



HAL
open science

Variation intra spécifique de résistance et de virulence dans un système hôte-parasitoïde : Approche intégrative de la spécificité des interactions

Aurore Dubuffet

► **To cite this version:**

Aurore Dubuffet. Variation intra spécifique de résistance et de virulence dans un système hôte-parasitoïde : Approche intégrative de la spécificité des interactions. Ecologie, Environnement. Université François Rabelais - Tours, 2006. Français. NNT: . tel-00101898

HAL Id: tel-00101898

<https://theses.hal.science/tel-00101898>

Submitted on 28 Sep 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS

TOURS

Ecole doctorale : **Santé, Sciences et Technologies**

Année universitaire : 2005 - 2006

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE
DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOURS

Discipline : **Sciences de la Vie**

**VARIATION INTRA SPÉCIFIQUE DE RÉSISTANCE ET DE VIRULENCE
DANS UN SYSTÈME HÔTE-PARASITOÏDE :
Approche intégrative de la spécificité des interactions**

Présentée et soutenue publiquement par :

Aurore DUBUFFET

le 15 juin 2006

Sous la direction de **Marylène Poirié**

JURY

Christine COUSTAU	Chargée de Recherche CNRS, LILLE
Marie MEISTER	Directeur de Recherche CNRS, STRASBOURG
Georges PERIQUET	Professeur, Université François Rabelais, TOURS
Marylène POIRIE	Professeur, Université NICE-Sophia Antipolis
Thierry RIGAUD	Directeur de Recherche CNRS DIJON
Michael STRAND	Professeur, Université de Georgie, USA

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE
DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE TOURS

Discipline : **Sciences de la Vie**

VARIATION INTRA SPÉCIFIQUE DE RÉSISTANCE ET DE VIRULENCE
DANS UN SYSTÈME HÔTE-PARASITOÏDE :
Approche intégrative de la spécificité des interactions

Présentée et soutenue publiquement par :

Aurore DUBUFFET

le 15 juin 2006

Sous la direction de **Marylène Poirié**

JURY

Christine COUSTAU	Chargée de Recherche CNRS, LILLE
Marie MEISTER	Directeur de Recherche CNRS, STRASBOURG
Georges PERIQUET	Professeur, Université François Rabelais, TOURS
Marylène POIRIE	Professeur, Université NICE-Sophia Antipolis
Thierry RIGAUD	Directeur de Recherche CNRS DIJON
Michael STRAND	Professeur, Université de Georgie, USA

Ce travail de thèse a été effectué au sein de l'IRBI (Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR CNRS/Université de Tours 6035) sous la direction de Marylène POIRIÉ et Georges Periquet

– Fichier PDF –

Si vous souhaitez imprimer ma thèse à partir de ce fichier pdf, veuillez noter que l'impression couleur n'est essentielle que pour les figures des pages 79, 123, 157, 159, 161 et 163 du manuscrit (qui correspondent aux pages 101, 145, 179, 181, 183 et 185 du pdf)

If you print my thesis from this file, please note that colour is necessary only for pages 79, 123, 157, 159, 161 et 163 of the manuscript (which correspond to pages 101, 145, 179, 181, 183 et 185 of the pdf file)

Merci ...

La réalisation d'une thèse est loin d'être le fruit du travail d'une seule personne. Aussi, je tenais à remercier de tout cœur toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à ma thèse. La liste est longue et j'espère n'oublier personne... (si un tel oubli se produit, sachez qu'il est la conséquence de la surchauffe de mon pauvre cerveau mais pas le moins du monde un signe d'ingratitude!).

Je tiens à remercier en premier lieu les membres de mon jury, **Yves Carton, Christine Coustau, Marie Meister, Thierry Rigaud et Mike Strand**, pour avoir accepté de prendre le temps de lire et d'évaluer mon travail (et tout spécialement Mike pour avoir eu le courage de lire cette thèse rédigée en grande partie en français !). Merci aussi pour vos suggestions et pour vos encouragements.

Un grand merci à mes deux directeurs de thèse, Marylène Poirié et Georges Periquet.

Merci **Marylène** pour ton enthousiasme, ton perfectionnisme chronique (ceux qui connaissent aussi le mien comprendront aisément pourquoi chaque article est relu et corrigé une bonne quinzaine de fois !) et pour le soin que tu mets toujours à relire rapidement tout ce que j'ai pu produire. Merci pour nos longues et enrichissantes discussions, "de visu" ou téléphoniques (je pense que tu es la seule personne au monde avec qui j'arrive à passer plus d'une heure au téléphone, et ça tout en trouvant encore quelque chose à raconter !). Merci aussi pour cette confiance que tu m'as accordée depuis longtemps et pour m'avoir laissé la liberté de mener comme je l'entendais ma recherche (ok, je sais, je suis têtue aussi...). Je sors de thèse en me sachant autonome, mais aussi en sachant qu'un filet de sécurité n'est pas très loin en dessous!

Et puis je tenais aussi à te remercier en tant qu'amie... Merci de m'avoir régulièrement rassurée, conseillée, fait rire ... et pour avoir pensé au chocolat dans les moments difficiles !!! Je suis heureuse que nous ayons pu conserver cette belle amitié malgré la distance et malgré les difficultés qui sont parfois rencontrées dans la relation thésarde/directrice de thèse. Merci pour tout ...

Merci **Georges** pour ta disponibilité, tes conseils avisés et ton calme (combien de fois as-tu tempéré mes états d'âme ?!!!). Merci d'avoir "pris la relève" après le départ de Marylène et d'avoir accepté qu'une dizaine de fois par semaine une tornade arrive dans ton bureau pour te parler de tout et n'importe quoi ... Merci d'avoir cru en moi, aussi bien pour ma recherche que pour tout l'enseignement en génétique des populations.

Je tenais aussi à remercier tout particulièrement **Yves Carton**, d'abord pour m'avoir accueillie en DEA puis pour avoir suivi de près tout mon travail de thèse. Merci pour nos nombreuses conversations, aussi bien amicales que scientifiques. Merci de m'avoir laissé fouiller maintes et maintes fois dans la "caverne d'Ali baba" (l'immense étagère couverte de publications dans votre bureau), de m'avoir raconté toutes ces anecdotes qui rendent tellement plus humaine cette science que nous pratiquons ! Merci de me "gronder" lorsque je ne valorise pas assez mon travail et de m'encourager dès que l'occasion se présente. Enfin, un grand merci pour avoir été là "le jour J" ... ce qui était vraiment important pour moi.

C'est également toute l'équipe "Génome et Stratégies Parasitaires" que je tiens à remercier chaleureusement. Vous avez tous largement contribué à mon épanouissement personnel et à mon évolution en tant que scientifique. Je pense que c'est important d'indiquer à toutes les personnes qui liront ces pages de remerciements que cette équipe est comme une famille pour moi. Je me suis sentie à ma place auprès de vous tous. Merci de m'avoir soutenu (et notamment ces derniers mois !) et de m'avoir aidée à prendre confiance en moi. Merci à **Jean-Michel Drezen** d'avoir prêté oreille à mes délires scientifiques ainsi qu'à mes diverses angoisses (désolée de ne pas avoir tenu ma promesse, j'ai très largement pleuré le jour de ma soutenance !), à **Elisabeth Huguet** pour ses touchantes attentions et sa gentillesse naturelle, **Catherine Dupuy** pour sa bonne humeur et nos fou rires. Mention spéciale à **Carole Labrousse** ("ma Carole"), sans qui je n'aurais rien pu faire. Merci d'avoir pris soin des petites *Leptopilina* et des drosos, et de m'avoir si souvent donné un "coup de main" (autrement dit, de m'avoir aidé à "glander" et "larver" ¹ !). Merci pour ta patience (car il en faut pour disséquer des centaines -voire milliers- de parasitoïdes) et pour être toujours si arrangeante. Je te dois une fière chandelle.

Merci aussi à tous les autres, qu'ils soient encore dans l'équipe ou qu'ils n'y soient passés que quelque temps. Merci **Corinne** de t'être occupée de moi lorsque j'étais stagiaire, il y a fort longtemps, quand j'étais toute petite... Merci **Jérôme** pour avoir eu la patience de m'apprendre les bases de la biologie moléculaire et pour tous tes conseils avisés en biochimie. Merci à **Annie, Bertille, Céline, Cindy, Delphine, Eric, François, Gwen, Juline, Karine et Samuel** pour contribuer au dynamisme et la bonne humeur ambiante qui règne dans cette équipe.

Merci aux 3 jeunes filles qui m'ont supportées en tant qu'encadrante ! Merci **Clara** pour ta bonne humeur et ton amitié (et pour être venue d'Espagne pour ma soutenance !), **Malivone** pour ton calme, **Laurène** pour ta persévérance et ton travail particulièrement soigné.

Une grande partie de ce travail n'aurait jamais pu être réalisée sans la contribution de nombreuses personnes.

Merci à **Jacques van Alphen** de m'avoir accueillie dans son laboratoire quelques jours en DEA et pour avoir contribué significativement à l'amélioration de mon premier article, **Eric Thibout** pour m'avoir prêté une pièce pour mes manip "comportement", **Eric Wajnberg** pour ses conseils éclairés en stats. Merci aux 2 "**Dominique**" de Nice qui ont réalisé récemment un travail remarquable sur les serpines... Au plaisir de vous rencontrer un jour ! Merci également à **Françoise Frey** pour m'avoir communiqué son sens de l'organisation et son enthousiasme pour ces charmantes petites *Leptopilina*...

Un très grand merci à l'équipe "biologie des entomophages" (BDE) d'Amiens qui m'a adoptée pour quelques semaines... Merci à tous pour votre accueil chaleureux. Merci en particulier à **Géraldine Doury** qui m'a permis de considérer mes données sous un autre angle. Nos petites conversations m'ont beaucoup apporté et c'est grâce à cela que j'ai pu "dérouler la bobine" tranquillement durant ma dernière année de thèse. Merci également à **Anas Cherqui** pour m'avoir fait découvrir les joies (et déceptions!) de la biochimie.

Merci infiniment à **Sébastien Moreau**, qui au moment le plus critique de ma thèse a pris le temps de m'écouter raconter mes galères... Merci Seb de m'avoir aidé dans la mise au point de mes manip "phénoloxydase" et de m'avoir aidé à l'époque à structurer l'ensemble de mes données (et j'en avais vraiment besoin !).

¹ afin d'éviter toute confusion : glander = disséquer des glandes impaires de femelles parasitoïde ; larver = disséquer des larves de drosophile !!!

Je remercie également **Maya Belghazi** pour son travail d'identification de facteurs de virulence. Merci d'avoir sorti par le plus merveilleux des hasards LA protéine magique ("*the cherry on the cake!*"). J'ai eu grand plaisir à collaborer avec toi et découvrir (avec bien du mal au début, il est vrai) les joies de la spectrométrie de masse. Merci à **Ana Paula Teixeira** pour m'avoir accueillie quelques jours et m'avoir appris l'électrophorèse "bidi" !

Merci à **Stéphane Dupas, Laure Kaiser, Francesco Pennacchio** et **Charles Godfray** pour nos passionnantes discussions et pour m'avoir donné de précieux conseils.

Enfin, je remercie **Joseph Voudibio** pour m'avoir fait parvenir un "piège banane" de Brazzaville. Bien que les parasitoïdes qui ont émergé de ce piège n'aient pas été de la bonne espèce, la réception de ce petit bout de Congo m'a procuré une joie immense ! Merci également à **Daniel Lachaise** pour m'avoir confié quelques souches de drosophiles et communiqué son enthousiasme pour l'histoire évolutive des drosophiles.

Je remercie l'**Université de Tours** pour la bourse de thèse qu'elle m'a accordé durant 3 ans, ainsi que pour sa contribution aux divers déplacements en Italie, réalisés dans le cadre de l'Ecole Doctorale Européenne. Merci également au **GDR 2153 " Evolution de Systèmes Hôte-Parasitoïdes : de l'Individu à l'Aire Géographique "** pour avoir financé mes déplacements sur Amiens.

Je tenais à remercier l'ensemble des membres de l'IRBI pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Merci en particulier à **Christine, Dominique, Sonia, Jean-Philippe** et **Guy** pour nous faciliter la vie au quotidien ; à **Liliane** pour m'avoir "coachée" dans mes premières années d'enseignement ; à **Martine, Christelle** et **Nathalie** (que je compte comme étant encore à l'IRBI !) pour leur amitié. Merci également à l'ensemble des "d'jeuns"² de l'IRBI pour toutes les soirées, les fous rires, les sourires échangés au quotidien.

Un grand merci également à **Jérôme Casas** qui s'est d'abord battu pour que j'obtienne ma bourse de thèse, puis qui m'a offert son aide à de nombreuses reprises durant ces quatre années. Merci Jérôme pour ton amitié, ton oreille attentive et pour avoir contribué avec Olivier et Sylvain à l'épanouissement de ma curiosité naturaliste !

Merci aux "**Raisonneuses**", à **Loïc, Choup', Sebastian** (et autres musiciens en herbe qui se reconnaîtront, la liste est longue !) pour les soirées guitare/chant que nous avons partagées. Ce fut un excellent exutoire ! Merci **Hélène** pour nos inoubliables tête-à-tête... Merci **Loïc, Aurélie, Xavier, Sam, Fanny, Cyril, Frank, Yannick, Pika, Carine, Mélanie, JaMes, Ana, Christophe** et tous les autres pour votre amitié et pour tous ces bons moments que nous avons partagés...

Je remercie tout spécialement **mes parents, mon frère, ma sœur et mes grands parents** pour m'avoir toujours soutenue et permis d'aller aussi loin dans mes études. Je regrette tant de n'avoir pas pu passer plus de temps avec vous tous cette année... Merci à vous, ainsi qu'à tous mes amis, d'avoir compris mes absences et de ne jamais m'en blâmer...

Et merci à toi **Sylvain** ...

² Fabienne, Aurélie, Romina, Sebastian, Fanny, Magda, Olivier, Coco, Céline, Delphine, Annie, Bertille, Juline, Franck, Laurianne, Simon, Apolline, Arnold, Michael, Bruno, Sébastien, Thomas (et Elyse!), David (et Cédric!), Isabelle, Olivier, Jérémy, Sandrine, Hong et ceux que j'aurai oublié par mégarde ...

SOMMAIRE

Introduction générale	1
Exposé bibliographique	4
I RESISTANCE DE L'HOTE: L'ENCAPSULEMENT	7
I.1 Reconnaissance du corps étranger	9
I.1.1 Le “non-soi”	11
I.1.2 Acteurs de la reconnaissance du “non-soi”	12
I.2 Déclenchement de la réponse immunitaire	15
I.2.1 Prolifération cellulaire	15
I.2.2 Activation de la cascade pro-phénoloxydase	17
I.3 Formation de la capsule mélanisée	24
I.3.1 Initiation et Recrutement	25
I.3.2 Terminaison	27
I.4 Mort du parasitoïde	30
II STRATEGIES DE VIRULENCE DES PARASITOÏDES	31
II.1 Facteurs de virulence	32
II.1.1 Polydnavirus (PDVs)	35
II.1.2 Particules d'allure virale (VLPs)	37
II.2 Stratégies d'immunoévasion locale	39
II.2.1 Développement dans les tissus de l'hôte	39
II.2.2 Protection conférée par les molécules à la surface des œufs	39

II.2.3	Protection conférée par la surface des larves	41
II.3	Stratégies d'immunosuppression systémique	42
II.3.1	Altération de la réponse cellulaire	44
II.3.2	Altération de l'activité phénoloxydase et/ou de la mélanisation	53
II.4	Succession de stratégies	54
III	VARIATIONS DE L'ISSUE DE L'INTERACTION HÔTE - PARASITOÏDE	55
III.1	Variations du succès d'un parasitoïde sur une espèce hôte	56
III.1.1	Causes proximales	56
III.1.2	Causes ultimes	59
III.2	Variations du succès d'un parasitoïde d'une espèce hôte à l'autre	81
IV	CONCLUSION DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	88

Modèle biologique 89

I	BIOLOGIE DES ESPÈCES ÉTUDIÉES	90
I.1	Espèce hôte: <i>Drosophila yakuba</i> Burla (1954)	90
I.2	Espèce parasitoïde: <i>Leptopilina boulardi</i> Barbotin, Carton et Kelner-Pillault, (1979)	90
II	SOUCHES UTILISÉES DANS L'ÉTUDE	94
II.1	Drosophiles	94
II.2	Parasitoïdes	95
III	MATRICE D'INTERACTION ET TERMES EMPLOYÉS	96
III.1	Matrice d'interaction	96
III.2	Termes spécifiques à l'étude	97

CHAPITRE 1 :**Variation de comportement de sélection d'hôte
au sein de l'espèce *L. boulandi* 99****PRESENTATION DE L'ETUDE..... 102****ARTICLE 1 : DO PARASITOID PREFERENCES FOR DIFFERENT
HOST SPECIES MATCH VIRULENCE ?..... 102****PRINCIPAUX RESULTATS 118****CHAPITRE 2 :****Variation de stratégie de virulence au sein de
l'espèce *L. boulandi* et spécificité parasitaire
117****PRESENTATION DE L'ETUDE..... 118****Variation intraspécifique de virulence sur une espèce hôte..... 118****Variation de succès d'une espèce hôte à l'autre..... 121****I ARTICLE 2: VIRULENCE STRATEGIES USED BY THE
PARASITOID WASP *LETOPILINA BOULARDI* AGAINST ITS
DROSOPHILA HOSTS..... 122****II EFFETS DES COMPOSES CONTENUS DANS LA GLANDE
IMPAIRE DE *L. BOULARDI* SUR L'ACTIVITE PHENOLOXYDASE
DE *D. YAKUBA*..... 148****II.1 Objectif/Principe 148****II.2 Matériel et méthodes..... 148****II.2.1 Obtention d'hémolymphe de larves de *D. yakuba* 148****II.2.2 Préparation des extraits de glande impaire 148**

II.2.3	Dosage de l'activité de l'enzyme phénoloxydase	148
II.3	Résultats	150
II.4	Discussion / Perspectives	152
II.4.1	Rôle des facteurs contenus dans la glande impaire dans l'inhibition transitoire de l'encapsulation	152
II.4.2	Spécificité d'inhibition	153
II.4.3	Nature des facteurs de virulence et variation intraspécifique	154
III	NATURE DES FACTEURS DE VIRULENCE CONTENUS DANS LES GLANDES IMPAIRES DES FEMELLES DE LA LIGNEE IS_Y	156
III.1	Objectif/Principe	156
III.2	Matériel et méthode	158
III.2.1	Comparaison des profils protéiques en condition native	158
III.2.2	Comparaison des profils protéiques en condition dénaturante	158
III.2.3	Analyse en condition dénaturante des bandes majeures observées en condition native	160
III.2.4	Identification des protéines des bandes protéiques majeures	160
III.2.5	Recherche de la présence d'une serpine dans les glandes de femelles IS _Y et IS _m	162
III.3	Résultats	162
III.3.1	Comparaison des profils protéiques en condition native	162
III.3.2	Comparaison des profils protéiques en condition dénaturante	162
III.3.3	Analyse en condition dénaturante des bandes majeures observées en condition native	164
III.3.4	Identification des protéines des bandes protéiques majeures	166
III.3.5	Recherche de la présence d'une serpine dans les glandes de femelles IS _Y et IS _m	166
III.4	Discussion / Perspectives	166

CHAPITRE 3 :

**Variation de résistance au parasitoïde
L. boulandi chez l'hôte *D. yakuba* 175**

PRESENTATION DE L'ETUDE.....	176
Comment expliquer les variations de résistance dans une espèce hôte ?	176
La résistance dans les modèles hôte/parasitoïdes.....	177
I. Bases génétiques	177
II. Bases physiologiques	178
Qu'en est-il dans le modèle <i>L. boulandi</i> / <i>D. yakuba</i> ?.....	180
I ARTICLE 3: GENETIC INTERACTIONS BETWEEN A PARASITOID WASP AND ITS <i>DROSOPHILA</i> HOSTS.....	180
II RECHERCHE DES BASES PHYSIOLOGIQUES DE LA RESISTANCE A <i>L. BOULARDI</i> CHEZ <i>D. YAKUBA</i>.....	199
II.1 Objectif/Principe	199
II.2 Matériel et méthodes.....	199
II.2.1 Comparaison de la capacité à encapsuler un corps étranger “neutre”	199
II.2.2 Hémogrammes	200
II.2.3 Mesure de l'activité PO	200
II.3 Résultats	201
II.3.1 Comparaison de la capacité à encapsuler un corps étranger “neutre”	201
II.3.2 Hémogrammes	203
II.3.3 Mesure de l'activité PO	203
II.4 Discussion / Perspectives	206
II.4.1 Comparaison de l'immunocompétence des lignées R ₁ et R ₂	206
II.4.2 Comparaison de la sensibilité des cibles des facteurs parasitaires dans les lignées R ₁ et R ₂	206

DISCUSSION 209

I INTERACTIONS *L. BOULARDI* - *DROSOPHILES* : REINTERPRETATION DE LA MATRICE D'INTERACTIONS 210

I.1 Les “types” IS_m et IS_y	210
I.2 Type IS_m : Succès “espèce-hôte dépendant”.....	211
I.2.1 Sélection d'hôte chez IS_m : préférence pour <i>D. melanogaster</i> ?	211
I.2.2 Stratégie de virulence d' IS_m : spécifique de <i>D. melanogaster</i> ?	214
I.3 Type IS_y : Succès “résistance de l'hôte dépendant”.....	216
I.3.1 Sélection d'hôte : des préférences moins marquées que chez IS_m	216
I.3.2 Stratégie de virulence d' IS_y	219
I.4 Bilan 1 : Variation intra-spécifique de stratégie parasitaire.....	222
I.5 Bilan 2 : Comment expliquer les variations de succès de <i>L. bouleardi</i> sur <i>D. melanogaster</i> et <i>D. yakuba</i> ?.....	223
I.5.1 Variation de virulence	223
I.5.2 Spécificité d'hôte (lignée IS_m)	226
I.5.3 Variation de résistance	226

II STRATEGIES DE VIRULENCE DES PARASITOÏDES DE *DROSOPHILES*..... 228

II.1 Mécanisme général.....	228
II.2 Effets sur le nombre total d'hémocytes et sur l'organe hématopoïétique	231
II.3 Effets sur les lamellocytes.....	232
II.4 Effets sur la cascade PO et la mélanisation	233
II.5 Bilan : diversité et similitudes de stratégies.....	233

CONCLUSION et PERSPECTIVES 237

BIBLIOGRAPHIE	240
----------------------	------------

ANNEXES	265
----------------	------------

Liste des Figures

Exposé Bibliographique

Résistance de l'hôte : l'encapsulation

Figure 1 : Représentation schématique du système immunitaire des insectes.....	8
Figure 2 : Voies de signalisation Toll, Imd et JAK/STAT.....	10
Figure 3 : Détail d'un œuf du parasitoïde <i>Leptopilina boulardi</i> encapsulé par une larve de <i>Drosophila yakuba</i>	13
Figure 4 : Larve de drosophile ayant encapsulé 2 œufs du parasitoïde <i>Leptopilina boulardi</i>	13
Figure 5 : Images en microscopie optique à contraste de phase des trois types d'hémocytes différenciés observés chez <i>Drosophila melanogaster</i>	14
Figure 6 : Prolifération et différenciation cellulaire dans l'organe hématopoïétique de la drosophile.....	14
Figure 7 : Représentation schématique du système d'activation de la pro-phenoloxylase (pro-PO) des arthropodes.....	19
Figure 8 : Représentation schématique de la synthèse de mélanine chez les insectes	19
Figure 9 : Lien entre mélanisation et voie d'activation Toll.....	21
Figure 10 : Images en microscopie à fluorescence du processus d'encapsulation d'un œuf de <i>Leptopilina boulardi</i> (lignée IS _y) chez <i>Drosophila melanogaster</i>	23
Figure 11 : Hémocytes et plasma sont nécessaires à l'encapsulation cellulaire mélanisée.....	23
Figure 12 : Embryon du parasitoïde <i>Leptopilina boulardi</i> s'échappant d'une capsule formée lors de la réaction immunitaire de larves de <i>Drosophila yakuba</i>	29
Figure 13 : Représentation schématique de la production des composés cytotoxiques supposés à l'origine de la mort du parasitoïde.....	29

