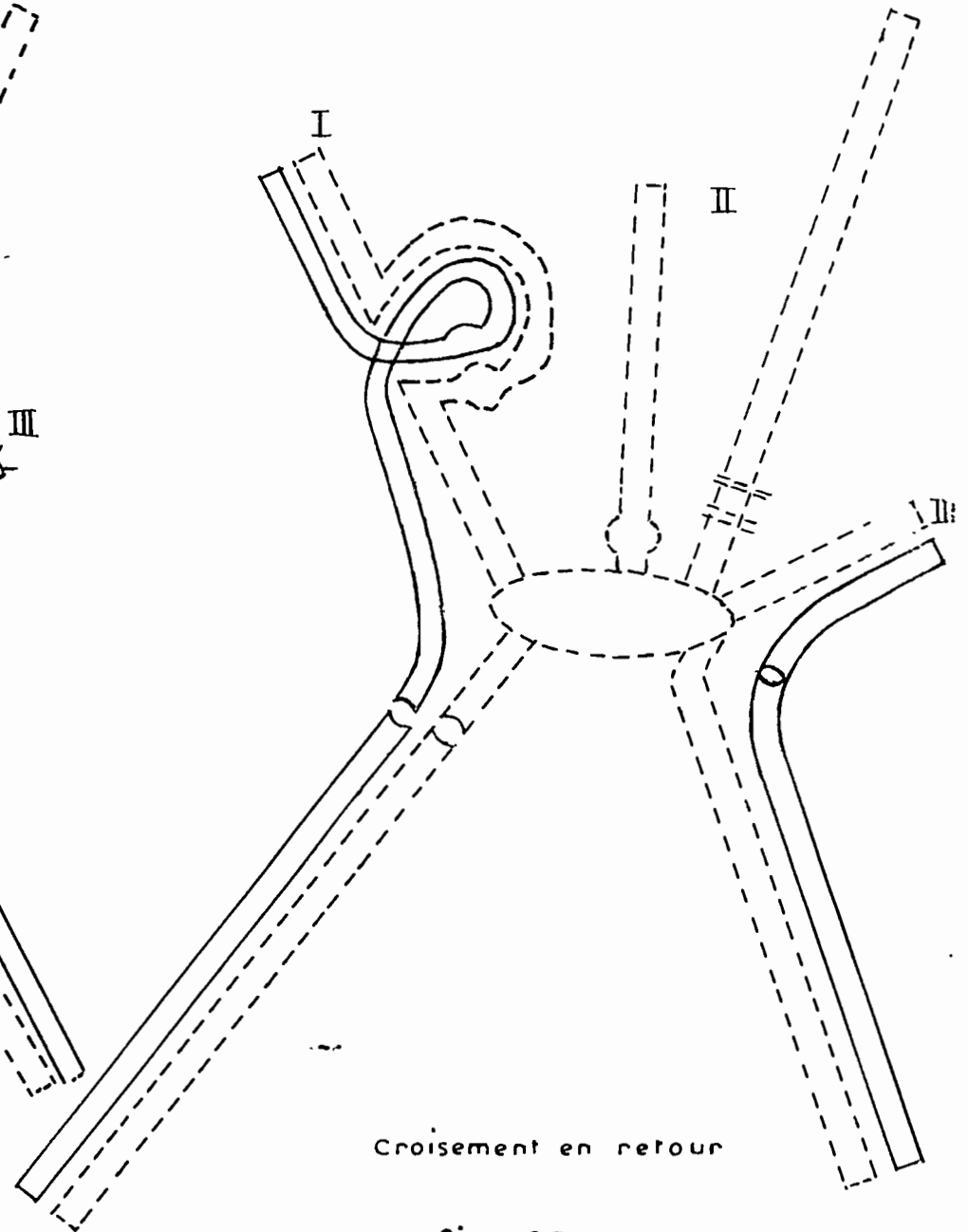
fig. 28b

Planche 28 (suite)



