

**Phénomènes d'incompatibilité
cytoplasmique
chez le moustique *Culex pipiens* L.
(Diptera : Culicidae)
du sud de la France.
Effet de la tétracycline⁽¹⁾**

Michel MAGNIN⁽²⁾⁽³⁾, Nicole PASTEUR⁽²⁾

Résumé

Deux souches de *Culex pipiens*, bidirectionnellement incompatibles et originaires du sud de la France, ont été croisées après traitement des larves à différentes concentrations de tétracycline. Nous montrons qu'en plus d'une diminution générale de la fertilité des femelles, le traitement par la tétracycline affecte profondément les relations d'incompatibilité, mais ce résultat dépend de la souche considérée et de la concentration de tétracycline utilisée.

Mots-clés : *Culex pipiens* — Incompatibilité cytoplasmique — Tétracycline.

Summary

CYTOPLASMIC INCOMPATIBILITIES IN *CULEX PAPIENS* L. MOSQUITOES (DIPTERA : CULICIDAE) FROM SOUTHERN FRANCE. ACTION OF TETRACYCLINE. Two bidirectionally incompatible strains, IAM and S54, were used to investigate the action of tetracycline treatment during larval stages, on incompatibility relationships. In all crosses, the fertility of treated females was low, probably due to a physiological action of tetracycline independent of the mechanism of incompatibility.

Incompatibility relationships between mosquitoes of the IAM strain, and between females IAM and males S54 were modified by tetracycline treatments (whereas IAM mosquitoes became incompatible, treated or untreated females IAM became compatible with treated males S54), but this action was gradual with increasing doses of tetracycline. On the contrary, no dose dependent action was observed between mosquitoes of strain S54, and no compatibility was restored between females S54 and males IAM at the tetracycline concentrations used (i.e. 0.0125, 0.0250 and 0.0500 g/l). It was shown that the modification of incompatibility relationships triggered by tetracycline is inherited in the untreated progeny of treated mosquito, during at least two generations.

These results are discussed in relation to the involvement of a microorganism in cytoplasmic incompatibility.

Key words : *Culex pipiens* — Cytoplasmic incompatibility — Tetracycline.

(1) Ce travail a bénéficié de l'aide financière de l'INSERM (contrat 84-1019), du MRT (contrat 85.T.0869) et du PIREN/CNRS (ATP « Écotoxicologie »).

(2) Laboratoire de Génétique, Institut des Sciences de l'Évolution (CNRS : UA 327), Université de Montpellier II, Place E. Bataillon, 34060 Montpellier, France.

(3) ORSTOM, U.R. Lutte contre les Vecteurs, 3191 route de Mende, 34060 Montpellier, France.

Introduction

Yen et Barr (1971, 1973) ont émis l'hypothèse que l'agent responsable des phénomènes de stérilité à hérédité maternelle observés dans certains croisements entre souches du complexe *Culex pipiens* (incompatibilité cytoplasmique, Laven 1967), était un micro-organisme symbiotique des gonades, *Wolbachia pipientis*. Bien que l'isolement du micro-organisme et sa réinjection dans un organisme préalablement rendu aposymbiotique n'aient pas, à notre connaissance, été réalisés, cette hypothèse s'appuie sur le rétablissement partiel de la compatibilité d'un croisement lorsqu'on élimine le micro-organisme par la tétracycline (Yen, 1972 ; Yen et Barr, 1973 ; Portaro et Barr, 1975 ; Subbarao *et al.*, 1977 ; Suenaga, 1981).

Raymond *et al.* (1986) et Magnin *et al.* (sous presse) ont décrit un système complexe de stérilités entre souches de *Culex pipiens* isolées dans la région de Montpellier (Sud de la France). Phénologiquement cette stérilité ressemble au phénomène d'incompatibilité cytoplasmique décrit par Laven (1967) et Jost (1970) et étudié par Yen et Barr (1971, 1973). Afin de préciser cette homologie, nous avons étudié l'effet du traitement à la tétracycline sur la compatibilité d'un croisement entre deux souches incompatibles de *Culex pipiens*.

Matériel et méthodes

Deux souches de *Culex pipiens*, S54 et IAM, fondées à partir de deux populations naturelles récoltées dans la région de Montpellier et bidirectionnellement incompatibles (Magnin *et al.*, sous presse), ont été utilisées. Ces souches sont entretenues en élevage dans les conditions décrites par Raymond *et al.* (1986).

