

« LE COMPLEXE *MACULIPENNIS* » : CRITÈRES MORPHOLOGIQUES ET ENZYMATIQUES DE DÉTERMINATION

J. SUZZONI-BLATGER*, R. CIANCHI**, L. BULLINI**, M. COLUZZI***

RÉSUMÉ

L'étude des systèmes gène-enzymes du « complexe *maculipennis* » du sud-ouest de la France confirme la présence de *Anopheles messeae* et l'absence d'individus hybrides entre les espèces jumelles du complexe. Elle confirme la médiocrité du critère morpho-

logique représenté par les soies antépalmées des larves qui montrent des variations géographiques très importantes. Cette étude montre des fréquences alléliques semblables pour les souches du sud-ouest de la France et du reste de l'Europe.

SUMMARY: The « *maculipennis* complex » : morphological and enzymatic characteristics of determination.

The electrophoretic analysis of gene-enzyme systems of the « complex *maculipennis* » in the southwestern of France confirms the existence of *A. messeae* and the lack of hybrids. The large

geographic variations in the larval chetotaxy of the 4th instar and the allelic frequencies of *Anopheles atroparvus*, *Anopheles typicus* and *Anopheles messeae* seems like those of european populations.

INTRODUCTION

Dans le genre *Anopheles*, et dans le sud-ouest de la France, le « complexe *maculipennis* » est formé de quatre espèces jumelles : *A. atroparvus*, *A. maculipennis (typicus)*, *A. subalpinus* et *A. messeae*. Le démembrement de ces espèces jumelles est basé essentiellement sur la chétotaxie larvaire et des critères ovulaires. Toutefois, pour certaines d'entre elles, de nombreuses difficultés de détermination systématique surgissent du fait de l'hétérogénéité observée dans les pontes et du fait du chevauchement parfois très important des valeurs de la chétotaxie des larves IV (4 et 5). Même en couplant ces deux méthodes, ce qui est impossible sur le terrain, et qui, de plus, est très lourd au laboratoire, il reste encore environ 5 % des souches qui ne peuvent être déterminées.

L'étude électrophorétique des systèmes gène-enzymes effectuée sur les membres italiens du complexe *maculipennis* (1, 3) a montré l'existence de fortes différences de fréquences alléliques pour un certain nombre de loci. Ces loci « diagnostiques » permettent chacun d'assigner correctement un individu (larve ou adulte) à l'une des espèces

avec une probabilité d'erreur de 0 à 5 %. Cette probabilité devient négligeable en utilisant plus d'un locus diagnostique.

Nous avons entrepris le démembrement du « complexe *maculipennis* » de la région de Toulouse (France) en utilisant, pour chaque souche, les caractères ovulaires, la chétotaxie larvaire et les systèmes gène-enzymes suivants : l'hydroxybutyrate déshydrogénase (*Hbdh*), qui discrimine à 99 % *A. maculipennis (typicus)*, de *A. atroparvus* et *A. messeae*; l'enzyme malique (*Me*) et la phosphatase acide (*Acph*), qui discriminent, chacune à 95 %, *A. atroparvus* de *A. maculipennis (typicus)* et *A. messeae*; l'isocitrate déshydrogénase-2 (*Idh-2*), qui discrimine *A. messeae* de *A. maculipennis* à 99 % et partiellement, de *A. atroparvus* à 90 %.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les femelles sont capturées dans une bergerie située à 15 km environ de la ville de Toulouse. Chaque femelle est mise en élevage individuel. Pour chacune des pontes obtenues, les œufs sont examinés un par un à la loupe binoculaire puis sont remis en élevage. Au stade IV, les soies antépalmées des segments IV et V sont dénombrées pour chaque larve. L'élevage est prolongé jusqu'à l'obtention des adultes; ceux-ci sont nourris avec du sucre et congelés au troisième jour de vie imaginale jusqu'à leur passage en électrophorèse.

Une analyse électrophorétique horizontale standard avec gel d'amidon (10 %) a été faite sur les exemplaires homogénéisés individuellement en eau distillée (2, 10). Les systèmes tampon et les méthodes de coloration pour les quatre loci enzymatiques analysés génétiquement (*Hbdh*, *Me*, *Idh-2*, *Acph*) sont donnés en détail dans les tableaux I et II.

* Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, 37, allées Jules-Guesde, F 31073 Toulouse Cedex.

** Dipartimento di Genetica e Biologia molecolare, Università di Roma La Sapienza, via Lancisi 29, 00161, Rome, Italie.

*** Istituto di Parassitologia, Università di Roma, Piazzale delle Scienze 5, Rome, Italie.

Accepté le : 23 octobre 1989.

TABLEAU I. — Systèmes tampon (reagents analytiques per litre; pH à température ambiante).

Système tampon	Électrodes	Gel
Tris/citrate I (Selander <i>et al.</i> , 1971) (9)	0,223 M Tris/0,086 M acide citrique, pH 6,3 (27 g Tris, 18,07 g acide citrique monohydraté)	0,008 M Tris/0,003 M acide citrique, pH 6,7 (0,97 g Tris, 0,63 g acide citrique monohydraté)
Phosphate/citrate (Harris, 1966) (6)	0,15 M tri-sodium citrate/0,24 M dihydrogénophosphate de sodium, pH 6,3 (44,11 g tri-sodium citrate, 33,12 g NaH ₂ PO ₄)	Tampon d'électrode dilué 1 : 40, ajusté à pH 6,3 avec 0,2 M acide citrique
Tris/versene/borate (modifié de Brewer & Sing, 1970) (2)	0,21 M Tris/0,15 M acide borique 0,006 M EDTA, pH 8 (25,4 g Tris, 9,24 g acide borique, 20 g EDTA)	0,021 M Tris/0,02 M acide borique, pH 8 (2,5 g Tris, 1,24 g acide borique, 0,25 g EDTA)

TABLEAU II. — Méthodes électrophorétiques.

Enzyme	Système tampon	V/cm	Temps	Tampon de coloration	Coenzymes	Substrats	Activateurs/Inhibiteurs	Méthode de visualisation
EC 1.1.1.30 HBDH (mod. de Shaw and Prasad, 1970) (10)	3	8	4 h	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NAD 15 mg	hydroxybutyrate 300 mg		MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0,8 %
EC 1.1.1.40 ME (Ayala <i>et al.</i> , 1972) (1)	1	8	3 1/2 h	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NADP 5 mg	1 M acide L-malique pH 7 5 ml	MgCl ₂ 10 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0,8 %
EC 1.1.1.42 IDH (Shaw and Prasad, 1970) (10)	1	7	3 1/2 h	0,05 M Tris/HCl pH 8 30 ml	NADP 5 mg	DL-isocitrate 60 mg	MgCl ₂ 10 mg	MTT 10 mg PMS 2 mg agar 0,8 %
EC 3.1.3.2 ACPH (Harris and Hopkinson, 1976) (7)	2	8	3 1/2 h	0,05 M citrate pH 4,5 50 ml		α-naphtylphosphate 100 mg		Fast Garnet GBC 100 mg

La désignation des loci et des allèles a été la même que dans les études précédentes; les loci sont numérotés en ordre de mobilité décroissante à partir du plus anodique, tandis que les allèles sont numérotés avec des nombres qui indiquent leur mobilité relative par rapport à une population standard (*A. maculipennis* de Frosinone, Italie) (3).

RÉSULTATS

Trois espèces jumelles ont été identifiées au cours de cette étude, ce sont *Anopheles maculipennis (typicus)*, *A. atroparvus*, *A. messeae*. Les deux premières sont les espèces les plus répandues dans le sud-ouest toulousain, *A. messeae* est rare, ainsi que *A. subalpinus* qui n'a pas été retrouvée dans cet échantillonnage.

1 — *Anopheles messeae*

A. messeae avait déjà été signalée dans un seul gîte, en 1954 (11), puis sa présence contestée en 1958; il avait été admis sa confusion avec *subalpinus* (12). Sa présence a été mentionnée à nouveau en 1980 (13) et depuis cette date, régulièrement retrouvé tous les étés. *A. messeae* qui est donc sympatrique d'*A. subalpinus* dans la Haute-Garonne, paraît être à la limite de son aire de répartition.

