

Rapport de stage de 1<sup>ère</sup> année du MASTER « Biodiversité, Ecologie et Evolution »

Parcours : Ecologie évolutive et comportementale

**« Effets des conditions de luminosité et de turbidité sur l'habituation des larves du moustique *Aedes aegypti* »**



**Laboratoire d'accueil :**

Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte

UMR 7261CNRS - Université de Tours

**Adresse :**

Faculté des Sciences et Techniques

Avenue Monge, Parc Grandmont

37200 Tours

**Encadrants :**

Dr. Fernando Guerrieri

Martin Dessart



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier M.Giron, le directeur de l'Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte pour m'avoir accueilli à l'IRBI.

Je remercie également Sylvain Pincebourde, chef de l'équipe INOV pour m'avoir fait une place au sein de son équipe de recherche.

Un grand merci à M.Guerrieri, mon maître de stage, pour m'avoir initié au monde de la recherche et pour avoir partagé ses connaissances et ses expériences lors de nos nombreuses discussions. Enfin, merci pour sa disponibilité et sa bienveillance qui m'ont accompagné tout au long de mon stage.

Je tiens également à remercier Martin Dessart, mon co-encadrant, qui bien que très occupé par sa thèse, a pris de son temps pour m'accompagner et me guider dans mon projet de stage. Merci pour ses nombreux conseils sur les statistiques et ses astuces pour apprivoiser le logiciel R.

Merci à Rihab Dib-Mohamad et Miguel Piñeirúa-Menéndez pour leur aide avec les statistiques.

Enfin, merci à Clémence Lochin et Charly Dufour pour leur aide avec la gestion des élevages.

Ce travail s'encadre dans le projet APR IR 2020 « COMPORTATE », financé par la Région Centre – Val de Loire. COMPORTATE est soutenu par le Réseau Thématique MiDi Milieux et Diversité, le Pôle DREAM, la Zone Atelier Loire et le Département d'Indre-et-Loire (37).



# Sommaire

## Table des matières

<b>I. Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>9</b>
1. Animaux.....	9
2. Milieux d'élevage.....	9
3. Préparation des groupes expérimentaux.....	11
4. Design expérimental.....	11
5. Traitement des données et analyses statistiques.....	13
<b>III. Résultats.....</b>	<b>17</b>
1. Expérience n°1.....	17
a. Evolution de la réponse durant l'entraînement.....	17
b. Comparaison de l'apprentissage entre condition.....	17
2. Expérience n°2.....	17
a. Evolution de la réponse durant l'entraînement.....	17
b. Comparaison du niveau d'apprentissage entre les deux conditions d'élevages.....	19
c. Comparaison de l'apprentissage entre conditions homologues.....	19
<b>IV. Discussion.....</b>	<b>21</b>
<b>V. Bibliographie.....</b>	<b>27</b>
i. Table des figures.....	i
ii. Résumé :.....	ii



## I. Introduction

Les conditions de luminosité et de turbidité influent directement sur la visibilité. Par conséquent, en fonction des conditions de luminosité et de turbidité présentes dans les milieux où ils évoluent, les animaux utilisent plus ou moins la modalité sensorielle visuelle. Le fait d'évoluer dans un milieu permettant une visibilité plus ou moins importante agit sur la réponse de l'animal aux stimuli et, dans les cas les plus extrêmes, peut aussi agir sur leur développement. Un exemple connu sur l'influence des conditions de visibilité sur la biologie des animaux est celui du poisson *Astyanax mexicanus*, une espèce de poisson vivant en Amérique Centrale (Blin & Rétaux, 2019). D'après Blin & Rétaux (2019), il existe deux écotypes d'*A. mexicanus* clairement distingués. L'un d'eux habite dans des espaces aquatiques à ciel ouvert, tandis que l'autre vit dans des cavernes complètement obscures. L'écotype cavernicole, privé de lumière, présente de nombreuses adaptations morphologiques, témoin d'une forte plasticité développementale. En effet, les populations cavernicoles se distinguent de leurs homologues de surface par une absence d'organes sensoriels consacrés à la vue (les yeux) et de pigments dans tout le corps. De plus, les poissons cavernicoles présentent des capacités de perception olfactive nettement supérieures à celles des poissons vivant en contact avec la lumière.

L'influence des conditions environnementales sur le développement a aussi été observée chez de nombreux invertébrés, comme le corail *Antillogorgia bipinnata* (Calixto-Botía & Sánchez, 2017) chez lequel la morphologie varie selon la profondeur à laquelle il se situe. Il existe également de nombreux exemples de variation phénotypique due à l'environnement chez les insectes. Pour n'en citer qu'un, *Phymata americana* est une espèce de punaise présentant différents morphes (Boyle & Start, 2020). En effet, la couleur de leur corps est adaptée à la fleur sur laquelle elles chassent, pour se camoufler et augmenter leur succès de prédation. En plus d'adopter un comportement favorisant la rencontre d'un environnement correspondant à leur morphe, ces punaises sont capables de modifier la pigmentation de leur cuticule lorsque leur morphe ne correspond pas au cadre.

La variation phénotypique représente donc une stratégie évolutive permettant l'occupation de divers écosystèmes. Nous nous sommes donc demandé si les conditions de luminosité pouvaient avoir des effets sur la perception visuelle chez les moustiques de l'espèce *Aedes aegypti*. Cette espèce étant présente dans les régions tropicales et subtropicales de toute notre planète.



*Aedes aegypti* est une espèce de moustique occupant à l'origine les forêts subsahariennes. Dans les derniers 500 ans, elle s'est rapidement adaptée à l'espèce humaine par l'extension des colonies et des territoires humains (Powell et al., 2018). Les conditions géopolitiques existantes dans les derniers siècles, notamment la traite esclavagiste, le commerce international et les migrations, ont permis à ce moustique d'envahir tous les continents, sauf l'Antarctique (Brady & Hay, 2020). Sa capacité à se développer, au stade larvaire, dans n'importe quel corps d'eau dans des conditions de luminosité et turbidité diverses, lui a permis de se maintenir et de se propager dans quasiment tous les environnements existants. Espèce holométabole, *A.aegypti* a un cycle de vie rapide, constitué de 4 stades larvaires, séparés par trois mues permettant la croissance de l'individu et s'achevant par une métamorphose donnant une nymphe (Leake, 1993). Aux stades pré imaginaires, l'individu évolue dans le milieu aquatique. Il utilise des organes spécifiques afin de respirer à la surface de l'eau : le siphon chez les larves et les trompettes chez les nymphes. Une fois le stade de nymphe achevé, l'individu émerge et passe du stade de nymphe, aquatique, au stade adulte aérien (Sophie, 2015). La vie larvaire (cf. Figure n°1) dure entre 8 et 10 jours, selon les conditions environnementales (température, abondance de nourriture, compétition, sexe de l'individu...). Au stade larvaire, l'individu se nourrit essentiellement de matière organique dissoute dans l'eau et passe à un régime constitué principalement de sève végétale au stade adulte (LANJIAO, 2018). De plus, les femelles adultes, en plus de sève, se nourrissent de sang afin de pondre des œufs. C'est dans leur stade adulte que les moustiques vont accomplir leur dispersion, puisqu'ils sont capables de parcourir jusqu'à 250m, en s'appuyant sur différentes modalités sensorielles, telles que la vue et l'odorat (Vinauger et al., 2019).