Le protocole de traitement des larves a été adapté de celui proposé par Portaro et Barr (1975). Les pontes sont mises à éclore dans deux litres d'eau distillée contenant du chlorhydrate de tétracycline (Tétracycline Diamant ND). Trois concentrations de tétracycline ont été testées : 0,0125 mg/ml, 0,0250 mg/ml et 0,0500 mg/ml. L'aliment, des croquettes de chat, est ajouté dès l'éclosion des larves. Huit à dix jours après le début du traitement, de l'eau distillée a été ajoutée dans les bacs d'élevage afin de maintenir le volume initial. Les nymphes obtenues ont été isolées et 30 à 50 adultes vierges de chaque sexe ont été croisés. Les pontes obtenues ont été mises à éclore individuellement et observées avec une loupe binoculaire au bout de cinq jours afin de déterminer le nombre d'œufs éclos, embryonnés ou sans développement embryonnaire apparent, qu'elles comportaient.

Nous désignerons par IAMT et S54T les parents des croisements qui ont été traités à la tétracycline. Un croisement nommé (A × B) est réalisé entre des femelles A et des mâles B.

Résultats et discussion

Le traitement par la tétracycline entraîne un allongement de la durée du développement larvaire ainsi que l'ont signalé Subbarao *et al.* (1977) et Awahmukalah et Brooks (1983). Huit à dix jours supplémentaires sont nécessaires aux larves pour atteindre le stade nymphe, et la mortalité larvaire est légèrement augmentée, surtout aux premiers stades.

L'action des différentes concentrations de tétracycline a été étudiée dans quatre croisements. Les pontes obtenues ont été classées en quatre groupes : (a) pontes à forts taux d'éclosions (plus de 80 % d'œufs éclos), (b) pontes faiblement ou moyennement écloses (1 à 80 % d'éclosion), (c) pontes embryonnées non écloses et (d) pontes sans développement embryonnaire (tabl. I).

En l'absence de tétracycline, les croisements S54 × IAM et IAM × S54 produisent deux types de pontes « stériles » : les plus abondantes (83,9 % et 85,7 % respectivement) contiennent une majorité d'œufs embryonnés dont moins de 1 % atteignent le stade larvaire ; les autres contiennent uniquement des œufs non embryonnés.

Alors que le croisement S54T × IAMT est resté incompatible aux trois concentrations de tétracycline étudiées, une compatibilité partielle est rétablie dans le croisement IAMT × S54T. Cet effet est progressif en fonction de l'augmentation de la concentration de tétracycline. A 0,0250 mg/ml, 12 des 31 pontes obtenues sont partiellement compatibles, et à 0,0500 mg/ml, on obtient sur 32 pontes, 13 pontes partiellement compatibles et 4 qui éclosent normalement (plus de 80 % d'œufs éclos).

L'action de différentes doses de tétracycline dans les souches S54 et IAM a aussi été étudié. Avec le croisement IAM × IAM, aucun effet notable n'a été enregistré aux trois concentrations quand seuls les mâles sont traités (croisement IAM × IAMT) ; par contre, quand les femelles sont traitées (croisements IAMT × IAM et IAMT × IAMT), la descendance du croisement est profondément affectée et l'action de la tétracycline semble progressive et fonction de la concentration utilisée pour traiter les parents. Ainsi, pour le croisement IAMT × IAMT par exemple, à la concentration de 0,0125 mg/ml, la majorité des pontes éclosent à plus de 80 % ; à 0,0250 mg/ml on obtient encore une telle ponte, mais aucune à la concentration de 0,500 mg/ml.

TABLEAU I

Effet de différentes concentrations de tétracycline sur la nature des pontes obtenues dans différents croisements.

