

ÉTUDE CYTOGÉNÉTIQUE D'ANOPHELES MACULIPENNIS EN ITALIE

Extension des recherches à d'autres espèces d'anophèles

GUIDO FRIZZI

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

Manuscrit reçu en mars 1953

RÉSUMÉ

Les méthodes cytogénétiques ont été appliquées au groupe *Anopheles maculipennis*, en vue de résoudre quelques problèmes de la biologie de ces moustiques. La structure des chromosomes des glandes salivaires de *A. maculipennis labbranchiae* var. *atroparvus* a été choisie comme base pour l'étude des arrangements chromosomiques d'autres espèces, en particulier des larves provenant de croisements d'espèces ou de races; on a analysé aussi les réarrangements chromosomiques dans les populations naturelles, en relation avec les valeurs adaptatrices à divers milieux. Les résultats de ces recherches ont confirmé la validité de la classification établie d'après les caractères morphologiques. Ils ont montré aussi qu'il existe une relation précise entre l'arrangement chromosomique et certains caractères tels que les stries des œufs et les soies anté-palmaires des larves.

L'étude cytogénétique s'est révélée précieuse pour distinguer certaines formes dont les caractères morphologiques sont trop variables pour conduire à des conclusions sûres. Elle a permis en particulier de distinguer *subalpinus* de *messeae* dans les gîtes où coexistent les larves de ces espèces ainsi que celles de *typicus*. La méthode a été appliquée en outre à l'étude des rapports phylogénétiques entre les formes *maculipennis* des régions paléo-arctiques et néo-arctiques et à celle de leur distribution géographique. Elle sera étendue, ultérieurement, au sous-genre *Nyssorhynchus*, dont certaines espèces présentent une grande importance épidémiologique.

Des questions pratiques de paludologie et l'intérêt plus directement biologique que présente la génétique des populations ont conduit à appliquer les méthodes cytogénétiques à l'étude des anophèles.

C'est surtout sur le groupe *maculipennis* qu'a porté la recherche génétique, en vue de résoudre quelques-uns des problèmes les plus intéressants de la biologie de ces nématocères.

Pour ces travaux, il importait de fixer une base cytologique précise, permettant l'étude détaillée des chromosomes polytènes. Il fallut d'abord examiner avec méthode et patience les chromosomes salivaires et mettre en évidence les particularités les plus fines de la structure chromosomique d'une race : *Anopheles maculipennis labranchiae* var. *atoparvus*, qui fut choisie comme base pour l'étude comparative des arrangements chromosomiques des autres espèces du groupe *maculipennis*.

Les chromosomes des glandes salivaires, homologués aux chromosomes méiosiques, sont constitués de trois unités : deux autosomes médiocentriques et un hétérochromosome subtelocentrique.

Ces faits établis, il fut possible d'aborder les problèmes de génétique des populations par l'étude des chromosomes salivaires des larves hybrides, résultant d'éventuels croisements viables entre espèces ou races différentes, ou, à défaut, par l'examen comparatif direct des arrangements chromosomiques. Sur ce dernier point, les recherches les plus aisées ont consisté à analyser les réarrangements chromosomiques dans les populations naturelles ; elles ont été étendues aussi au problème des différentes valeurs adaptatrices à divers milieux. En fait, certaines observations ont conduit à supposer que les divers arrangements chromosomiques rencontrés devaient être responsables des diverses adaptations spécifiques, notamment au stade larvaire.

On a soumis à un examen comparatif la structure chromosomique des six variétés qui composaient, a-t-on cru pendant un certain temps, le groupe *maculipennis* ; plus récemment, après une révision systématique basée sur un ensemble de critères morphologiques et écologiques, le nombre de ces variétés a été réduit à cinq. Les insectes examinés furent capturés en diverses parties de l'Italie, notamment dans la plaine du Pô.

On a établi la carte chromosomique de *A. atoparvus*, sur la base d'une constance absolue de la structure. En fait, on n'a pas observé le moindre réarrangement chromosomique dans les exemplaires de cette espèce, étudiée de façon continue pendant plusieurs années, capturés dans des localités fort distantes, telles que Rovigo, Rome et Malpensa.