Stratégies de virulence des parasitoïdes

Figure 14 : Cycle biologique des parasitoïdes porteurs de polydnavirus.....	36
Figure 15 : Photographie en microscopie électronique à transmission de particules à allure virale (VLPs)	38
Figure 16 : Photographie d'une glande impaire du parasitoïde <i>Leptopilina boulardi</i>	38
Figure 17 : Suppression systémique de la capacité des larves de <i>Drosophila melanogaster</i> à encapsuler un corps étranger.....	48
Figure 18 : Modification de la morphologie des lamellocytes de <i>Drosophila melanogaster</i> par les parasitoïdes <i>Leptopilina heterotoma</i> , <i>L. victoricae</i> et <i>L. boulardi</i>	48
Figure 19 : Profils protéiques des glandes impaires des lignées virulentes G301-1 et G431 (=IS _m) et de la lignée avirulente G486 (=IS _y) du parasitoïde <i>Leptopilina boulardi</i>	51

Variation de l'issue de l'interaction

- Figure 20** : Déterminisme génétique de la virulence vis à vis de *Drosophila melanogaster* chez le parasitoïde *Leptopilina heterotoma*.....60
- Figure 21** : Diagramme illustrant l'issue des interactions entre le parasitoïde *Leptopilina bouvardi* et l'hôte *Drosophila melanogaster*, en fonction des interactions génétiques entre un locus pour la résistance de l'hôte et un locus pour la virulence du parasitoïde.....62
- Figure 22** : Représentation schématique du succès parasitaire dans le cas d'adaptations locales (a) ou dans le cas de variations du niveau général de résistance et de virulence d'une population à l'autre (b)68
- Figure 23** : Variations géographique (a) de l'encapsulement des œufs de *Leptopilina bouvardi* dans l'hôte *Drosophila melanogaster* en conditions sympatriques, (b) du niveau de résistance de *D. melanogaster* et (c) du niveau de virulence de *L. bouvardi*.....71
- Figure 24** : Niveau de virulence de différentes populations européennes du parasitoïde *Asobara tabida* sur l'espèce hôte *Drosophila melanogaster*.....72
- Figure 25** : Niveau de résistance de différentes populations européennes de *Drosophila melanogaster* au parasitoïde *Asobara tabida*.....72
- Figure 26** : Variations géographiques du niveau de virulence de *Leptopilina bouvardi* sur les hôtes *Drosophila melanogaster* (a) et *Drosophila yakuba* (b)74
- Figure 27** : Comparaison du nombre total d'hémocytes observé dans des lignées de *Drosophila melanogaster* sélectionnées pour leur résistance au parasitoïde *Asobara tabida* (S) par rapport aux lignées témoin (C)77
- Figure 28** : Corrélation entre le degré d'enveloppement dans les tissus hôte et la survie des œufs du parasitoïde *Asobara tabida* dans *Drosophila melanogaster*.....77
- Figure 29** : Comparaison des profils hémoctaires de larves de *Drosophila melanogaster* ayant des niveaux de résistance différents (R et S), à différents moments après leur parasitisme par deux lignées du parasitoïde *Leptopilina bouvardi* ayant des niveaux de virulence différents (IS_y et IS_m).....79
- Figure 30** : Comparaison des profils protéiques (PAGE Natif) des glandes impaires de lignées de diverses origines géographiques du parasitoïde *Leptopilina bouvardi*.....80
- Figure 31** : Corrélation entre le succès parasitaire de *Leptopilina bouvardi* (évalué par le taux d'émergence de parasitoïdes adultes) et le taux d'encapsulement de ses œufs, dans 7 espèces de drosophiles du sous-groupe *melanogaster*.....84
- Figure 32** : Corrélation entre taux d'encapsulement du braconidé *Asobara tabida* et nombre total d'hémocytes chez les larves parasitées et non parasitées de 6 espèces de drosophiles du sous-groupe *melanogaster*.....86
- Figure 33** : Absence de corrélation entre le taux d'encapsulement de *Leptopilina bouvardi* et le nombre total d'hémocytes chez les larves non parasitées de 5 espèces de drosophiles du sous-groupe *melanogaster*.....87

Modèle biologique

Figure 34 : Mâle <i>Drosophila yakuba</i> adulte.....	91
Figure 35 : Aire de répartition de <i>Drosophila yakuba</i>	91
Figure 36 : Cycle de vie de <i>Drosophila yakuba</i> et <i>Drosophila melanogaster</i>	91
Figure 37 : Femelle <i>Leptopilina bouvardi</i> sondant le milieu à l'aide de son ovipositeur afin de localiser une larve de drosophile.	92
Figure 38 : Cycle de développement de <i>Leptopilina bouvardi</i>	92
Figure 39 : Variations géographiques du niveau de virulence de <i>Leptopilina bouvardi</i> sur les hôtes <i>Drosophila melanogaster</i> (a) et <i>Drosophila yakuba</i> (b)	97
Figure 40 : Diagramme illustrant l'issue des interactions entre le parasitoïde <i>Leptopilina bouvardi</i> et les espèces hôtes <i>Drosophila melanogaster</i> et <i>D. yakuba</i> en fonction des lignées parasitoïde et hôte considérées.....	97

Chapitre 1 : Variation de comportement

Figure 41 : Comportement de sélection d'hôte et séquences comportementales du cycle d'attaque d'un endoparasitoïde.....	100
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Chapitre 2 : Variation de virulence

Figure 42 : Possible states of the parasitoid wasp <i>Leptopilina bouvardi</i> 48 hours post-infestation of a <i>Drosophila yakuba</i> larva.....	123
Figure 1 (Article 2) : Encapsulation degrees of paraffin oil drops injected in <i>D.yakuba</i> larvae unparasitized or parasitized by <i>L. bouvardi</i>	133
Figure 2 (Article 2) : Encapsulation degrees of paraffin oil drops co-injected in <i>D.yakuba</i> larvae together with a saline solution or <i>L. bouvardi</i> venom gland extracts.....	135
Figure 43 : Specific inhibition of phenoloxydase (PO) activity in <i>Drosophila yakuba</i> haemolymph (R_1 line) by <i>Leptopilina bouvardi</i> IS_y venom gland extracts.....	151
Figure 44 : Inhibition of melanisation in <i>Drosophila yakuba</i> haemolymph (R_1 line) by venom gland extracts of the IS_y line of <i>Leptopilina bouvardi</i>	151
Figure 45 : Native PAGE of venom gland protein extracts of <i>Leptopilina bouvardi</i> females from different areas.	157
Figure 46 : Western blot analysis of venom gland proteins from the IS_y line of <i>Leptopilina bouvardi</i> (avirulent on <i>Drosophila melanogaster</i>) and from the G301-1 and IS_m lines (virulent on <i>D. melanogaster</i>) using an antibody directed against the P4 recombinant protein.....	157
Figure 47 : Bands excised for internal sequencing.....	159
Figure 48 : Comparison of protein profiles between IS_m and IS_y <i>Leptopilina bouvardi</i> females.....	161
Figure 49 : Molecular weights of the major bands observed in the native profile of IS_y venom glands.....	163
Figure 50 : RT-PCR detection of putative serpins in the venom glands of females of the IS_m and IS_y lines of <i>Leptopilina bouvardi</i>	167

Figure 51 : Proteinic sequences deduced from nucleotide sequences of RT-PCR products.....167
Figure 52 : Proteinic sequence alignment of some arthropod serpins.169
Figure 53 : Inhibitory mechanism of serpins.170

Chapitre 3 : Variation de résistance

Box 1 (Article 3) : Genetic interactions matrix in the *Drosophila* -*L. bouleardi* reference system.....193
Figure 1 (Article 3) : Geographic distribution of *D. yakuba* resistance to IS_y parasitoids in tropical Africa195
Figure 54 : Comparison of ‘general encapsulation abilities’ of the R_1 and R_2 lines of *D. yakuba*, respectively susceptible and resistant to the IS_y line of *Leptopilina bouleardi*.....202
Figure 55 : Inhibition of Phenoloxydase (PO) activity in *Drosophila yakuba* (R_1 and R_2 lines) haemolymph by *Leptopilina bouleardi* IS_y long gland extracts.....205

Discussion

Figure 56 : Phylogenetic tree inferred from the nucleotide sequences of the ITS2 region of the representatives strains of the six species of *Leptopilina* belonging to the *heterotoma* and *bouleardi* groups.213
Figure 57 : Encapsulation rates of *Leptopilina bouleardi* eggs of the “ IS_m type” in different species of the *melanogaster* subgroup.....218
Figure 58 : Short review of physiological differences that may contribute to the variation of success of *Leptopilina bouleardi* in the host species *D. melanogaster* and *D. yakuba*. The different loci that are involved in this variation are also given.225
Figure 59 : Phylogenetic tree of different parasitoid superfamilies belonging to the Apocrita suborder.....230

Liste des Tableaux

Exposé Bibliographique

Tableau 1 : Comparaison des types hématocytaires impliqués dans les fonctions de cellules souches, réservoirs de proPO, phagocytose et encapsulement chez la drosophile et les lépidoptères.....	16
Tableau 2 : Serpines intervenant dans la régulation de l'activation de la proPO chez <i>Manduca sexta</i> et <i>D. melanogaster</i>	22
Tableau 3 : Récapitulatif des types cellulaires impliqués dans la fabrication de la capsule chez les lépidoptères et la drosophile.....	24
Tableau 4 : La coopération cellulaire est nécessaire à l'encapsulement chez <i>P. includens</i>	26
Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différentes stratégies de virulence employées par les parasitoïdes pour échapper à la réponse immunitaire de leurs hôtes décrites dans cet exposé.....	33
Tableau 6 : Résistance à différents parasitoïdes dans des souches de <i>Drosophila melanogaster</i> sélectionnées pour leur résistance vis à vis d'un autre parasitoïde.	67
Tableau 7 : Taux d'encapsulement des œufs du parasitoïde <i>Leptopilina boulardi</i> dans des souches sympatriques de <i>Drosophila melanogaster</i>	73
Tableau 8 : Taux d'infestation et taux d'encapsulement d'une souche congolaise de <i>L. boulardi</i> (souche G-346) dans 4 espèces permissives à son développement.....	75

Chapitre 2 : Variation de virulence

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des connaissances concernant la stratégie de virulence employée par la lignée IS _m vis à vis de <i>D. melanogaster</i>	119
Table 1 (Article 2) : Outcome of immune interactions between the two different lines of <i>Leptopilina boulardi</i> (IS _y and IS _m) and the reference resistant lines of <i>Drosophila melanogaster</i> and <i>Drosophila yakuba</i>	137
Table 2 (Article 2) : Percentage of hatched parasitoid eggs as a function of their age at the time of observation.....	137
Table 3 (Article 2) : Total haemocyte count (THC), differential count of plasmatocytes, lamellocytes and crystal cells, and percentage of bipolar cells in unparasitized <i>Drosophila yakuba</i> larvae and in larvae parasitized by IS _y and IS _m females of <i>Leptopilina boulardi</i> , 27 hours after parasitization.....	139
Tableau 10 : Molecular weights of 'SDS' proteinic bands corresponding to each analysed native band and molecular weights of the bands P _y A, P _y B, P _y C et P _y D définies from the SDS proteinic profile of venom gland extracts of IS _y females.....	165

Chapitre 3 : Variation de résistance

Table 1 (Article 3) : Collection sites of the <i>D. yakuba</i> reference lines used for genetic analyses and percentage of encapsulation of <i>L. boulardi</i> eggs from the IS _y and IS _m lines.....	185
Table 2 (Article 3) : <i>D. yakuba</i> strains collection sites, collection dates, status and percentage of encapsulation of <i>L. boulardi</i> eggs from the IS _y and IS _m lines.....	185
Table 3 (Article 3) : Percentage of encapsulation of <i>L. boulardi</i> IS _y eggs by <i>D. yakuba</i> larvae originating from different crosses involving the R ₁ and R ₂ lines.....	189
Table 4 (Article 3) : Contrast ANOVA for encapsulation of <i>L. boulardi</i> IS _y eggs by <i>D. yakuba</i> larvae originating from crosses involving the R1 and R2 lines (Generalized linear model with binomial error term.....	189
Table 5 (Article 3) : Chi-squared homogeneity tests of susceptible : resistant ratios of <i>D. yakuba</i> larvae submitted to parasitism by <i>L. boulardi</i> IS _y females. Expected ratios are calculated under a one-locus model with dominance of the resistant allele.....	191
Tableau 11 : Comparison of the THC, the plasmatocyte count, the lamellocyte count and the crystal cell count in <i>D. yakuba</i> larvae of the R ₁ and R ₂ lines, unparasitized or parasitized by <i>L. boulardi</i> females of the IS _y or IS _m line, using contrast ANOVA.	204
Tableau 12 : Total haemocyte count (THC), differential count of plasmatocytes, lamellocytes and crystal cells, in unparasitized <i>Drosophila yakuba</i> larvae and in larvae parasitized by IS _y or IS _m females of <i>Leptopilina boulardi</i> , 27 hours after parasitization.	204

Discussion

Tableau 13 : Comparison of virulence strategies used by different species to escape the <i>Drosophila</i> immune system.	231
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Annexes

- Annexe 1** : Taux d'encapsulation des oeufs de *Leptopilina boulardi* en fonction de la lignée de parasitoïde considérée, l'espèce hôte et la lignée hôte.
- Annexe 2** : Séquences des peptides obtenus après digestion trypsique des bandes protéiques majeures des glandes à venin de la lignée IS_y de *L. boulardi*
- Annexe 3** : Article : Labrosse C, Carton Y, Dubuffet A, Drezen JM, Poirié M. 2003. Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *Journal of Insect Physiology* 49: 513-522

Introduction générale

Chaque être vivant est confronté au cours de sa vie à de nombreux facteurs environnementaux qui façonnent ses traits d'histoire de vie, comme sa survie ou sa reproduction. Parmi l'ensemble de ces facteurs, les autres organismes vivants occupent à eux seuls une place importante. Ainsi, chaque être vivant vit constamment en interaction avec un ou plusieurs autres êtres vivants, via des relations diverses telles que prédation, compétition, mutualisme ou parasitisme. Ce dernier type d'interaction est largement répandu, puisque *“tout être vivant est concerné par le parasitisme, soit en tant qu'hôte, soit en tant que parasite”* (Price, 1980 ; Barbault, 1992).

Les insectes parasitoïdes, dont il sera question dans cette thèse, emploient un mode de vie particulier situé à mi-chemin entre prédation et parasitisme. Les parasitoïdes sont des insectes qui effectuent leur développement larvaire aux dépens d'un autre arthropode, généralement un insecte, qui va mourir à l'issue de l'interaction (Godfray, 1994). Loin d'être une exception, ce mode de vie est extrêmement répandu chez les insectes, puisque selon les estimations, il serait partagé par 8 à 25% de l'ensemble des insectes (Godfray, 1994 ; Quicke, 1997). Les parasitoïdes ont été décrits chez six grands ordres d'insectes: Diptères, Lépidoptères, Neuroptères, Coléoptères, Trichoptères et Hyménoptères, mais l'ordre des Hyménoptères représente à lui seul 80% des parasitoïdes (Quicke, 1997). Le terme parasitoïde, employé pour la première fois par Reuter (1913), a été aussi récemment employé pour définir des parasites non-insectes (ciliés, bactériophages...) dont le développement conduit à la mort de leurs hôtes (Gomez-Gutiérrez *et al.*, 2003 ; Forde *et al.*, 2004). Son emploi sera cependant restreint aux insectes dans ce manuscrit.

Les parasitoïdes ont adopté une grande variété de styles de vie (Godfray, 1994 ; Quicke, 1997 ; Pennacchio et Strand, 2006). Selon l'espèce de parasitoïde, différents stades de développement de l'hôte (œuf, stades larvaires, stade pupal ou stade adulte) peuvent être attaqués. Certains parasitoïdes vont pondre leurs œufs dans la cavité générale de l'hôte (**endoparasitoïdes**) tandis que d'autres vont déposer leurs œufs à la surface de l'hôte (**ectoparasitoïdes**). Ils sont qualifiés de **solitaires** lorsqu'un seul parasitoïde peut se développer par hôte, ou **grégaire** si plusieurs parasitoïdes se développent sur un seul hôte. Enfin, les parasitoïdes **koïnobiontes** permettent à leurs hôtes de poursuivre leur développement après parasitisme, tandis que les parasitoïdes **idiobiontes** paralysent de manière permanente ou tuent leurs hôtes au moment de l'oviposition, ou attaquent un stade qui ne se développera plus (Askew et Shaw, 1986).

Comme pour tout parasite obligatoire, le succès reproducteur (*fitness*) d'un parasitoïde dépend en grande partie de sa capacité à infester avec succès son hôte. Ce succès parasitaire est décomposé généralement en 4 étapes successives: localisation de l'habitat, localisation de l'hôte, acceptation de l'hôte, adéquation à la physiologie de l'hôte (Doutt, 1964 ; Vinson, 1975). Pour chacune de ces étapes, un ensemble d'adaptations morphologiques, comportementales et/ou physiologiques a pu être sélectionné au cours de l'évolution afin d'optimiser la *fitness* du parasitoïde. Le succès d'un parasitoïde conduit systématiquement à la mort de son hôte, qui est alors totalement consommé avant d'avoir laissé une descendance. La *fitness* de l'hôte va donc aussi dépendre de sa capacité à échapper au parasitisme. Ainsi, à chacune des étapes clef du parasitisme, un panel d'adaptations permettant à l'hôte d'échapper au parasitisme peut être sélectionné. L'issue de l'interaction entre un parasitoïde et un hôte donné va donc dépendre d'un ensemble d'adaptations et de contre adaptations sélectionnées chez chacun des 2 partenaires. Les adaptations permettant au parasitoïde d'aboutir au succès parasitaire sont appelées **stratégies de virulence**¹, tandis que les adaptations permettant à un insecte hôte d'y échapper sont appelées **mécanismes de résistance** (Henter, 1995 ; Kraaijeveld et Godfray, 1999 ; Dupas *et al.*, 2002). Au cours de cette étude, les termes résistance et virulence seront toutefois restreints aux adaptations concernant le succès ou la mise en échec de la réponse immunitaire de l'hôte, dernière ligne de défense qu'un hôte peut employer pour échapper au parasitisme.

Si de nombreuses études ont décrit tant les mécanismes de résistance des hôtes que les stratégies de virulence employées par les parasitoïdes, les variations génétiques de ces caractères au niveau intra-spécifique sont en comparaison rarement décrites et encore moins explorées d'un point de vue physiologique et moléculaire. L'existence de ces variations dans les populations naturelles est pourtant un facteur central permettant la mise en place de processus coevolutifs et leur étude peut apporter des informations essentielles à la compréhension des mécanismes régissant l'évolution des interactions hôte-parasitoïde. De plus, s'il est bien connu que certaines espèces hôtes sont "permissives" au développement d'une espèce de parasitoïde donné, alors que d'autres ne le sont pas, les facteurs physiologiques sous-jacents à la spécificité parasitaire sont en revanche largement méconnus chez les parasitoïdes.

Ces différences de permissivité entre les différentes espèces hôtes peuvent sélectionner chez les parasitoïdes des comportements visant à déposer leur progéniture dans l'espèce hôte la plus permissive (espèce hôte "optimale") (van Alphen et Vet, 1986 ; Charnov et Stephens, 1988 ; Vet *et*

¹ Dans les interactions hôte-parasitoïde, la virulence désigne la capacité du parasitoïde à réussir le parasitisme. Cette notion de virulence diffère donc de celle employée dans les interactions hôte-pathogène, où elle désigne l'impact du pathogène sur la *fitness* de son hôte (Hansen et Koella, 2003).

al., 2002). Cependant, si des comportements “optimaux” de sélection d'hôte sont souvent décrits chez diverses espèces de parasitoïdes, les variations intra-spécifiques de ces comportements ne sont pour ainsi dire jamais explorées. Pourtant, si “l'espèce hôte la plus permissive” dépend de la population de parasitoïde considérée, alors la préférence d'espèce hôte pourrait varier d'une population à l'autre. Ces variations de comportement de choix, couplées à des variations de virulence, pourraient provoquer l'émergence de populations de parasitoïde spécialisées sur différentes espèces hôtes, et à long terme favoriser la différenciation de ces populations en “races-hôte”, chacune adaptée à une espèce hôte spécifique (Tauber et Tauber, 1989).

De manière générale, ma thèse avait pour objectifs de :

1. Analyser l'impact des variations de virulence d'un parasitoïde sur son comportement de choix d'espèce hôte.
2. Déterminer les bases physiologiques de la variation de virulence d'une espèce de parasitoïde sur une espèce hôte donnée et caractériser les facteurs à l'origine de ces variations.
3. Déterminer les bases physiologiques et moléculaires à l'origine des variations de succès d'un parasitoïde d'une espèce hôte à l'autre (spécificité parasitaire).
4. Comprendre les bases physiologiques et génétiques de la variation de résistance d'une espèce hôte à un parasitoïde donné.

J'ai choisi pour cela d'étudier le parasitoïde *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera : Figitidae) pour lequel des variations de virulence vis à vis de 2 espèces hôtes, *Drosophila melanogaster* (Diptera : Drosophilidae) et *Drosophila yakuba* (Drosophilidae) ont été décrites (Dupas et Boscaro, 1999). Lorsque j'ai commencé ma thèse, de nombreuses données concernant les interactions entre ce parasitoïde et l'hôte *D. melanogaster* étaient disponibles. Au cours de ce travail, je me suis attachée à décrire les interactions génétiques, comportementales et physiologiques entre ce parasitoïde et l'autre espèce hôte, *D. yakuba*, tout en les comparant avec les données connues sur le modèle *L. boulardi* - *D. melanogaster*. L'intégration de l'ensemble de ces données fournit des éléments de discussion sur les bases sous-jacentes à la spécificité parasitaire et sur l'immunocompétence des hôtes.

Ce manuscrit débutera par un exposé bibliographique présentant les variations de résistance et de virulence dans les interactions hôte-parasitoïde. Dans la première partie de cet exposé, la réponse immunitaire des insectes aux macro-organismes tels que les parasitoïdes sera présentée, dans le but de comprendre quelles sont les composantes de l'immunité que les parasitoïdes peuvent cibler afin d'échapper à l'encapsulation. Dans la deuxième partie, un éventail des stratégies de virulence employées par diverses espèces de parasitoïdes visant à contrecarrer cette réponse

immunitaire sera exposé. Enfin, dans la troisième partie, une revue des causes proximales (physiologiques, agissant au niveau individuel) et ultimes (évolutives, agissant à l'échelle de la population) expliquant les variations de succès et d'échec des 2 partenaires de l'interaction sera présentée. L'ensemble de cette revue conduira finalement à la formulation des questions fondamentales auxquelles j'ai voulu répondre au cours de ma thèse.

Les différentes parties de cette synthèse contiendront des informations générales, issues de l'étude de différents modèles biologiques et des données concernant plus particulièrement le parasitoïde étudié, *Leptopilina boulardi*. Ces données, sur lesquelles le lecteur pourra juger utile de revenir, seront indiquées par le signe employé ici en bordure de texte.

