

Présence d'un caryotype très original à 53–54 chromosomes chez *Vesperus xatarti* Mulsant 1839 (Coleoptera : Cerambycidae : Vesperinae)

ANNE-MARIE DUTRILLAUX, SIBYLE MOULIN & BERNARD DUTRILLAUX *

Muséum National d'Histoire Naturelle, UMR 5202-OSEB, CNRS/MNHN, 16, rue Buffon, CP 39, F-75005 Paris, France

* Corresponding author

Abstract. Very unusual diploid karyotype with 53–54 chromosomes in *Vesperus xatarti* Mulsant 1839 (Coleoptera: Cerambycidae: Vesperinae). Technical improvements for studying chromosomes of Coleoptera are described and applied to the analysis of the karyotype of *Vesperus xatarti*. It includes, 53–54 chromosomes at the diploid status, which is one of the highest number known in beetles. This indicates that a long and/or intense chromosomal evolution, probably by chromosome fission, originated this karyotype. The use of chromosome banding allowed us to identify all chromosomes and show that the difference in chromosome number is sex dependent: 54 in females and 53 in males. These different numbers could be explained as follows: the female has two pairs of autosomes, while the male has two unique chromosomes and a third one resulting from the fusion of their homologs (or alternatively, it would not have undergone a fission). This kind of situation was already described in other beetles, but never in Cerambycidae. This characteristic karyotype deserves to pay a special attention for further systematic revision of the *Vesperus* genus.

Résumé. Après description de techniques permettant d'établir avec précision le caryotype des coléoptères, l'analyse cytogénétique du *Vesperus xatarti* est rapportée. Son caryotype est tout à fait particulier, puisqu'il possède 53–54 chromosomes à l'état diploïde, un nombre bien supérieur à ce qui a été rapporté jusqu'ici chez les Coléoptères. Ceci indique qu'une évolution importante, probablement par fissions chromosomiques multiples, en est à l'origine. L'utilisation de marquage chromosomique en bandes permet de montrer que la variation de nombre est liée au sexe : 54 chez la femelle et 53 chez le mâle. Cette différence est due au fait que la femelle possède deux paires de petits autosomes, et le mâle deux autosomes uniques et un autre chromosome résultant de leur fusion ou de leur maintien non fissionné. Cette particularité, décrite chez d'autres coléoptères comme un système à chromosomes sexuels multiples, n'avait jamais été encore observée chez les Cerambycidae. Ces particularités chromosomiques mériteraient d'être prises en compte pour une éventuelle révision de la position systématique des *Vesperus*.

Keywords: Caryotype, Chromosomes, *Vesperus*, Pyrenees.

Les Coléoptères possèdent généralement des formules chromosomiques proches de 20. Les formules à plus de 30 chromosomes sont rares et celles à plus de 40 exceptionnelles. Parmi les exceptions se rencontrent surtout des Curculionidae parthénogénétiques dont il a été montré que le caryotype était polyploïde (pour références, voir Smith & Virkki 1978). Leur nombre de chromosomes est beaucoup plus faible à l'état diploïde, se situant entre 20 et 30. Chez les Cerambycidae dont les chromosomes ont été dénombrés (Smith & Virkki 1978), environ 80 % des espèces ont 20 ou 22 chromosomes et le nombre le plus élevé a été rapporté chez *Apriona japonica* Thomson, avec 36 chromosomes (Abe *et al.* 1971). Ceci suggère que les formules chromosomiques primitives devaient se situer

autour de 20. Les quelques études chromosomiques publiées depuis 1978 ne font pas état de formules chromosomiques inhabituelles et confirment ainsi les études plus anciennes. Toutefois, même si la compilation de Smith & Virkki (1978) fait état de plus de 2000 espèces étudiées, il faut bien admettre que celle-ci n'est probablement pas représentative de la diversité des quelques 300.000 espèces de Coléoptères. Cela indique cependant que leur évolution caryotypique procède rarement par un mécanisme de fission chromosomique, d'ailleurs peu répandu chez les animaux en général. Parmi les Cerambycidae, quelques taxons ont une position systématique peu évidente. Ainsi, le genre *Vesperus* a été rapproché des Lepturinae avant d'être porté au rang de tribu ou de sous famille, et récemment, il a même été proposé d'en faire une famille distincte des Cerambycidae (Mulsant 1839 ; Villiers 1978 ; Bense 1995 ; Vives 2000). Ces difficultés taxinomiques ont été récemment discutées par Vives (2004). Nous avons eu l'occasion d'étudier