La comparaison de la structure chromosomique de *labranchiae* avec la structure-type de *atoparvus* n'a révélé aucune mutation ; les hybrides viables du croisement, eux-mêmes, n'ont présenté aucun indice apparent de réarrangement chromosomique. On a seulement constaté un défaut d'union en des localisations diverses dans les diverses sections des homologues.

De très nombreux exemplaires de la forme *typicus*, provenant aussi de localités diverses et très distantes, ont été également étudiés. Dans cette espèce, on a rencontré aussi une structure chromosomique constante ; elle diffère de la structure-type d'*atoparvus* par une importante inversion paracentrique dans le segment droit du chromosome III, qui se détache nettement dans les hybrides du croisement ♀ *typicus* × ♂ *atoparvus* et réciproquement, chez lesquels on constate pareillement un défaut presque total d'union entre les homologues.

La forme *sacharovi* est l'une des moins étudiées. On a pourtant examiné des exemplaires provenant de la province de Rovigo et de nombreuses régions de la côte orientale de la Corse. A l'examen comparatif, on a toujours constaté une forte inversion paracentrique dans le segment gauche du chromosome III (voir figures 1 et 2) et une faible inversion dans le chromosome I ou chromosome X.

En revanche, *messeae* présente, dans le segment droit du chromosome III une forte inversion paracentrique, identique par sa forme à celle de *typicus*, qui se retrouve avec une constance absolue (voir figures 3 et 4), alors que tel n'est pas le cas pour certains réarrangements du chromosome X, que l'on rencontre également, avec une fréquence variable, dans diverses zones géographiques. Il s'agit en particulier de ceci : Dans la forme dite *messeae*, à part la constance absolue de l'inversion paracentrique du segment droit du chromosome III, certains individus présentent, pour le chromosome X, une structure-type identique à celle d'*atroparvus* et de *typicus*, alors que d'autres offrent, en revanche, une série de réarrangements très complexes dus probablement à des mutations successives antérieures, aussi à l'état homozygote (voir figures 5 et 6). On a d'abord pensé à un dimorphisme chromosomique dans l'espèce *messeae*, avec diverses valeurs adaptatrices, microclimatiques et saisonnières ; mais, plus tard, le problème du rapport entre les caractères morphologiques et les réarrangements du chromosome X s'est posé. Pour le résoudre, on a recueilli, pendant toute une saison, dans 11 postes répartis sur 120 km, entre les contreforts des Alpes et des Apennins, le plus grand nombre de sujets possible. On a analysé les caractères morphologiques des œufs et des larves et la structure chromosomique de ces dernières. L'étude a porté, en tout, sur les larves provenant de 1.570 œufs : 866 présentaient une inversion dans l'arrangement du chromosome X, et 704 un arrangement conforme au type.

On a procédé au classement des œufs, en suivant scrupuleusement le tableau dressé par Bates & Hackett,² et à celui des larves, selon les critères proposés dans le travail le plus récent de Bates¹ et celui de Buonomini.³ Ce faisant, on a classé les œufs, d'après leurs caractères, en 45 combinaisons réparties en trois groupes de classes. On a pu ainsi établir des tableaux statistiques, à l'examen desquels on a appliqué le test d'hétérogénéité, selon la formule de Brandt et Snedecor⁴.

On a constaté une corrélation étroite entre les stries des flotteurs et l'inversion dans le chromosome X, les flotteurs lisses correspondant à la structure-type de l'X. Les corrélations entre les arrangements chromosomiques et l'aspect de la surface des œufs étaient moins marquées, mais non moins significatives.

De ce qui précède, on peut conclure que l'on doit considérer comme *messeae* les sujets dont l'arrangement chromosomique présente une inversion, et comme *subalpinus* ceux dont l'arrangement du chromosome X

est conforme au type. L'avantage pratique de la découverte d'une telle corrélation est le suivant : alors que les caractères morphologiques des œufs varient, soit sous l'influence du milieu ambiant, soit pour des raisons intrinsèques dépendant des facteurs héréditaires qui régissent le phénotype — si bien qu'il n'est pas toujours possible de se fier à ces caractères pour distinguer *subalpinus* de *messeae* —, la constance des deux arrangements du chromosome X des glandes salivaires rend cette différenciation nette et assez facile à mettre en évidence par une technique très simple.