Le contrôle des populations d'*A. aegypti* représente un enjeu à la fois économique, écologique, social et sanitaire puisque ce moustique est vecteur de nombreux arbovirus, tels que les agents responsables de la fièvre jaune, la dengue ainsi que le Chikungunya (Nene et al., 2007) que les femelles transmettent lors de leurs repas sanguins.

Ainsi, mettre en évidence des capacités de plasticité développementale, cognitive et comportementale contribuera, d'un côté, à mieux comprendre comment *A. aegypti* est capable de s'adapter aux nombreux environnements et à y perdurer dans le temps et, d'un autre côté, à explorer l'influence des conditions environnementales sur la physiologie, les capacités cognitives et le comportement.

La plasticité comportementale peut être mise en évidence grâce à l'étude de l'apprentissage. En effet, l'apprentissage peut être défini comme la modification du

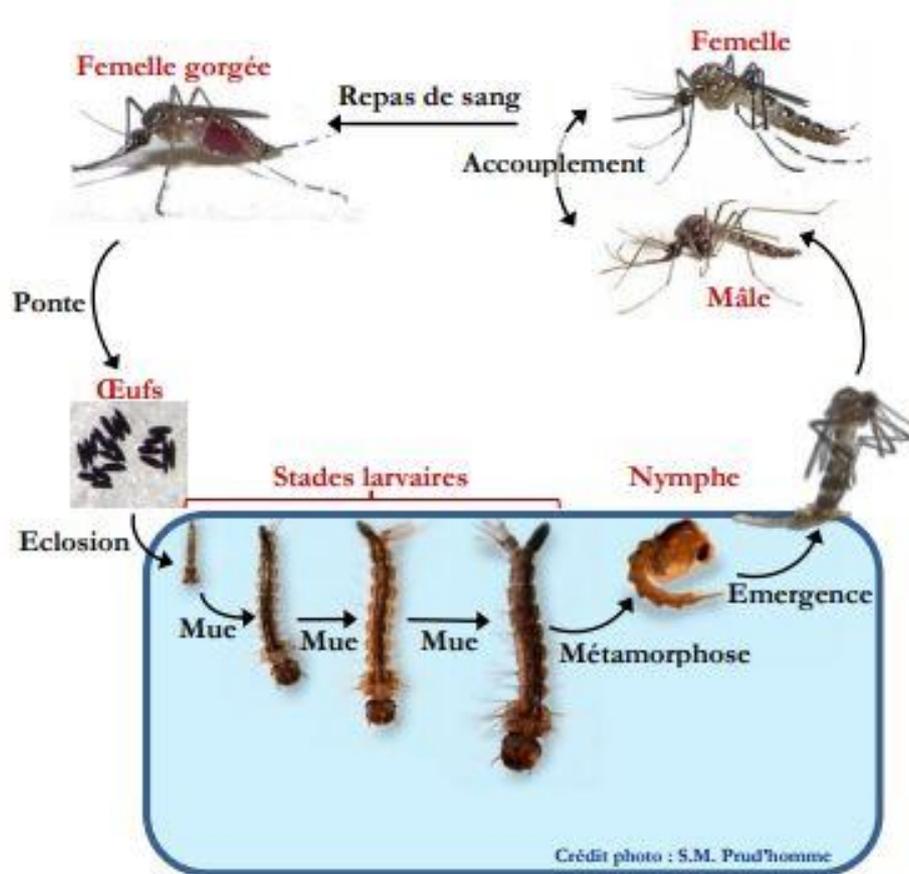


Figure 1 : Schéma du cycle de vie du moustique *Aedes aegypti*

comportement d'un individu à cause de l'expérience. Pour étudier des effets environnementaux sur les capacités cognitives des larves de moustique, nous nous sommes appuyés sur une forme d'apprentissage non-associatif appelée habituation (Baglan et al., 2017).

L'habituation se définit par la diminution de la réponse suite à la répétition de la stimulation (Groves & Thompson, 1970). Par exemple, un stimulus déclenche une réponse défensive chez l'individu naïf. Si la présentation du stimulus n'a aucune conséquence sur l'individu, celui-ci cesse de répondre car le stimulus (signal) perd sa signification. L'habituation a été étudiée chez plusieurs modèles animaux, autant des vertébrés (*Rana clamitans*, amphibiens (Owen & Perrill, 1998), *Gasterosteus aculeatus*, actinoptérygiens (Peeke, 1969)) que des invertébrés (*Aplysia californica*, mollusque (Pinsker et al., 1970), *Caenorhabditis elegans*, nématode (Rankin et al., 1990)).

Pour mettre en évidence de possibles effets des conditions de visibilité sur la perception chez les larves du moustique *A. aegypti*, nous avons étudié leur performance cognitive en fonction de leur condition d'élevage. Ainsi, nous avons élevé différents groupes de larves de moustique en faisant varier la luminosité et la turbidité de l'eau ; eau claire éclairée ; eau turbide éclairée ; eau claire dans l'obscurité ; eau turbide dans l'obscurité. La turbidité de l'eau est sa capacité à absorber ou à dévier une lumière incidente et se mesure en Nephelometric Turbidity Unit (NTU). Ces larves, au stade larvaire 4 (L4), ont ensuite été entraînées suivant un protocole d'habituation déjà utilisé pour des larves de moustique au sein de l'équipe (Baglan et al., 2017 ; 2018 ; Pietrantuono et al. 2021). Ce protocole consiste à présenter un objet devant une source lumineuse, à intervalles réguliers, afin de projeter une ombre sur la larve. Ce stimulus produit chez la larve naïve un comportement de fuite caractérisé par une flexion rapide de l'abdomen, qui est donc utilisable pour un protocole d'habituation, car la présentation du stimulus n'a aucun effet nocif sur la larve. Ce stimulus visuel est optimal afin d'observer les effets des conditions de luminosité et de turbidité sur la capacité de perception visuelle des larves du moustique *A.aegypti*.

De possibles effets des conditions de luminosité sur la perception visuelle chez les larves de moustique seraient : 1) que les larves élevées dans des conditions d'obscurité et/ou dans un milieu turbide devraient se servir moins de la vue pour appréhender leur environnement. De ce fait, nous nous attendions à observer une réponse des larves au stimulus visuel, mais, étant perçu comme très intense (effet de nouveauté du stimulus), l'habituation serait plus faible voire inexistante 2) les larves ne répondraient pas du tout au stimulus visuel (notamment les larves qui ont évolué privées de lumière) 3) il était aussi possible que les conditions de



luminosité/turbidité n'aient aucune conséquence sur les capacités perceptives et d'apprentissage.