E-mail: bdutrill@mnhn.fr

Accepté le 24 mars 2006

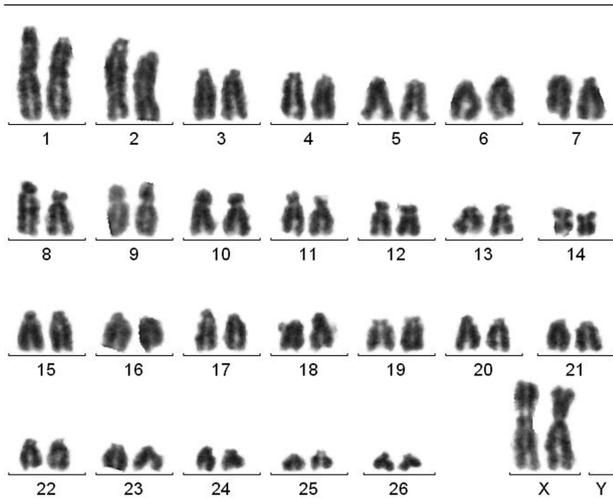


Figure 1
Caryotype établi après coloration par le Giemsa d'une métaphase femelle de *Vesperus xatarti* [Female karyotype of *Vesperus xatarti* after Giemsa staining].

les chromosomes d'œufs provenant d'une ponte d'une femelle de *Vesperus xatarti*. Le caryotype de cette espèce possède le nombre diploïde le plus élevé jamais rapporté chez un Cerambycidae, et l'un des plus élevés chez les coléoptères en général. Ce résultat est surprenant et fait l'objet du présent article.

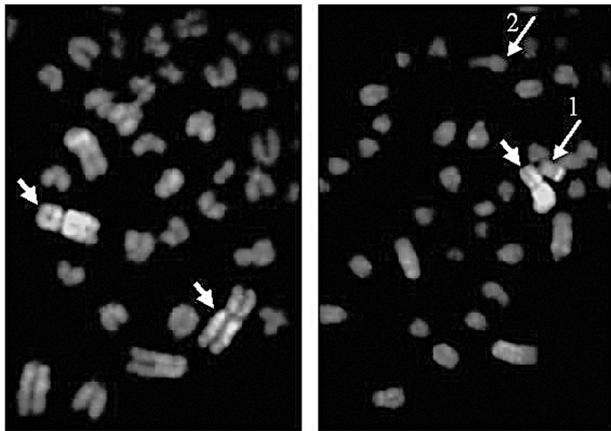


Figure 2
Métaphases partielles à un stade compacté de *Vesperus xatarti* colorées par la moutarde de quinacrine. : cellules femelle (a) avec deux X très fluorescents et mâle (b) avec un X et Y1 très fluorescents (flèches épaisses et fine), indiquant la présence d'hétérochromatine. Bien qu'hétérochromatique aussi, le bras court de l'Y2 est pâle. [Partial Q-banded metaphases of *Vesperus xatarti* female (a) and male (b). The compacted X chromosomes (thick arrows) and the distal part of Y1 (thin arrow) exhibit a brilliant fluorescence characterising heterochromatin. The short arm of Y2 (thin arrow) is dull, with thin and cohesive chromatids, which represents other heterochromatic features.]

Matériel et méthodes

Matériel

Un ensemble de mâles et de femelles de *Vesperus xatarti* a été capturé en avril 2005 à environ 1000 m d'altitude dans les Albères, forêt de la Massane (42°30'N 2°56'E), (France, Pyrénées-Orientales, Le Perthus). L'une des femelles gardées en captivité a fait une ponte dont les œufs ont été utilisés à différents jours. Les meilleurs résultats cytogénétiques ont été obtenus entre les 8^{ème} et 12^{ème} jours après la ponte. Aucun résultat n'a été obtenu à partir des adultes mâles dont la gamétogenèse était trop avancée, et qui ne possédaient donc plus de cellules en division.

