

ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE D'ANOPHELES GAMBIAE

G. FRIZZI, D^r ès Sc.

*Institut de Zoologie « Lazzaro Spallanzani »
Université de Pavie, Italie*

M. HOLSTEIN, D^r ès Sc.

Entomologiste, Organisation mondiale de la Santé

RÉSUMÉ

Les auteurs ont préparé la carte chromosomique d'*Anopheles gambiae*, afin de faciliter l'étude des populations naturelles de ce moustique. Ils ont constaté chez cette espèce une grande variabilité de la structure chromosomique. L'étude cytogénétique, qui a révélé chez *A. gambiae* le polymorphisme chromosomique le plus fort que l'on ait constaté jusqu'ici dans une espèce anophélienne, a confirmé la diversité des populations naturelles de cet anophèle.

L'étude comparative de deux lots d'une même souche élevés à des températures différentes (31°C et 24°C) a confirmé également l'existence de populations différenciées auxquelles correspondent différents pourcentages de fréquence dans les inversions hétérozygotes.

La Deuxième Conférence du Paludisme en Afrique, organisée sous les auspices de l'OMS, du 28 novembre au 6 décembre 1955, a montré, à travers la masse d'informations nouvelles, l'importance extrême que présente la connaissance précise de la biologie d'*Anopheles gambiae* pour la réussite des campagnes de lutte contre le paludisme, quelle que soit la méthode employée. Il ressort en effet des documents récents et des publications antérieures, que la biologie du vecteur principal de cette endémie est extrêmement diverse, non seulement d'un point à un autre du continent africain — ce qui peut aisément se comprendre — mais encore dans des zones géographiquement limitées et climatiquement comparables où, toutes choses étant égales par ailleurs, on s'attendrait à une certaine uniformité biologique. En fait toutes les recherches effectuées jusqu'à présent n'apportent que des renseignements contradictoires tant du point de vue des préférences trophiques que du comportement exo-endophile ou de la réponse aux divers insecticides, pour ne citer que les points les plus importants. Les résultats des études faites sur des colonies ne cadrent généralement pas avec les observations faites dans la nature, et le problème se pose tout entier de savoir si l'on se trouve en présence d'un complexe ou d'une espèce dont

la plasticité est fonction d'adaptations écologiques génétiquement discernables.

Les méthodes classiques d'investigation entomologique n'ont pas fourni jusqu'à présent de résultats réellement valables et seules des techniques nouvelles pourront vraisemblablement apporter des solutions aux problèmes posés. Parmi elles, la cytogénétique, d'application récente en ce qui concerne les anophèles, doit être mise au premier plan, en raison des résultats qu'elle a déjà permis d'enregistrer et de sa rigoureuse objectivité. Le but du présent travail est d'exposer les premières recherches effectuées sur la cytogénétique d'*A. gambiae*, avec l'espoir qu'elles pourront servir de base de travail à ceux qui ont pour charge, en Afrique, d'élucider les points obscurs de la biologie de cet anophèle.

Méthode et techniques

L'étude cytogénétique s'effectue sur les chromosomes polytènes des glandes salivaires des larves. Ces chromosomes géants, qui existent dans les cellules épithéliales de l'intestin, les tubes de Malpighi et d'autres tissus, atteignent leur plus grande taille et le maximum de netteté structurale dans les glandes salivaires des jeunes larves au IV^e stade.

Les glandes salivaires, au nombre de deux, sont situées à la partie antérieure du thorax de part et d'autre du tractus intestinal. Chacune est divisée en deux portions, distale et proximale, qui, d'origine embryologique commune, diffèrent cependant par plusieurs caractères. La portion distale est nettement plus grande que la proximale et est formée de 50 à 60 cellules légèrement aplaties qui présentent un renflement au niveau du noyau; la portion proximale, appliquée contre l'œsophage, a une forme nettement sphérique et est constituée de 16 à 25 cellules coniques et volumineuses. L'étude des chromosomes ne peut se faire que dans les cellules proximales, car dans la partie distale, bien que géants, ils ne possèdent pas de structure étudiable.