↪ De même, lorsque les questions abordées au cours de ma thèse seront évoquées dans cette introduction bibliographique, elles seront indiquées par la flèche employée en début de ce paragraphe.

Après l'introduction bibliographique, la biologie du modèle *L. boulardi* - *D. yakuba*, ainsi que les lignées hôte et parasitoïde employées durant cette thèse seront décrites. La matrice d'interactions hôte-parasitoïde employée sera présentée et les termes "résistance" et "virulence" reformulés dans le contexte des interactions de ce système. **La matrice d'interactions est aussi fournie sous forme de fiche cartonnée afin faciliter la compréhension de ce manuscrit.**

Les travaux réalisés au cours de cette thèse seront ensuite décrits dans 3 différents chapitres:

CHAPITRE 1: Variation de comportement de sélection d'hôte au sein de l'espèce *Leptopilina boulardi*

CHAPITRE 2: Variation de stratégie de virulence au sein de l'espèce *Leptopilina boulardi* et spécificité parasitaire

CHAPITRE 3: Variation de résistance au parasitoïde *Leptopilina boulardi* chez l'hôte *Drosophila yakuba*: bases génétiques et physiologiques

Une brève synthèse des données disponibles au début de ma thèse sur le modèle biologique *L. boulardi* - *D. yakuba* et sur le modèle de comparaison *L. boulardi* - *D. melanogaster* sera effectuée pour chaque aspect, au début du chapitre correspondant. Les questions propres au modèle biologique seront alors explicitement posées. Les données obtenues seront synthétisées en fin de chapitre.

Enfin, la matrice d'interactions présentée sera réinterprétée à la lumière des données obtenues au cours de cette thèse, dans une discussion générale qui permettra de reformuler la question fondamentale des mécanismes de la spécificité parasitaire.

Exposé bibliographique: Variations de résistance et de virulence dans les relations hôte-parasitoïde

La fitness d'un parasitoïde dépend en grande partie de sa capacité à infester un hôte dans lequel sa progéniture pourra se développer. Le succès de cette infestation dépend de plusieurs étapes clefs, définies par Doutt en 1964. Il va s'agir dans un premier temps de localiser l'habitat de l'hôte, puis l'hôte lui-même dans cet habitat. Une descendance sera alors déposée sur ou dans l'hôte et cette descendance devra réussir son développement aux dépens de l'hôte. A chacune de ces étapes, chaque partenaire de l'interaction va mettre en pratique un panel d'adaptations visant à réussir le parasitisme pour l'un et le faire échouer pour l'autre (Gross, 1993 ; Strand et Pech, 1995b).

Plusieurs types de stimuli peuvent être utilisés par les parasitoïdes pour localiser leurs hôtes (Vet et Dicke, 1992 ; Vinson, 1998). Ces stimuli peuvent être de nature physique (visuels ou vibratoires) et/ou chimique. Ces derniers peuvent concerner des signaux émis par les insectes eux mêmes, comme leurs déjections, leurs traces kairomonales ou leurs phéromones sexuelles. Il a par exemple été démontré récemment que les phéromones anti-aphrodisiaques émises par les mâles de *Pieris brassicae*, pour éloigner les autres mâles des femelles, sont employées par le parasitoïde *Trichogramma brassicae* pour localiser les œufs fraîchement pondus par la pieride (Fatouros *et al.*, 2005). Les signaux émis par les plantes attaquées par les insectes hôtes sont des composés chimiques également employés par les parasitoïdes pour détecter leurs hôtes (Turlings *et al.*, 1990). Enfin, les odeurs de fruits en fermentation ou de champignons en décomposition, par exemple, sont utilisées par les parasitoïdes du genre *Asobara* et *Leptopilina* afin de localiser leurs hôtes drosophiles qui vivent dans ce type de microhabitat (van Alphen et Vet, 1986).

Les hôtes sont donc probablement sélectionnés pour limiter les signaux perçus par les parasitoïdes afin de réduire la probabilité d'être découverts. C'est le cas du lépidoptère *Heliothis subflexa* qui se développe sur des plantes qui n'émettent pas d'acide linoléique, un composant clef de la chaîne de synthèse de la volicitine, substance habituellement émise par les plantes pour attirer les parasitoïdes (De Moraes et Mescher, 2004). Les comportements de l'hôte peuvent aussi varier en fonction de la situation, tel qu'il a été observé dans la relation entre la mineuse de pommier *Phyllonorycter blancardella* et le parasitoïde *Sympiesis sericeicornis* (Djemai *et al.*, 2000 ; Djemai *et al.*, 2001). Dans cette interaction, le parasitoïde détecte la mineuse grâce aux vibrations émises par les mouvements de celle-ci dans la feuille de pommier. En retour, la larve mineuse est capable de détecter les vibrations émises par le parasitoïde. La

larve peut alors adopter divers types de comportements, allant de l'immobilité totale pour éviter d'être repérée, à des mouvements très vifs lui permettant d'esquiver l'ovipositeur du parasitoïde si celui-ci l'a localisée.

Divers types de comportements peuvent éviter à un insecte d'être parasité une fois découvert. Parmi ceux-ci, on trouve des comportements agressifs envers le parasitoïde (revue dans Gross, 1993 ; Strand et Pech, 1995b), des comportements de fuite ou des comportements grégaires. Chez les guêpes *Liostenogaster vechti* et *L. flavolineata*, la nidification en groupe peut offrir un certain degré de protection contre les parasitoïdes par effet de dilution du risque de parasitisme (Coster-Longman *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'emploi d'une cuticule épaisse ou de structures protectrices peut protéger un hôte de la piqûre du parasitoïde. Le coléoptère *Trogoderma variable*, par exemple, possède un ensemble de poils acérés sur son abdomen et la face dorsale du thorax qui peuvent se détacher et provoquer l'enchevêtrement des prédateurs. Ce type de défense est cependant inefficace avec les guêpes du genre *Laelius* puisque ces parasitoïdes piquent la face ventrale du coléoptère afin de le paralyser, ce qui leur permet ensuite de déposer leurs œufs en toute sécurité (Nutting et Spangler, 1969).

Enfin, de nombreux facteurs vont influencer le succès de développement des œufs de parasitoïdes qui ont pu être déposés (Vinson et Iwantsch, 1980). Parmi ceux-ci, l'insuffisance nutritionnelle de l'hôte ou la présence de toxines nuisibles au parasitoïde peuvent conduire à la mort du parasitoïde en développement. En effet, la séquestration de composés chimiques d'origine végétale est parfois employée par les insectes phytophages pour neutraliser la progéniture du parasitoïde (revue dans Gross, 1993). En dernier lieu, les œufs des parasitoïdes sont confrontés à la **réponse immunitaire de l'hôte** (Carton et Nappi, 1997 ; Schmidt *et al.*, 2001). Cette réponse immunitaire concerne surtout les endoparasitoïdes koïnobiontes, puisque ceux-ci sont en contact durable avec leurs hôtes vivants. Contre les macro-organismes tels que les insectes endoparasitoïdes, cette réponse immunitaire, appelée "**résistance**" dans ce manuscrit, se manifeste par la formation d'une capsule multicellulaire mélanisée autour du corps étranger. Pour échapper à cet encapsulement, diverses "**stratégies de virulence**" ont été sélectionnées chez les parasitoïdes (Vinson, 1990 ; Strand et Pech, 1995b ; Schmidt *et al.*, 2001 ; Pennacchio et Strand, 2006).

I RESISTANCE DE L'HÔTE: L'ENCAPSULEMENT

La réponse immunitaire des insectes est principalement décrite chez la drosophile et quelques lépidoptères modèles, tels que *Pseudaletia includens*, *Bombyx mori* et *Manduca sexta*. En effet, les données disponibles sur son génome (<http://flybase.bio.indiana.edu/>), l'existence de nombreux mutants, ainsi que sa facilité d'élevage, font de la drosophile un organisme modèle pour l'étude de différentes fonctions biologiques, dont l'immunité innée. Les chenilles de lépidoptères sont de leur côté des organismes intéressants pour l'étude de l'immunité au niveau physiologique et en terme de transcriptomique et protéomique. Leur taille importante chez de nombreuses espèces facilite l'injection de corps étrangers synthétiques (poils de pinceau, fils de nylon, billes de latex, de Sephadex...) et le suivi de la réaction immunitaire en réponse à ces objets, ainsi que l'extraction "en masse" d'ARN et des protéines impliquées dans l'immunité.

Plusieurs types de réponses immunitaires se distinguent chez les insectes, selon le type de corps étranger à neutraliser.

Contre les **micro-organismes** tels que les bactéries ou certains champignons, 3 types de réponses immunitaires sont employés: la phagocytose, la nodulation et la synthèse de peptides antimicrobiens (Hoffmann, 1995 ; Lavigne et Strand, 2002 ; Hoffmann, 2003) (Figure 1). Au cours de la réaction de **phagocytose**, des hémocytes vont englober puis digérer les microorganismes, tandis que la **nodulation** consiste à piéger un grand nombre de microorganismes dans un agrégat multicellulaire, selon un processus assez similaire à celui de l'encapsulement (voir plus loin). Les **peptides antimicrobiens** possèdent des activités antibactériennes, dirigées spécifiquement contre les bactéries Gram positif ou Gram négatif ou des activités antifongiques. La production de ces peptides s'effectue dans le corps gras et les hémocytes des insectes, sous le contrôle des voies de signalisations Toll et/ou Imd. La voie Toll est connue pour réguler la réponse des hôtes aux bactéries Gram positif et aux champignons, tandis que la réponse des insectes aux bactéries Gram négatif est principalement régulée par la voie Imd (Hoffmann, 2003) (Figure 2).

Contre les **macro-organismes** tels que les endoparasitoïdes, la réponse immunitaire employée est la **réaction d'encapsulement** (Figures 3 et 4), qui fait appel à des composants cellulaires et humoraux. Par abus de langage, on parle parfois de "réponse cellulaire" et de "réponse humorale", mais cette dichotomie sera évitée dans cet exposé, pour au contraire souligner la coopération entre les différents composants de l'immunité.

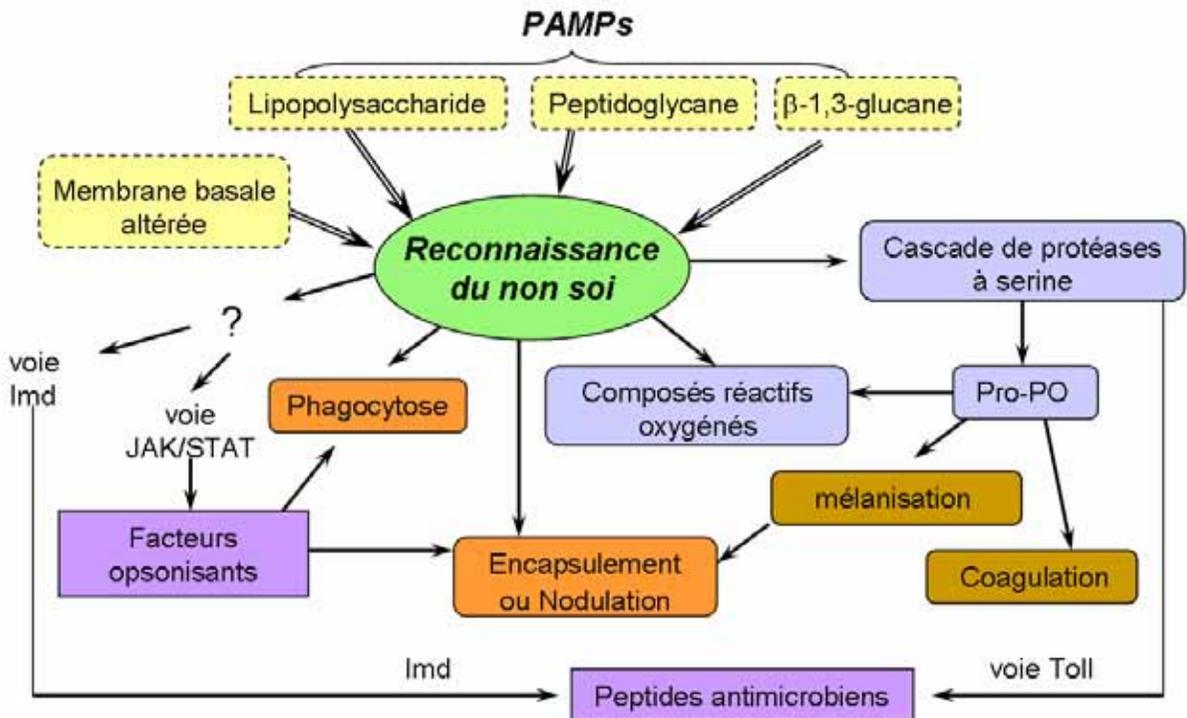


Figure 1 : Représentation schématique du système immunitaire des insectes.

Modifié de Tzou et al., 2002

La réaction d'encapsulation consiste en la fabrication d'une gangue multicellulaire et mélanisée autour du corps étranger. Son élaboration peut se décomposer en 4 étapes essentielles:

- (1) Reconnaissance du corps étranger
- (2) Déclenchement de la réponse immunitaire
 - prolifération cellulaire
 - activation de la cascade pro-phénoloxydase
- (3) Formation de la capsule mélanisée
- (4) Mort du macro-organisme étranger

I.1 Reconnaissance du corps étranger

Chez les insectes, le système qui permet la reconnaissance des micro-organismes tels que bactéries et champignons est assez bien connu, contrairement à celui qui permet la reconnaissance de macro-organismes tels que les parasitoïdes.

Le système de reconnaissance des **micro-organismes** se base sur la reconnaissance de motifs moléculaires structuraux conservés (communs à de nombreuses espèces de micro-organismes pathogènes) appelés **PAMPs** (pour *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) par des récepteurs, appelés **PRRs** (pour *Pathogen-Recognition Receptors*) (Janeway, 1989) (Figure 1) Les structures reconnues le plus généralement sont les lipopolysaccharides (LPS) présents à la surface des bactéries Gram négatif, les peptidoglycane (PGN) et l'acide lipotéichoïque présents à la surface de bactéries Gram positif, et les β -1,3-glucanes présents à la surface des champignons et des levures. De nombreux facteurs, comme les lectines (telles que les immulectines), l'hémoline, les LPS-binding protein, les PGRP (pour *Peptidoglycan Recognition Proteins*), les β GRP (pour *β -1,3-glucanes Recognition Proteins*), et les TEP (pour *Thioester-containing Protein*) ont été décrits comme PRRs potentiels (Gillespie *et al.*, 1997 ; Kanost *et al.*, 2004 ; Nappi *et al.*, 2004a).

Certains de ces PRRs, telles que les immulectines IML-1, IML-2 et IML-3 de *Manduca sexta*, sont connus pour favoriser l'encapsulation de billes de latex qui en sont recouvertes artificiellement (Yu et Kanost, 2004 ; Yu *et al.*, 2005 ; Ling et Yu, 2006). Cependant, aucune étude n'a à ce jour démontré expérimentalement que les PRRs sont directement impliqués dans la reconnaissance des macro-organismes (Schmidt *et al.*, 2001).

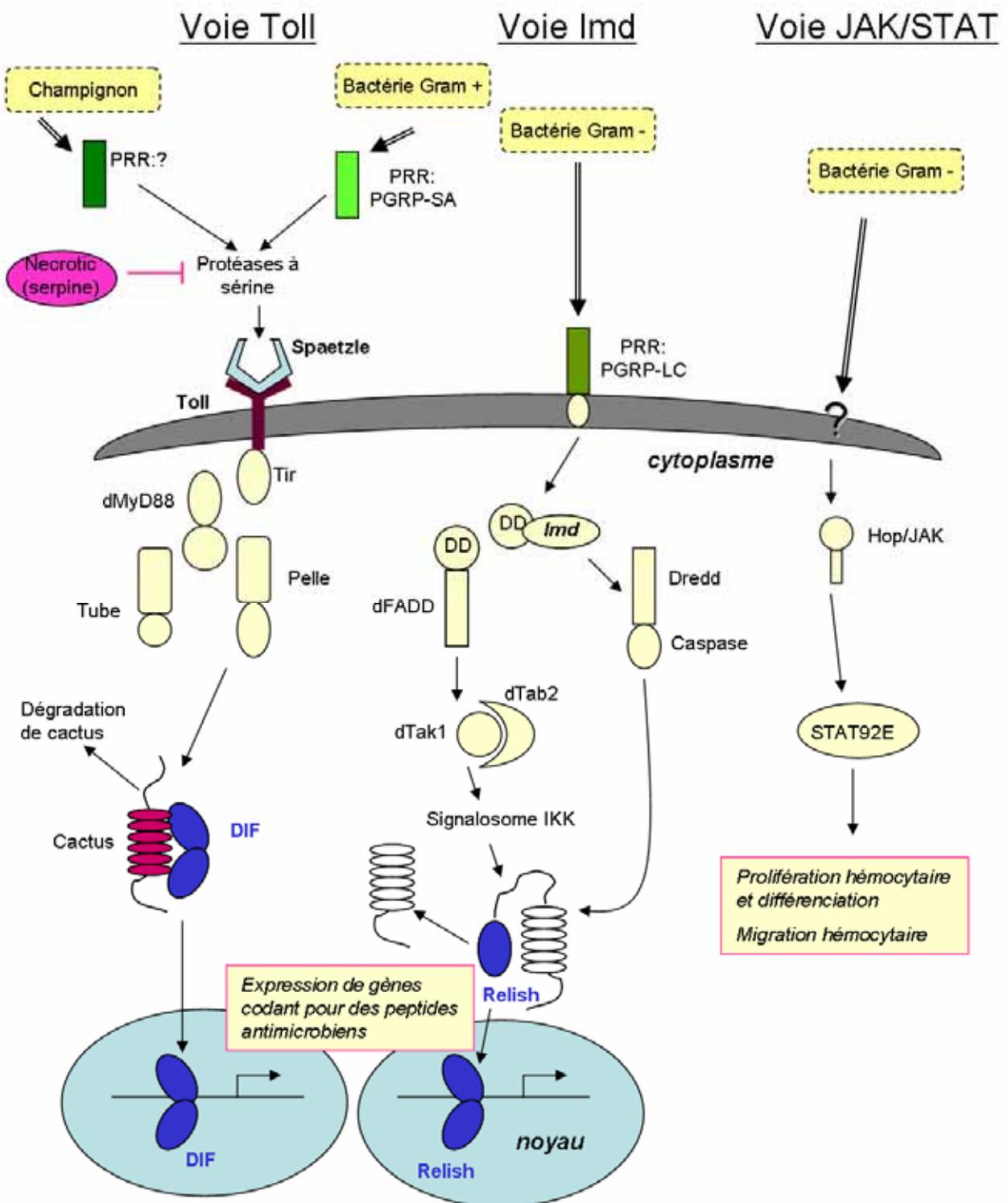


Figure 2 : Voies de signalisation Toll, Imd et JAK/STAT.

a) Voie Toll: Suite à la reconnaissance du corps étranger, la cascade de protéases à sérine est activée. La dernière protéase de cette cascade clive le précurseur de la protéine Spaetzle. Ce ligand se fixe alors sur le récepteur transmembranaire Toll qui active une voie de transduction intracellulaire aboutissant à la phosphorylation et à la dégradation de l'inhibiteur Cactus et à la translocation nucléaire du facteur de transcription DIF qui active plusieurs gènes cibles.

b) Voie Imd : le corps étranger est directement reconnu par un récepteur transmembranaire. Le facteur de transcription est RELISH.

c) Voie JAK/STAT : le mécanisme de reconnaissance induisant cette cascade reste inconnu.

D'après Nappi & al 2004 et Irving & al in press

1.1.1 Le “non-soi”

Les insectes parasitoïdes étant par définition phylogénétiquement proches de leurs hôtes, leurs composants de surface sont donc voisins des insectes qu'ils infestent, ce qui rend impossible l'emploi d'équivalents aux PAMPs pour les reconnaître comme non-soi.

Les expériences de transplantations de tissus allogéniques ou xénogéniques ont relevé l'importance de la **distance phylogénétique** sur la réaction d'encapsulation. Ainsi, les tissus transplantés sont d'autant plus encapsulés qu'ils proviennent d'espèces phylogénétiquement éloignées (Lackie, 1988). De plus, les insectes n'encapsulent généralement pas les tissus transplantés d'un individu de la même espèce (Carton, 1976). Cependant, ces tissus sont encapsulés si leur surface est mécaniquement endommagée ou altérée enzymatiquement (Rizki et Rizki, 1980). Enfin, chez la drosophile, les mutations qui causent l'altération de la membrane basale (membrane recouvrant la cavité générale ainsi que tous les tissus des insectes) conduisent à la formation de “capsule” autour de tissus du soi, qui sont alors considérés comme “tumoraux” (Rizki et Rizki, 1986).

L'**intégrité de la membrane basale** semble être l'un des facteurs les plus importants dans la reconnaissance du non-soi (Rizki et Rizki, 1986 ; Lackie, 1988 ; Pech *et al.*, 1995). Salt (1970) avait d'ailleurs suggéré que tout ce qui est “*quelque chose d'autre qu'une membrane basale (de l'espèce) intacte est reconnu comme non-soi*”. Les hémocytes sont donc sensibles à tout changement de cette matrice, essentiellement constituée de laminine, de collagène IV, et de protéoglycanes non caractérisés (Fessler *et al.*, 1994). Une étude de Pech *et al.* (1995), par exemple, montre que les hémocytes n'adhèrent pas à une matrice artificielle dont les constituants sont ceux majoritairement présents dans la membrane basale. En résumé, la reconnaissance du non-soi chez les insectes apparaît plutôt comme la reconnaissance de “**l'absence de molécules du soi**”. Selon Schmidt *et al.* (2001), l'absence d'adhésion des hémocytes à une membrane basale intacte pourrait être due à la présence de molécules qui inhibent l'adhésion hémocytaire, tels que des glycoconjugants de glycoprotéines et de glycolipides. Le soi altéré pourrait être ainsi reconnu par des lectines solubles agissant comme des opsonines, ou par des lectines-récepteurs de surface localisés sur les hémocytes.

L'injection de différents types de billes de chromatographie dans la cavité générale de différentes espèces d'insectes a permis de mieux définir les caractéristiques de surface reconnues comme non-soi. (Lackie, 1983, 1986 ; Lavine et Strand, 2001a). Lavine et Strand (2001a) ont testé la réaction d'encapsulation de la chenille *Pseudoplusia includens* vis à vis de 19 types différents de billes. Leurs résultats ont montré que les billes portant certains **groupements fonctionnels**, tels que des groupements sulfoniques, diéthylaminoéthyles et amines quaternaires, sont plus encapsulées que celles porteuses d'autres groupes fonctionnels. La **charge électrique globale** influence également l'encapsulation d'un corps étranger puisque les billes porteuses de charges positives ou neutres sont plus encapsulées que les billes chargées négativement, aussi bien chez *Pseudoplusia includens*

(Lavine et Strand, 2001a) que chez le criquet *Schistocerca gregaria* ou la blatte *Periplaneta americana* (Lackie, 1983, 1986).

Enfin, l'étude de Lavine et Strand (2001a) montre que certaines billes sont reconnues directement par les hémocytes, tandis que d'autres ne sont reconnues par les hémocytes que si elles sont opsonisées par des molécules humorales non caractérisées, originaires du plasma de l'hôte. Ce dernier résultat indique l'importance de la coopération entre facteurs cellulaires et humoraux lors de l'encapsulation.

1.1.2 Acteurs de la reconnaissance du "non-soi"

Les médiateurs de la reconnaissance des macro-organismes sont encore assez mal connus chez les insectes, mais il est généralement admis que ce sont les hémocytes circulants qui reconnaissent le corps étranger.