Techniques cytogénétiques

Tous les deux jours, un œuf était traité par écrasement entre lame et lamelle en présence d'une goutte d'orcéine lactique (orcanette : 0,15 g, acide lactique : 4,5 ml, eau distillée : 5,5 ml) afin de détecter la présence de cellules en division. Si tel était le cas, trois ou quatre œufs embryonnés étaient nettoyés brièvement, puis plongés dans un tube à centrifuger de type Eppendorf contenant un à deux ml de solution hypotonique (sérum de veau foetal 1 vol., eau bi-distillée 2 vol.). Les œufs étaient rapidement écrasés en utilisant un piston épousant la forme intérieure du tube. Après élimination de la coque, le contenu des œufs était laissé en suspension pendant 10 min avant d'être centrifugé à 500 g pendant 5 min. Après élimination du liquide surnageant par pipetage, du fixateur de Carnoy (éthanol : 3 vol., acide acétique : 1 vol.) était ajouté et les cellules remises en suspension. Une seconde fixation comparable à la première était faite après une heure, ou bien les tubes étaient placés à + 4 °C pour attendre une fixation ultérieure. Celle-ci effectuée, les tubes étaient à nouveau centrifugés pour remettre le culot cellulaire en suspension dans quelques gouttes de fixateur. Cette suspension était alors déposée par goutte à la pipette pasteur sur des lames porte-objet froides (4 à 6 °C) et humides ou juste sorties du congélateur. Après 24 heures de séchage, les préparations étaient colorées ou traitées pour induire un marquage en bandes.

Le repérage des métaphases sur les lames s'effectuait après coloration par le colorant de Giemsa (Giemsa : 4 vol. ; tampon phosphate pH 6,5 : 6 vol. ; eau distillée : 90 vol.) pendant 5 minutes. Après photographie éventuelle des métaphases, les lames étaient décolorées et hydrolysées pendant 1 heure dans de l'acide chlorhydrique 0,2 N. Elles étaient ensuite rincées à l'eau, puis colorées par une solution de moutarde de quinacrine (Caspersson *et al.* 1970) à 5 mg pour 100 ml d'eau pendant 20 min, rincées avec du tampon phosphate de pH 6,5 et recouvertes d'une lamelle pour être observées sous un microscope à épifluorescence équipé d'un système d'analyse d'images (METASYSTEMS, Isis). D'autres lames étaient traitées par une solution d'hydroxyde de baryum 0,3 N à 50 °C pendant 13 secondes, rincées à l'eau, puis plongées dans une solution de SSCX2 (NaCl 0,3 M ; citrate trisodique 0,03 M) à 60 °C pendant 1 heure, pour obtenir des bandes C (coloration de l'hétérochromatine constitutive, adaptation de la méthode de Sumner 1972). Elles étaient photographiées avec un microscope standard ZEISS Phomi3 équipé d'un système de traitement d'images (METASYSTEMS, Ikaros).

Résultats

Des métaphases de chaque sexe ont été obtenues à trois reprises, aux jours 8, 11 et 12 après la ponte. Trois œufs étant utilisés à chaque fois, cela signifie que le nombre d'embryons ayant donné un résultat est compris entre 6 et 9. Deux sortes de métaphases ont été observées, les unes avec des chromosomes courts et pelucheux et les autres avec des chromosomes longs et bien structurés. Les analyses ont porté sur ces dernières. Le nombre de chromosomes était assez variable (tableau 1), mais il est apparu évident que la variation était liée à celle des chromosomes sexuels : 54 pour les cellules XX (femelles) et 53 pour les cellules avec un seul X (mâles). Les cellules à nombre plus faible de chromosomes, minoritaires, ont été considérées comme incomplètes, à la suite d'un étalement trop violent.