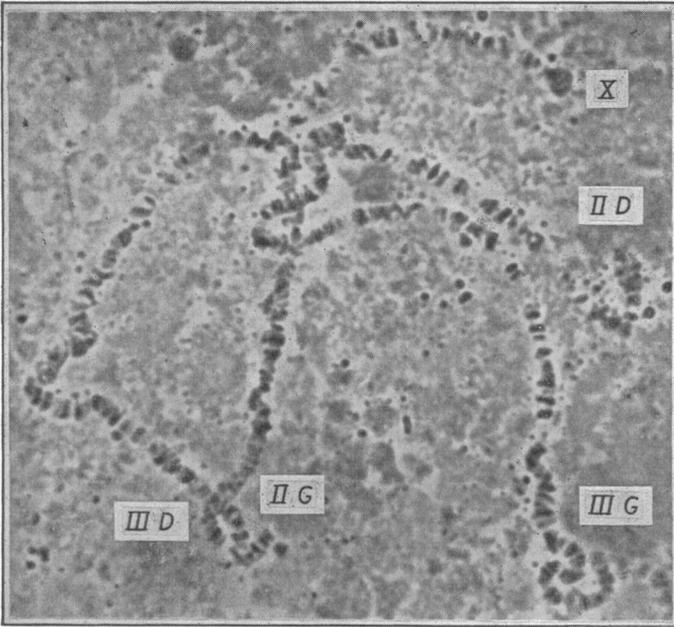
La dissection s'effectue à sec. Les glandes, isolées, sont fixées durant quelques secondes dans un mélange de 33 parties (v/v) d'acide acétique glacial et 100 parties d'alcool absolu.

On a utilisé comme colorant le carmin acide (préparé à saturation dans de l'acide acétique à 45%). Le temps de coloration est variable: de 3 à 45 minutes selon que les préparations seront examinées respectivement en contraste de phase ou au microscope normal et qu'elles sont temporaires ou permanentes.

La régression, de 30 secondes à 15 minutes respectivement, est faite à l'acide acétique à 45%.

Les montages permanents ont été faits à l'Euparal sur lame albuminée après déshydratation par exposition, pendant 24 heures, aux vapeurs d'alcool absolu.

**FIG. 1. ÉQUIPEMENT CHROMOSOMIQUE NORMAL
DES GLANDES SALIVAIRES DE A. GAMBIAE**



**FIG. 2. ÉQUIPEMENT CHROMOSOMIQUE AVEC INVERSION
SUR LE SEGMENT 39-41 DE III G**

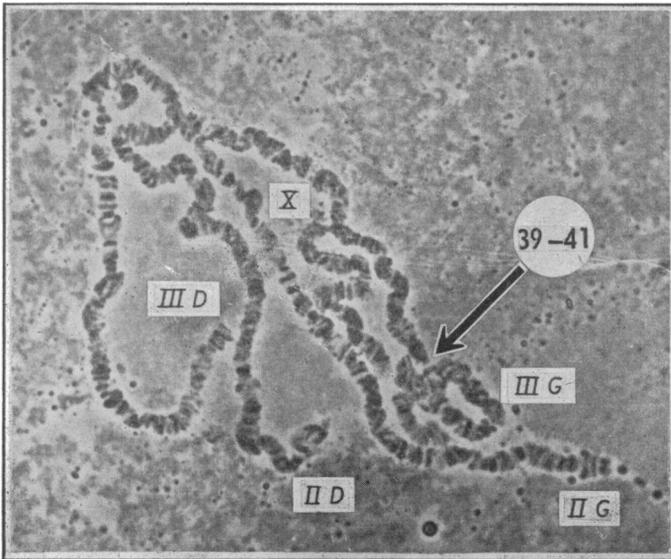
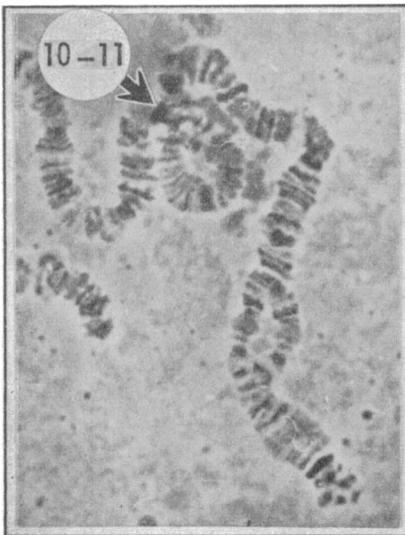