Chez de nombreuses espèces de **lépidoptères**, telles que *Galleria mellonella* (Schmit et Ratcliffe, 1977), *Pseudoplusia includens* (Pech et Strand, 1996) et *Heliothis virescens* (Ratner et Vinson, 1983), les **granulocytes**, premières cellules en contact avec le corps étranger, sont généralement considérés comme acteurs de la reconnaissance du non-soi. Cependant, l'étude de Lavine et Strand (2001a) chez *P. includens* a démontré que la présence de granulocytes n'est pas toujours nécessaire à l'encapsulation de billes synthétiques de certains types. Des billes de Sephadex recouvertes de groupement carboxyméthyl, par exemple, peuvent être encapsulées en l'absence de granulocytes si celles-ci ont été incubées au préalable dans le plasma de l'insecte. Il semble donc que la reconnaissance des corps étrangers chez *P. includens* puisse impliquer des récepteurs situés sur les granulocytes et/ou (selon les cas) des récepteurs humoraux inconnus.

Chez la **drosophile**, les **plasmatoctes**, qui s'attachent au chorion des œufs de parasitoïde quelques heures après l'infestation, sont généralement considérés comme la première ligne de surveillance dans l'hémolymphe (Russo *et al.*, 1996 ; Williams *et al.*, 2005) mais aucune étude détaillée des acteurs de la reconnaissance du non-soi n'a été menée à ma connaissance.

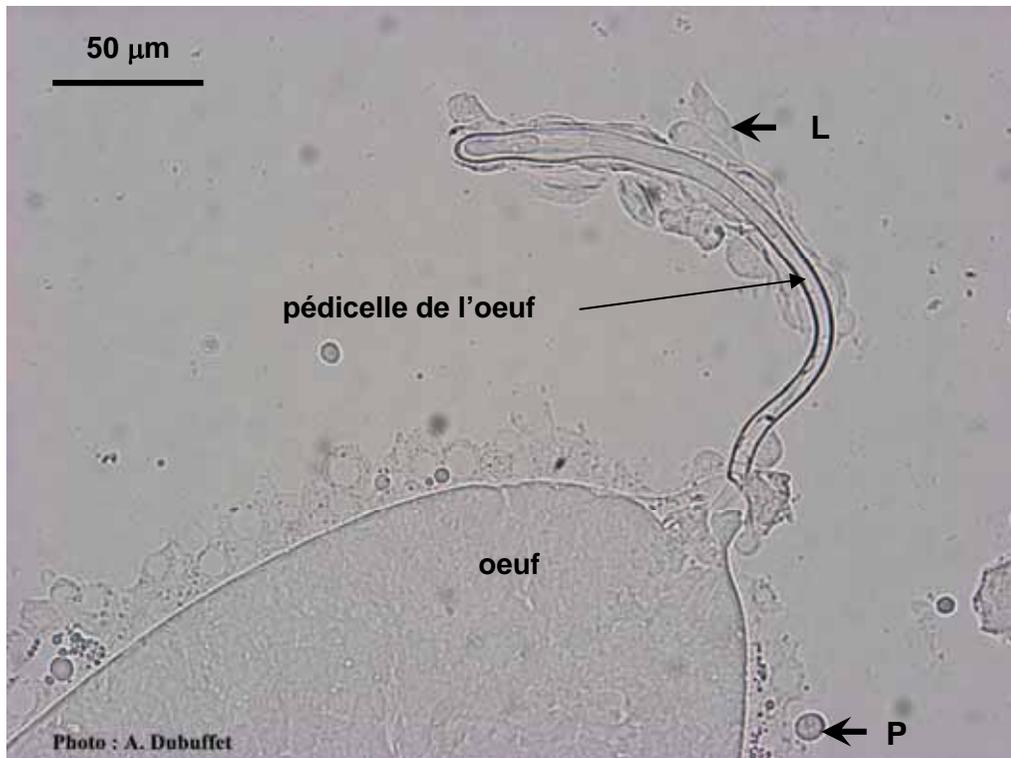


Figure 3 : Œuf du parasitoïde *Leptopilina boulardi* en cours d'encapsulement par le système immunitaire de l'hôte *Drosophila yakuba*, 24 heures après parasitisme.

L'agrégation de différents types cellulaires (Plasmatocytes: P et Lamellocytes: L) est initiée mais la mélanisation de l'œuf n'a pas encore eu lieu.



Figure 4 : Larve de drosophile ayant encapsulé 2 œufs du parasitoïde *Leptopilina boulardi*.

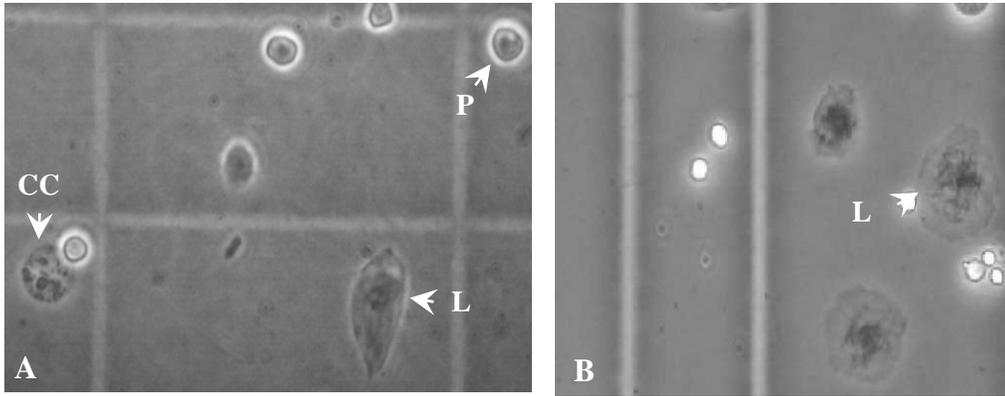


Figure 5 : Images en microscopie optique à contraste de phase des trois types d'hémocytes différenciés observés chez *Drosophila melanogaster*.
Plasmatocytes (P), Cellules à cristaux (CC) et Lamellocytes (L).

Photo: C. Labrosse

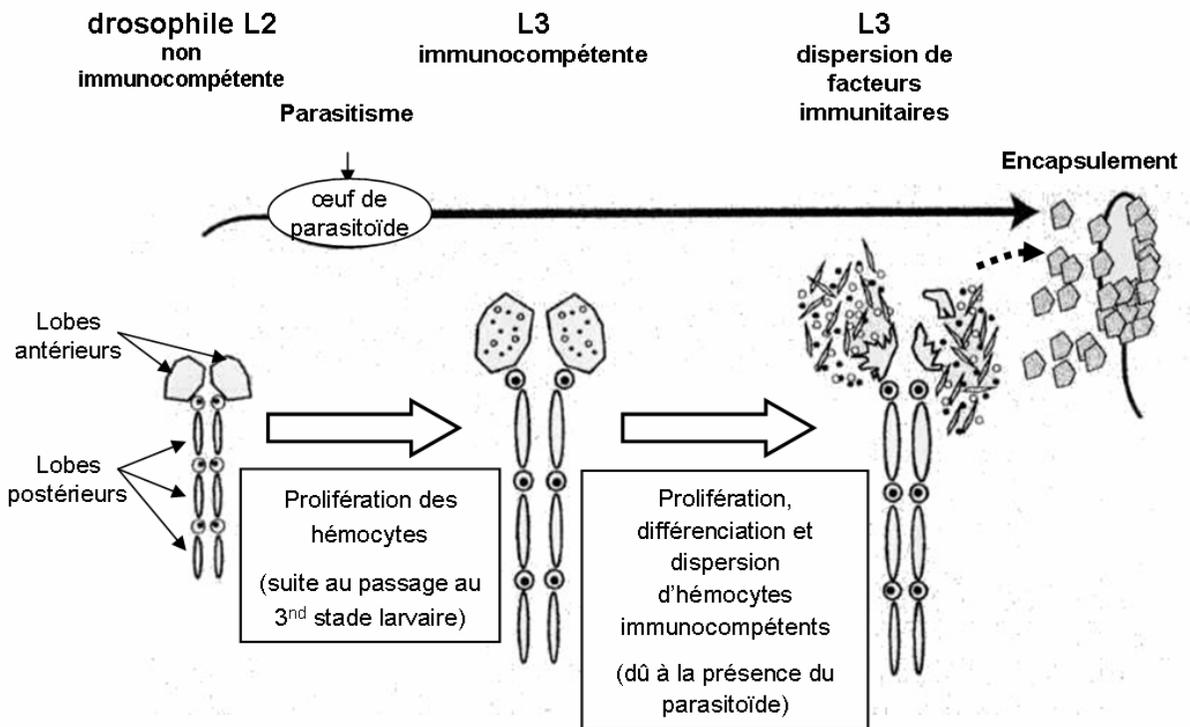


Figure 6 : Prolifération et différenciation cellulaire dans l'organe hématopoïétique de la drosophile.

Après le passage du 2^e au 3^e stade larvaire, une forte prolifération cellulaire a lieu dans l'organe hématopoïétique des larves de drosophile, qu'elles soient saines ou parasitées. La glande hématopoïétique de troisième stade contient alors un nombre suffisant d'hémocytes immunocompétents qui vont pouvoir être libérés.

Lors de la réponse au parasitisme, une prolifération importante des hémocytes, ainsi que leur différenciation est observée dans la glande hématopoïétique. La glande hématopoïétique se disperse alors, relâchant ainsi les hémocytes différenciés dans l'hémolymphe.

Modifié de Sorrentino et al., 2002.

I.2 Déclenchement de la réponse immunitaire

Une fois le corps étranger reconnu, de nombreux gènes sont surrégulés ou sous régulés durant les premières heures après infestation, puis durant la formation de la capsule (Wertheim *et al.*, 2005). Une grande partie de ces gènes code pour des protéines impliquées dans les voies de signalisation Toll et JAK/STAT (impliquées notamment dans la prolifération cellulaire, nécessaire à l'élaboration de la capsule cellulaire) ou pour des sérines protéases et des inhibiteurs de protéases, impliqués dans la cascade d'activation de la prophénoloxydase. L'activation de cette cascade joue un rôle central dans le processus de mélanisation, de synthèse de composés toxiques, ainsi que dans le processus d'encapsulation lui-même.

I.2.1 Prolifération cellulaire

- Types hémocytaires

L'hémolymphe des insectes contient différents types de cellules hémocytaires (ou hémocytes) qui se distinguent par leur morphologie et leur fonction (Brehélin *et al.*, 1978 ; Brehélin et Zachary, 1986 ; Gardiner et Strand, 2000 ; Lavine et Strand, 2002).

Chez la drosophile, la population hémocyttaire comprend 4 types cellulaires majeurs: les prohémyocytes, les plasmatoctes, les cellules à cristaux et les lamellocytes (Brehélin, 1982 ; Meister et Lagueux, 2003) (Figure 5). Les **plasmatoctes** sont des cellules sphériques d'environ 10µm de diamètre, caractérisées par un gros noyau. Elles sont impliquées dans la phagocytose, l'encapsulation, ainsi que dans la production de peptides antimicrobiens. Ces cellules représentent 90% de la population hémocyttaire. Les **cellules à cristaux** sont légèrement plus grandes que les plasmatoctes et représentent environ 5% des hémocytes. Ces cellules contiennent des précurseurs de la cascade prophénoloxydase dont il sera fait mention plus loin (partie I.2.2). Les **lamellocytes** sont de larges cellules aplaties et discoïdales de 25 à 40µm de diamètre, fortement impliquées dans l'encapsulation des macro-organismes (partie I.3). Chez les larves de drosophiles saines, les lamellocytes ne représentent que 5% du nombre total d'hémocytes alors qu'ils représentent jusqu'à 50% des hémocytes suite à l'infection par un parasitoïde (Russo *et al.*, 2001). Une étude récente indique que ce type hémocyttaire produit également un précurseur de la cascade phénoloxydase (Irving *et al.*, 2005).

Il est à noter que les types hémocytaires présents chez les lépidoptères ne correspondent pas à ceux observés chez les diptères (Lavine et Strand, 2002) (Tableau 1). Chez les chenilles de lépidoptères, cinq principaux types d'hémocytes ont été décrits: les prohémyocytes, les granulocytes (ou cellules granulaires), les plasmatoctes (qui ne correspondent pas aux plasmatoctes de la drosophile), les œnocytoïdes et les sphérulocytes (Lavine et Strand, 2002). Chez *Pseudoplusia includens*, organisme lépidoptère modèle chez lequel la plupart des études sur l'encapsulation ont été réalisées, les **granulocytes** et les **plasmatoctes**

constituent respectivement 65% et 30% des hémocytes (Pech *et al.*, 1994). Ces deux types cellulaires participent à l'élaboration de la capsule, mais ce sont principalement les plasmatoctes qui constituent la gangue cellulaire chez les lépidoptères (partie I.3).

Le nombre total et la proportion de chaque type d'hémocyte peuvent varier en fonction du stade de développement et de l'état physiologique (présence ou absence d'invasion parasitaire) des individus. Ainsi, chez *Spodoptera frugiperda* et *P. includens*, les plasmatoctes sont les cellules les plus nombreuses durant les premiers stades de développement de la chenille, alors que les granulocytes sont majoritaires lors du dernier stade (Gardiner et Strand, 2000). Chez *D. melanogaster*, le nombre total moyen d'hémocytes par individu est inférieur à 200 au premier stade larvaire, pour atteindre plus de 5000 au stade prépupal (Lanot *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Comparaison des types hémocytaires impliqués dans les fonctions de cellules souches, réservoirs de précurseurs de proPO, phagocytose et encapsulement chez la drosophile et les lépidoptères. D'après Lavine & Strand (2002).

	Drosophile	Lépidoptères
Cellules souches	Prohémocytes	Prohémocytes
Cellules contenant les précurseurs de la cascade prophénoloxydase	Cellules à cristaux	Oenocytoides
Cellules phagocytaires	Plasmatoctes	Plasmatoctes Granulocytes
Cellules constituant la capsule	Lamellocytes Plasmatoctes	Plasmatoctes Granulocytes

Les hémocytes sont issus de la différenciation de cellules souches (prohémocytes) et/ou de divisions cellulaires comme cela a été décrit chez *Spodoptera frugiperda*, *Pseudoplusia includens* (Gardiner et Strand, 2000) et *D. melanogaster* (Lanot *et al.*, 2001). Chez ces espèces, **l'organe hématopoïétique** (encore appelé **glande lymphatique**), contenant un grand nombre de prohémocytes, joue un rôle important dans la prolifération et la différenciation cellulaire. Chez *Drosophila melanogaster*, cet organe hématopoïétique, présent uniquement durant les phases larvaires, est composé de plusieurs lobes, répartis symétriquement le long du vaisseau dorsal. Les lobes postérieurs contiennent essentiellement des prohémocytes tandis que les lobes antérieurs contiennent des cellules différenciées qui sont relâchées dans la circulation (Lanot *et al.*, 2001) (Figure 6).

- *Prolifération cellulaire*

Lors de l'introduction d'un œuf de parasitoïde ou de tout autre macro-organisme étranger, l'augmentation du nombre total d'hémocytes dans l'hémolymphe de l'hôte est très souvent observée. Une étude de Strand et Noda (1991), par exemple, a montré une augmentation du nombre d'hémocytes du lépidoptère *Pseudoplusia includens* suite au parasitisme par *Microplitis demolitor*.

Chez la drosophile, une prolifération et une différenciation massive des hémocytes, et plus particulièrement des lamellocytes, est observée dans l'organe hématopoïétique des larves suite à l'introduction d'un œuf de parasitoïde (Lanot *et al.*, 2001 ; Sorrentino *et al.*, 2002). Quelques heures après parasitisme, les lamellocytes se différencient massivement dans les lobes antérieurs de l'organe hématopoïétique. Ces lobes antérieurs sont ensuite dispersés afin de relâcher leur contenu, ce qui conduit à une augmentation importante du nombre de lamellocytes circulant. Cette augmentation du nombre d'hémocytes, observée par différents auteurs lors de la réaction immunitaire contre les parasitoïdes (Eslin et Prévost, 1998 ; Lanot *et al.*, 2001 ; Russo *et al.*, 2001 ; Nappi *et al.*, 2004b), peut aussi être observée lors de l'injection de solutions salines (Brehélin, 1982 ; Rizki et Rizki, 1992 ; Eslin et Prévost, 1998 ; Labrosse *et al.*, 2005a) ou lors d'une simple blessure stérile (Rizki et Rizki, 1992 ; Márkus *et al.*, 2005).

La prolifération hémocytaire s'effectue sous le contrôle de multiples voies de signalisation, comme les voies **JAK/STAT** (Agaisse et Perrimon, 2004 ; Sorrentino *et al.*, 2004 ; Zettervall *et al.*, 2004) ou **Toll** (Qiu *et al.*, 1998). De plus, l'**ecdysone** (hormone de régulation du développement) semble fortement impliquée dans la prolifération hémocytaire puisque la prolifération des lamellocytes au sein de l'organe hématopoïétique n'a pas lieu chez les mutants ayant un taux faible d'ecdysone (Sorrentino *et al.*, 2002). La différenciation des pro-hémocytes est ensuite régulée par l'expression de nombreux gènes, parmi lesquels *serpent*, *lozenge*, *U-shape* et *glial cells missing* (Evans et Banerjee, 2003) (voir Meister (2003) et Nappi *et al.* (2004a) pour revue). Récemment, un gène intervenant dans la voie induisant la production de lamellocytes en réponse au parasitisme, *collier*, a pu être isolé (Crozatier *et al.*, 2004).

1.2.2 Activation de la cascade pro-phénoloxydase

Peu de temps après le début de l'encapsulation, des taches brunes de mélanine apparaissent à la surface de la cuticule de l'hôte qui a été endommagée lors de la ponte, ainsi que sur la surface de l'œuf déposé dans l'hémocoèle de l'hôte (Nappi et Vass, 1993 ; Nappi et Christensen, 2005). Cette mélanine est produite par l'action de la phénoloxydase, enzyme clef de la réponse immunitaire contre les parasitoïdes (Ashida et Brey, 1998 ; Söderhäll et Cerenius, 1998 ; Cerenius et Söderhäll, 2004 ; Nappi et Christensen, 2005). La cascade conduisant à la formation de mélanine participe à la neutralisation de l'intrus notamment par la production de

composés réactifs oxygénés et nitrés hautement toxiques qui vont conduire à sa mort (partie I.4).

La phénoloxydase (**PO**) est présente chez les insectes sous la forme d'une enzyme inactive, la pro-phénoloxydase (**proPO**). L'essentiel de la production de proPO est semblable par une classe d'hémocytes: les cellules à cristaux chez la drosophile (Rizki et Rizki, 1985 ; Meister et Lagueux, 2003), et les oenocytoides chez les lépidoptères (Iwama et Ashida, 1996 ; Ling et Yu, 2005). Il semble cependant qu'un gène codant une proPO soit exprimé dans les lamellocytes de Drosophile ((Irving *et al.*, 2005).

Une cascade protéolytique dont la dernière étape est le clivage de la proPO par une protéase à sérine (appelée **PAP**, pour *Pro-phenoloxidase Activating Protease*) permet l'activation de la PO (Figure 7). Cette PAP existe sous la forme d'un zymogène inactif qui est lui-même activé au travers d'une cascade d'activation impliquant d'autres protéases à sérine, suite à la reconnaissance d'un corps étranger. Outre le déclenchement des réactions de mélanisation, il a récemment été démontré expérimentalement que l'activation de la phénoloxydase est nécessaire à l'encapsulement cellulaire, contrairement à ce qui avait été suggéré par Rizki et Rizki à partir de l'étude de mutants (1990c). En effet, l'injection de la serpine 27A, inhibiteur spécifique des PAPs de drosophile (voir paragraphe suivant), diminue considérablement le pourcentage d'encapsulement des œufs du parasitoïde *L. bouvardi* (Nappi *et al.*, 2005). D'autres études indiquent aussi l'inhibition conjointe de la mélanisation et de l'encapsulement cellulaire par des inhibiteurs de protéases à sérine, comme le p-APMSF (Ling et Yu, 2005, 2006), ce qui indique une forte coopération entre les différents composants de l'immunité dans la mise en place de l'encapsulement.

L'enzyme PO activée catalyse l'oxydation de substances phénoliques en quinones qui polymérisent non-enzymatiquement en mélanine (Marmaras *et al.*, 1996 ; Sugumaran, 2002) (Figure 8). Durant cette réaction de mélanisation, des composés intermédiaires oxygénés (**ROI**, pour *Reactive Oxygen Intermediate*) et nitrés (**RNI**, pour *Reactive Nitrogen Intermediate*), sont également formés (Nappi *et al.*, 1995 ; Nappi et Christensen, 2005). Ces composés étant hautement toxiques, aussi bien pour le parasitoïde à neutraliser (partie I.4) que pour l'insecte hôte, la réaction de mélanisation est strictement localisée au niveau du corps étranger et est régulée par un ensemble d'inhibiteurs.

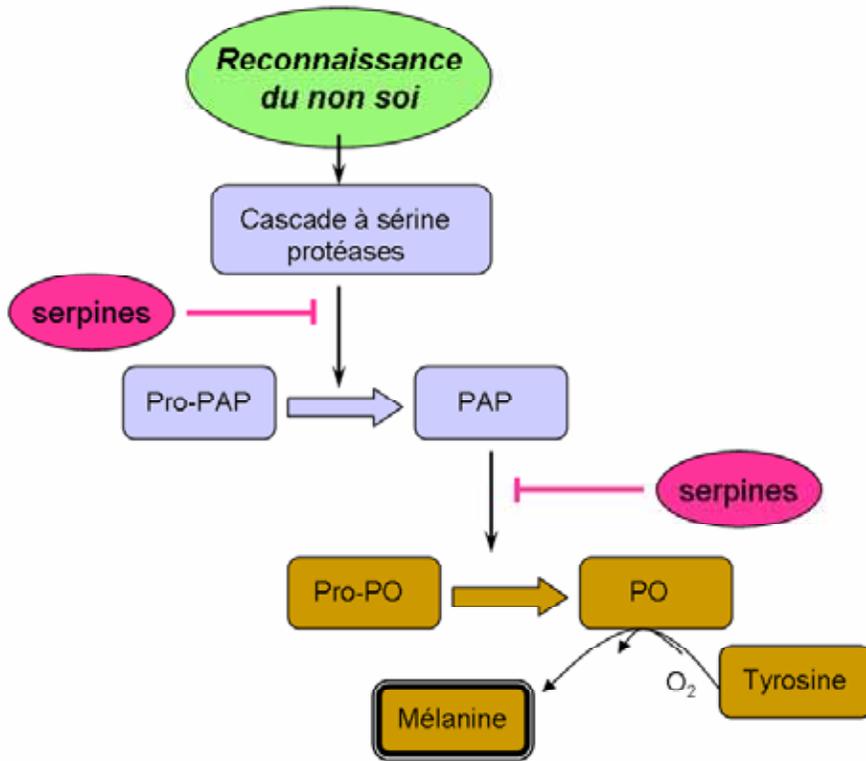


Figure 7 : Représentation schématique du système d'activation de la pro-phenoloxydase (pro-PO) des arthropodes.