Une seule ponte a été obtenue. La moyenne des soies antépalmées est de 18,22 ($n = 16$) avec des valeurs extrêmes des brins des soies allant de 14 à 25. La diagnose ovulaire et la chétotaxie larvaire sont confirmées par l'analyse électrophorétique. En particulier, comme le montre le tableau III, la souche de *A. messeae* se différencie de celle de *A. maculipennis* pour avoir en homozygotie les allèles *Hbdh*¹⁰² et *Idh-2*¹⁰⁵, et se différencie de celles de *A. atroparvus* pour avoir en homozygotie les allèles *Me*¹⁰⁰, *Idh-2*¹⁰⁵ et *Acph*¹⁰⁰. Ces allèles sont ceux que l'on retrouve le plus fréquemment dans les populations européennes de *A. messeae* étudiées (1-3 et données non publiées).

2 — *Anopheles maculipennis (typicus)*

Le diagnose ovulaire des 25 souches de *maculipennis* n'a pas posé de problèmes. Les moyennes des soies antépalmées des larves de stade IV s'échelonnent de 12,64 à 18,14 avec des valeurs extrêmes du nombre de brins comprises entre 11 et 22. Pour toutes ces souches, les électrophorèses des adultes confirment les déterminations effectuées aux stades œufs et larves. Les souches de *A. maculipennis* se distinguent de celles de *A. atroparvus* pour avoir les allèles *Hbdh*¹⁰⁰ et *Acph*¹⁰⁰ en homozygotie ou, à basse fréquence, en hétérozygotie respectivement avec *Hbdh*⁹², *Hbdh*¹⁰⁸ et

TABLEAU III. — Fréquences génotypiques des loci diagnostiques *Hbdh*, *Me*, *Idh-2* et *Acph* dans les échantillons de *Anopheles messeae*, *A. maculipennis* et *A. atroparvus* (typicus) des environs de Toulouse (France).

Loci	Génotypes	A. Messeae	A. maculipennis (typicus)	A. atroparvus
<i>Hbdh</i> *	92/100	— —	0,04	— —
	98/102	— —	— —	0,08
	100/100	— —	0,85	— —
	100/108	— —	0,11	— —
	102/102	1,00	— —	0,58
	102/108	— —	— —	0,24
	102/110	— —	— —	0,05
<i>Me</i>	94/106	— —	— —	0,03
	98/100	— —	0,02	— —
	100/100	1,00	0,98	0,02
	100/106	— —	— —	0,25
	106/106	— —	— —	0,69
<i>Idh-2</i>	100/100	— —	1,00	1,00
	105/105	1,00	— —	— —
<i>Acph</i>	90/94	— —	— —	0,07
	94/94	— —	— —	0,85
	94/100	— —	— —	0,06
	94/106	— —	— —	0,02
	100/100	1,00	0,90	— —
	100/106	— —	0,10	— —

* Estimation relative aux femelles, *Hbdh* étant un locus lié au sexe.

*Acph*¹⁰⁶ (tableau III). Au locus *Me*, la discrimination entre ces deux espèces n'est pas complète (98 %) car le génotype *Me*^{100/100}, trouvé dans la grande majorité des souches de *A. maculipennis*, est présent à 2 % chez *A. atroparvus* de Toulouse. L'absence de l'allèle *Hbdh*¹⁰², et la complète homozygotie pour *Idh-2*¹⁰⁰ permettent de reconnaître *A. maculipennis* de *A. messeae*. Les fréquences alléliques des quatre loci, obtenues par l'estimation des génotypes parentaux des souches analysées, sont en accord avec celles des autres populations européennes de *A. maculipennis* étudiées (1-3 et données sont publiées).

3 — *Anopheles atroparvus*

Les moyennes des soies antépalmées s'échelonnent de 10,8 à 16,0 et les valeurs extrêmes des brins des soies sont 8 et 23.