Croisement	Traitement		Concentration (g/l)	Nombre de pontes étudiées	Pontes embryonnées avec			Pontes non embryonnées	
	♀	♂			> 80%	1 - 80%	< 1%		
	d'éclosions								
IAM x S54	non	non	0	56	0	0	54	2	
	oui	oui	0,0125	36	0	0	7	29	
			0,0250	31	0	12	16	3	
			0,0500	32	4	13	2	13	
		oui	0,0125	24	0	0	23	1	
			0,0500	25	0	0	2	23	
		non	0,0125	7	0	0	2	5	
		oui	0,0500	20	0	10	3	7	
	S54 x IAM	non	non	0	31	0	0	27	4
		oui	oui	0,0125	8	0	0	5	3
			0,0250	13	0	0	13	0	
			0,0500	6	0	1	3	2	
		oui	0,0125	2	0	0	0	2	
			0,0500	4	0	0	0	4	
		non	0,0125	30	0	3	27	0	
		oui	0,0250	20	0	3	16	1	
IAM x IAM		non	non	0	40	37	3	0	0
		oui	oui	0,0125	20	14	0	6	0
			0,0250	24	1	2	21	0	
			0,0500	19	0	7	12	0	
		oui	0,0125	11	3	0	4	4	
			0,0250	19	0	0	18	1	
			0,0500	27	0	0	12	15	
		non	0,0125	19	19	0	0	0	
		oui	0,0500	19	19	0	0	0	
	S54 x S54	non	non	0	40	31	8	0	1
oui		oui	0,0125	0*	-	-	-	-	
			0,0250	2	0	0	0	2	
			0,0500	6	0	5	1	0	
		oui	0,0125	4	0	0	0	4	
			0,0500	0*	-	-	-	-	
		non	0,0125	22	6	6	0	10	
		oui	0,0500	15	10	0	0	5	

(*) : aucune ponte obtenue.

Avec le croisement S54 x S54, on constate également un effet de la tétracycline qui se traduit par l'apparition de pontes qui n'éclosent pas. Toutefois, cet effet ne semble pas varier en fonction des doses utilisées. Il faut noter que le traitement des femelles semble affecter leur capacité à produire des pontes ; ce phénomène a été observé dans tous les croisements S54T x S54 et S54T x S54T et explique les petits effectifs de pontes obtenus.

L'action de la tétracycline étant la plus marquée avec la concentration de 0,0500 mg/ml, nous avons choisi cette dose pour étudier son effet sur l'ensemble des croisements possibles entre individus traités ou non des souches IAM et S54 (tabl. II).

L'élevage des larves en présence de tétracycline se traduit par l'apparition d'une compatibilité partielle dans les croisements IAM x S54T (n° 12) et IAMT

x S54T (n° 14). Dans le croisement IAM x S54T, 76,9 % des pontes ont présenté au moins une larve éclos et le pourcentage moyen d'œufs éclos par ponte varie de 0 à 89,7 % (moyenne 30,2 %). Pour le croisement IAMT x S54T, 89,5 % des pontes ont éclos et le taux d'éclosions varie de 0 à 92,5 % (moyenne 38,5 %). Toutefois, dans les deux cas, quelques pontes gardent un caractère incompatible (respectivement 23,1 et 10,5 % des pontes embryonnées). Les femelles S54, qu'elles soient traitées ou non, sont incompatibles avec les mâles IAM, qu'ils soient traités ou non. Il est à noter qu'à l'exception des croisements IAM x IAM (n° 1), IAM x IAMT (n° 2), S54 x S54 (n° 5) et S54 x S54T (n° 6), la proportion d'œufs ne présentant aucun développement embryonnaire apparent est très importante (39 à 87 %). Un résultat analogue a aussi été rapporté par Yen (1972).

TABLEAU II

Analyse des pontes obtenues sans ou après traitement des larves à la tétracycline (0,05 g/l).