FIG. 3. CHROMOSOME II D NORMAL



**FIG. 4. CHROMOSOME II D AVEC
INVERSION SUR LE SEGMENT 10-11**



**FIG. 5. CHROMOSOME II D AVEC
INVERSION SUR LE SEGMENT 13-14**

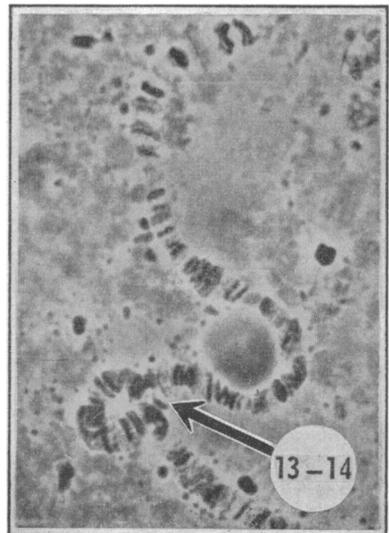
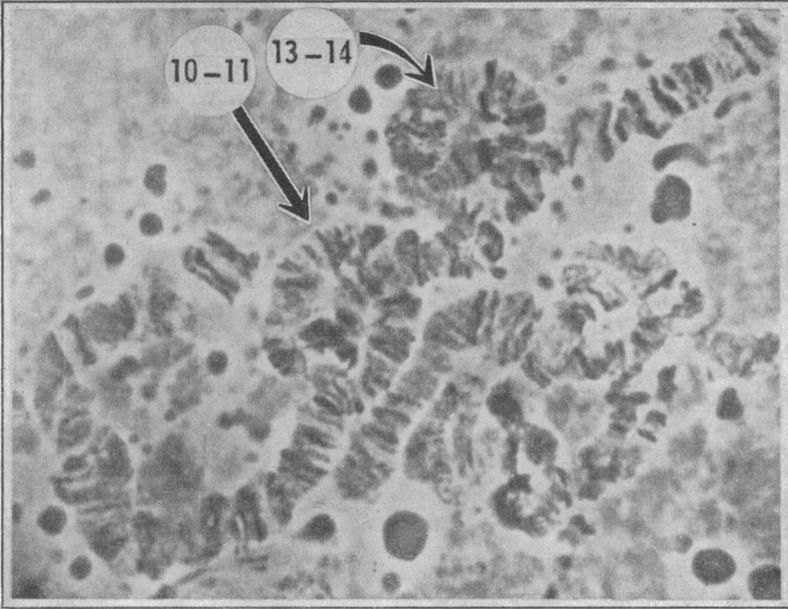
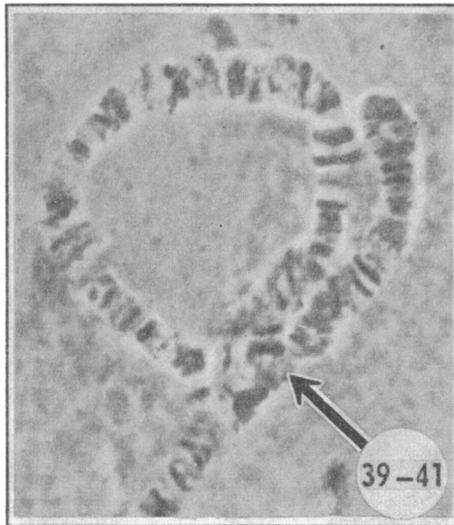