Nous nous sommes également intéressés aux performances des larves lorsque le stimulus visuel est présenté dans un milieu turbide. Nous voulons à la fois déterminer si la turbidité de l'eau lors de l'entraînement et le changement de conditions (élevage/entraînement) ont un effet sur l'habituation (Pietrantuono et al. 2021).

Nous pouvons supposer qu'une eau turbide diminuerait le contraste du stimulus visuel et donc que la réponse des larves serait moins intense. Le changement des conditions de turbidité du milieu entre l'élevage et l'entraînement pourrait également perturber l'apprentissage des larves. Enfin, il se pourrait que les conditions physiques du milieu n'aient aucun impact sur l'apprentissage.



## II. Matériels et Méthodes

### 1. Animaux

Nous avons réalisé nos expériences avec des larves du moustique *Aedes aegypti*. Nos expériences ont été réalisées sur des individus du quatrième stade larvaire (L4). Les larves ont été obtenues à partir d'œufs d'*A. aegypti* provenant du Laboratoire d'Insectes Nuisibles (LIN-IRD, Montpellier, France) et ont été élevées dans une pièce à la température (25°C) et l'humidité (60% HR) contrôlées. Dans une cuve (cf. Figure n°2) nous avons ajouté 500 mL d'eau déchlorée mesurée à l'aide d'une éprouvette graduée de 250 mL. Afin de synchroniser l'éclosion des œufs, environ 0,25 cm<sup>3</sup> de vitamine C ont été ajoutés à l'eau déchlorée. De plus, deux granules de nourriture pour crevettes d'aquarium (« Novo Prawn ») ont été déposés dans les cuves d'élevages. Enfin, les œufs ont été ajoutés en prenant soin de les immerger complètement.

### 2. Milieux d'élevage

Nous avons préparé nos élevages dans deux conditions de luminosité : *salle éclairée* ou *absence de lumière*. Dans le premier cas, les cuves d'élevage ont été placées sur une étagère, soumises à une photopériode de 12 h de lumière artificielle et 12 h d'obscurité. Afin de limiter les contacts visuels avec l'extérieur, les cuves ont été entourées d'un papier blanc opaque.

Dans le deuxième cas, les cuves étaient placées dans une armoire opaque avec sa porte fermée, donc dans une obscurité totale. Nous supposons que les larves élevées à l'obscurité, bien qu'elles n'aient pas eu d'indications de la photopériode, ont eu une régulation circadienne puisque l'armoire n'était pas isolée de toute perturbations, et donc des vibrations et du bruit causés par l'activité humaine journalière.

Nous avons obtenu, par ailleurs, deux conditions de turbidité : *eau claire* ou *eau colorée*. Dans le premier cas, les larves étaient élevées dans l'eau déchlorée sans ajout d'aucune substance. Dans le deuxième cas, la turbidité de l'eau a été obtenue en mélangeant trois colorants alimentaires (rouge, jaune et bleu, marque « **Vahiné** »). Chaque colorant a été prélevé à l'aide d'une seringue graduée (0,3 mL). Donc, 0.3 mL de chaque colorant a été ajouté à l'eau déchlorée. La turbidité a ensuite été mesurée quotidiennement (cf. Figure n°3) à l'aide d'un turbidimètre (HACH Test Kit, modèle 52600-00).



Figure 3 : Photographie d'une cuve d'élevage placée à la lumière.

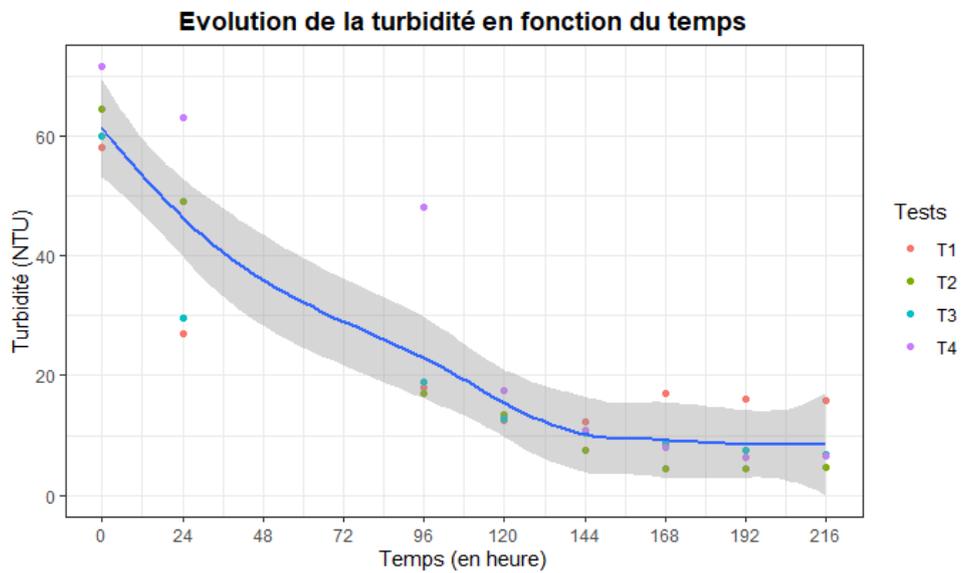


Figure 2 : Graphique de l'évolution de la turbidité utilisée dans les deux expériences en fonction du temps.

Les tests (T1, T2, T3, T4) représentent plusieurs solutions de turbidité réalisées en suivant le protocole expérimental et servent donc de répliqués.

### 3. Préparation des groupes expérimentaux

Pour répondre à notre question, nous avons réalisé deux expériences. Dans la première, les larves ont été entraînées (cf. Design expérimental) dans de l'eau claire, alors que dans la seconde expérience, elles ont été entraînées dans de l'eau turbide. La turbidité dans l'expérience n°2 a été mesurée avant et après l'entraînement, permettant d'affirmer qu'elle se situait entre 65,1 et 87,4 NTU.

De plus, pour chaque expérience, des conditions d'élevage spécifiques ont été réalisées. Pour chaque condition, deux élevages ont été réalisés en suivant le même protocole. Les conditions d'élevage sont exposées ci-dessous

Expérience n°1 :

- (1) C-L+ : Les larves ont été élevées à la lumière dans de l'eau claire (n=21).
- (2) C+L+ : Les larves ont été élevées à la lumière dans de l'eau turbide (n=22).
- (3) C-L- : Les larves ont été élevées à l'obscurité dans de l'eau claire (n=21).
- (4) C+L- : Les larves ont été élevées à l'obscurité dans de l'eau turbide (n=23).