Les résultats sont résumés dans le tableau IV. Environ 70 % des souches ont pu être identifiées par le diagnostic ovulaire, 50 % par la chétotaxie larvaire, tandis que toutes les souches ont été identifiées par électrophorèse. Les souches de *A. atroparvus* se différencient de *A. maculipennis* par l'allèle *Hbdh*¹⁰², trouvé en homozygotie ou en hétérozygotie avec les allèles *Hbdh*⁹⁸, *Hbdh*¹⁰⁸ et *Hbdh*¹¹⁰; et pour l'allèle *Acph*⁹⁴, dans la majorité des cas en homozygotie ou en hétérozygotie, avec *Acph*⁹⁰, *Acph*¹⁰⁰ et *Acph*¹⁰⁶ (tableau III). Les génotypes les plus fréquents au locus *Me*, qui comme nous l'avons vu, différencie à 98 % de *A. maculipennis*, sont *Me*^{100/106} et *Me*^{100/106}. Enfin les

TABLEAU IV. — Comparaison des déterminations systématiques obtenues par la diagnose ovulaire (J. S.), le nombre de soies antépalmées $\pm$ l'écart-type (J. S.) et la méthode électrophorétique (R. C.). Dans la colonne diagnose larvaire, le premier nombre correspondant à la moyenne du nombre de soies antépalmées ($\pm$ écart-type) et le second au nombre de mesures effectuées.

N° Ponte	Diagnose ovulaire	Diagnose larvaire	Électrophorèse
Am5339	?	14,32 $\pm$ 1,96 31	<i>atroparvus</i>
Am5369	<i>atroparvus</i>	mortalité stade 2	<i>atroparvus</i>
Am5370	<i>atroparvus</i>	11,10 $\pm$ 1,59 20	<i>atroparvus</i>
5385	<i>atroparvus</i>	12,17 $\pm$ 1,37 30	<i>atroparvus</i>
5394	?	14,44 $\pm$ 2,34 25	<i>atroparvus</i>
5396	<i>atroparvus</i>	14,10 $\pm$ 1,77 20	<i>atroparvus</i>
5404	<i>atroparvus</i>	16,00 $\pm$ 2,38 20	<i>atroparvus</i>
5405	<i>atroparvus</i>	10,77 $\pm$ 1,33 30	<i>atroparvus</i>
5407	<i>atroparvus</i>	12,22 $\pm$ 1,31 31	<i>atroparvus</i>
5423	<i>atroparvus</i>	mortalité stade 1	<i>atroparvus</i>
5439	<i>atroparvus</i>	12,68 $\pm$ 1,92 34	<i>atroparvus</i>
5448	?	non dénombrées	<i>atroparvus</i>
5450	<i>atroparvus</i>	13,81 $\pm$ 2,26 31	<i>atroparvus</i>
5451	<i>atroparvus</i>	non dénombrées	<i>atroparvus</i>
5463	<i>atroparvus</i>	mortalité stade 1	<i>atroparvus</i>
5465	?	14,86 $\pm$ 1,98 21	<i>atroparvus</i>
5470	?	14,95 $\pm$ 1,79 20	<i>atroparvus</i>
5483	?	non dénombrées	<i>atroparvus</i>
5484	<i>atroparvus</i>	non dénombrées	<i>atroparvus</i>
5491	<i>atroparvus</i>	non dénombrées	<i>atroparvus</i>

loci *Idh-2*, avec le génotype *Idh-2*^{100/100}, et *Acph* permettent la diagnose entre *A. atroparvus* et *A. messeae*. Pour *A. atroparvus* les fréquences alléliques ne diffèrent pas significativement de celles des autres populations européennes.

Les résultats obtenus confirment les observations faites au cours de notre enquête : la diagnose ovulaire est un meilleur critère de détermination que la chétotaxie larvaire, à condition d'étudier la totalité des pontes (14). Nous obtenons pour les soies antépalmées des moyennes très élevées jamais retrouvées jusqu'à présent dans la bibliographie. La fiabilité des techniques électrophorétiques nous permet de ne pas mettre en doute la validité de ces résultats. Avant l'étude des systèmes gène-enzymes, nous avions envisagé l'hypothèse d'une hybridation *atroparvus* $\times$ *maculipennis*, mais les électrophorèses n'ont pas révélé de souches hybrides dans la population étudiée. Ceci confirme que les variations morphologiques des œufs et des larves sont la conséquence d'adaptations au milieu. Rioux, en 1958, signalait à propos d'*atroparvus* : « il s'agit d'une forme essentiellement rustique, douée d'une grande plasticité mésoclimatique, ... cette plasticité peut être conçue comme l'expression écologique d'une hétérogénéité génétique » (8).