Quant aux corrélations entre les deux arrangements chromosomiques de l'X et le nombre des soies antépalmaires des tergites IV et V des larves au stade IV, elles sont en plein accord avec les conclusions auxquelles on est parvenu sur la valeur taxonomique des ramifications des soies. On sait, en fait, que le nombre des ramifications des soies antépalmaires ne varie qu'entre d'étroites limites chez *typicus* et *messeae*, mais que, par contre, ces variations sont plus étendues chez *subalpinus*. C'est pourquoi dans les gîtes larvaires où seuls *typicus* et *subalpinus* sont présents, il est possible, d'après des données statistiques, de déterminer la composition numérique des gîtes et éventuellement les variations saisonnières ; mais il est, par contre, impossible de déterminer la constitution du gîte larvaire lorsque *messeae* accompagne ces deux espèces. La distinction devient possible quand on utilise la méthode d'analyse chromosomique, car celle-ci permet de différencier *typicus* de *messeae* d'après l'arrangement chromosomique, tandis que *typicus* diffère de *subalpinus* par le nombre de ramifications des soies antépalmaires.

Une fois ces corrélations établies, on a été en mesure de tirer des déductions intéressantes sur la répartition géographique des trois espèces *typicus*, *subalpinus*, *messeae*, et sur leurs variations saisonnières. En fait, *typicus* se cantonne dans les zones à climat sub-méditerranéen, alors que *subalpinus* et *messeae* se trouvent plus fréquemment dans la plaine, où l'on observe aussi des variations saisonnières ; c'est ainsi qu'au printemps, *messeae* est plus nombreux que *subalpinus* et que l'inverse se produit en juin, *messeae* recommençant à prédominer vers la fin de l'été.

En conclusion, la méthode cytologique fondée sur les réarrangements chromosomiques découverts dans les formes italiennes du groupe *maculipennis* (sous-genre *Anopheles*) a non seulement fait ressortir la conformité des arrangements chromosomiques et de la classification fondée essentiellement sur les caractères morphologiques, mais elle s'est révélée très précieuse du fait qu'elle permet une analyse sûre des espèces, lorsque les caractères morphologiques sont trop variables pour conduire à des conclusions valides.

Mais on ne s'est pas borné à appliquer la méthode cytogénétique au seul *maculipennis* italien ; l'étude de *claviger* en a déjà bénéficié. On s'en est servi surtout pour découvrir les rapports phylogénétiques entre les *maculipennis* des régions paléo-arctiques et ceux des régions néo-arctiques.

En effet, nous sommes en mesure de présenter ici certaines observations préliminaires sur trois espèces nord-américaines que nous a aimablement envoyées le D^r L. E. Rozeboom, de Baltimore : *freeborni*, *quadrimaculatus* et *aztecus*.

La structure des chromosomes salivaires de *freeborni* ne paraît pas différer sensiblement de celle des formes italiennes d'*atroparvus*, si ce n'est par une légère inversion dans le chromosome X. Le segment gauche du chromosome III d'*aztecus* est identique à celui d'*atroparvus*, mais il a fallu arrêter l'étude à ce point, du fait que la souche s'est épuisée rapidement. *Quadrimaculatus* semble être celle des formes américaines qui présente le moins d'affinité structurale avec *atroparvus* ; elle paraît n'avoir en commun avec cette dernière espèce que quelques zones limitées à deux terminaisons. Pour le reste du matériel chromosomique, *quadrimaculatus* ne semble pas présenter de similitude de structure, à moins que ne soient intervenus, ce qui n'est pas improbable, des réarrangements assez profonds pour qu'il soit difficile de conclure à une affinité structurale. On pourra sans doute, par la suite, appliquer et étendre la méthode cytogénétique au sous-genre *Nyssorhynchus*, dont certaines espèces ont une grande importance épidémiologique. Nous avons entrepris l'étude d'une d'entre elles, *A. aquasalis*, avec le concours du D^r I. Ricciardi, venu spécialement du Brésil, sous les auspices de la Fondation Rockefeller, pour se familiariser avec la méthode cytogénétique. A vrai dire, les recherches sur le sous-genre *Nyssorhynchus* promettent d'être beaucoup plus encourageantes et plus faciles que ne l'ont été les travaux effectués jusqu'ici sur le sous-genre *Anopheles*. En effet, les structures chromosomiques des *A. aquasalis* apportés par le D^r Ricciardi et celles des exemplaires d'*albimanus* que nous a envoyés de Panama le D^r H. Trapido, sont d'une netteté incomparablement supérieure à celle des espèces du sous-genre *Anopheles* étudiées jusqu'à présent (voir figures 7 et 8).