La condition (4) de l'expérience n°1 ne permettait pas réellement d'observer l'effet de la turbidité de l'eau puisqu'elle n'a de sens qu'en présence de lumière (cf. définition). Cette condition permettait plutôt de contrôler que les colorants utilisés n'étaient pas toxiques pour les larves et ne modifiaient pas leur comportement.

Expérience n°2 :

- (1) C-L+ : Les larves ont été élevées à la lumière dans de l'eau claire.
- (2) C+L+ : Les larves ont été élevées à la lumière dans de l'eau turbide.

### 4. Design expérimental

Les larves L4 ont été entraînées dans une salle différente de celle d'élevage, maintenue dans une obscurité totale à l'exception du dispositif expérimental. La température a été maintenue à 25 +/- 1 °C. Les larves ont été disposées dans des petites boîtes de Petri de 3 cm de diamètre et 1,2 cm de hauteur, remplies d'eau claire ou colorée selon l'expérience. Les larves étaient entraînées en aveugle et choisies selon une simulation de choix au hasard.

Les boîtes de Petri ont chacune été disposées sur un support en mousse situé sur une table, afin de diminuer au maximum les vibrations pouvant perturber les résultats. Chaque module



d'entraînement était séparé des autres par des cloisons opaques en cartons afin d'isoler visuellement les larves. Une lumière était disposée au-dessus de chaque boîte de Petri, à environ 16 cm de la surface de la table. Le stimulus visuel était constitué d'un support métallique soutenant le servo-moteur sur lequel fût attaché un carré de carton de 2 cm de côté. Ce dispositif était réglé de manière que le carré de carton soit situé à 11 cm de la surface de la table et environ 6 cm de la boîte de Petri (cf. Figure n°4). Le servo-moteur était contrôlé automatiquement par une carte « Arduino uno » pour transmettre le stimulus d'habituation, à une vitesse angulaire de 315.8°/s à 4.8 V. Notre installation nous a permis de tester 10 larves par séance d'entraînement.

Avant le début de l'entraînement, les larves ont été laissées au moins 30 minutes en acclimatation dans les boîtes de Petri afin de diminuer leur stress dû au transport et au prélèvement et ainsi ne pas fausser les résultats. Les larves stressées par le déplacement réalisaient le comportement de fuite spontanément de façon répétée. Après cette phase d'acclimatation, l'entraînement démarrait et le stimulus visuel passait de la position n°1 à la position n°2, projetant de ce fait une ombre sur la boîte de Petri. Après un court laps de temps (2 s), le stimulus revenait à sa position initiale (cf. Figure n°5). L'ombre projetée sur les larves a un effet aversif car elle simule la présence d'un potentiel prédateur. La réponse comportementale de la larve a été observée. Une réponse de fuite (flexion rapide de l'abdomen de durée variable) a été notée « 1 » et une absence de réponse de fuite notée « 0 ».

Le stimulus visuel a été présenté aux larves de moustique toutes les 5 minutes, à 15 reprises. A l'issue du 15<sup>e</sup> essai, une perturbation, consistant à insuffler de l'air dans l'eau à l'aide d'une pipette a été réalisée afin de vérifier que les larves étaient toujours capables de répondre à un stimulus.

Enfin, les larves entraînées ont été isolées pendant 48h dans des boîtes de Petri remplies d'eau déchlorée afin de vérifier que les larves entraînées n'étaient pas des nymphes pharates. Toute larve ayant mué pendant ces 48 h a été écartée des analyses statistiques (total : 13 larves).

## 5. Traitement des données et analyses statistiques

Seules les larves ayant répondu au premier essai ont été conservées. De ce fait, nous avons confirmé que la diminution du niveau de réponse de fuite était dû à l'habituation. De plus, les larves ne répondant pas à la perturbation ont été aussi éliminées, car leur absence de réponse au



Figure 4 : Photographie du dispositif expérimental mis en place.

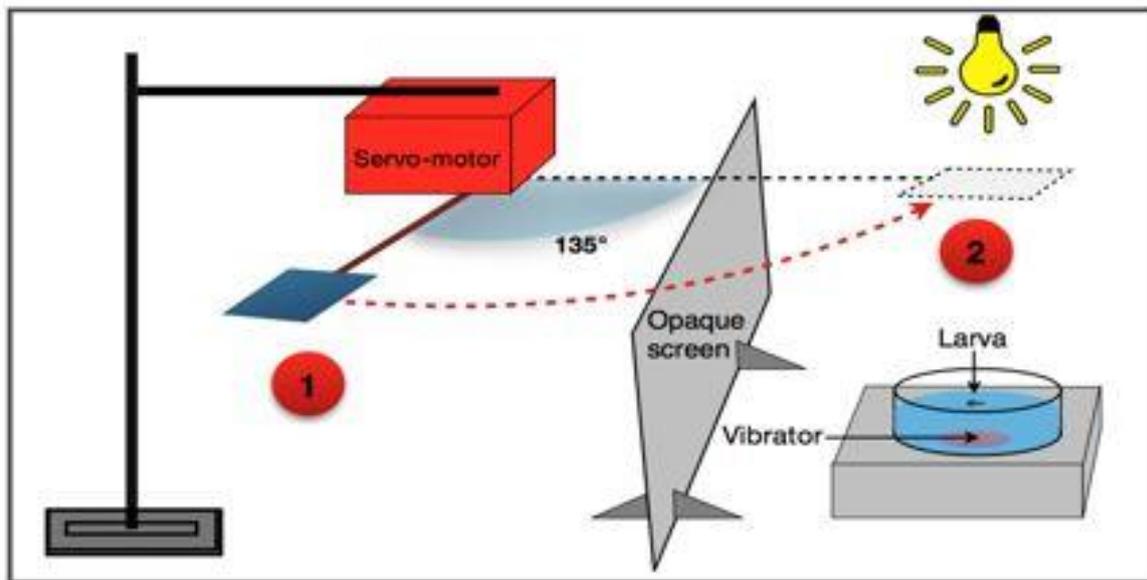


Figure 5 : Schéma du dispositif expérimental d'habituation et son fonctionnement. Dans notre cas, le "vibrator" n'est pas utilisé.

stimulus pouvait être dû à l'impossibilité d'activité motrice ; par exemple, à cause de la fatigue motrice (total : 3 larves). Pour les analyses statistiques, nous avons utilisé le logiciel « R » sous la version 4.0.5 ([www.r-project.org](http://www.r-project.org); R Development Core Team, 2020). Le Modèle Généralisé Linéaire Mixte (GLMm) avec le *package* lme4 (Bates et al., 2015) sous une structure binomiale (logit-link) et une Anova ont été utilisés pour étudier la variation de la réponse le long de l'entraînement pour chaque condition. Les individus et l'élevage ont été incorporés comme variables aléatoires et les essais comme variable fixe. Un GLMm a également été réalisé pour comparer l'apprentissage entre les différentes conditions pour l'expérience n°1 et n°2 mais également pour comparer les performances des conditions de l'expérience n°2 avec leurs homologues de l'expérience n°1. Les individus, l'élevage et les essais ont été incorporés comme variables aléatoires et la condition comme variable fixe. Nous avons appliqué la correction de Bonferroni pour des comparaisons multiples ( $\alpha=0.025$ ).