Croisements	Pontes étudiées	nombre moyen d'oeufs par ponte (*)	Pontes sans embryons	Pontes avec embryons					
				sans éclosions		avec éclosions			
				nombre	(%)	% moyen par ponte d'oeufs (*)	éclos	embryonnés	non embryonnés
1- IAM x IAM	40	65,6 (19,4)	0	0	40	(100 %)	92,7 (13,0)	1,5 (5,4)	5,6 (9,0)
2- IAM x IAMF	19	84,8 (31,7)	0	0	19	(100 %)	95,7 (8,7)	2,1 (4,8)	2,1 (4,2)
3- IAMT x IAM	27	85,5 (14,5)	15	12	0	(0 %)	0	12,8 (18,2)	87,2 (18,2)
4- IAMT x IAMF	19	66,9 (30,6)	0	12	7	(36,8 %)	7,6 (16,9)	9,0 (8,4)	83,4 (18,1)
5- S54 x S54	40	58,8 (19,0)	1	0	39	(100 %)	84,0 (16,5)	8,2 (9,6)	7,8 (12,8)
6- S54 x S54F	15	47,7 (12,0)	5	0	10	(100 %)	95,1 (3,2)	1,1 (1,2)	3,8 (2,5)
7- S54T x S54		aucune	ponte	obtenue					
8- S54T x S54T	6	34,2 (17,4)	0	1	5	(83,3 %)	18,8 (15,9)	10,0 (3,6)	71,2 (18,0)
9- F1(S54T x S54T)**	2	103 (1,0)	0	0	2	(100 %)	99,0 (0)	1,0 (0)	0
10- F2(S54T x S54T)**	20	96,7 (23,8)	0	0	20	(100 %)	97,0 (3,4)	2,3 (3,1)	0,7 (0,8)
11- IAM x S54	56	47,7 (10,6)	2	48	6	(11 %)	0,1 (-)	60,5 (29,9)	39,6 (30,2)
12- IAM x S54T	20	87,1 (23,0)	7	3	10	(76,9 %)	30,2 (30,1)	9,6 (5,7)	61,0 (29,1)
13- IAMT x S54	25	-	23	2	0	(0 %)	0 (-)	-	-
14- IAMT x S54T	32	78,4 (16,9)	13	2	17	(89,5 %)	38,5 (35,2)	4,3 (4,6)	52,1 (34,8)
15- F1(IAMT x IAMT)** x F2(S54T x S54T)**	7	101 (7,2)	0	0	7	(100 %)	90,5 (19,6)	1,4 (2,3)	8,1 (19,3)
16- S54 x IAM	31	65,2 (12,8)	4	26	1	(4 %)	0,02 (-)	25,4 (19,2)	74,4 (19,1)
17- S54 x IAMF	20	51,4 (15,1)	1	16	3	(15 %)	0,44 (1,1)	43,8 (27,3)	55,6 (26,7)
18- S54T x IAM	4	41,0 (10,5)	4	0	0	(0 %)	0 (-)	-	-
19- S54T x IAMT	6	32,8 (8,7)	2	3	1	(25 %)	2,4 (4,9)	16,8 (11,7)	80,8 (8,6)

(*) écart type entre parenthèses ; (**) non traités

Le fait de traiter les mâles ou les femelles dans ces croisements n'est pas équivalent (tabl. II). Ainsi, les femelles IAM non traitées donnent des résultats similaires avec les mâles traités ou non de la même souche (croisements n° 1 et 2). Au contraire, les femelles IAM traitées sont incompatibles avec les mâles IAM non traités (croisement n° 3) et ne donnent que des pontes à faibles taux d'éclosions avec les mâles IAM traités (croisements n° 4). D'une manière générale, le traitement des mâles augmente le taux d'éclosions, alors que le traitement des femelles le diminue, le plus souvent fortement.

Il est possible que ce dernier phénomène soit partiellement dû à un effet de la tétracycline indépendant de l'incompatibilité cytoplasmique (peut être lié à une destruction massive de la flore), car on constate, dans la descendance non traitée du croisement S54T x S54T, une augmentation du pourcentage moyen d'oeufs éclos par ponte : de 18,8 % pour la génération traitée, à 99,0 % et 97,0 % chez les descendants de première et deuxième générations (tabl. II, croisements n° 9 et 10), comme l'avaient observé Yen et Barr (1973).

En addition, la levée de l'incompatibilité par le

traitement à la tétracycline s'est maintenu pendant deux générations : le croisement entre femelles non traitées issues du croisement IAMT x IAMT et mâles non traités issus de la F2 du croisement S54T x S54T est resté compatible, bien que le traitement n'ait pas été renouvelé (tabl. II, croisement n° 15). Des résultats analogues avaient été obtenus par Yen et Barr (1973), Fine *et al.* (1977) et Suenaga (1981); par contre, Subbarao *et al.* (1977) avaient observé une réversion totale de compatibilité en deux générations.

Conclusion

Comme l'avaient observé divers auteurs en étudiant des souches incompatibles de *C. pipiens*, nous avons montré que les relations d'incompatibilité observées entre deux souches originaires de la région de Montpellier sont modifiées quand on élève les larves en présence de tétracycline. Toutefois l'action de la tétracycline est complexe. Tout d'abord elle dépend de la concentration utilisée et de la souche considérée. Ensuite elle semble avoir un effet à deux niveaux : celui

de la fertilité globale des individus exposés et celui des relations de compatibilité. Les deux phénomènes étant exprimés par un même paramètre, ici le taux d'éclosions, il n'est pas facile de faire la part des choses.