FIG. 6. CHROMOSOME II D AVEC LES DEUX INVERSIONS



**FIG. 7. CHROMOSOME III G AVEC INVERSION
SUR LE SEGMENT 39-41**



**FIG. 8. CHROMOSOME III G AVEC INVERSION
SUR LE SEGMENT 39-41**

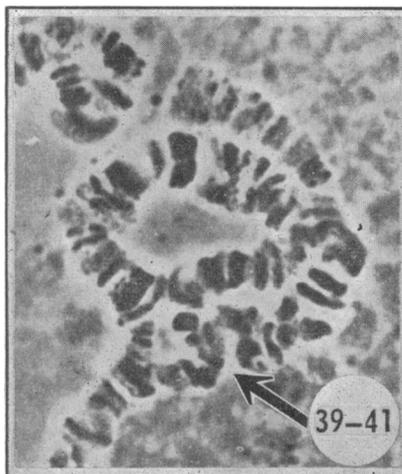
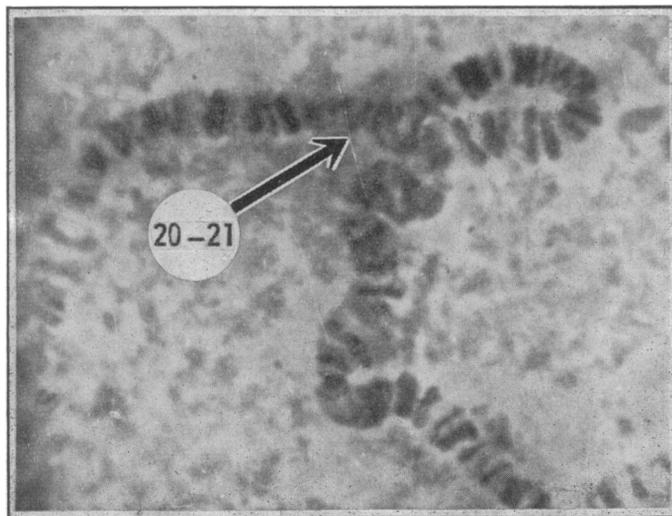


FIG. 9. CHROMOSOME II G AVEC INVERSION SUR LE SEGMENT 20-21



Les chromosomes salivaires, étant plus longs que le diamètre du noyau, sont agglomérés en pelote à l'intérieur de la membrane nucléaire; d'où la nécessité, après la régression, d'écraser la préparation sous la lamelle (technique du squash) afin de rompre la membrane, de libérer les chromosomes et d'obtenir le déroulement qui permettra leur étude. Chaque chromosome se présente avec une structure striée transversalement, due à la succession des bandes sombres ayant absorbé le colorant séparées par des intervalles non colorés.

Nos études ont été faites sur une souche de *A. gambiae* originaire de Lagos, aimablement envoyée par le Dr L. J. Bruce-Chwatt, entretenue depuis plusieurs années à Pavie. L'élevage a été maintenu à la température moyenne de 24°C, les larves ont été nourries à la levure dans des cuvettes moyennement peuplées; les adultes ont été alimentés sur des lapins.

Cette souche s'est montrée extrêmement variable en ce qui concerne le déroulement des chromosomes et la netteté de leur structure. Il est arrivé, à plusieurs reprises et sans raison apparente, qu'aucune étude ne puisse être faite pendant quelques jours, les chromosomes d'un ou plusieurs lots de larves étant totalement « illisibles ». Rien de comparable n'a jamais été noté, jusqu'à présent, avec les autres espèces anophéliennes utilisées au laboratoire.