### III. Résultats

#### 1. Expérience n°1

##### a. Evolution de la réponse durant l'entraînement

- Condition n°1 (C-L+) :

Le GLMM a montré une diminution significative de la réponse avec les essais ( $F = 88.228$ ,  $ddl = 14$ ,  $p < 0.001$ ). Il y'a bien eu un apprentissage chez les larves élevées en condition lumière sans colorant.

- Condition n°2 (C+L+) :

Le GLMM a montré une diminution significative de la réponse avec les essais ( $F = 76.82$ ,  $ddl=14$ ,  $p < 0.001$ ). Il y'a bien eu un apprentissage chez les larves élevées en condition lumière avec colorant.

- Condition n°3 (C-L-) :

Le GLMM a montré une diminution significative de la réponse avec les essais ( $F = 79.192$ ,  $ddl=14$ ,  $p < 0.001$ ). Il y'a bien eu un apprentissage chez les larves élevées en condition d'obscurité sans colorant.

- Condition n°4 (C+L-) :

Le GLMM a montré une diminution significative de la réponse avec les essais ( $F= 96.479$ ,  $ddl=14$ ,  $p < 0.001$ ). Il y'a bien eu un apprentissage chez les larves élevées en condition d'obscurité avec colorant.

##### b. Comparaison de l'apprentissage entre condition

Le graphique (cf. Figure n°6) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les conditions (GLMM,  $p \gg 0.025$  ; pour toutes les conditions). L'apprentissage ne varie donc pas avec les conditions d'élevages.

#### 2. Expérience n°2

##### a. Evolution de la réponse durant l'entraînement

- Condition n°1 (C-L+) :

Dans les graphiques qui vont suivre (Figures n°6-n°8), le lissage des courbes ne permet pas à ces dernières de commencer à un taux de 1 à l'essai n°1 comme elles le devraient. De plus, pour chaque condition, deux points apparaissent à chaque essai, témoignant des deux élevages réalisés par conditions.

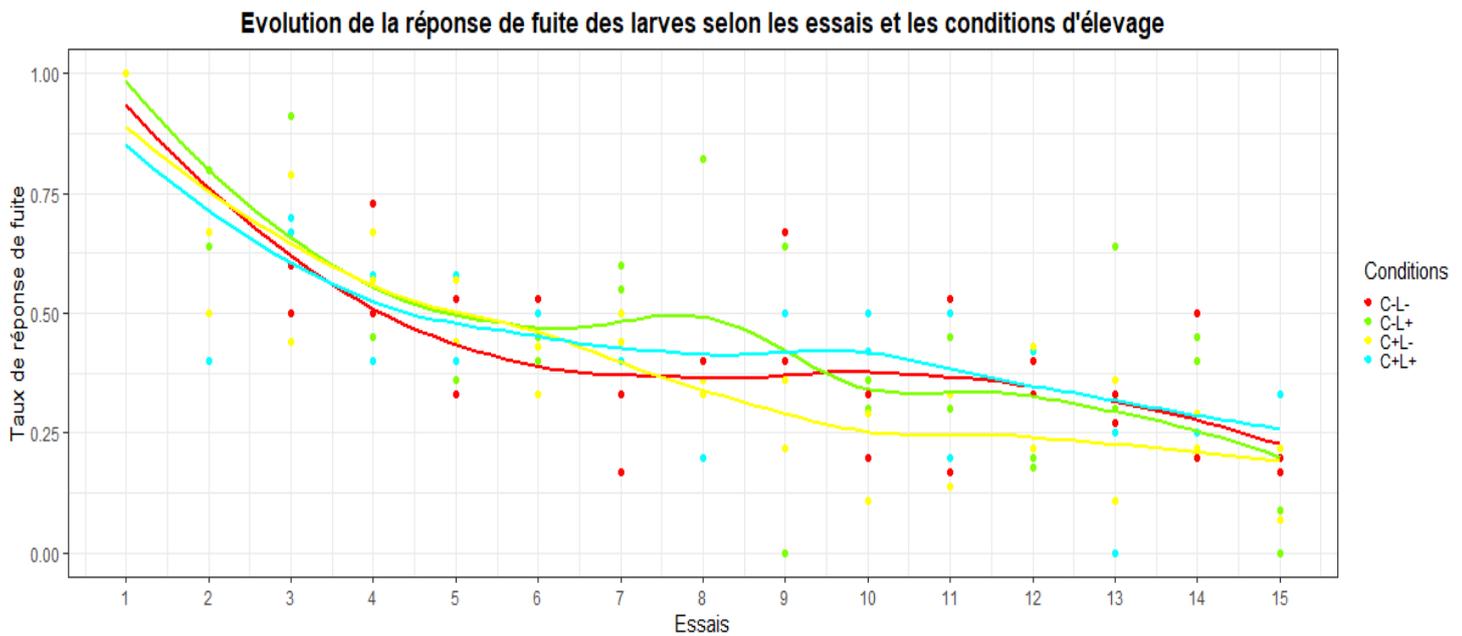


Figure 6 : Evolution du taux de la réponse de fuite des larves entraînées, selon les essais et les conditions d'élevage (expérience n°1).

Le GLMM a montré une diminution significative de la réponse avec les essais ( $F = 90.708$ ,  $ddl=14$ ,  $p < 0.001$ ). Il y'a bien eu un apprentissage chez les larves élevées en condition de lumière sans colorant entraînées dans de l'eau turbide.

- Condition n°2 (C+L+) :

Le GLMM a montré une diminution significative de la réponse avec les essais ( $F = 60.245$ ,  $ddl=14$ ,  $p < 0.001$ ). Il y'a bien eu un apprentissage chez les larves élevées en condition de lumière sans colorant entraînées dans de l'eau turbide.

b. Comparaison du niveau d'apprentissage entre les deux conditions d'élevages

Le graphique (cf. Figure n°7) montre qu'il n'y a pas de différences significatives d'apprentissage entre les deux conditions (GLMm,  $p \gg 0.025$ , pour les deux conditions). L'apprentissage ne varie donc pas avec les conditions d'élevage pour l'expérience n°2.

c. Comparaison de l'apprentissage entre conditions homologues

Le graphique (cf. Figure n°8) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux conditions d'entraînements et d'élevage (GLMm,  $p \gg 0.025$ , pour toutes les conditions). L'apprentissage ne varie donc pas avec les conditions physiques de milieu (turbide ou non).