Nous avons déjà dressé la carte chromosomique de *A. aquasalis*. Le D^r Ricciardi, de retour au Brésil depuis peu, a en mains la clé qui lui permettra de comparer entre elles un bon nombre d'espèces des séries *tarsimaculatus* et *argyritarsis*, dans lesquelles la différenciation des espèces est souvent difficile, parfois même impossible, et il pourra apporter ainsi une précieuse contribution soit à la recherche biologique pure, soit à la paludologie pratique.

SUMMARY

Cytogenetic methods have been applied to the group *Anopheles maculipennis* with the aim of clarifying certain problems in the biology of these mosquitos.

The chromosome structure of the salivary glands of *A. maculipennis labranchiae* var. *atroparvus* was selected as a standard on which to base a comparative study of the arrangement of chromosomes in other species of the *maculipennis* group, and in the

larvae resulting from cross-mating different races and species. Chromosome rearrangements in natural populations, and their relation to adaptation in various environments, particularly at the larval stage, have also been analysed.

The varieties of *maculipennis* studied were captured in various parts of Italy, chiefly in the Po valley. *Atroparvus* and *labranchiae*, together with their hybrids, appear to have a constant chromosome structure. *Typicus* arrangement is also constant, differing from *atroparvus* in showing considerable paracentric inversion in the right arm of the third chromosome. *Sacharovi* is distinguished by marked paracentric inversion in the left arm of the third chromosome, and slight inversion in the first chromosome, or chromosome X. *Messeae* shows considerable and constant paracentric inversion in the right arm of the third chromosome.

The morphological characters of eggs and larvae, and the larval chromosome structure, were analysed in specimens from 11 different catching-stations over a wide area. The larvae developed from 1,570 eggs were examined: 866 larvae showed inversion in the arrangement of chromosome X, and 704 showed standard structure. A correlation was noted between the egg-characters and inversion of chromosome X. Chromosome arrangement showing inversion, and standard arrangement of chromosome X, may thus be considered as the respective criteria for the identification of *messeae* and *subalpinus*—a basis for classification which has considerable practical advantages.

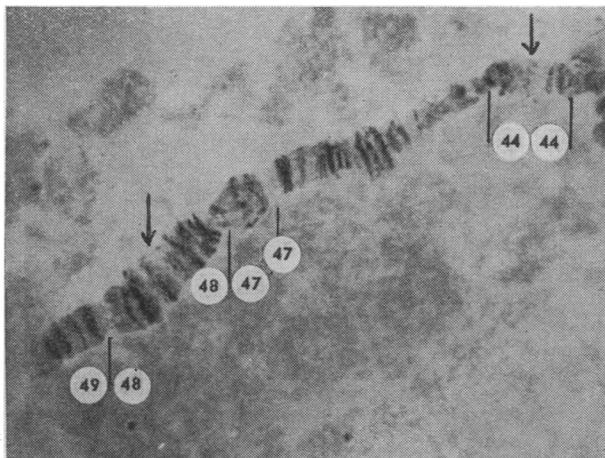
The results of this research confirm the validity of the classification according to morphological characteristics, and reveal a definite relationship between chromosome arrangement and certain properties such as the float-ridges of the eggs, and the antepalpmate hairs of the larvae. The investigation has also provided information on the geographical distribution and seasonal variation of *typicus*, *subalpinus*, and *messeae*.