CONCLUSION

L'étude des systèmes gène-enzymes de 46 souches d'*Anopheles* appartenant au « complexe *maculipennis* » dans le sud-ouest de la France met en évidence :

a — 3 espèces jumelles : *A. atroparvus*, *A. maculipennis* (*typicus*) et *A. messeae* (*A. subalpinus* n'ayant pas été retrouvé dans cet échantillonnage), confirmant ainsi la présence de *A. messeae*;

b — de très grandes variations géographiques dans la chétotaxie des larves de 4^e stade d'*A. atroparvus*. Ce critère morphologique apparaît extrêmement fluctuant, ce qui remet en cause les déterminations effectuées sur le terrain à partir d'un petit échantillonnage surtout dans les zones géographiques où coexistent *A. atroparvus*, *maculipennis* (*typicus*) et *messeae*;

c — que les fréquences alléliques des souches de *A. atroparvus*, *A. maculipennis* (*typicus*) et *A. messeae* du sud-ouest de la France ne diffèrent pas de celles des autres populations européennes;

d — l'absence d'individus hybrides malgré la coexistence de ces espèces jumelles dans les mêmes gîtes d'adultes.

RÉFÉRENCES

1. Ayala F. J., Powell J. R., Tracey M. L., Mourao C. A., Perez-Salas S. : Enzyme variability in the *Drosophila willistoni* group. IV. Genic variation in natural populations of *Drosophila willistoni*. *Genetics*, 1972, 70, 113-139.
2. Brewer G. J., Sing C. F. : An Introduction to Isozyme Techniques. *Academic Press*, New York et London, 1970.
3. Bullini L., Coluzzi M. : Electrophoretic studies on gene-enzyme systems in mosquitoes (Diptera-Culicidae). *Parassitologia*, 1973, 15, 221-248.
4. Guy Y., Salières A., Boesiger E. : Contribution à l'étude du « complexe *maculipennis* » (Diptera-Culicidae-Anophelinae). Mise au point en 1975. *Ann. biol.*, 1976, 15, 227-282.
5. Harant H., Rioux J. A., Attisso M., Ruffie J. : Variabilité génétique chez *Anopheles atroparvus atroparvus*. *C. R. Soc. Biol.*, 1957, 151, 2158-2162.
6. Harris H. : Enzyme polymorphism in man. *Proc. Roy. Soc. London B*, 1966, 169, 298-310.
7. Harris H. et Kopkinson D. A. : Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. *North-Holland Publishing Company*, Amsterdam-Oxford. *America Elsevier Publishing Company Inc.*, 1976, New York.
8. Rioux J. A. : Les Culicides du « Midi » méditerranéen. *Ed. Paul Lechevalier*, Paris, 1958, 303 p.
9. Selander R. K., Smith M. H., Yang S. Y., Johnson W. E., Gentry J. B. : Biochemical polymorphism in the genus *Peromyscus*. I. Variation of the olf-field mouse (*Peromyscus polionotus*). *Studies in Genet.*, Univ. Texas publ. N. 7103, 1971, 49-90.
10. Shaw C., Prasad R. : Starch gel electrophoresis of enzymes : a compilation of recipes. *Biochem. Genet.*, 1970, 54, 297-320.
11. Sicart M. : Révision des Culicidés du Bassin sous-pyrénéen. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*, 1954, 89, 231-234.
12. Sicart M., Rioux J. A., Ruffie J. : Les biotypes d'*Anopheles maculipennis* dans la région de Toulouse. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*, 1958, 93, 73-78.
13. Suzzoni-Blatger J., Anglade F., Larrouy G. : Présence d'*Anopheles messeae* (Diptera-Culicidae) en Haute-Garonne. *Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse*, 1980, 116, 175-178.
14. Suzzoni-Blatger J., Sevin A. : Étude de la chétotaxie larvaire du « complexe *maculipennis* » (Diptera-Culicidae) dans la région de Toulouse. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1982, 57, 649-654.