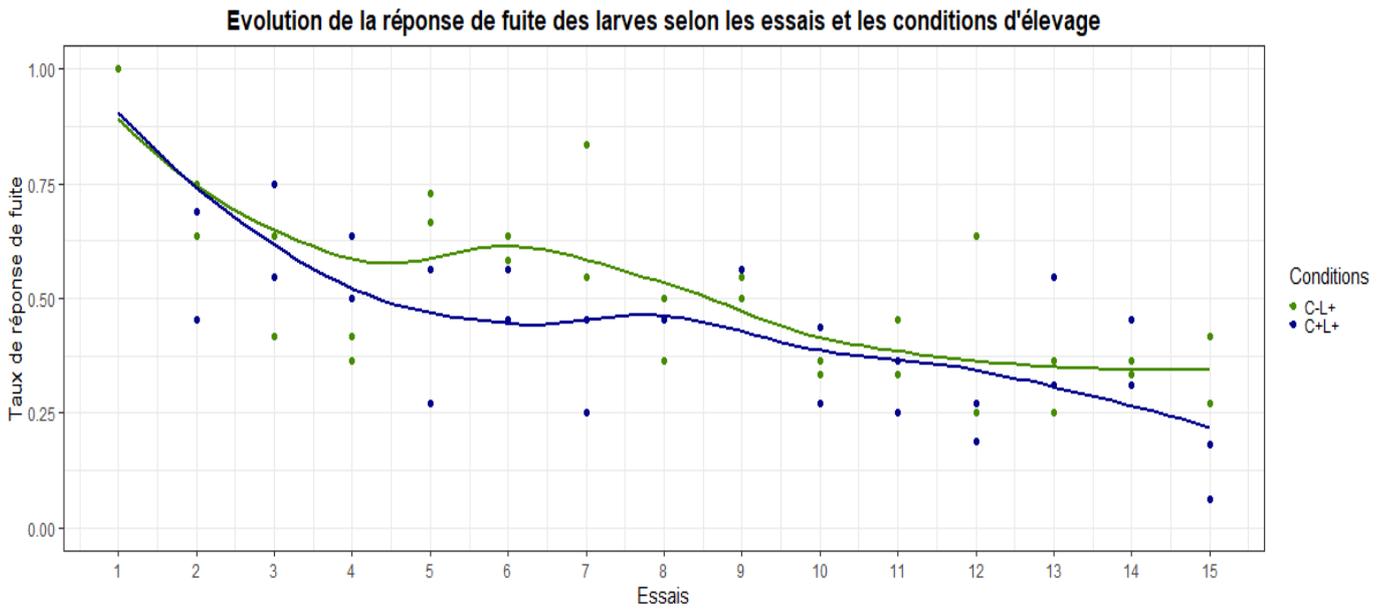


Figure 7 : Evolution du taux de la réponse de fuite des larves entraînées, selon les essais et les conditions d'élevage (expérience n°2).

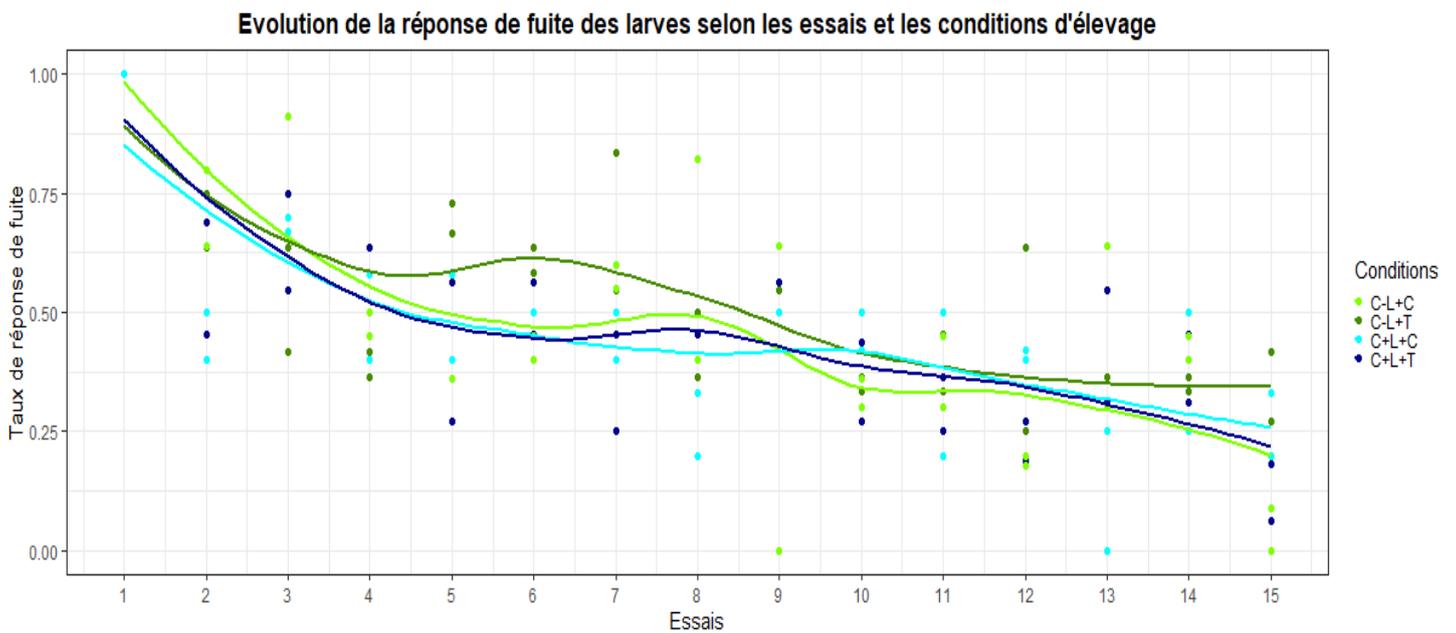


Figure 8 : Comparaison de l'évolution du taux de réponse des larves entre conditions homologues entraînées sous différentes conditions (expérience n°1 : eau claire, noté C ; expérience n°2 : eau turbide, noté T).

## IV. Discussion

Tout d'abord, nous avons montré que toutes les larves qui ont été entraînées suivant le protocole d'habituation étaient capables d'apprendre. De plus, aucune des conditions d'élevage, que ce soit pour l'expérience n°1 ou n°2, n'ont eu d'effet sur l'apprentissage des larves d'*Aedes aegypti*. Cela nous permet également de confirmer, via les résultats des conditions d'élevage n°4 (obscurité et eau turbide), que les colorants utilisés n'étaient pas nocifs pour les larves de moustique. Enfin, les conditions de turbidité lors de l'entraînement n'ont, en aucun cas, modifié les capacités d'apprentissage des larves.