Caryotype femelle

Ce caryotype comprend 54 chromosomes, dont 19 paires autosomales sont strictement acrocentriques (à centromère distal) et les N° 8 à 14 submétacentriques, (centromère sub-terminal, délimitant un bras court). Les gonosomes sont représentés par une paire de chromosomes X submétacentriques, dont la grande taille est peu habituelle chez les Coléoptères (Fig.1).

La coloration par la moutarde de quinacrine révèle des bandes discrètes (bandes Q, Caspersson *et al.* 1970) qui permettent de classer les paires chromosomiques avec une précision imparfaite, mais assez satisfaisante, compte tenu du polymorphisme qui touche les paires 8 à 14, et de la petite taille de la plupart des chromosomes. Dans les métaphases les plus compactées ; les chromosomes X portent des bandes Q intenses, ce qui laisse supposer qu'ils sont largement composés d'hétérochromatine, expliquant ainsi leur grande taille (Fig. 2a).

La coloration en bandes C est restée très discrète, en dépit de tous les ajustements techniques que nous avons réalisés. Elle met en évidence les centromères et quelques

Tableau 1. Distribution des nombres chromosomiques observés dans les cellules mâles et femelles d'embryons de *Vesperus xatarti*. [Chromosome numbers in male and female cells from *Vesperus xatarti* embryos].

Nombres de chromosomes	Nombres de cellules femelles	Nombres de cellules mâles
54	20	0
53	5	20
52	1	6
51	0	2
50	1	2
<50	0	2

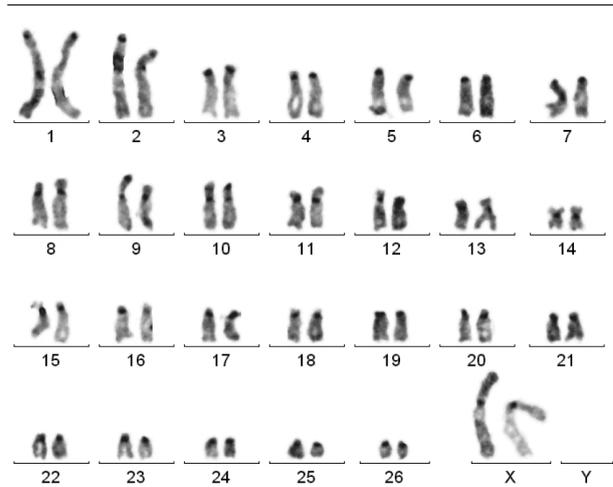


Figure 3
Caryotype femelle en bandes C, mettant en évidence de discrètes variations de coloration permettant d'apparier les homologues. [C-banded female karyotype exhibiting staining characteristics allowing us to pair the homologs].

extrémités des bras courts des sub-métacentriques, 8 à 14 révélant ainsi le polymorphisme de ces chromosomes. Après traitement d'images, des bandes discrètes sont mises en évidence le long des chromatides, ce qui permet d'apparier assez correctement les homologues et de les classer (Fig. 3).

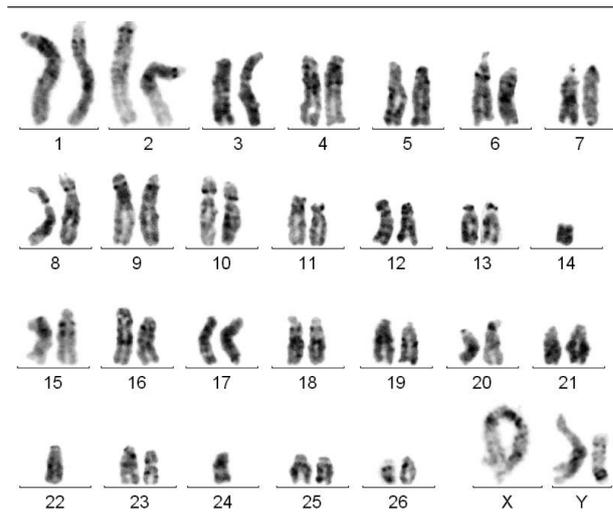


Figure 4
Caryotype mâle en bandes Q montrant la présence de cinq chromosomes non appariés : les 22, 24, Y1 à droite, Y2 à gauche et X. Les couleurs ont été inversées par traitement d'images pour obtenir une coloration noire sur fond blanc. L'un des deux chromosomes 14 manque accidentellement. [Q-banded male karyotype exhibiting five non-paired chromosomes: N°22, 24, Y1 right, Y2 left and X. Black and white colours were inverted by computer. One chromosome 14 is accidentally missing.]