Cytogenetic methods are thus shown to be of value in distinguishing between types of which the morphological characters are too variable to allow of reliable identification. In particular, these methods facilitate the recognition of *subalpinus* and *messeae* in breeding-places where larvae of these species, and those of *typicus*, coexist. Phylogenetic relations between, and geographical distribution of, the various forms of *maculipennis* in palaeo-arctic and neoarctic regions have also been studied by these means, and cytogenetics may usefully be applied to the study of the subgenus *Nyssorhynchus*, certain species of which are of great epidemiological importance.

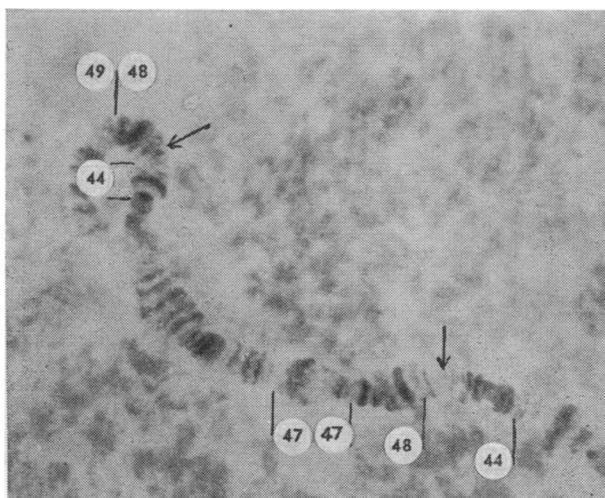
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bates, M. (1939) *Riv. Malariol.* 18, 299
2. Bates, M. & Hackett, L. W. (1938) Dans : *VII. Kongress für Entomologie*, Berlin, 3, 1555
3. Buonomini, G. (1940) *Riv. Parassit.* 4, 163
4. Snedecor, G. W. (1946) *Statistical methods applied to experiments in agriculture and biology*, 4th ed., Ames, Iowa

**FIG. 1. BRAS GAUCHE DU CHROMOSOME III
D'ATROPARVUS — ARRANGEMENT-TYPE**

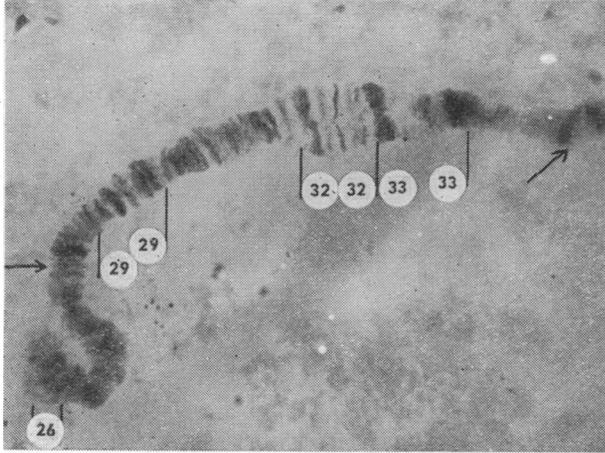


**FIG. 2. BRAS GAUCHE DU CHROMOSOME III
DE SACHAROVI — RÉARRANGEMENT**

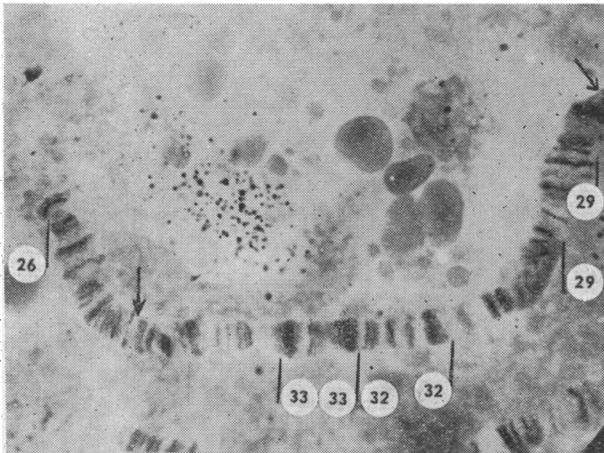


Les traits et les chiffres indiquent des sections particulières du chromosome. Les flèches indiquent les points où s'est produite la rupture qui, à la suite de l'inversion, a entraîné le réarrangement.