Premièrement, nous avons vu que les conditions d'élevage des larves n'ont eu aucun effet, et donc la luminosité n'a pas d'influence sur leur capacité sensorielle et d'apprentissage. Nous pourrions penser que dans des conditions de faible luminosité voire obscure, il serait intéressant pour la larve de faire un « compromis » dans la répartition de ses ressources énergétiques comme c'est le cas du poisson *Astyanax mexicanus* (Blin & Rétaux, 2019), mentionné dans l'Introduction. *A. mexicanus* exprime un phénotype privilégiant le développement de ses organes olfactifs au détriment des organes visuels (yeux, modulation du Système Nerveux Central). Nous aurions pu penser que, de manière analogue, la larve d'*A. aegypti* exprimerait différents phénotypes selon les conditions de luminosité afin de favoriser différentes modalités sensorielles (olfactif, mécanoréception...). Néanmoins, nos résultats montrent que ce n'est pas le cas, au moins concernant la diminution de la modalité visuelle.

*Aedes aegypti* est une espèce holométabole (Leake, 1993), elle passe du stade larvaire aquatique à un stade adulte aérien. Dans son stade adulte, elle utilise plusieurs modalités sensorielles pour se repérer, dont l'une principale est la vue. Ainsi, être capable d'exprimer un seul phénotype conservant une machinerie optique fonctionnelle (yeux, lobe optique, corps pédonculé), qu'importe les conditions du milieu, semble être l'adaptation la plus optimale pour l'espèce.

Deuxièmement, nous pouvons en déduire que quelques soient les conditions de turbidité de l'eau lors de l'apprentissage, les larves étaient capables de percevoir et d'interpréter le stimulus visuel comme un danger car il provoquait la réponse de fuite. Ensuite, la présentation répétée du stimulus pouvait là encore entraîner l'habituation. De plus, les conditions de turbidité de l'eau appliquées dans nos expériences n'ont modifié ni le niveau de réponse, ni la dynamique d'apprentissage. Un changement spontané des conditions physiques du milieu ne semble pas non plus perturber les capacités sensorielles des larves. En effet, les larves élevées à l'eau claire dans l'expérience n°2 puis entraînées à l'eau turbide, et inversement les larves élevées à l'eau



turbide dans l'expérience n°1 puis testées à l'eau clair ne sont pas perturbées dans la perception et l'interprétation du stimulus visuel. Ainsi, nous pourrions penser que le contexte environnemental n'influe pas sur les capacités d'apprentissage des larves.

Dans une étude récente de Pietranuono et al. (2021), il a été montré que l'apprentissage des larves du moustique *Aedes aegypti* était contexte-dépendant. Contrairement à nous qui avons influé sur le contexte environnant (eau), Pietranuono et al. (2021) ont modifié le contexte du fond en modifiant la couleur de ce dernier (blanc, noir, rayé). Ils ont montré que lorsque les larves étaient entraînées avec un fond noir, le niveau d'apprentissage était significativement inférieur, comparé aux larves élevées sur fond blanc. De plus, un changement du contexte visuel (fond) entraînait une augmentation de la réponse, confirmant que l'habituation était un apprentissage contexte-dépendant. Les auteurs en ont conclu que la différence d'apprentissage entre les conditions était dû à une variation du contraste induit par le stimulus visuel (ombre projetée) et le contexte (fond) (Pietranuono et al. 2021).

Nous pouvons émettre plusieurs hypothèses pour expliquer la non-significativité du contexte physique sur l'apprentissage observée dans notre étude. Tout d'abord, il est probable que, comme la larve a besoin de remonter fréquemment à la surface pour respirer (Sophie, 2015) et que les boîtes de Petri utilisées pour l'entraînement sont de faible profondeur, la larve ne soit pas impactée par une turbidité ambiante, se trouvant la plupart du temps très proche de la surface et ne percevant ainsi pas une diminution du contraste induit par le stimulus. Augmenter la taille des boîtes de Petri utilisées pourrait donc en partie diminuer ce biais. De plus, il est possible que le niveau de turbidité utilisé dans l'expérience n°2 était trop faible pour créer un contraste suffisamment important pour perturber la perception des larves du stimulus, sachant qu'en plus, la turbidité décroît rapidement avec le temps (cf. Figure n°3).

Enfin, nous avons vu à quelle point les capacités d'habituation des larves étaient conservées qu'importe les conditions d'élevage. Cela met en lumière l'importance de l'apprentissage non-associatif et plus précisément de l'habituation dans le cycle de vie d'*Aedes aegypti*. En effet, il a été montré par Tuno et al. (2004) que le comportement de fuite, et plus précisément de plongée de la larve avait un coût énergétique très important et pouvait accroître la mortalité de la larve lorsqu'il était utilisé à une fréquence très élevée (Tuno et al., 2004). L'observation de capacité d'habituation chez de nombreuses espèces, que ce soit du poisson (Peeke, 1969) au nématode (Rankin et al., 1990) en passant par la grenouille (Owen & Perrill, 1998), en plus d'*Aedes aegypti* montre que cette capacité a largement été sélectionnée et conservée au cours de l'évolution.



Nous avons donc montré dans notre étude des capacités d'adaptation extrêmement développées chez le moustique *Aedes aegypti*. Cette forte capacité adaptative aux conditions physiques du milieu pourrait ainsi avoir contribué à la propagation et l'établissement d'*Aedes aegypti* dans de nombreux environnements (Brady & Hay, 2020).

Il serait intéressant pour la suite d'explorer d'autres modalités sensorielles, comme l'olfaction, chez les larves de moustique afin d'observer si en condition d'obscurité, les larves développent des capacités supérieures pour d'autres stimulus sensoriels. De plus, bien que notre étude n'ait pas mis en évidence d'effet sur le stade larvaire des conditions de luminosité, étudier les capacités visuelles des adultes provenant des élevages à l'obscurité nous permettrait de confirmer que cette modalité sensorielle est largement conservée, témoignant d'une forte adaptabilité chez *Aedes aegypti*. Enfin, étendre ce protocole à d'autres espèces de moustique pour étudier l'adaptation aux conditions de luminosité serait intéressant pour mieux comprendre le rôle de l'environnement dans le développement cognitif des insectes.