Hybride F₁

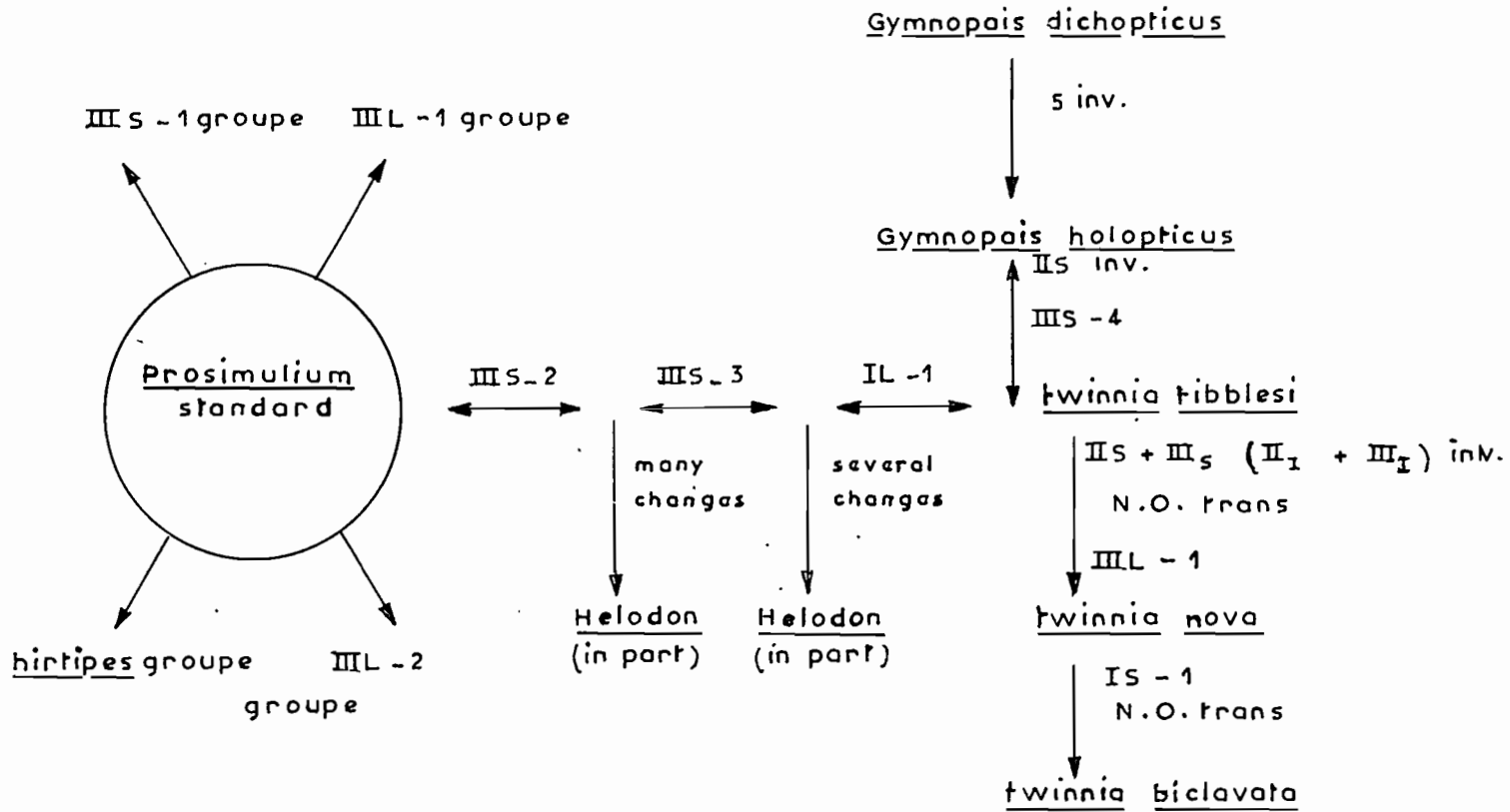
fig. 28 c



Croisement en retour

fig. 28 d

Planche 30



RELATIONS CYTOPHYLLOGONETIQUES DES ESPECES DU GENRE Twinnia