Une cascade de protéases à sérine permet le clivage de la forme inactive de l'enzyme d'activation de la prophenoloxydase (pro-PAP, pour *pro-form of the Prophenoloxidase-Activating Protease*) en enzyme d'activation de la prophenoloxydase active (PAP, pour *Prophenoloxidase-Activating Protease*). Cette dernière enzyme va alors cliver la forme inactive de la phenoloxydase (pro-PO) en phenoloxydase active (PO)

Modifié de Cerenius & Söderhäll, 2004

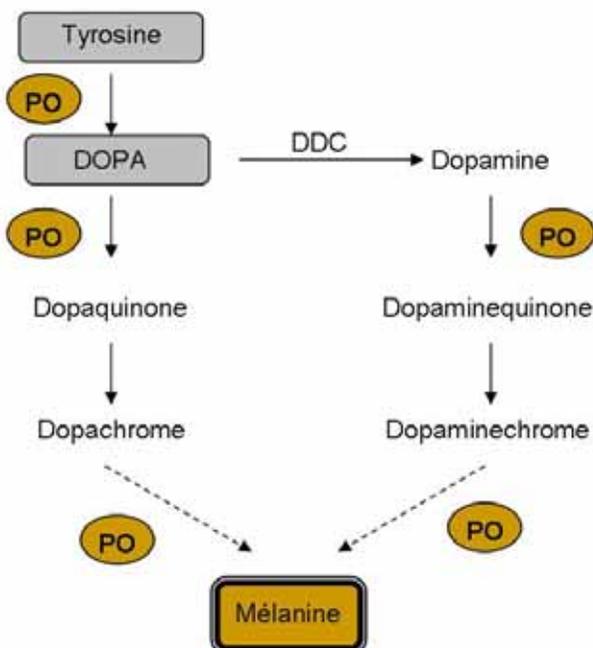


Figure 8 : Représentation schématique de la synthèse de mélanine chez les insectes.

PO: phénoloxydase active, DDC: Dopa decarboxylase

D'après Marmaras et al., 1996

- *Régulation de l'activation de la cascade PO*

L'activité de l'enzyme PO peut être régulée soit par l'inhibition de l'enzyme PO elle-même, comme observé chez *Musca domestica* (Daquinag *et al.*, 1995), soit par l'inhibition de son activation. L'ensemble des études menées à ce jour indique que chez la Drosophile et les Lépidoptères étudiés la régulation de cette enzyme est réalisée par des inhibiteurs de protéases à sérines, qui vont ainsi agir en aval de l'activation de la proPO.

Ces inhibiteurs appartiennent à la super famille des serpinines (*Serine Protease Inhibitors*). Ce sont des protéines globulaires, avec un large domaine conservé de 370 à 390 acides aminés et une extrémité C-terminale variable, de 30 à 40 acides aminés (Irving *et al.*, 2000 ; Silverman *et al.*, 2001). Lors de l'inhibition, les serpinines forment un complexe covalent avec la protéase à sérine qu'elles inhibent, avant d'être clivées par cette dernière qui sera alors inhibée. Ces inhibiteurs sont ainsi considérés comme des inhibiteurs irréversibles de type "substrat-suicide" puisqu'ils ne seront plus utilisables une fois clivés.

De nombreuses serpinines ont été identifiées chez les insectes, notamment chez les lépidoptères *Manduca sexta* et *Bombyx mori* (Kanost, 1999) et les diptères *D. melanogaster* (Reichhart, 2005) et *Anopheles gambiae* (Danielli *et al.*, 2003 ; Abraham *et al.*, 2005).

Dans le génome de *D. melanogaster*, 29 gènes semblent coder des serpinines (Reichhart, 2005), parmi lesquelles 9 sont significativement surexprimées durant l'encapsulation d'un parasitoïde et pourraient donc contrôler l'activation d'une cascade d'activation à sérine associées à la réaction immunitaire (Wertheim *et al.*, 2005). La fonction de chacune de ces serpinines est à ce jour encore largement méconnue (Reichhart, 2005). La **serpinine 27A** est la seule serpinine chez la drosophile qui soit identifiée comme impliquée dans la régulation de l'activation de la proPO, en inhibant spécifiquement une PAP terminale (De Gregorio *et al.*, 2002a). Chez les drosophiles saines, le rôle de cette serpinine est de maintenir l'inhibition de l'activation de la proPO (Ligoxygakis *et al.*, 2002), tandis que lors d'une réaction immunitaire, son rôle serait de restreindre la mélanisation au site de blessure ou à l'emplacement de la capsule en formation (De Gregorio *et al.*, 2002a). Le mécanisme de régulation de l'activation de la proPO par la serpinine 27A a été étudié plus en détail par Ligoxygakis *et al.* (2002). Leur étude semble indiquer que lors d'un challenge microbien, la voie de signalisation *Toll* induit l'expression d'une PAP (ou d'un activateur de PAP) (De Gregorio *et al.*, 2002b). Une partie des PAP produites est inhibée par les serpinines 27A présentes dans l'hémolymphe, via la formation de complexes Spn27A-PAP. Ces complexes sont alors détruits, éliminant ainsi la serpinine 27A de l'hémolymphe. L'excédent de PAP permet alors l'activation de la proPO, et ainsi la mélanisation (Figure 9).

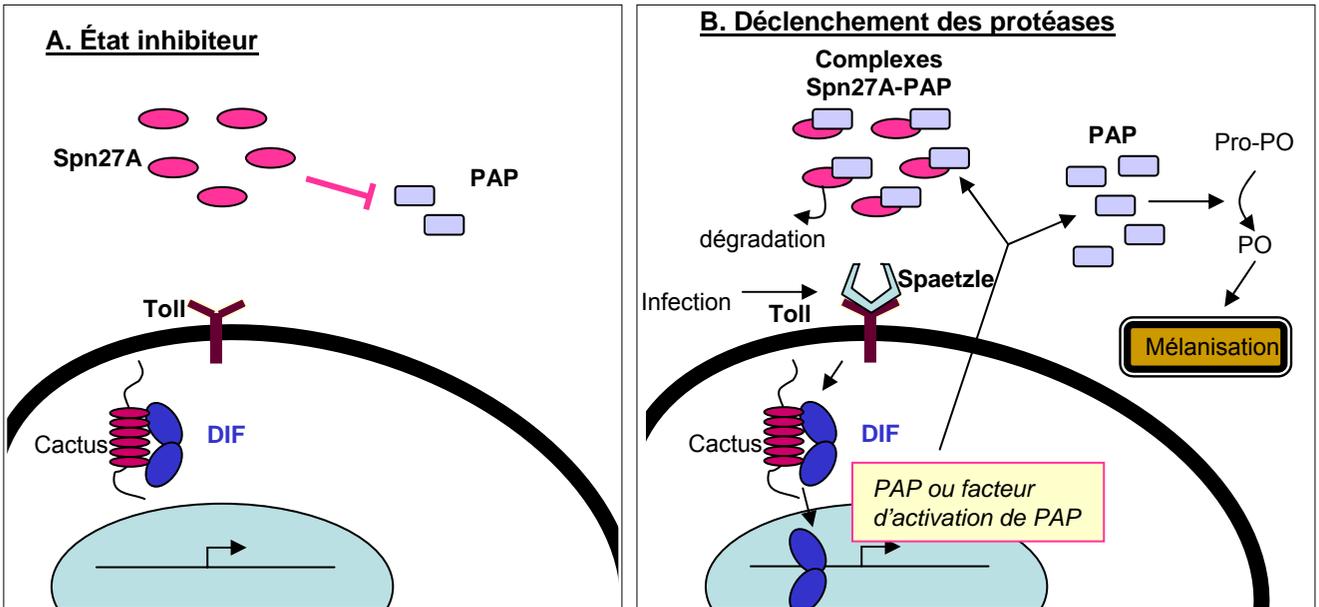


Figure 9 : Lien entre mélanisation et voie d'activation Toll.

A. En condition non infectieuse, l'hémolymphe est maintenue en état d'inhibition par un excès de Serpine 27A (Spn27A), qui bloque l'activité de l'enzyme d'activation de la prophénoloxydase (PAP, pour *Prophenoloxidase-Activating Protease*).

B. Le signal d'une infection est donné au récepteur Toll, via la cytokine Spaetzle. La transduction du signal conduit à la transcription de gènes codant pour la PAP ou pour un activateur de la PAP, par l'action du facteur de transcription DIF. A son tour, La PAP déclenche l'activation de la proPO en PO, permettant ainsi la synthèse de mélanine. Cette PAP est aussi ciblée par la serpine 27A. Le complexe Spn27A-PAP sera par la suite supprimé de l'hémolymphe.

D'après Ligoxygakis et al., 2002

Chez *M. sexta*, l'étude systématique des protéases à sérine et des serpines qui les inhibent semble indiquer que l'action des serpines est spécifique à un spectre restreint de protéases, ce qui est dû principalement aux différences observées dans la région C-terminale de ces protéines (Jiang *et al.*, 1994 ; Jiang et Kanost, 1997). Parmi ces serpines, les serpines **1-J, 3, 4, 5 et 6** semblent réguler l'activation de la proPO en inhibant soit directement une PAP, soit les protéases en amont des PAP dans la cascade d'activation (Jiang *et al.*, 2003 ; Zhu *et al.*, 2003 ; Wang et Jiang, 2004 ; Zou et Jiang, 2005 ; Tong et Kanost, 2005) (Tableau 2).

Tableau 2 : Serpines intervenant dans la régulation de l'activation de la proPO chez *Manduca sexta* et *D. melanogaster*. HP: hemolymph protease, PAP: pro-PO activating proteases

Espèce concernée	Serpines connues pour inhiber l'activation de la pro-PO	Protéase inhibée
<i>Manduca sexta</i>	Serpine 1-J (Kanost, 1999)	PAP-3 (Jiang <i>et al.</i> , 2003)
	Serpine 1-I (Wang et Jiang, 2006)	HP-14 (Wang et Jiang, 2006)
	Serpine-3 (Zhu <i>et al.</i> , 2003)	PAP-1 et PAP-3 (Zhu <i>et al.</i> , 2003)
	Serpine-4 (Tong et Kanost, 2005)	HP-1, HP-6, HP-21, et 2 protéases non identifiées (Tong <i>et al.</i> , 2005)
	Serpine-5 (Tong et Kanost, 2005)	HP-1 et HP-6 (Tong <i>et al.</i> , 2005)
	Serpine-6 (Wang et Jiang, 2004)	PAP-3 (Wang et Jiang, 2004) et HP-8 (Zou et Jiang, 2005)
<i>Drosophila melanogaster</i>	Serpine 27A (De Gregorio <i>et al.</i> , 2002a)	PAP inconnue (De Gregorio <i>et al.</i> , 2002a)

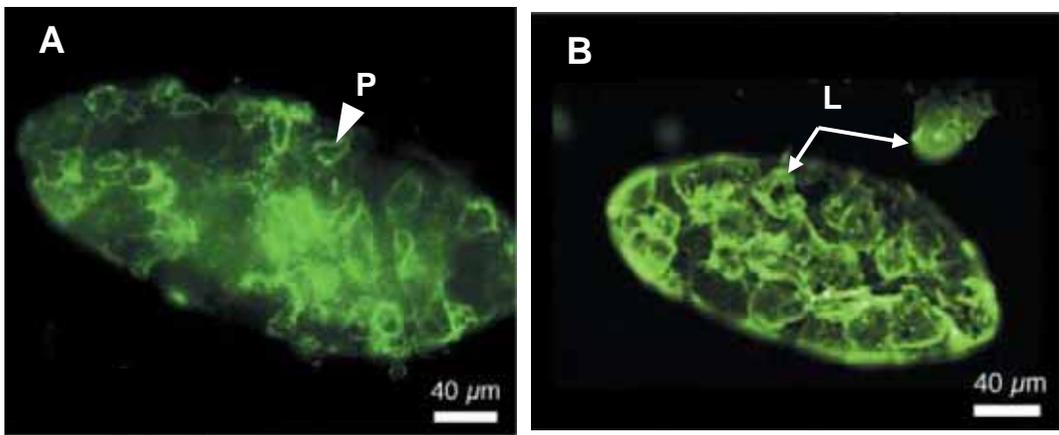


Figure 10 : Images en microscopie à fluorescence du processus d'encapsulation d'un œuf de *Leptopilina boulardi* (lignée IS_y) chez *Drosophila melanogaster*, (A) 24-26 heures post-infestation et (B) 40 heures post-infestation.

A. L'œuf de parasitoïde encapsulé a été récupéré dans une larve parasitée depuis 24-26 heures et marqué avec un anticorps spécifique aux plasmatocytes. B. L'œuf de parasitoïde encapsulé a été récupéré dans une larve parasitée depuis 40 heures et marqué avec un anticorps spécifique aux lamellocytes. P: Plasmatocyte. L: lamellocyte

D'après Williams et al., 2005

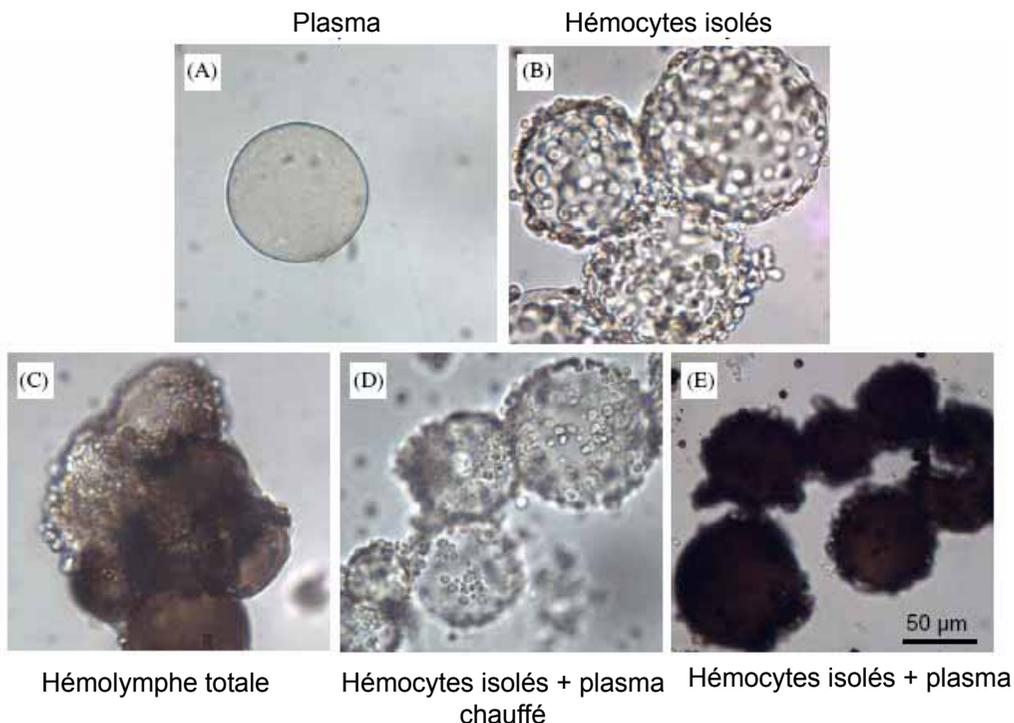


Figure 11 : Hémocytes et plasma sont nécessaires à l'encapsulation cellulaire mélanisée.

Des billes d'agarose recouvertes d'immulectines IML-2 sont incubées avec différentes fractions (plasma débarrassé d'hémocytes ou hémocytes isolés) obtenues à partir de l'hémolymphe de larves non injectées. (A) plasma, (B) hémocytes, (C) hémolymphe totale (plasma + hémocytes) , (D) hémocytes + plasma chauffé, (E) hémocytes isolés + plasma. L'encapsulation et la mélanisation des billes d'agarose sont observés après 24 heures en microscopie.

D'après Ling & Yu 2005

I.3 Formation de la capsule mélanisée

Lors de la formation de la capsule, des hémocytes habituellement libres dans l'hémolymphe subissent des modifications importantes de leurs propriétés d'adhésion, ce qui leur permet de s'agréger autour de l'œuf du parasitoïde pour former une capsule constituée de plusieurs couches cellulaires.

Chez la drosophile, l'encapsulation implique 2 types cellulaires : les plasmotocytes et les lamellocytes (Russo *et al.*, 1996). Les plasmotocytes s'attachent en premier lieu au corps étranger, qui est ensuite recouvert de nombreuses couches de lamellocytes (Figure 10).

Chez le lépidoptère *Pseudoplusia includens*, la formation de la capsule nécessite aussi 2 types cellulaires différents, les granulocytes et les plasmotocytes. Les cellules granulaires s'attachent à la surface du corps étranger formant une première couche cellulaire, qui est recouverte de nombreuses couches de plasmotocytes. L'encapsulation se termine par un dépôt de granulocytes à la périphérie de la capsule (Pech et Strand, 1996).

La construction de la capsule est souvent divisée en trois étapes, chacune faisant intervenir un type particulier d'hémocytes (Tableau 3): la phase d'initiation, la phase de recrutement et la phase de terminaison (Russo *et al.*, 1996 ; Lavine et Strand, 2002). L'**initiation** de l'encapsulation cellulaire nécessite l'adhésion des hémocytes à la surface d'une cible étrangère, tandis que durant la phase de **recrutement**, les hémocytes vont se lier à d'autres d'hémocytes. Enfin, la réaction doit s'achever après l'accumulation de plusieurs couches cellulaires (phase de **terminaison**). L'encapsulation nécessite donc une signalisation intercellulaire importante pour le recrutement et la coopération des différents types hémocytaires. La plupart des études menées à ce jour sur les mécanismes sous-jacents à l'encapsulation ont été menées sur des lépidoptères, et plus particulièrement sur l'espèce *P. includens*.

Tableau 3 : Récapitulatif des types cellulaires impliqués dans la fabrication de la capsule chez les lépidoptères et la drosophile.

Phase de construction de la capsule	Lépidoptères	Drosophiles
Initiation	Granulocytes	Plasmotocytes
Recrutement	Plasmotocytes	Lamellocytes
Terminaison	Granulocytes	Lamellocytes

I.3.1 Initiation et Recrutement

Plusieurs étapes cruciales se déroulent durant la phase d'initiation de l'encapsulation. D'une part, des facteurs opsonisants d'origine cellulaire peuvent recouvrir le corps étranger afin d'en faciliter l'encapsulation. D'autre part, d'autres facteurs vont rendre adhésifs les hémocytes circulants, permettant ainsi leur recrutement sur la surface du corps étranger.

- Opsonisation du corps étranger

Quelques minutes après l'introduction d'un corps étranger (billes synthétiques ou œuf de parasitoïde), la lyse d'un premier type hémocytaire, suivie d'un dépôt de matériel granulaire ou dense aux électrons est généralement observée. Plusieurs études tendent à indiquer que le matériel relâché par ces hémocytes est nécessaire au recrutement d'autres types hémocytaires.

Ce matériel est assez bien décrit chez les lépidoptères. Chez *Samia cynthia*, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori* et *Pseudoplusia includens*, l'attachement des granulocytes à une bille synthétique est observé moins d'une heure après son introduction. Ces cellules se lysent et relarguent leurs inclusions granulaires, déposant ainsi une substance granulaire sur le corps étranger (Schmit et Ratcliffe, 1977 ; Patak, 1990 ; Takahashi et Enomoto, 1995 ; Pech et Strand, 1996). Des cellules granulaires additionnelles s'attachent ensuite à la cible et entre elles, formant un ensemble de plaques autour de la cible.

Le rôle des facteurs relargués par les granulocytes sur l'initiation de l'encapsulation a été mis en évidence chez *Pseudoplusia includens* par une étude de Pech et Strand (1996), grâce à l'emploi de plasmacytes et de granulocytes purifiés. Leurs expériences *in vitro* ont démontré que des billes synthétiques ne pouvaient être encapsulées par les plasmacytes en l'absence de granulocytes, à moins que le corps étranger ait été au préalable incubé dans un milieu ayant contenu des granulocytes (Tableau 4). Enfin, l'ajout de peptides possédant la séquence Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) au milieu ayant contenu des granulocytes inhibe l'encapsulation, contrairement à l'ajout d'un peptide contrôle de séquence RGEK (Pech et Strand, 1995). Par contre, des billes synthétiques recouvertes de peptides RGDS sont plus rapidement encapsulées par les plasmacytes que les billes recouvertes du peptide contrôle. La **séquence RGD** est connue pour être une séquence d'acide aminés reconnue par les molécules d'adhésion transmembranaires de la famille des **intrégrines** (D'Souza *et al.*, 1991). Cette reconnaissance permet l'attachement des cellules au substrat par les intégrines. Ces résultats indiquent donc la participation d'une protéine de type intégrine dans le processus d'adhésion des plasmacytes RGD-dépendant. La présence de telles intégrines sur les hémocytes de *P. includens* et *M. sexta* ayant été récemment confirmée (Lavine et Strand, 2001b ; Levin *et al.*, 2005), il est actuellement supposé que les granulocytes relarguent à la surface du corps étranger des protéines contenant la séquence RGD, afin de favoriser l'encapsulation par les plasmacytes.

Chez la drosophile, une couche dense aux électrons est observée à la surface des œufs de parasitoïde en cours d'encapsulation 6 heures à peine après leur introduction. Cette couche, attractive pour les plasmacytes, semble déposée par un type hémocytaire non identifié car des débris cellulaires sont observés au voisinage du corps étranger. La nature de ce matériel dense aux électrons reste cependant inconnue (Russo *et al.*, 1996). Après le dépôt de cette première couche de plasmacytes, les lamellocytes s'aggrègent et adhèrent les uns aux autres autour du corps étranger probablement au moyen d'intégrines dont la présence a été récemment mise en évidence à la surface de ces hémocytes (Irving *et al.*, 2005).

Tableau 4 : La coopération cellulaire est nécessaire à l'encapsulation chez *Pseudoplusia includens*. Après séparation et purification des plasmacytes et des granulocytes, le pourcentage de billes synthétiques encapsulées obtenu 24h après différents traitements a été comparé. Seule la présence de granulocytes, ou de milieu ayant contenu les granulocytes, permet d'obtenir un taux d'encapsulation similaire à celui obtenu avec de l'hémolymphe total. D'après Pech et Strand (1996).

Traitement	% de billes encapsulées
Hémolymphe total	40-45 %
Plasmacytes isolés	0.4%
Granulocytes isolés	< 5 %
Plasmacytes isolés + Granulocytes isolés	50-55 %
Plasmacytes isolés + milieu non conditionné	15-20 %
Plasmacytes isolés + milieu ayant contenu des plasmacytes	10-15 %
Plasmacytes isolés + milieu ayant contenu des granulocytes	40-45 %

D'autres études, moins détaillées, ont permis d'identifier des facteurs impliqués dans l'initiation de l'encapsulation. Ces facteurs, appelés **ERP** (pour *Encapsulation-Relating Proteins*) ont été obtenus en purifiant les protéines retrouvées attachées aux billes synthétiques injectées quelques minutes auparavant. Chez les larves du coléoptère *Tenebrio molitor*, 2 protéines de 48 et 56 kDa ont été étudiées. L'analyse de leur séquence peptidique, obtenue à partir du cDNA, a révélé que ces 2 protéines sont des **protéines riches en glutamine**, de fonction inconnue (Cho *et al.*, 1999). De même, chez la chenille de lépidoptère *Galleria mellonella*, une protéine de 47 kDa similaire à 74.4 % à la **calréticuline** de drosophile (une protéine ubiquitaire qui a de nombreuses fonctions connues) a été isolée (Choi *et al.*, 2002). Dans les 2 cas, les anticorps dirigés contre ces protéines ont permis de détecter leur présence sur ou dans les hémocytes de l'insecte, suggérant leur origine cellulaire (Cho *et al.*, 1999 ; Choi *et al.*, 2002 ; Asgari et Schmidt, 2003). Enfin, lorsque les billes sont recouvertes de ces mêmes anticorps, elles ne sont plus encapsulées, ce qui indique que ces facteurs ERP sont probablement impliqués dans un phénomène d'opsonisation.

- *Changement des propriétés adhésives des hémocytes*

Une fois le corps étranger opsonisé par les facteurs relâchés par les premières cellules en contact avec lui, les hémocytes qui participent à la formation de la capsule passent d'un état libre non adhésif à un état activé fortement adhésif. Cela implique l'action de facteurs, de type cytokines, qui vont jouer sur l'état des hémocytes.