## V. Bibliographie

- Baglan, H., Lazzari, C., & Guerrieri, F. (2017). Learning in mosquito larvae (*Aedes aegypti*): Habituation to a visual danger signal. *Journal of Insect Physiology*, *98*, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.01.001>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, *67*(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Blin, M., & Rétaux, S. (2019). Voir ou sentir, l'histoire d'*Astyanax mexicanus*. *Medecine Sciences : M/S*, *35*(1), 19–23. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018314>
- Boyle, J., & Start, D. (2020). Plasticity and habitat choice match colour to function in an ambush bug. *Functional Ecology*, *34*(4), 822–829. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13528>
- Brady, O. J., & Hay, S. I. (2020). The global expansion of dengue: How *aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. *Annual Review of Entomology*, *65*, 191–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-024918>
- Calixto-Botía, I., & Sánchez, J. A. (2017). A case of modular phenotypic plasticity in the depth gradient for the gorgonian coral *Antilloorgia bipinnata* (Cnidaria: Octocorallia). *BMC Evolutionary Biology*, *17*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0900-8>
- Groves, P. M., & Thompson, R. F. (1970). Habituation: A dual-process theory. *Psychological Review*, *77*(5), 419–450. <https://doi.org/10.1037/h0029810>
- LANJIAO, W. (2018). *Résistance aux Insecticides : Importance dans la Transmission du virus Chikungunya par les Moustiques Aedes aegypti*. 28.
- Leake, C. (1993). The biology of mosquitoes. Volume 1: Development, nutrition and reproduction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *87*(6), 718. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90329-o](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90329-o)
- Nene, V., Wortman, J. R., Lawson, D., Haas, B., Kodira, C., Tu, Z., Loftus, B., Xi, Z., Megy, K., Grabherr, M., Ren, Q., Zdobnov, E. M., Lobo, N. F., Campbell, K. S., Brown, S. E., Bonaldo, M. F., Zhu, J., Sinkins, S. P., Hogenkamp, D. G., ... Severson, D. W. (2007). Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science*, *316*(5832), 1718–1723. <https://doi.org/10.1126/science.1138878>
- Owen, P. C., & Perrill, S. A. (1998). Habituation in the green frog, *Rana clamitans*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *44*(3), 209–213. <https://doi.org/10.1007/s002650050533>
- Harman V.S Peek (1969). Habituation of conspecific aggression in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Behaviour*, (35), 137-156. <https://doi.org/10.1163/156853970X00178>
- Pinsker, H., Kupfermann, I., Castellucci, V., & Kandel, E. (1970). Habituation and dishabituation of the gill-withdrawal reflex in *Aplysia*. *Science*, *167*(3926), 1740–1742. <https://doi.org/10.1126/science.167.3926.1740>
- Pietrantuono A.L., Aguirre M.B., Bruzzone O.A., Guerrieri F.J. (2021); Habituation in mosquito larvae *Aedes aegypti* is context-specific. *J Exp Biol ; jeb.242351*. doi: <https://doi.org/10.1242/jeb.242351>
- Powell, J. R., Gloria-Soria, A., & Kotsakiozi, P. (2018). Recent history of *Aedes aegypti*: Vector genomics and epidemiology records. *BioScience*, *68*(11), 854–860. <https://doi.org/10.1093/biosci/biy119>

Rankin, C. H., Beck, C. D. O., & Chiba, C. M. (1990). *Caenorhabditis elegans*: A new model system for the study of learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 37(1), 89–92. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(90\)90074-O](https://doi.org/10.1016/0166-4328(90)90074-O)

Sophie, P. (2015). *Conséquences de l' exposition de l' insecte modèle Aedes aegypti aux polluants des eaux de surface : Des mécanismes moléculaires à la dynamique des populations.*

Tuno, N., Miki, K., Minakawa, N., Githeko, A., Yan, G., & Takagi, M. (2004). Diving ability of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) larvae. *Journal of Medical Entomology*, 41(4), 810–812. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.810>

Vinauger, C., Van Breugel, F., Locke, L. T., Tobin, K. K. S., Dickinson, M. H., Fairhall, A. L., Akbari, O. S., & Riffell, J. A. (2019). Visual-Olfactory Integration in the Human Disease Vector Mosquito *Aedes aegypti*. *Current Biology*, 29(15), 2509-2516.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.06.043>

## **i. Table des figures**

Figure 1 : Schéma du cycle de vie du moustique <i>Aedes aegypti</i> .....	4
Figure 2 : Photographie d'une cuve d'élevage placée à la lumière. ....	10
Figure 3 : Graphique de l'évolution de la turbidité utilisée dans les deux expériences en fonction du temps. ....	10
Figure 4 : Photographie du dispositif expérimental mis en place. ....	14
Figure 5 : Schéma du dispositif expérimental d'habituation et son fonctionnement. Dans notre cas, le "vibrator" n'est pas utilisé.....	14
Figure 6 : Evolution du taux de la réponse de fuite des larves entraînées, selon les essais et les conditions d'élevage (expérience n°1).....	18
Figure 7 : Evolution du taux de la réponse de fuite des larves entraînées, selon les essais et les conditions d'élevage (expérience n°2).....	20
Figure 8 : Comparaison de l'évolution du taux de réponse des larves entre conditions homologues entraînées sous différentes conditions (expérience n°1 : eau claire, noté C ; expérience n°2 : eau turbide, noté T). ....	20



## ii. **Résumé :**

La luminosité et la turbidité sont deux facteurs influant la visibilité. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'impact de la luminosité et de la turbidité sur les capacités sensorielles et cognitives des larves du moustique *Aedes aegypti*. Pour ce faire, nous avons utilisé un protocole d'habituation, consistant à présenter à intervalle régulier un carré de carton en dessous d'une lumière, projetant ainsi une ombre (stimulus visuel) sur la larve. Nous avons entraîné plusieurs groupes de larves élevées en conditions de luminosité différentes : (1) larves élevées à la lumière dans de l'eau claire ; (2) larves élevées à la lumière dans de l'eau turbide ; (3) larves élevées à l'obscurité dans de l'eau claire ; (4) larves élevées à l'obscurité dans de l'eau turbide. Les larves ont été entraînées dans de l'eau claire ou dans de l'eau turbide. Les analyses statistiques ont montré que les conditions d'élevage n'ont aucun effet sur le niveau et la dynamique d'apprentissage chez les larves. De plus, les conditions physiques du milieu (turbide vs claire) ne modifient pas non plus les capacités sensorielles des larves.

Mots clés : comportement, apprentissage non-associatif, cognition, développement, adaptation.

## **Summary :**

Luminosity and turbidity are two factors influencing visibility. In this study, we focused on the potential impact of luminosity and turbidity on sensory and cognitive skills in *Aedes aegypti* mosquito larvae. In order to do this, we applied a habituation protocol, in which a square of cardboard was presented at regular interval under a light, thus projecting its shadow (visual stimulus) on the larva. We individually trained several larvae reared under different luminosity and turbidity conditions; (1) larvae raised in light and clear water; (2) larvae raised in light and turbid water; (3) larvae raised in darkness and clear water; (4) larvae raised in darkness and turbid water. Larvae were trained in clear or turbid water. Statistical analyses showed that rearing conditions did not influence neither the level nor the dynamics of learning. Moreover, the physical conditions of the environment did not modify the sensory skills in the assayed larvae.

Keywords: behavior, non-associative learning, cognition, development, adaptation.