**FIG. 3. BRAS DROIT DU CHROMOSOME III
D'ATROPARVUS — ARRANGEMENT-TYPE**



**FIG. 4. BRAS DROIT DU CHROMOSOME III DE TYPICUS,
MESSEAE ET SUBALPINUS — RÉARRANGEMENT**



Les traits et les chiffres indiquent les sections particulières du chromosome. Les flèches indiquent les points où s'est produite la rupture qui, à la suite de l'inversion, a entraîné le réarrangement.

FIG. 5. CHROMOSOME X D'ATROPARVUS — ARRANGEMENT-TYPE

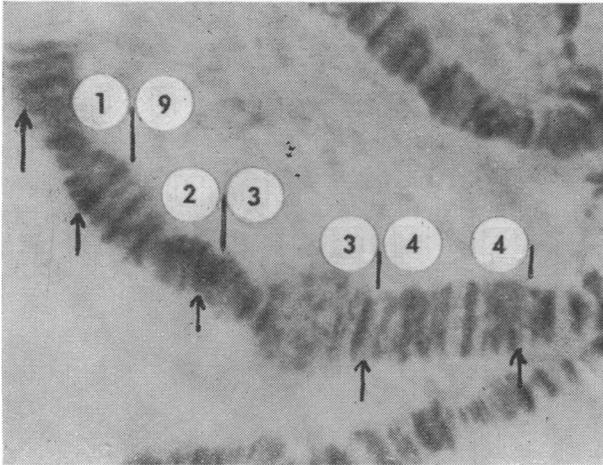
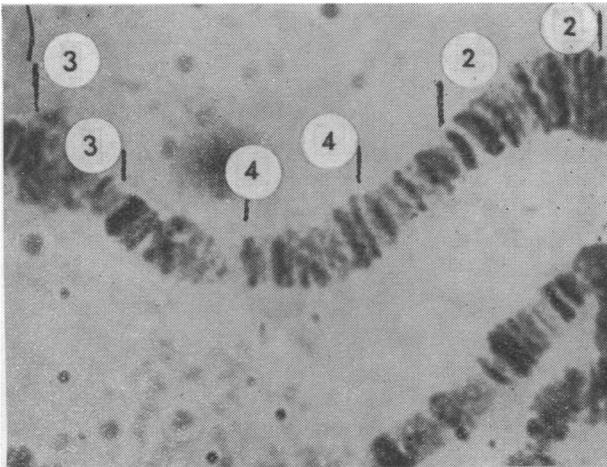
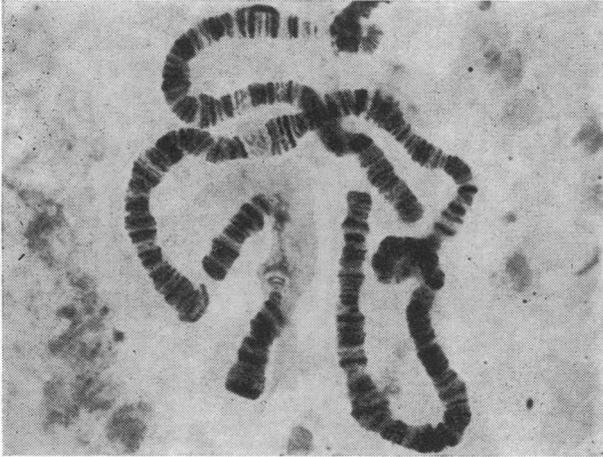


FIG. 6. CHROMOSOME X DE MESSEAE — RÉARRANGEMENT



Les traits et les chiffres indiquent des sections particulières du chromosome. Les flèches indiquent les points où s'est produite la rupture ayant entraîné le réarrangement.

**FIG. 7. CHROMOSOMES SALIVAIRES DU SOUS-GENRE
NYSSORHYNCHUS — A. AQUASALIS**



**FIG. 8. CHROMOSOMES SALIVAIRES DU SOUS-GENRE
NYSSORHYNCHUS — A. ALBIMANUS**