Chez les lépidoptères, de tels facteurs semblent produits par les granulocytes. Un facteur de faible masse moléculaire ($< 3\text{kDa}$), produit par les hémocytes, semble remplir cette fonction chez *Heliothis virescens* (Davies *et al.*, 1988). La nature de ce facteur, nommé **EPF** (pour *Encapsulation Promoting Factor*) n'a cependant pas été décrite.

Des études plus récentes sur *P. includens* ont permis d'identifier une cytokine de 23 acides aminés, nommé **PSP1** (pour *Plasmatocyte Spreading Peptide*) qui induit l'étalement des plasmatocytes par un changement rapide de leurs propriétés adhésives (Clark *et al.*, 1997 ; Strand *et al.*, 2000). L'injection du peptide synthétisé aux chenilles provoque l'adhésion massive de plasmatocytes les uns aux autres et aux surfaces étrangères, provoquant ainsi une chute du nombre de plasmatocytes en circulation dans l'hémolymphe (Clark *et al.*, 1997). Ainsi, le peptide PSP1 permet l'établissement *in vitro* de structures cellulaires en feuillets successifs, similaires à celles observées autour des capsules. Ce peptide est produit par les granulocytes, sur lesquels il a une action inhibitrice de l'étalement (Strand et Clark, 1999 ; Strand *et al.*, 2000).

La phase de recrutement cellulaire est donc complètement dépendante de la phase d'initiation, au cours de laquelle les premières cellules en place (les granulocytes chez les lépidoptères et un type cellulaire inconnu chez la drosophile) relarguent des facteurs qui induisent l'agrégation d'un second type cellulaire (principalement les lamellocytes chez les diptères, et les plasmatocytes chez les lépidoptères).

Après le dépôt de plusieurs couches cellulaires, la dernière étape de l'encapsulation consiste à stopper l'agrégation hémocytaire.

I.3.2 Terminaison

- *Arrêt de l'agrégation cellulaire*

Plusieurs hypothèses ont été proposées afin d'expliquer l'arrêt de l'agrégation cellulaire. Chez la drosophile, cet arrêt est corrélé au dépôt d'une couche de lamellocytes ayant des propriétés de surface différentes des lamellocytes des couches plus internes (Rizki et Rizki, 1986), tandis que chez le lépidoptère *P. includens*, la dernière couche hémocytaire est constituée de granulocytes (Pech et Strand, 1996 ; Lavine et Strand, 2002).

Un premier scénario, proposé par Rizki et Rizki (1983 ; 1986), suggérait que l'arrêt du recrutement des hémocytes était dû à l'épuisement en nombre des hémocytes "adhésifs" dans l'hémolymphe. Cependant, la plupart des études semblent indiquer que l'agrégation cellulaire cesse suite à un changement des propriétés adhésives des cellules qui forment la couche la plus externe de la capsule (Ratcliffe, 1993 ; Schmidt *et al.*, 2001). De nombreuses études ont mis en évidence que la formation de la capsule s'arrête lorsqu'une couche semblable à celle de la membrane basale apparaît à la périphérie de la capsule (Grimstone *et al.*, 1967 ; Chain *et al.*, 1992 ; Pech et Strand, 2000). Chez *P. includens*, par exemple, l'apparition d'une telle couche est observée en fin d'encapsulation. Cette couche résulterait de l'apoptose des granulocytes périphériques, elle même induite par les plasmatocytes (Pech et Strand, 1996, 2000).

- *Mélanisation*

La mélanisation de la capsule hémocytaire est généralement observée à la fin du processus de formation de la capsule (Ratcliffe, 1993 ; Carton et Nappi, 1997). Il est à noter cependant que la coloration noire observée au niveau de la capsule ne doit pas toujours être attribuée à la formation de mélanine. En effet, l'observation en microscopie électronique de la capsule chez la drosophile a révélé que la différence entre les capsules hémocytaires noires et blanches n'était pas due à la présence ou l'absence de mélanine, mais à la présence ou l'absence de nécrose des cellules les plus internes de la capsule (Russo *et al.*, 1996).

Une étude récente chez *Manduca sexta* permet d'éclairer le rôle synergique de la "réponse cellulaire" et de la "réponse humorale" dans le mécanisme de mélanisation. Au cours de cette étude, Ling et Yu (2005) ont pu démontrer, à l'aide d'anticorps anti-proPO, que la proPO, connue pour être produite et stockée dans les oenocytoides (Jiang *et al.*, 1997), est présente à la surface des granulocytes et des sphérulocytes des chenilles saines. Lors d'une réaction immunitaire contre des billes synthétiques, cette proPO est activée en PO active, conduisant ainsi à la mélanisation de ces hémocytes. Leur étude montre cependant que cette mélanisation n'est possible qu'en présence conjointe des hémocytes et des composants du plasma, contenant probablement les protéases à sérine nécessaire à l'activation de la proPO (Figure 11) (Ling et Yu, 2005). La PO active a tendance à adhérer aux surfaces étrangères, ainsi qu'aux surfaces des hémocytes qui se collent alors entre eux pour former des agrégats (Ashida et Brey, 1998). Chez *Bombyx mori* par exemple, les hémocytes positifs à la PO forment des agrégats avec d'autres hémocytes qui n'ont pas d'activité PO (Ling *et al.*, 2005). Ainsi, la couche de granulocytes recouvrant la capsule pourrait constituer une surface de proPO, qui une fois activée, initierait la mélanisation de ces hémocytes, et conduirait ainsi à la mélanisation de la capsule hémocytaire. Bien que la réaction de mélanisation soit généralement considérée comme un composant de "l'immunité humorale", cette étude met clairement en évidence le rôle crucial de l'action synergique de la phénoloxydase et des hémocytes dans la mélanisation de la capsule (Ling et Yu, 2005).

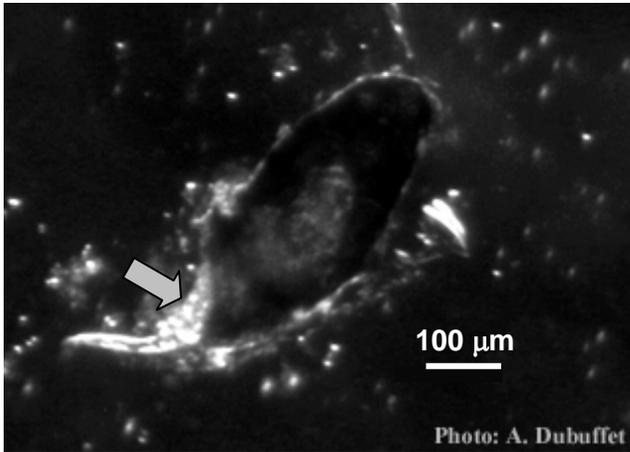


Figure 12 : Embryon du parasitoïde *Leptopilina boulardi* s'échappant d'une capsule formée lors de la réaction immunitaire de larves de *Drosophila yakuba*. La flèche indique l'embryon du parasitoïde

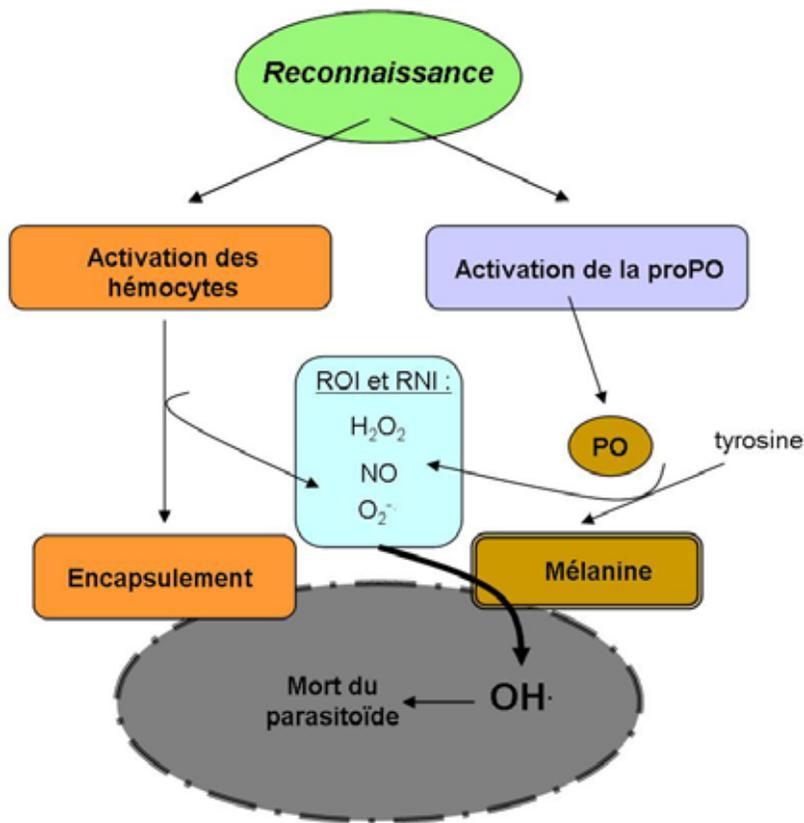


Figure 13 : Représentation schématique de la production des composés cytotoxiques supposés à l'origine de la mort du parasitoïde.

La reconnaissance du corps étranger entraîne la réaction d'encapsulation autour de l'œuf du parasitoïde et l'activation de la cascade prophenol-oxydase (pPO). Cette cascade permet la formation de mélanine et de composés oxygène et nitrogène réactifs (ROI et RNI respectivement). Ces composés réactifs génèrent alors des radicaux hydroxyle (OH·) grâce à la mélanine, qui seront à l'origine de la mort du parasitoïde.

I.4 Mort du parasitoïde

La réaction d'encapsulation a généralement pour conséquence la mort du parasite, bien que l'échappement de parasitoïdes vivants de capsules complètes ait parfois été signalé (Kraaijeveld et van Alphen, 1994) (observations personnelles, Figure 12)

Salt (1970) avait suggéré que la mort du parasitoïde pouvait être attribuée à son asphyxie dans la capsule formée. En effet, il avait observé que la quantité d'oxygène était faible à l'intérieur des capsules. Cependant, des études plus récentes suggèrent plutôt que les composés cytotoxiques (Intermédiaires Réactifs Oxygénés (**ROI**) et Azotés (**RNI**)) produits lors de l'encapsulation pourraient être impliqués dans la mort des parasites d'insectes (Nappi et Vass, 2001 ; Nappi et Christensen, 2005) (Figure 13). Ces molécules sont en effet connues pour jouer un rôle important dans l'immunité chez les mammifères, tant par leur action toxique que par leur rôle de régulateur cellulaire de l'immunité (revue dans Nathan et Shiloh, 2000).

Chez *D. melanogaster*, des niveaux élevés d'anions super-oxyde ($O_2^{\cdot -}$), de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de monoxyde d'azote (NO) sont produits durant la réaction d'encapsulation de parasitoïdes. Ces molécules sont produites par les hémocytes et lors de la mélanisation de la capsule (Nappi *et al.*, 1995 ; Nappi et Vass, 1998 ; Nappi *et al.*, 2000). L'anion super-oxyde, ainsi que l'interaction du peroxyde d'hydrogène avec le monoxyde d'azote, peuvent former des radicaux hydroxyles (**OH \cdot**), l'espèce oxygénée la plus cytotoxique connue (Nappi et Vass, 1998). Enfin, il a été suggéré que le pigment de mélanine pourrait servir de piège pour les molécules cytotoxiques, localisant les réactions au niveau des surfaces étrangères, empêchant ainsi la distribution de substances cytotoxiques dans l'hémocœle de l'insecte (Geremia *et al.*, 1984 ; Vass et Nappi, 2000).

Bien qu'aucune preuve expérimentale de la toxicité effective de ces molécules n'ait été apportée à ce jour dans les modèles hôte-parasitoïdes, ces intermédiaires réactifs produits durant les réactions immunitaires chez l'insecte sont considérées comme les molécules responsables de la mort des parasites.

II STRATÉGIES DE VIRULENCE DES PARASITOÏDES

Les endoparasitoïdes koinobiontes ont développé une large gamme de stratégies afin d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (Vinson, 1990 ; Strand et Pech, 1995b ; Schmidt *et al.*, 2001 ; Moreau, 2003 ; Pennacchio et Strand, 2006) (Tableau 5). Certains sont connus pour infester des hôtes "immuno-incompétents", tels que de jeunes hôtes immunitairement immatures. Les trichogrammes, par exemple, infestent exclusivement des œufs de lépidoptères, dépourvus d'hémocytes à ce stade de développement (Salt, 1968). Dans le même ordre d'idée, l'infestation d'hôtes naturellement incapables de former une capsule peut s'avérer efficace. C'est une stratégie employée par le braconidé *Asobara tabida*, qui semble pondre préférentiellement ses œufs dans des larves de *Drosophila subobscura* (van Alphen et Janssen, 1982), hôte naturellement incapable de produire des lamellocytes et donc de former des capsules en réponse à l'infestation par un parasitoïde (Eslin et Doury com. pers.).

La plupart des études effectuées à ce jour indiquent que de nombreux parasitoïdes infestent des hôtes habituellement capables de former une capsule autour d'un corps étrangers. Deux grandes catégories de stratégies peuvent alors être définies: les stratégies d'immunoévasion locale et les stratégies d'immunosuppression systémique. Les parasitoïdes employant des stratégies d'**immunoévasion locale** (aussi appelées "passive" ou "de conformité") laissent les défenses immunitaires de l'hôte intactes, en se développant par exemple dans des endroits inaccessibles au système immunitaire de l'hôte ou en possédant des caractéristiques de surface qui vont empêcher les hémocytes de s'aggréger sur leur cuticule. Les stratégies d'**immunosuppression systémique** ("active" ou "de régulation") induisent au contraire une altération globale des capacités de l'hôte à encapsuler. Dans la suite de cette synthèse, nous considérerons comme systémiques toutes les stratégies qui vont inhiber l'encapsulation d'un autre corps étranger introduit dans le corps de l'hôte, et locales les stratégies qui ne permettent pas cette protection.

Afin de déterminer le caractère local ou systémique de la stratégie de virulence employée par une espèce de parasitoïde, différents types de corps étrangers peuvent être employés. Les études portant sur les parasitoïdes de lépidoptères emploient généralement l'injection de billes synthétiques (sephadex, latex...) ou plus rarement de morceaux de poils de pinceau. Ce type d'injection est cependant difficilement utilisable pour l'étude des stratégies de virulence employées par les parasitoïdes de drosophiles, du fait de la taille extrêmement réduite des larves de drosophiles au stade parasité (1-2mm). D'autres types de corps étrangers, tels que des œufs de parasitoïdes avirulents (habituellement encapsulés) (Nappi et Streams, 1969 ; Labrosse *et al.*, 2003) ou plus récemment des gouttes d'huile de paraffine (Moreau *et al.*, 2003) sont employés comme techniques alternatives. De même, des souches tumorales de drosophiles ont été largement utilisées

(Nappi, 1975 ; Chiu *et al.*, 2000 ; Labrosse *et al.*, 2003 ; Morales *et al.*, 2005). Les larves de ces souches produisent de façon constitutive des lamellocytes en surabondance, lamellocytes qui finissent par s'aggréger entre eux pour former des tumeurs, dans une réaction de pseudo-encapsulation. Les tumeurs peuvent également résulter d'une réaction auto-immune où des tissus larvaires endommagés sont encapsulés puis mélanisés. L'altération de la réponse immunitaire de *D. melanogaster* par les parasitoïdes peut ainsi aisément être détectée en observant l'incidence du parasitisme sur la formation de ces tumeurs mélanisées.

Cette 2^e partie de synthèse bibliographique a pour objectif d'illustrer à l'aide de quelques exemples le panel de stratégies employé par les endoparasitoïdes. Lorsque les facteurs de virulence responsables des effets observés sont connus, ils seront décrits. Enfin, l'accent sera porté sur les stratégies employées par les parasitoïdes de drosophiles, qui seront ainsi toutes référencées.

II.1 Facteurs de virulence

Les facteurs employés par les endoparasitoïdes koinobiontes pour échapper à la réponse immunitaire de leurs hôtes sont variés. Ce sont généralement des facteurs injectés lors de la ponte par la femelle parasitoïde, mais il peut s'agir parfois de facteurs provenant de l'embryon de parasitoïde lui-même. Les facteurs injectés par la femelle parasitoïde incluent des protéines produites dans les glandes accessoires associées au système génital (appelées selon les espèces glande à venin ou glande impaire) ou dans le calice ovarien (Labrosse *et al.*, 2003 ; Moreau et Guillot, 2005), des virus (Beckage, 1998 ; Shelby et Webb, 1999 ; Drezen *et al.*, 2003 ; Stasiak *et al.*, 2005) et des particules d'allure virale (Feddersen *et al.*, 1986 ; Rizki et Rizki, 1990a). Les facteurs connus pour être produits par les jeunes parasitoïdes en développement comprennent les tératocytes (cellules provenant de la membrane séreuse de l'embryon du parasitoïde, Dahlman, 1991) ainsi probablement que des sécrétions larvaires (Lavine et Beckage, 1996). L'ensemble de ces facteurs de virulence va concourir à mettre en échec la réponse immunitaire des insectes contre les parasitoïdes, mais peut aussi avoir des effets importants sur leur développement et leur reproduction, effets qui ne seront pas analysés dans cette synthèse (voir Beckage et Gelman, 2004).

Les polydnavirus et les particules d'allure virale sont parmi les facteurs de virulence les plus originaux, notamment de par leur nature et leur structure organisée. Les polydnavirus constituent le premier exemple de symbiose virus/eucaryote décrit à ce jour (Espagne *et al.*, 2004) tandis que la nature et l'origine des particules d'allure virale restent encore sujets à controverses.

Tableau 5 : Tableau récapitulatif des différentes stratégies de virulence employées par les parasitoïdes pour échapper à la réponse immunitaire de leurs hôtes qui sont décrites dans cet exposé. Les parasitoïdes de drosophiles sont notés en gras.

Légende: **VLPs:** Virus Like Particles; **PDV :** polydnavirus

Les polydnavirus sont souvent désignés comme suit: les initiales du nom latin du parasitoïde suivies de PDV (polydnavirus).

Stratégie	Parasitoïdes utilisant ce mécanisme (hôtes concernés)	Facteurs de virulence identifiés	
Infestation d'hôtes "immuno-incompétents"			
- hôtes immunitairement immatures	Trichogrammes (divers lépidoptères)	<i>Non nécessaires</i>	
- hôtes naturellement incapables de former une capsule	<i>Asobara tabida</i> (<i>D. subobscura</i>)	<i>Non nécessaires</i>	
Immunoévasion locale			
1. Localisation du parasitoïde dans des tissus inaccessibles au système immunitaire	<i>Asobara tabida</i> (<i>D. melanogaster</i>)	Chorion adhésif	
2. Caractéristiques de surface empêchant l'élicitation d'une réponse immunitaire	<i>Macrocentrus cingulum</i> (<i>Ostrinia furnacalis</i>)	Membrane extraembryonnaire	
	<i>Copidosoma floridanum</i> (<i>Pseudoplusia includens</i> , <i>Trichoplusia ni</i>)		
	Protection localisée au niveau de l'oeuf	<i>Toxoneuron nigriceps</i> (<i>Heliothis virescens</i>)	Chorion
		<i>Cotesia kariyai</i> (<i>Pseudaletia separate</i>)	Protéine du calice IEP
		<i>Cotesia rubecula</i> (<i>Pieris rapae</i>)	Protéine du calice Crp32
		<i>Venturia canescens</i> (<i>Euphestia kuehniella</i>)	VLPs, hémomucine, composants du fluide du calice sans VLPs
Protection localisée au niveau de la larve	<i>Venturia canescens</i> (<i>Euphestia kuehniella</i>)	hémomucine	
	<i>Cotesia congregata</i> (<i>Manduca sexta</i>)	?	
	<i>Chelonus inanitus</i> (<i>Spodoptera littoralis</i>)	?	

Immunosuppression systémique

1. Altération de la réponse immunitaire cellulaire	Apoptose	<i>Cotesia kariyai (Pseudaletia separata)</i>	- Venin dans les 1 ^{ères} heures - CkPDV ensuite	
		<i>Cotesia congregata (Manduca sexta)</i>	CcPDV	
		<i>Microplitis demolitor (Pseudoplusia includens)</i>	MdPDV	
		<i>Leptopilina heterotoma (D. melanogaster)</i>	VLPs	
	Altération de l'organe hématopoïétique, impliqué dans la prolifération cellulaire	<i>Cotesia kariyai (Pseudaletia separata)</i>	CkPDV	
		<i>Asobara citri (D. melanogaster)</i>		
		<i>Leptopilina heterotoma (D. melanogaster)</i>		
		<i>Leptopilina victoriae (D. melanogaster)</i>		
	2. Inhibition de l'activité PO ou de la mélanisation	Altération du cytosquelette d'actine et/ou des capacités d'étalement	<i>Ganaspis xanthopoda (D. melanogaster)</i>	
			<i>Campoletis sonorensis (Heliothis virescens)</i>	- Protéines ovariennes dans les 1 ^{ères} heures - CsPDV (VHv1.1) ensuite
<i>Cotesia rubecula (Pieris rapae)</i>			CrV1 (PDV)	
<i>Cotesia congregata (Manduca sexta)</i>			Homologue de CrV1 (PDV)	
<i>Microplitis demolitor (Pseudoplusia includens)</i>			Glc1.8 (MdPDV)	
<i>Venturia canescens (Euphestia kuehniella)</i> (localement ou transitoirement)			Fluide du calice sans VLPs	
<i>Leptopilina heterotoma (D. melanogaster)</i>			VLPs	
<i>Leptopilina victoriae (D. melanogaster)</i>			VLPs	
<i>Leptopilina boulandi (D. melanogaster)</i>			P4 (VLPs)	
			<i>Cotesia congregata (Manduca sexta)</i>	CcPDV
	<i>Cotesia rubecula (Pieris rapae)</i>	Protéase à sérine du venin (Vn50)		
	<i>Campoletis sonorensis (Heliothis virescens)</i>	CsPDV		
	<i>Microplitis demolitor (Pseudoplusia includens)</i>	MdPDV (+ venins)		
	<i>Venturia canescens (Euphestia kuehniella)</i> (localement ou transitoirement)	Fluide du calice sans VLPs		
	<i>Asobara tabida (D. melanogaster)</i>			
	<i>Asobara citri (D. melanogaster)</i>			
	<i>Leptopilina boulandi</i> (supposé chez <i>D. melanogaster</i>)			

II.1.1 Polydnavirus (PDVs)

Les polydnavirus (PDVs, pour *Polydisperse DNA Viruses*) sont caractérisés par un génome segmenté, constitué de multiples cercles (ou segments) d'ADN double brin (pour revue : Beckage, 1998 ; Webb, 1998 ; Turnbull et Webb, 2002 ; Drezen *et al.*, 2003 ; Espagne *et al.*, 2004). Les virions matures sont présents dans le fluide du calice, une région située dans la partie inférieure des ovaires des femelles parasitoïdes dans laquelle ils sont produits. Ils sont ensuite injectés dans l'hôte au moment de la ponte. Les gènes viraux sont alors exprimés dans l'hôte, ce qui permet la réussite parasitaire, mais ces virus ne se répliquent pas dans l'hôte.