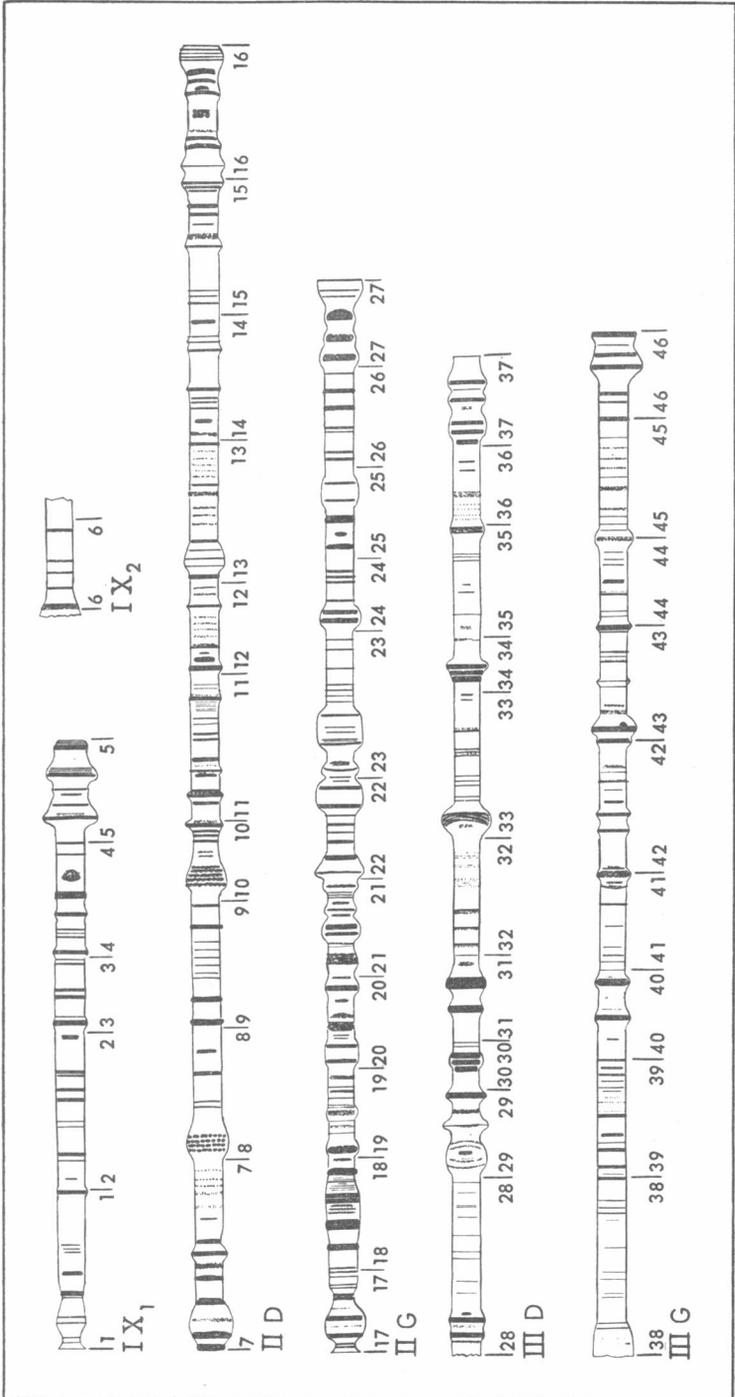
Les chromosomes de *A. gambiae*

L'équipement chromosomique de *A. gambiae* (fig. 1) est de 3 paires de chromosomes: 2 autosomes médiocentriques en forme de V — un bras étant plus long que l'autre — et le chromosome X, subtélocentrique. La carte chromosomique que nous présentons (fig. 10) est en quelque sorte stylisée, en ce sens qu'elle montre seulement les caractéristiques principales des chromosomes, nécessaires à l'étude pratique des populations, et non les détails précis qui sont du ressort de la génétique formelle. C'est ainsi, par exemple, que les larges bandes sombres pourront éventuellement se révéler constituées soit d'une, soit de deux ou trois bandes accolées mais difficilement différenciables. Les terminaisons sont très caractéristiques et se sont toujours montrées parfaitement reconnaissables. Plus difficiles à examiner sont les parties de chromosomes voisines du chromocentre, le grand nombre de réarrangements chromosomiques étant souvent la cause du non-déroulement des chromosomes dans les préparations.

Les chromosomes ont été, ainsi qu'il se doit, divisés en zones numérotées, caractéristiques soit d'une succession de bandes facilement repérable soit de la présence d'une inversion.

Le fait saillant qui ressort de l'étude faite est que *A. gambiae* présente un polymorphisme chromosomique de beaucoup supérieur à celui des autres espèces étudiées. Chez l'*A. maculipennis* italien, aussi bien que chez l'*A. maculipennis* américain, les inversions ne s'observent que sur le chro-

FIG. 10. CARTE CHROMOSOMIQUE DE A. GAMBIAE



mosome III et, rarement, sur le X, alors que chez *A. gambiae* tous les autosomes sont sujets à des inversions, en fréquence naturellement variable, ce qui complique singulièrement l'étude cytologique de l'espèce.

Les inversions les plus fréquentes sont situées sur les chromosomes II D et III G (fig. 2-8). II G et III D sont également affectés (fig. 9), mais avec une fréquence très réduite. Aucune inversion n'a été notée sur le chromosome X. L'inversion de III G est subterminale, intéressant le secteur 39-41 (fig. 2, 7 et 8); aucune autre inversion n'a été vue sur ce chromosome. Sur II D la plus fréquente est subterminale, affectant le secteur 10-11 (fig. 4 et 6), mais une autre inversion, quoique bien moins fréquente, a été constatée près du chromocentre dans le secteur 13-14 (fig. 5). A deux ou trois occasions, on a constaté la coexistence des deux inversions. Sur II G, l'inversion intéresse le secteur 20-21 (fig. 9). Toutes ces inversions sont hétérozygotes, le réarrangement homozygote inversé n'a pas encore été vu, contrairement à ce qui se passe par exemple dans les formes italiennes de *maculipennis* qui ne montrent que des inversions homozygotes. Mais il n'est évidemment pas exclu que des inversions homozygotes puissent se produire dans la nature chez *A. gambiae*.