En ce qui concerne les phénomènes d'incompatibilité, nos résultats confirment : (1) que la levée d'un phénomène d'incompatibilité est possible en traitant les larves avec de la tétracycline, (2) que traiter les femelles ou les mâles d'un croisement n'a pas le même effet, et (3) qu'au sein d'une souche, le traitement par la tétracycline peut induire une stérilité.

Ces résultats montrent que le phénomène d'incompatibilité est incontestablement lié à la présence d'un micro-organisme éliminé par la tétracycline, comme l'ont suggéré Yen et Barr dès 1971.

L'apport le plus important de notre étude est d'avoir montré que l'action de la tétracycline est

progressive en fonction de la concentration utilisée (croisements IAM × S54 et IAM × IAM) et qu'elle ne se fait sentir qu'à partir d'un certain seuil de concentration. Ainsi, les différences observées avec les individus de la souche IAM et ceux de la souche S54 peuvent s'expliquer, soit par l'absence de micro-organismes dans S54, soit par une différence du seuil de tolérance à la tétracycline des micro-organismes contenus dans les deux souches. Cette dernière hypothèse semble la plus vraisemblable car elle permet non seulement d'expliquer la totalité de nos résultats, mais aussi les grandes variations rapportées dans la littérature (Yen et Barr, 1973 ; Subbarao *et al.*, 1977 ; Suenaga, 1981 ; Awahmukalah et Brooks, 1983, 1985), par des auteurs travaillant avec des souches différentes et des concentrations de tétracycline variées.

Manuscrit accepté par le Comité de Rédaction le 6 février 1987.

BIBLIOGRAPHIE

- AWAHMUKALAH (D. S. T.) et BROOKS (M. A.), 1983. — Reproduction of an inbred strain of *Culex pipiens* prevented by loss of *Wolbachia pipiensis*. *J. Invert. Path.*, 41 : 184-190.
- AWAHMUKALAH (D. S. T.) et BROOKS (M. A.), 1985. — Viability of *Culex pipiens pipiens* eggs affected by nutrition and aposymbiosis. *J. Invert. Path.*, 45 : 225-230.
- FINE (P. E. M.), ELLIS (D. S.) et CURTIS (C. F.), 1977. — Further studies of *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 71 : 382.
- JOST (E.), 1970. — Untersuchungen zur Kreuzungsterilität im *Culex pipiens* Komplex. *Wilhelm Roux Arch. Entwickl. Org.*, 166 : 173-188.
- LAVEN (H.), 1967. — Speciation and evolution in *Culex pipiens* : 251-275, in *Genetics of Insect Vectors of Disease* (J. W. Wright, R. Pal, eds.). Elsevier Press, North Holland.
- MAGNIN (M.), PASTEUR (N.) et RAYMOND (M.), sous presse. — Multiple incompatibilities within populations of *Culex pipiens* L. in southern France. *Genetica*.
- PORTARO (J. K.) et BARR (A. R.), 1975. — « Curing » *Wolbachia* infections in *Culex pipiens*. *J. Med. Entomol.*, 12 : 265.
- RAYMOND (M.), MAGNIN (M.), PASTEUR (N.), PASTEUR (G.), et SINEGRE (G.), 1986. — Cytoplasmic incompatibility in the mosquito *Culex pipiens* L. from southern France : implications for the selection and dispersal of insecticide resistance genes in natural populations. *Genetica*, 70 : 113-118.
- SUBBARAO (S. K.), KRISHNAMURTHY (B. S.), CURTIS (C. F.), ADAK (T.) et CHANDRAHAS (R. K.), 1977. — Segregation of cytoplasmic incompatibility/compatibility properties in *Culex pipiens fatigans*. *Genetics*, 87 : 381-390.
- SUENAGA (O.), 1981. — [Cytoplasmic incompatibility and the role of *Wolbachia pipiensis* in *Culex pipiens* complex.] *Akaieka Newsletter*, 5 : 16-29.
- YEN (J. H.), 1972. — The microorganismal basis of cytoplasmic incompatibility in the *Culex pipiens* complex. Ph. D. Thesis, 133 p.
- YEN (J. H.) et BARR (A. R.), 1971. — New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature*, 232 : 657-658.
- YEN (J. H.) et BARR (A. R.), 1973. — The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *J. Invert. Path.*, 22 : 242-250.