Il existe 2 familles de PDVs : les Bracovirus, associés à des parasitoïdes de la famille des Braconidés, et les Ichnovirus, associés à des Ichneumonidés (Stoltz *et al.*, 1984). L'association des PDVs aux Braconidés et aux Ichneumonidés aurait été acquise par des événements d'intégration indépendants d'un génome viral dans le génome d'un ancêtre de chacune de ces familles de parasitoïdes (Webb, 1998). Chez les braconidés, l'événement aurait eu lieu il y a environ 73 millions d'années (Whitfield, 2002). L'ADN des polydnavirus est ainsi présent sous 2 formes chez le parasitoïde: une forme linéaire intégrée au génome des parasitoïdes auxquels ils sont associés, ce qui assure leur transmission verticale aux générations suivantes et une forme segmentée circulaire dans les particules virales (Figure 14). La réplication des PDVs n'a lieu que chez le parasitoïde, dans le calice ovarien où ils sont libérés par bourgeonnement (pour les ichnovirus) ou par lyse cellulaire (pour les bracovirus). Plus de 30 000 espèces parasitoïdes seraient ainsi associées à un PDV (Webb, 1998). Cette association originale a été décrite comme le seul cas de mutualisme obligatoire (symbiose) entre un virus et un organisme eucaryote, puisque le virus n'est transmis que via la descendance de la guêpe, dont le succès reproducteur est strictement dépendant de l'expression des gènes viraux (Whitfield, 1990).

L'organisation complexe de ces génomes viraux a été révélée par le séquençage des différents cercles d'ADN double brin du bracovirus associé à l'espèce *Cotesia congregata* (Espagne *et al.*, 2004). De façon inattendue, l'organisation de ce génome semble plus proche de celle d'un eucaryote que de celle d'un virus, avec par exemple une fréquence non négligeable de gènes possédant des introns, ce qui repose la question de l'origine virale des PDVs. L'une des hypothèses alternatives serait que des systèmes produisant des intermédiaires d'ADN circulaire, tels que des éléments transposables, pourraient avoir conduit à la création de pseudo-virus. L'acquisition de protéines de capsides auraient alors permis l'infection des cellules des hôtes. Les nombreux gènes de virulence présents, regroupés en familles multigéniques pourraient avoir été acquis secondairement à partir du génome du parasitoïde. La création de cette entité pseudo-virale chez ces familles de parasitoïdes pourrait au final avoir contribué à leur importante diversification, en permettant la production à moindre coût d'un arsenal de facteurs de virulence chez l'hôte quelques heures après parasitisme.

PARASITISME

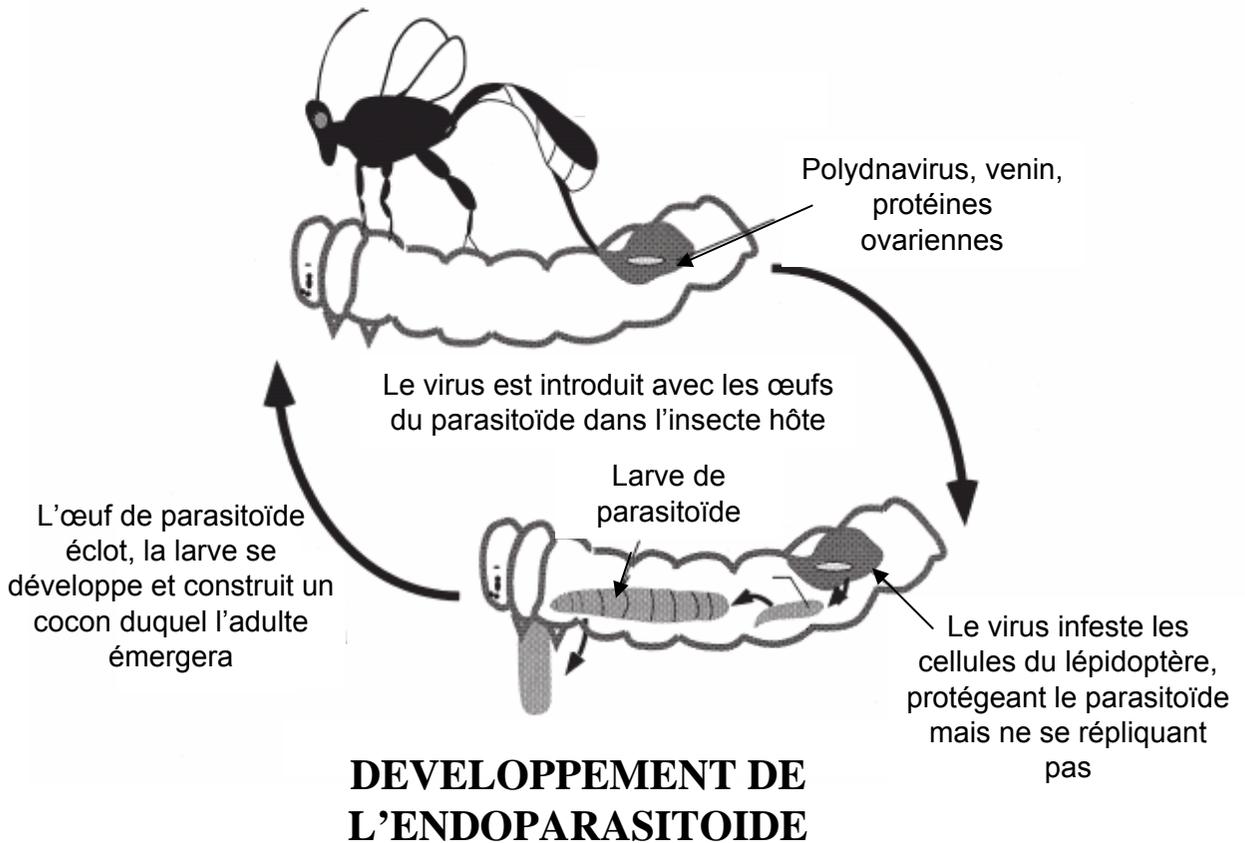


Figure 14 : Cycle biologique des parasitoïdes porteurs de polydnavirus

D'après Shelby & Webb 1999

II.1.2 Particules d'allure virale (VLPs)

D'autres facteurs d'allure virale, mais dépourvus d'ADN (VLPs, pour *Virus Like Particles*) sont parfois impliqués dans les phénomènes de virulence. Ces VLPs ont été décrites chez des hyménoptères de la famille des Figitidés, comme *Leptopilina heterotoma* (Rizki et Rizki, 1990a), *Leptopilina boulardi* (Dupas *et al.*, 1996) ou *Leptopilina victoriae* (Morales *et al.*, 2005), chez l'Ichneumonidé *Venturia canescens* (Feddersen *et al.*, 1986) et chez les 2 espèces de Braconidés *Biosteres longicaudatus* et *Microctonus aethiopoides* (Lawrence et Akin, 1990 ; Barratt *et al.*, 1999). Ces VLPs sont observées dans les ovaires chez *M. aethiopoides*, les glandes à venin chez *B. longicaudatus* et le fluide du calice chez *V. canescens*. Chez les espèces du genre *Leptopilina*, elles sont produites dans une glande accessoire appelée glande impaire et accumulées dans le réservoir de cette glande (Figures 15 et 16).

Chez les Figitidés *L. heterotoma* et *L. victoriae*, les VLPs sont des particules sphériques constituées d'un cœur dense aux électrons d'environ 300 nm de diamètre, duquel partent de multiples extensions (Rizki et Rizki, 1990a ; Morales *et al.*, 2005). Leur structure est assez différente de celle des VLPs de *L. boulardi* qui sont dépourvues d'extensions et qui contiennent de nombreuses vésicules (Dupas *et al.*, 1996 ; Labrosse *et al.*, 2003). Des différences de morphologie des VLPs peuvent aussi être observées au sein d'une même espèce, comme chez *L. boulardi* (Dupas *et al.*, 1996). Les premières étapes de la biogenèse des VLPs de *L. victoriae* s'effectuent dans la glande impaire à partir de précurseurs de 90 nm de diamètre sécrétés, tandis que leur maturation prend place dans le réservoir de cette glande où ils apparaissent regroupés en paquets (Morales *et al.*, 2005 ; Chiu *et al.*, 2006). Notons que par abus de langage, l'ensemble constitué par la glande impaire, son réservoir et le canal les reliant est souvent appelé glande impaire.

Ces VLPs sont retrouvés dans le canal de l'ovipositeur chez *L. boulardi* et sont observés à la surface des œufs de *L. boulardi*, *L. victoriae* et *L. heterotoma* une fois pondus dans le corps de l'hôte *D. melanogaster* (Dupas *et al.*, 1996 ; Chiu *et al.*, 2006). Il est donc généralement admis qu'ils sont injectés dans l'hôte lors de l'oviposition. Chez *L. heterotoma*, les VLPs entrent à l'intérieur des hémocytes de l'hôte et sont retrouvés libres dans le cytoplasme des lamellocytes (Rizki et Rizki, 1990a ; Chiu *et al.*, 2006). Chez *V. canescens*, les VLPs semblent attachés à la surface de l'œuf du parasite (Hellens *et al.*, 1996).

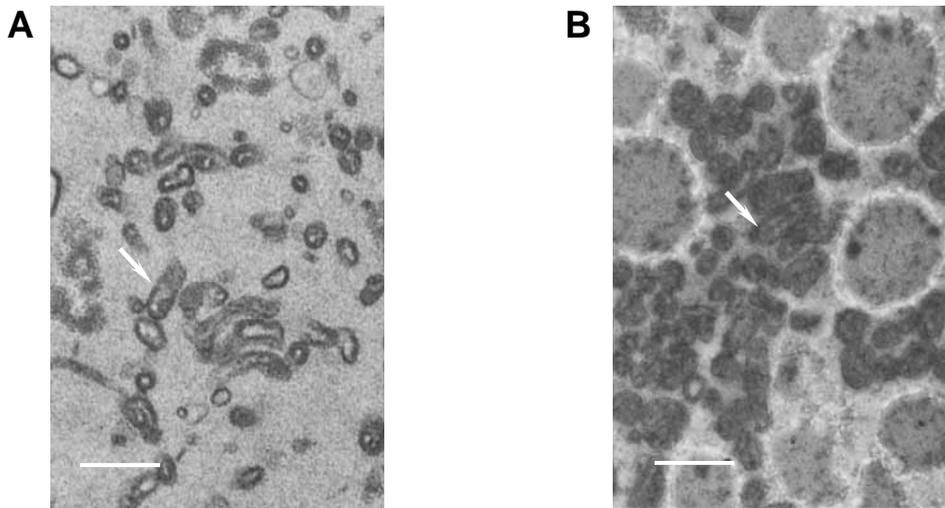


Figure 15 : Photographie en microscopie électronique à transmission de particules à allure virale (VLPs) (flèches) présentes dans les glandes impaires de *Leptopilina boulardi*. **A** : Particules de la souche IS_y. **B** : Particules de la souche IS_m.

Échelle : 500 nm

Photos: C. Labrosse

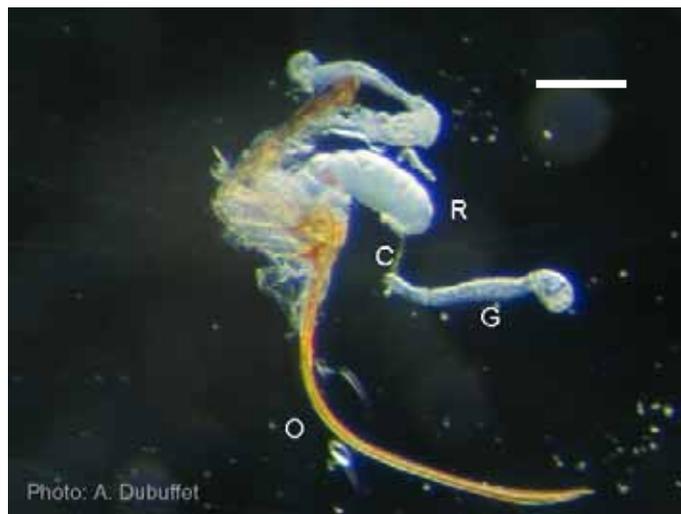


Figure 16 : Photographie d'une glande impaire (glande à venin) du parasitoïde *Leptopilina boulardi*

G: Glande (lobe sécréteur de la glande impaire); R: Réservoir où sont accumulées les produits de la glande; C: Canal reliant la glande au réservoir; O: Ovipositeur

Échelle: 250 μ m

II.2 Stratégies d'immunoévasion locale

Plusieurs types de stratégies d'immunoévasion locale peuvent permettre à un parasitoïde d'échapper à la réponse immunitaire de son hôte sans l'altérer globalement, soit en se camouflant dans les tissus mêmes de l'hôte, soit en se protégeant grâce à des molécules de surface qui vont inhiber localement l'adhésion cellulaire.

II.2.1 Développement dans les tissus de l'hôte

Un type de stratégie connu chez certaines populations de l'espèce *Asobara tabida* consiste pour le parasitoïde à effectuer son **développement dans les tissus de l'hôte**, ce qui le rend inaccessible au système immunitaire des larves de drosophiles. Ce parasitoïde infeste les larves de *D. melanogaster* de 1^{er} et 2^e stade qui continuent alors leur développement jusqu'au stade pupal. Durant ce développement, les œufs du parasitoïde doivent faire face au système immunitaire de la drosophile (Lanot *et al.*, 2001). Grâce aux propriétés adhésives du chorion qui recouvre les œufs, le parasitoïde échappe à la réponse immunitaire de *D. melanogaster* en s'entourant de tissus de l'hôte (Monconduit et Prévost, 1994 ; Eslin *et al.*, 1996 ; Prévost *et al.*, 2005). Il a d'ailleurs été suggéré que le résultat de l'infestation dépendrait d'une 'course' entre la mise en place de la réponse immunitaire et le recouvrement de l'œuf par les tissus de l'hôte (Eslin et Prévost, 2000). D'autres corps étrangers, tels que des gouttes d'huile injectées quelques heures après parasitisme sont encapsulés, confirmant ainsi le caractère local de cette stratégie de virulence (Moreau *et al.*, 2003).

Notons que les œufs du parasitoïde *Leptopilina boulardi* étant parfois observés accolés au tube digestif ou au corps gras de l'hôte *D. melanogaster* (Rizki *et al.*, 1990), observations personnelles), l'emploi de cette stratégie a aussi parfois été suggéré chez cette espèce.

II.2.2 Protection conférée par les molécules à la surface des œufs

L'encapsulation de corps étrangers (billes de sephadex, poils de pinceau...) injectés dans le corps de l'hôte peu après parasitisme alors que l'œuf de parasitoïde n'est pas encapsulé - ce qui signifie que la réponse immunitaire des hôtes est toujours fonctionnelle - a été également observé lors du parasitisme de différents lépidoptères par les parasitoïdes *Macrocentrus cingulum* (Hu *et al.*, 2003), *Cotesia kariyai* (Tanaka, 1987a), *Toxoneuron nigriceps* (Vinson, 1971) ou *Venturia canescens* (Feddersen *et al.*, 1986). De même, les œufs matures des parasitoïdes *Copidosoma floridanum* (Corley et Strand, 2003), *Macrocentrus cingulum* (Hu *et al.*, 2003), *Toxoneuron nigriceps* (Davies et Vinson, 1986), *Venturia canescens* (Salt, 1965 ; Feddersen *et al.*, 1986) ou *Cotesia rubecula* (Asgari et Schmidt, 1994) ne sont habituellement pas encapsulés lorsqu'ils sont artificiellement injectés dans leurs hôtes lépidoptères. Cependant, si la surface de ces œufs est altérée par traitement chimique ou enzymatique

avant leur injection, leur encapsulement peut être observé. Ainsi, chez toutes ces espèces, les œufs présenteraient certaines **caractéristiques de surface** qui empêchent l'élicitation d'une réponse immunitaire, protégeant ainsi localement l'œuf de parasitoïde du système immunitaire de l'hôte.

Chez le braconidé *Cotesia kariyai*, une des protéines constituant les particules virales (CkPDV) injectées lors du parasitisme semble fortement impliquée dans la protection de surface des œufs du parasitoïde (Hayakawa et Yazaki, 1997). Cette protéine d'environ 50kDa, appelée **IEP** (pour *ImmunoEvasive Protein*), peut protéger des surfaces étrangères de l'encapsulement par le lépidoptère *Pseudoplusia separata*. De plus, des œufs du parasitoïde neutralisés avec un anticorps dirigé contre cette protéine ne sont plus protégés de l'encapsulement (Tanaka *et al.*, 2002). Cette protéine, riche en cystéines, est codée par le génome de la guêpe (et non par le génome présent dans les particules du PDV) et est exprimée dans les cellules du calice peu après l'initiation de l'expression des protéines de capsid des CkPDV (Tanaka *et al.*, 2002). De même, chez *Cotesia rubecula*, la protéine **Crp32** produite dans les cellules du calice recouvre les œufs durant leur passage dans l'oviducte et les protège par la suite de l'encapsulement. En effet, une bille de résine recouverte de la protéine recombinante Crp32 est protégée de l'encapsulement (Asgari *et al.*, 1998). Cette protéine, bien que reconnue par les anticorps dirigés contre les particules virales (Asgari et Schmidt, 1994), est probablement codée par le génome des femelles parasitoïdes puisqu'aucun ADN codant pour cette protéine n'a été retrouvé dans les particules virales (Asgari *et al.*, 1998). Enfin, les œufs du Braconidé *Toxoneuron nigriceps* possèdent une enveloppe glycoprotéique fibreuse qui leur permettrait d'éviter l'encapsulement par le lépidoptère *Heliothis virescens* (Davies et Vinson, 1986).

Plusieurs facteurs semblent protéger localement les œufs de l'ichneumonidé *Venturia canescens* (Schmidt *et al.*, 2001). Les premiers qui furent décrits furent leurs VLPs. Ces **VLPs** sont produits par les cellules du calice et recouvrent les œufs lors de leur sortie des ovarioles (Rotheram, 1967 ; Bedwin, 1979 ; Feddersen *et al.*, 1986). L'attachement de ces VLPs à la surface des œufs de *Venturia canescens* semble leur conférer une protection contre les défenses immunitaires de l'hôte *Ephestia kuehniella* (Feddersen *et al.*, 1986). Une deuxième protection est conférée par des **composants du fluide du calice**, qui altèrent *in vitro* l'étalement des hémocytes et la mélanisation (Beck *et al.*, 2000). La réaction d'encapsulement de corps étrangers inertes étant par ailleurs intacte suite au parasitisme (Feddersen *et al.*, 1986), les auteurs ont émis l'hypothèse que la protection conférée par le fluide du calice est probablement locale et transitoire. L'ajout de l'inhibiteur de protéase à sérine p-APMSF permettant d'obtenir la même inhibition de l'activité PO et de l'étalement des hémocytes, l'hypothèse de la présence d'une serpine dans le fluide du calice de *V. canescens* a été posée (Beck *et al.*, 2000). Enfin, Kinuthia *et al.* (1999) ont isolé une **mucine** à la surface de l'œuf du parasitoïde, très similaire à une hémomucine présente chez *D. melanogaster* et qui serait également présente chez l'hôte *Ephestia kuehniella*. Cette hémomucine capte les lipophorines présentes dans l'hémolymphe de l'hôte, formant ainsi un complexe

lipophorine-hémomucine (Kinuthia *et al.*, 1999). Il a été montré par ailleurs que les hémocytes de blatte n'adhèrent pas aux surfaces recouvertes de lipophorines (Coodin et Caveney, 1992). Ainsi, le complexe formé entre la mucine recouvrant la surface de l'œuf et les lipophorines de l'hôte pourrait protéger l'œuf de parasitoïde de l'encapsulation (Kinuthia *et al.*, 1999). L'ensemble de ces résultats indiquent que l'échec des hémocytes de l'hôte à encapsuler les œufs de *Venturia canescens* serait dû à une inhibition locale de la fonction hémocytaire plutôt qu'à un mimétisme moléculaire des surfaces de l'hôte, contrairement à ce qui avait été suggéré précédemment (Schmidt et Schuchmann-Feddersen, 1989 ; Schmidt *et al.*, 1990)

II.2.3 Protection conférée par la surface des larves

La protection des parasitoïdes est généralement décrite au niveau des œufs mais quelques rares exemples relatent une protection localisée à la surface des larves de parasitoïdes.

Chez l'ichneumonidé *Venturia canescens*, **l'hémomucine** observée à la surface des œufs est aussi observée à la surface de la larve (Kinuthia *et al.*, 1999). Les auteurs de cette étude ont suggéré que les lipophorines de l'hôte pourraient entrer dans l'œuf durant l'embryogenèse au travers du micropyle (orifice externe observé généralement à un pôle de l'œuf), protégeant ainsi la larve après son éclosion (Kinuthia *et al.*, 1999)

Une protection localisée à la surface des larves de parasitoïde a aussi été invoquée chez le parasitoïde *Cotesia congregata*. Les larves de *C. congregata* peuvent réussir leur développement lorsqu'elles sont transférées dans des chenilles de *Manduca sexta* saines (c'est à dire n'ayant pas subi les effets des facteurs injectés lors de la ponte tels que les PDVs), alors que des œufs injectés dans les mêmes chenilles sont encapsulés (Lavine et Beckage, 1996). Ces résultats suggèrent que des facteurs protecteurs localisés à la surface des larves de *C. congregata* pourraient inhiber localement la réponse immunitaire des chenilles hôtes.

De même, une telle protection pourrait être invoquée chez le parasitoïde *Chelonus inanitus* (Stettler *et al.*, 1998). Ce parasitoïde dépose ses œufs dans ceux du lépidoptère *Spodoptera littoralis* qui continue son développement jusqu'au 5^e stade larvaire. Le parasitoïde se développe ainsi d'abord dans un hôte immunodéficient (l'œuf de lépidoptère), puis dans des chenilles capables de mettre en place une réponse immunitaire. Lorsque des billes de latex sont injectées en même temps que des larves de parasitoïdes dans des chenilles parasitées par des femelles ayant été exposées à des rayons-X (qui n'injectent ainsi que des œufs stériles avec leurs PDVs et leurs venins), l'encapsulation des billes de latex est observée, tandis que les larves de parasitoïde sont indemnes et poursuivent leur développement. Cette protection des larves n'est cependant pas obtenue lorsqu'elles sont implantées dans des chenilles saines. Ces résultats indiquent ainsi que la réponse immunitaire des chenilles *S. littoralis* est globalement intacte suite à l'injection des PDVs et du venin, et que les propriétés de surface de la larve, agissant en synergie avec des composants du venin et/ou des PDVs inhibent localement son encapsulement (Stettler *et al.*, 1998).

II.3 Stratégies d'immunosuppression systémique

L'altération globale de la réaction d'encapsulation (aussi appelée **immunosuppression**) est une stratégie de virulence largement employée par les parasitoïdes. Les effets sous-jacents à l'inhibition globale des capacités de l'hôte à encapsuler un corps étranger sont généralement liés à l'altération de la réponse cellulaire et/ou à l'inhibition de l'activité phénoloxydase par les facteurs injectés lors de l'oviposition.

Chez les parasitoïdes porteurs de polydnavirus, l'inhibition de l'encapsulation est souvent attribuée aux PDVs injectés lors de l'oviposition (Lavine et Beckage, 1995 ; Strand et Pech, 1995b ; Beckage, 1998 ; Schmidt *et al.*, 2001). Ainsi, chez les parasitoïdes *Campoletis sonorensis* (Edson *et al.*, 1981), *Cotesia congregata* (Beckage *et al.*, 1994) et *Microplitis demolitor* (Strand et Noda, 1991), l'injection de virus purifié reproduit les effets du parasitisme en protégeant des billes de sephadex injectées dans l'hôte de l'encapsulation. D'autres facteurs, comme des venins ou des protéines ovariennes peuvent améliorer l'action des PDVs, voire même être essentiels à la mise en échec de la réponse immunitaire. Chez *Microplitis demolitor* par exemple, l'action conjointe du venin et du fluide du calice a un effet plus important sur l'immunité de l'hôte *Pseudaletia includens* que l'action seule du fluide du calice contenant les PDVs (Strand et Noda, 1991). De même, des venins chez *C. kariyai* (Tanaka, 1987b) ou des protéines ovariennes chez *C. sonorensis* altèrent la réponse immunitaire des hôtes durant les premières heures du parasitisme, avant que l'expression des gènes viraux soit effective (Webb et Luckhart, 1994 ; Luckhart et Webb, 1996 ; Webb et Luckhart, 1996). Enfin, des protéines de venin, comme le peptide Vn1.5 de *C. rubecula*, peuvent être essentielles à l'expression des polydnavirus (Zhang *et al.*, 2004b).