Caryotype mâle

Il comprend 53 chromosomes, dont un X semblable à ceux de la femelle. Deux autosomes ne semblent pas avoir d'homologue. Ils ont été classés en 22 et 24. Il existe en plus deux chromosomes, classés en Y, que nous n'avons pas observés dans les cellules femelles. L'un (Y1) est sub-métacentrique. Il ne porte qu'une bande C centromérique, mais porte aussi une intense bande Q à l'extrémité de son bras long (Fig. 2b). L'autre (Y2) est également sub-métacentrique, et diffère de tous les autres par le rapprochement des chromatides de son bras court (Fig. 2b). Celui-ci ne porte pas de bande Q mais

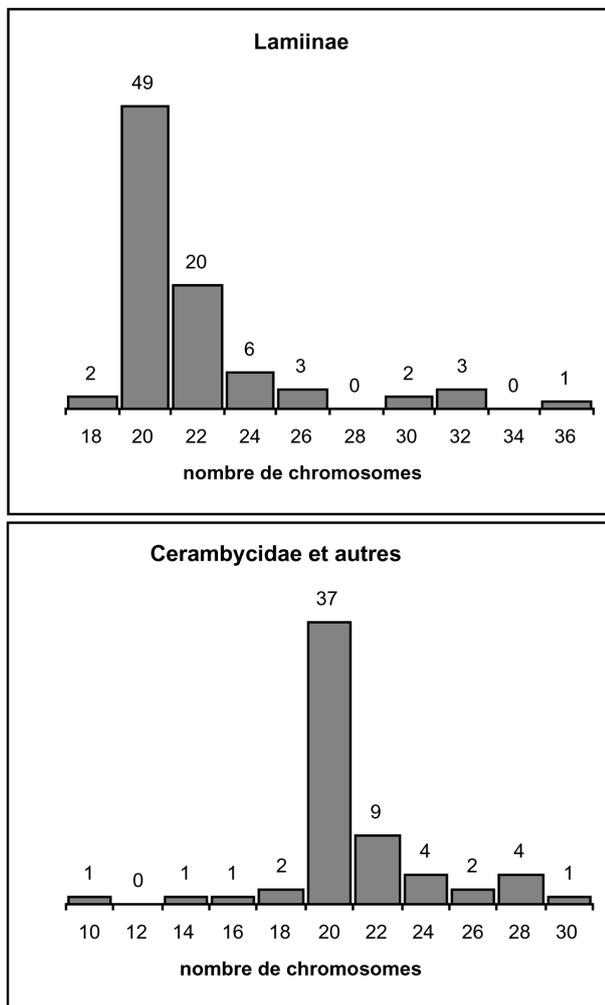


Figure 5
Histogrammes montrant la distribution des nombres chromosomiques chez les Lamiinae et les autres sous familles de Cerambycidae (données de Smith & Virkki 1978) Les nombres d'espèces sont indiqués au sommet des colonnes. [Histograms indicating the distribution of chromosome numbers in Lamiinae and other Cerambycidae subfamilies (data from Smith & Virkki 1978). The numbers of species are given at the top of the bars.]

une petite bande C en son milieu. La structure de ce bras, avec des chromatides fines et rapprochées, évoque une composition hétérochromatique. Une première interprétation pourrait être que les deux autosomes manquants auraient subi une translocation en tandem pour constituer le bras long de ce chromosome, ce qui est une hypothèse compatible avec le marquage observé à la figure 4. L'interprétation inverse serait que le chromosome correspondant aux deux petits autosomes représenterait une forme ancestrale non fissionnée : l'événement de fission serait donc passé à l'état homozygote chez la femelle et resté à l'état hétérozygote chez le mâle. Dans un cas comme dans l'autre, le maintien de cette hétérozygotie de structure chromosomique laisse supposer que les chromosomes uniques chez le mâle, ici l'Y1 et l'Y2, portent des gènes déterminants mâles.