Populations de *A. gambiae*

Le point le plus important était de savoir si ces inversions hétérozygotes, bloquant un certain nombre de caractères étaient sous la dépendance de conditions écologiques différentes et déterminées. Afin de le préciser, nous avons séparé en deux lots les œufs provenant d'une même sous-colonie. Les larves écloses ont été élevées en thermostat, les unes à la température habituelle de 24°C, les autres à 31°C, les variations ne dépassant pas $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Nous avons pu montrer que chacun de ces lots était caractérisé par une fréquence différente dans les arrangements chromosomiques hétérozygotes; la différence était statistiquement significative, P étant plus petit que 10^{-10} (voir tableau I).

**TABLEAU I. FRÉQUENCE DES INVERSIONS
SELON LA TEMPÉRATURE D'ÉLEVAGE**

Température	Avec inversion	Sans inversion	Total
31°C	104	49	153
24°C	15	115	130
Nombre total examiné			283

$$\chi^2 = 89,2 \quad P < 10^{-10}$$

TABLEAU II. RÉPARTITION DES INVERSIONS CHROMOSOMIQUES SELON LA TEMPÉRATURE D'ÉLEVAGE

Chromosomes présentant des inversions	Nombre de larves présentant des inversions	
	31°C	24°C
II D	79	2
II D, II G	2	—
II D, II G, III D	—	—
II D, II G, III G	—	—
II D, II G, III D, III G	—	—
II D, III D	1	—
II D, III D, III G	—	—
II D, III G	14	1
II G	5	—
II G, III D	—	—
II G, III G	1	—
II G, III D, III G	—	—
III D	3	—
III D, III G	—	—
III G	37	14

TABLEAU III. FRÉQUENCE DE CHAQUE INVERSION SELON LA TEMPÉRATURE D'ÉLEVAGE

Chromosome	Présence (+) ou absence (—) d'inversion	Nombre de larves		Total
		31°C	24°C	
II D	+	79	2	81
	—	74	128	202
II G	+	5	—	5
	—	148	130	278
III D	+	3	—	3
	—	150	130	280
III G	+	37	14	51
	—	116	116	232

Nous avons pu constater que les inversions hétérozygotes sont plus fréquentes à la température de 31°C et que l'inversion sur le chromosome II D semble caractéristique du lot élevé à cette température. On a noté sur ce lot, par ailleurs, des inversions sur les chromosomes II G et III D qui n'ont pu être mises en évidence dans le lot à 24°C. Ce dernier est caractérisé par la prédominance de l'inversion sur III G.

Cette première expérience, de caractère purement indicatif nous tenons à le signaler, a montré que l'espèce *A. gambiae* présente des réarrangements, c'est-à-dire des inversions hétérozygotes, différents. Puisque, d'après ces expériences, la fréquence de ces inversions varie suivant la température d'élevage, on peut supposer qu'elles correspondent à des valeurs adaptatives diverses. Le nombre d'inversions rencontrées est trop grand pour que l'on puisse déterminer avec certitude la valeur adaptative de chaque inversion particulière. Cela demande des études plus approfondies, principalement sur le terrain, où interviendront non seulement la température, mais la salinité, le pH, l'alimentation, la lumière, les variations saisonnières, etc.

En conclusion, il paraît possible de penser que les grandes différences observées dans le comportement de *A. gambiae* en de nombreuses régions d'Afrique, que l'on supposait raciales, s'expliqueront par des différences génétiques que révèle le polymorphisme chromosomique que nous avons mis en évidence en laboratoire.

SUMMARY

In order to facilitate the study of natural populations of *Anopheles gambiae*, the authors have prepared a chromosome map of that mosquito, and note a very variable chromosome structure. Indeed, cytogenetic studies show that *A. gambiae* has the most highly polymorphic chromosome structure yet observed in any anopheline, and it seems very possible that the considerable differences in the behaviour of this mosquito observed in a number of regions of Africa may be due to genetic differences shown by this polymorphism.

A comparative study of two lots of larvae hatched from the same subcolony of eggs but developed, the one at 31°C, and the other at 24°C, has also confirmed the existence of differentiated *gambiae* populations with correspondingly different frequencies of heterozygote inversion.