Discussion

A notre connaissance, aucune espèce du genre *Vesperus* n'avait encore fait l'objet d'une étude cytogénétique, malgré l'intérêt que cela aurait pu avoir en raison des difficultés que les systématiciens ont rencontrées pour classer ces insectes parmi les autres Cerambycidae. Leur distribution géographique restreinte et le fait que la gamétogenèse semble achevée chez les imagos en sont vraisemblablement les raisons. Le caryotype de *V. xatarti* est pourtant très intéressant car il possède deux particularités, l'une par rapport à l'ensemble des coléoptères, et l'autre par rapport aux autres Cerambycidae.

La première de ces particularités est le nombre diploïde de chromosomes très élevé, puisque des formules chromosomiques dépassant 50 n'ont été décrites qu'exceptionnellement, et elles correspondent alors généralement à des tétraploïdies associées à une reproduction parthénogénétique. Outre son aspect spectaculaire, cette formule chromosomique suggère que l'évolution chromosomique ayant abouti à ce caryotype a procédé par de multiples fissions. Au cas où ce nombre élevé de chromosomes serait le résultat d'une polyplôidie, le fait que nous ayons pu les apparier, et non les classer par tétrades, impliquerait la survenue de multiples remaniements de structure chromosomiques et de passages à l'homozygotie, ce qui rend cette interprétation moins probable.

La distribution du nombre de chromosomes chez les Cerambycidae, indiquée à la figure 5, montre qu'il n'y a aucun indice d'une évolution par fissions chromosomiques progressives. Le passage de 20 (nombre ancestral présumé) à 54 implique donc la succession de 34 fissions dans l'hypothèse où celles-ci seraient indépendantes les unes des autres. Très peu de données existent sur ce mode d'évolution

chromosomique qui implique la création de néo-centromères et de néo-télomères. Chez les mammifères, l'existence d'une évolution de ce type a été démontrée chez les Cercopithèques dont le caryotype passe de 44 à 72 (Dutrillaux *et al.* 1982). Dans ce taxon, de nombreuses formules avec des nombres de chromosomes intermédiaires ont été observées, montrant que les fissions surviennent progressivement, et non comme un mécanisme en tout ou rien. Dans le cas présent, l'absence de formules intermédiaires peut avoir au moins trois explications : un mécanisme en tout ou rien; un manque de données, et pour cela, il sera du plus haut intérêt d'étudier d'autres espèces de *Vesperus* ; ou une durée d'évolution beaucoup plus longue ayant fait disparaître les formes intermédiaires. En effet, l'évolution des Cercopithèques par fission chromosomique est vraisemblablement récente, puisque des groupes pluri-spécifiques existent dans la nature (Struhsaker *et al.* 1988) et l'hybridation d'individus à nombres chromosomiques différents est possible (données personnelles non publiées).

Quel qu'en soit leur mécanisme, ces multiples fissions indiquent une position tout à fait particulière du *V. xatarti*, et si celui-ci est représentatif des autres *Vesperus*, du genre entier. Certains auteurs, comme Bense (1995), n'hésitent d'ailleurs pas à les placer, sur des critères morphologiques et comportementaux, dans une famille à part.

La seconde particularité concerne le déterminisme chromosomique du sexe, puisqu'il ne correspond pas à un système XX chez la femelle et XY chez le mâle, comme chez les autres Cerambycidae. Le mâle possède cinq chromosomes non appariés, dont un X semblable à ceux de la femelle. Les quatre autres comprennent deux chromosomes uniques, classés en 22 et 24, correspondant à deux paires chez la femelle et deux chromosomes sans équivalent chez celle-ci. L'un de ces derniers semble formé par la fusion des homologues des 22 et 24 et porte un bras court hétérochromatique. L'autre, qui n'a aucune correspondance avec le caryotype femelle, est partiellement hétérochromatique. Des formules sexuelles complexes ont déjà été observées chez des coléoptères, mais jamais encore chez des Cerambycidae. Elles ont été décrites comme des formules à chromosomes sexuels multiples, en l'absence d'élément permettant de proposer l'origine de ces chromosomes (pour références, voir Smith & Virkki, 1978), mais l'hypothèse d'une translocation avait bien été envisagée parmi d'autres. Le travail présenté ici, qui vise à identifier chaque chromosome montre l'état hétérozygote du mâle et suggère fortement soit la survenue d'une translocation entre deux petits autosomes, ou inversement d'une fission passée à l'état homozygote chez la femelle

seulement. Dans ces conditions, il est illogique d'appeler Y des autosomes non appariés. Toutefois, le dérivé de la translocation 22–24 n'existant que chez le mâle, porte vraisemblablement des gènes du déterminisme mâle à la suite d'une translocation Y-autosome, s'il se maintient dans l'espèce. C'est pourquoi nous l'avons appelé Y2. À côté de la formule 54,XX de la femelle, celle du mâle devrait donc être 53,XY1Y2 en adoptant le système international de nomenclature des chromosomes (ISCN 1995).

En conclusion, *V. xatarti* possède un caryotype original parmi les Cerambycidae, et même parmi les coléoptères. Ce paramètre pourrait être pris en compte pour une révision de sa position systématique, car il indique qu'une grande distance génétique le sépare des autres Cerambycidae. L'utilisation de techniques adaptées pour l'étude chromosomique des coléoptères ouvre des possibilités intéressantes puisqu'elle permet d'aller bien au-delà du simple comptage des chromosomes, comme cela est souvent fait. Il sera particulièrement intéressant d'étudier le caryotype d'autres espèces de *Vesperus* et de comparer le contenu en ADN de leurs cellules à celui d'autres espèces de Cerambycidae afin de trancher entre l'hypothèse d'une tétraploidie et celle d'une longue série de fissions.

Références

- Abe A., Kudoh K., Saitoh K.** 1971. Chromosome studies of beetles III: a chromosome survey of 18 species of the subfamily Lamiinae (Cerambycidae). *Scientific Reports*, Hiroasaki University **18**: 53-63.
- Bense U.** 1995. *Longhorn Beetles : illustrated keys to the Cerambycidae and Vesperidae of Europe*. Margraf Verlag, Weikersheim, 512 p.
- Caspersson A.T., Zech L., Johansson C., Modest E.J.** 1970. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma* **30**: 215-227.
- Dutrillaux B., Couturier J., Muleris M., Lombard M., Chauvier G.** 1982. Chromosomal phylogeny of forty-two species or subspecies of Cercopithecoidea (Primates, Catarrhini). *Annales de Génétique* **25**: 96-109.
- ISCN 1995.** *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*.
- Mittelman F.(ed).** S. Karger, Basel, 114p.
- Mulsant E.** 1839. *Histoire naturelle des Coléoptères de France, Vol.1. Longicornes*. Masson, Paris, 304 p.
- Smith S.G., Virkki N.** 1978. *Animal Cytogenetics 3 Insecta 5 Coleoptera*. Gebrüder Bornstraeger, Berlin, Stuttgart, 366 p.
- Struhsaker T.T., Butynski T.M., Lwanga J.S.** 1988. Hybridization between redbellied (*Cercopithecus ascanius schmidti*) and blue (*C. mitis stuhlmani*) monkeys in the Kimbale forest, Uganda, p.477-498 in: **Gautier A., Bourlière F., Gautier J.P., Kingdon J. (eds)**, *A Primate Radiation: evolutionary biology of the African guenons*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Sumner A.T.** 1972. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. – *Experimental Cell Research* **75**: 304-306.
- Villiers A.** 1978. Faune des Coléoptères de France, 1. Cerambycidae. *Encyclopédie Entomologique* **52**: 1-552
- Vives E.** 2000. *Fauna Iberica : Coleoptera Cerambycidae*. Museo Nacional de ciencias naturales Consejo Superior de Investigaciones científicas, Madrid, 713 p.
- Vives E.** 2004. Révision du genre *Vesperus* Dejean, 1821 (Coleoptera : Cerambycidae) *Annales de la Société entomologique de France* (n.s.) **40**: 437-457.