L'inhibition de l'encapsulation est aussi observée chez de nombreux parasitoïdes dépourvus de PDVs et produisant ou non des VLPs, parmi lesquels des parasitoïdes de drosophile. Ainsi, le parasitisme de *Leptopilina heterotoma* (Nappi, 1975 ; Nappi, 1977 ; Rizki *et al.*, 1990), *Leptopilina victoriae* (Morales *et al.*, 2005) et *Ganaspis xanthopoda* (Chiu *et al.*, 2000) diminue significativement la formation de tumeurs mélanisées des souches tumorales de *D. melanogaster*. De même, le parasitoïde *Pseudocoila mellipes*, normalement encapsulé par les larves de *D. melanogaster*, est protégé de l'encapsulation si les larves sont infestées au préalable par *Leptopilina heterotoma* (Streams et Greenberg, 1969). Enfin, le parasitoïde *Asobara citri* réduit significativement la proportion de gouttes de paraffine encapsulées par les larves de *D. melanogaster* (Moreau *et al.*, 2003).

L'inhibition de l'encapsulation par le parasitoïde *Leptopilina bouvardi* est en comparaison moins prononcée et pourrait dépendre du stade d'activation de la réponse immunitaire au moment de l'oviposition. Dans une première étude, réalisée par Rizki *et al.* (1990), la souche tumorale *tu-W*, présentant un nombre élevé de lamellocytes adhésifs, a été employée. 98%

des larves non parasitées de cette souche forment spontanément des tumeurs mélanisées. Ce pourcentage tombe à moins de 6% lorsque les larves sont parasitées par *L. heterotoma*, mais est de 100% avec *L. bouleardi*, suggérant ainsi aux auteurs l'emploi d'une stratégie de virulence passive par cette espèce. Ce résultat n'a été confirmé qu'en partie par Labrosse *et al.* (2003). Dans cette étude, la souche tumorale *hop^{Tum-1}* présentant un nombre élevé de lamellocytes, à l'origine de la formation des tumeurs mélanisées, a été employée. Bien que le pourcentage de larves présentant des tumeurs ne soit pas significativement différent entre les lots de larves parasitées et les lots de larves non parasitées, la mélanisation de ces tumeurs semble cependant affectée. En effet, celles-ci sont moins souvent mélanisées dans les lots de larves ayant subi le parasitisme. Au cours de la même étude, l'effet du parasitisme d'une lignée "virulente" de *L. bouleardi* (lignée IS_m) sur la capacité à encapsuler une lignée "avirulente" de la même espèce (lignée IS_y), habituellement encapsulée, a aussi été testé (Figure 17). Dans des conditions de simple infestation, plus de 80% des œufs de la lignée "avirulente" de *L. bouleardi* sont encapsulés par les larves résistantes de *D. melanogaster*, tandis qu'aucun œuf de la lignée virulente de *L. bouleardi* n'est encapsulé. Au cours de cette étude, les auteurs ont montré qu'en condition de multiparasitisme, les œufs du parasitoïde "avirulent" sont complètement protégés de l'encapsulation par la ponte de femelles de la lignée virulente, ce qui démontre une immunosuppression systémique (Labrosse *et al.*, 2003). Enfin, une inhibition de la formation de tumeurs par le parasitoïde *L. bouleardi* a été obtenue avec une souche mutante pour les gènes *Black Cell* et *modulo*, présentant des tumeurs spontanées autour de tissus se développant anormalement, comme le corps gras ou les glandes lymphatiques (Nappi *et al.*, 2004b). Cette inhibition est cependant assez faible, puisque le pourcentage de larves présentant des tumeurs passe de 100% chez les larves saines à 80% chez les larves parasitées. De plus, l'inhibition de la formation de tumeurs est obtenue lorsque le parasitisme est effectué sur des larves de 50 heures, mais elle est inexistante lorsque des larves plus âgées sont parasitées. L'ensemble de ces résultats suggère une inhibition des capacités d'encapsulation des larves de *D. melanogaster* par le parasitisme de *L. bouleardi*, mais dont l'efficacité pourrait dépendre par exemple du nombre de lamellocytes présents dans les larves au moment de l'oviposition.

II.3.1 Altération de la réponse cellulaire

Les altérations de la réponse cellulaire peuvent être de différentes natures. Elles peuvent affecter l'organe producteur d'hémocytes (organe hématopoïétique), perturbant ainsi la prolifération cellulaire habituellement observée après infestation, et/ou directement les hémocytes circulants, assez souvent par un phénomène d'apoptose. Ces effets peuvent toucher toutes les catégories cellulaires ou cibler spécifiquement un type hémocytaire. Des modifications du cytosquelette des hémocytes sont par ailleurs fréquemment observées, souvent corrélées avec l'altération de la capacité des hémocytes à s'étaler sur une surface étrangère.

Le nombre total d'hémocytes (**THC**, *Total Hemocytes Count*) après parasitisme peut soit diminuer par rapport au contrôle non parasité, indiquant alors une altération de la réponse cellulaire par le parasitoïde, ou au contraire être augmenté. Dans ce cas, l'augmentation du THC, due à la prolifération cellulaire résultant de la reconnaissance du parasitoïde comme corps étranger, peut masquer la diminution d'un ou plusieurs types spécifiques d'hémocytes ciblés lors du parasitisme.

- Parasitoïdes porteurs de PDVs

L'altération du THC est un phénomène souvent observé chez les hôtes parasités par des parasitoïdes porteurs de PDVs (Stettler *et al.*, 1998). La diminution du THC se produit par exemple suite à l'infestation par *Camponotus sonorensis* (Davies *et al.*, 1987 ; Davies et Vinson, 1988), *Toxoneuron nigriceps* (Vinson, 1971), *Cotesia melanoscela* (Guzo et Stoltz, 1987), ou *Cotesia kariyai* (Teramoto et Tanaka, 2004). Chez *C. kariyai*, la diminution du THC est attribuée au venin dans les premières heures qui suivent l'infestation, puis à l'action des PDVs dont les gènes sont exprimés 4 heures après l'infestation (Teramoto et Tanaka, 2004). La diminution du THC observée chez *C. kariyai* semble due à l'**apoptose** des hémocytes circulants induite par les PDVs injectés. En effet, 6 heures après infestation, l'ADN des hémocytes présente un profil en échelle, signe typique d'une digestion de l'ADN associée à l'apoptose (Teramoto et Tanaka, 2004). Cette dégradation apoptotique de l'ADN est aussi induite chez les granulocytes de *Pseudoplusia includens* 12 heures après l'injection du PDV de *Microplitis demolitor* (Strand et Pech, 1995a). Les cellules apoptotiques présentent alors des caractéristiques de surface particulières, similaires à celles induites par le PDV de *Cotesia congregata* (Lavine et Beckage, 1996 ; Amaya *et al.*, 2005). La **prolifération cellulaire** peut aussi être la cible de l'immunosuppression. Ainsi, le PDV de *C. kariyai* bloque les mitoses des hémocytes circulants et affecte également directement l'organe hématopoïétique, réduisant ainsi le nombre d'hémocytes relâchés lors de l'infection (Teramoto et Tanaka, 2004). Enfin, un type précis d'hémocytes est souvent la cible de l'immunosuppression. Chez *C. sonorensis* par exemple, la diminution du THC observée est principalement due à une diminution importante du nombre de plasmatocytes (Davies *et al.*, 1987 ;

Davies et Vinson, 1988). De même, une diminution spécifique du nombre de plasmatoctes et de granulocytes est observée lors du parasitisme par *M. demolitor* chez *P. includens*. Cette diminution est cependant masquée par l'augmentation du nombre total d'hémocytes (Gardiner et Strand, 1999 ; Strand *et al.*, 1999).

L'inhibition des capacités des hémocytes à s'étaler sur les surfaces étrangères est également un phénomène couramment observé lors du parasitisme par les parasitoïdes porteurs de PDVs. Chez *Pseudoplusia includens* parasité par *Microplitis demolitor*, par exemple, le comportement d'étalement des plasmatoctes et des granulocytes est fortement altéré par l'action du PDV (Strand et Noda, 1991 ; Strand *et al.*, 1999). Plus précisément, deux études *in vitro* ont permis de mettre en évidence le rôle du gène **Glc1.8** du PDV de *M. demolitor* dans l'inhibition de l'étalement hémocytaire (Beck et Strand, 2003, 2005). L'inhibition de l'expression de ce gène par la technique d'interférence de l'ARN permet de restaurer les capacités d'adhésion des cellules High Five du lépidoptère *Trichoplusia ni* (Beck et Strand, 2003). De même, l'expression du gène Glc1.8 recombinant réduit la capacité de ces cellules à adhérer aux surfaces étrangères, mimant ainsi les effets de l'infection par le PDV (Beck et Strand, 2005).

Enfin, l'**altération du cytosquelette d'actine** des hémocytes, ainsi que l'inhibition consécutive de leurs capacités d'étalement peut également être observée.

Cette aberration d'organisation du cytosquelette est observée par exemple chez le lépidoptère *Heliothis virescens* parasité par *Campoletis sonorensis* (Webb et Luckhart, 1994 ; Webb et Luckhart, 1996). Lors du parasitisme par *C. sonorensis*, le cytosquelette des plasmatoctes et des granulocytes est d'abord altéré par l'effet de **protéines ovariennes** de 29 à 36 kDa 1h30 après l'infection (Webb et Luckhart, 1994 ; Luckhart et Webb, 1996 ; Webb et Luckhart, 1996), puis par les protéines exprimées par les PDVs (Webb et Luckhart, 1996 ; Turnbull *et al.*, 2004). Les protéines ovariennes semblent agir sur les hémocytes en y entrant par endocytose 30 minutes après l'infestation, altérant le comportement d'étalement des hémocytes pour une durée de 24 heures. Ces protéines sont les glycoformes d'une même protéine de 29kDa synthétisée dans les cellules du calice et codée par le génome du parasitoïde (Luckhart et Webb, 1996). Le virus CsPDV inhibe ensuite l'étalement des hémocytes du 2^e au 5^e jour après l'infection (Luckhart et Webb, 1996) en induisant des changements dans le cytosquelette des plasmatoctes et des granulocytes (Webb et Luckhart, 1996). Une protéine de 30kDa, riche en motifs cys et codée par le gène **VHv1.1** de CsPDV, semble fortement impliquée dans l'altération de la fonction hémocytaire puisque l'expression de cette protéine en système baculovirus inhibe l'encapsulation de corps étrangers habituellement encapsulés (Li et Webb, 1994).

L'altération du cytosquelette des hémocytes, corrélée à un changement de leurs propriétés d'adhésion, est également observée chez *Pieris rapae* dès 6 heures après l'infestation par *Cotesia rubecula*, au

moment où l'expression du PDV est observée (Asgari *et al.*, 1996 ; Asgari *et al.*, 1997). Cette inhibition n'est cependant que transitoire puisque les hémocytes isolés de chenilles parasitées depuis 2 jours sont impossibles à distinguer des hémocytes de chenilles non parasitées (Asgari *et al.*, 1997). Une des protéines codées par le PDV, une glycoprotéine sécrétée, **CrV1**, est sécrétée par les hémocytes infectés et le corps gras dans l'hémolymphe, où elle interagit avec la surface des hémocytes. Il semble que l'internalisation de CrV1 soit alors dépendante de sa dimérisation, requise pour son interaction avec des lipophorines, suggérant une internalisation du complexe CrV1-lipophorine (Schmidt *et al.*, 2005). L'effet de CrV1 est une altération du cytosquelette des hémocytes, ainsi que l'inhibition transitoire des changements de surface des hémocytes habituellement observés lors d'une réaction immunitaire. Cette modification de surface implique notamment l'exposition de sites fixant des lectines (Asgari *et al.*, 1997). La déstabilisation des filaments d'actine par la protéine CrV1, suite à son interaction avec des lipophorines présentes dans le plasma de l'hôte, induit ainsi l'inhibition de l'activation des hémocytes (Asgari et Schmidt, 2002 ; Schmidt *et al.*, 2005).

L'expression de la protéine **homologue à CrV1** chez l'hôte *Manduca sexta* parasité par *Cotesia congregata* semble au contraire durable. En effet, des transcrits de ce gène sont détectés dans le corps gras et les hémocytes de la chenille dès 4 heures après l'infestation et jusqu'à l'émergence des parasitoïdes (Amaya *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'altération de la morphologie des hémocytes est détectée chez les chenilles *M. sexta* parasitées par *C. congregata* 24 heures après parasitisme. Les hémocytes sont amassés en paquets, présentent des caractéristiques spécifiques des cellules apoptotiques et ont un cytosquelette complètement désorganisé par rapport aux hémocytes de chenilles saines.

L'ensemble de ces études suggère que chez les parasitoïdes porteurs de PDVs, la suppression de la réponse immunitaire est en large majorité induite par des facteurs codés par les PDVs et exprimés dans les chenilles lors du parasitisme.

- *Parasitoïdes de drosophiles*

Les altérations de la fonction hématocytaire sont aussi largement utilisées par les parasitoïdes de larves de drosophile, avec des effets sur le nombre total d'hématocytes ou sur un type particulier d'hématocytes.

Les larves de *D. melanogaster* parasitées par le parasitoïde *Asobara citri* par exemple, présentent un nombre de plasmatocytes et de lamellocytes réduit par rapport aux larves non parasitées (Moreau *et al.*, 2003). Les lobes antérieurs de l'organe hématopoïétique semblent par ailleurs affectés. Ces lobes sont connus pour produire de fortes quantités d'hématocytes lors de la réaction immunitaire d'encapsulation (Lanot *et al.*, 2001) (I.2.1, p17). Lors du parasitisme par le parasitoïde *A. citri*, ces lobes antérieurs sont absents, alors qu'ils sont gonflés lors du parasitisme par *Asobara tabida*, qui emploie une stratégie de virulence locale (donc non-invasive pour le système immunitaire) (Moreau *et al.*, 2003). Les auteurs de l'étude n'ayant par ailleurs décelé aucune pathologie hématocytaire ou trace d'apoptose, la diminution du nombre d'hématocytes dans les larves de drosophiles après parasitisme par le parasitoïde *A. citri* a été attribuée à une **altération de l'organe hématopoïétique**.

L'altération de l'organe hématopoïétique n'est pas cependant toujours corrélée à une diminution du nombre d'hématocytes. L'atrophie complète de l'organe hématopoïétique a été observée chez les larves de *D. melanogaster* parasitées par *Leptopilina heterotoma* alors qu'une augmentation du THC est observée (Nappi et Streams, 1969 ; Chiu *et al.*, 2000 ; Vass et Nappi, 2000). Suite au parasitisme, les lobes antérieurs disparaissent complètement et seuls des vestiges des lobes postérieurs subsistent. La suppression de lobes de l'organe hématopoïétique est également observée suite au parasitisme par *Leptopilina victoriae* ou *Ganaspis xanthopoda*, mais est absente lors du parasitisme par la souche "avirulente" IS_y de *L. bouvardi* (Chiu *et al.*, 2000 ; Chiu et Govind, 2002). Cette suppression semble associée à l'**apoptose** détectée dans les glandes hématopoïétiques des drosophiles parasitées par *L. heterotoma* ou *L. victoriae* (Chiu et Govind, 2002).

Les 3 espèces de parasitoïdes du genre *Leptopilina* étudiées à ce jour induisent une **modification de la forme des lamellocytes** de leur hôte *D. melanogaster*. Une proportion variable de lamellocytes, habituellement de forme discoïdale, adoptent une conformation de type bipolaire lorsqu'ils sont parasités par *L. heterotoma* (Rizki et Rizki, 1984 ; Rizki *et al.*, 1990 ; Rizki et Rizki, 1994) ou *L. bouvardi* (Rizki *et al.*, 1990 ; Russo *et al.*, 2001 ; Labrosse *et al.*, 2005a) (Figure 18). Le cytosquelette des cellules semble totalement destructuré dans les lamellocytes altérés par *L. heterotoma* (Rizki et Rizki, 1994), ce qui semble réduire fortement les capacités des lamellocytes à adhérer aux surfaces étrangères et pourrait même induire la lyse de ces cellules (Rizki et Rizki, 1991). Les facteurs contenus dans la glande impaire, associée à l'appareil génital des femelles, sont responsables de ces effets.

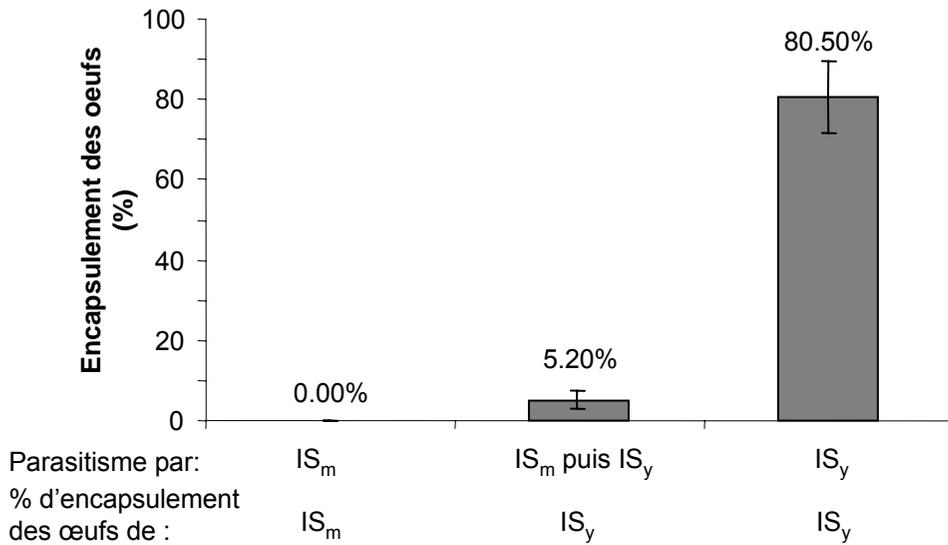


Figure 17 : Suppression systémique de la capacité des larves de *Drosophila melanogaster* à encapsuler un corps étranger par le parasitoïde *Leptopilina boulardi*.

Les œufs de la lignée virulente IS_m (ou G431) ne sont pas encapsulés par les larves hôtes de la lignée résistante de référence, contrairement aux œufs de la lignée avirulente IS_y (ou G486). Lors de doubles infestations des larves par la lignée IS_m puis la lignée IS_y, les œufs de la lignée IS_y sont protégés de l'encapsulation par la lignée IS_m.

D'après Labrosse et al., 2003

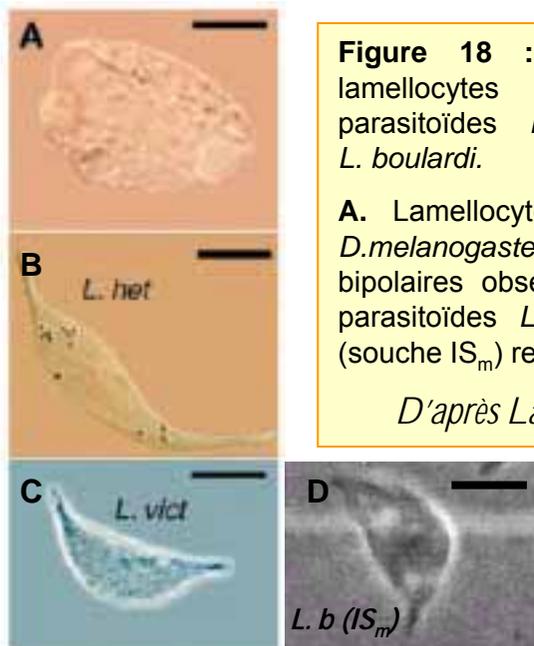


Figure 18 : Modification de la morphologie des lamellocytes de *Drosophila melanogaster* par les parasitoïdes *Leptopilina heterotoma*, *L. victorise* et *L. boulardi*.

A. Lamellocyte normal, observé dans une larve de *D.melanogaster* non parasitée; **B. C. D.** Lamellocytes bipolaires observés dans une larves parasitées par les parasitoïdes *L. heterotoma*, *L. victorise* et *L. boulardi* (souche IS_m) respectivement.

D'après Labrosse et al., 2005a et Chiu & Govind 2002

L'injection de ces facteurs à des larves saines de *D. melanogaster* induit en effet la modification des lamellocytes circulants (Rizki et Rizki, 1984 ; Labrosse *et al.*, 2005a). De même, ces effets peuvent être obtenus *in vitro* avec les facteurs contenus dans la glande impaire du parasitoïde *L. victoriae* (Morales *et al.*, 2005) ou de *L. heterotoma* (Rizki et Rizki, 1990a, b, 1991). Enfin, il a été récemment démontré que l'injection d'extraits de glande impaire de *L. boulandi* dans des larves résistantes de *D. melanogaster* réduit fortement leurs capacités à encapsuler la souche "avirulente" de la même espèce (lignée IS_y), confirmant ainsi le rôle immunosuppresseur des facteurs contenus dans cette glande impaire (Labrosse *et al.*, 2003).

L'analyse des différentes fractions obtenues en gradient de centrifugation à partir de la glande impaire de *L. heterotoma* a permis à Rizki et Rizki (1990a) d'identifier la nature des facteurs agissant sur la forme des lamellocytes de *D. melanogaster*. Sur l'ensemble des fractions obtenues, une seule leur a permis de reproduire *in vitro* les effets du parasitisme (ou du contenu complet de la glande impaire) sur la morphologie des lamellocytes. L'analyse en microscopie électronique de cette fraction a révélé la présence de particules d'allure virale (VLPs), qui sont depuis considérées comme les facteurs responsables de l'immunosuppression chez les parasitoïdes du genre *Leptopilina*. Ces VLPs sont aussi observés dans les glandes impaires des espèces *L. victoriae* et *L. boulandi* (Dupas *et al.*, 1996 ; Morales *et al.*, 2005). Les analyses en microscopie électronique suggèrent que les VLPs adhèrent aux surfaces des lamellocytes par leurs extensions, puis entrent dans ces hémocytes afin d'altérer leur morphologie (Rizki et Rizki, 1990a ; Chiu *et al.*, 2006). Les premiers lamellocytes allongés apparaissent chez *D. melanogaster* dès 90 minutes après parasitisme par *L. heterotoma*. Ils représentent environ 1/3 du nombre total d'hémocytes dans les heures qui suivent. 98% des lamellocytes sont affectés par cette modification 3 heures après le parasitisme par *L. heterotoma* (Rizki et Rizki, 1984). Ce pourcentage est cependant bien moins important lors du parasitisme par *L. boulandi*. En effet, le pourcentage de lamellocytes affectés n'est que d'environ 10% 6 heures après l'infestation et ne dépasse ensuite jamais les 60% (Russo *et al.*, 2001).

Les contenus protéiques des glandes impaires de *L. boulandi*, *L. heterotoma* et *L. victoriae* ont été récemment analysés (Labrosse *et al.*, 2005b ; Chiu *et al.*, 2006).

Quatre bandes protéiques majeures sont observées en conditions natives chez les femelles *L. boulandi* des lignées IS_m et G301-1, virulentes sur l'hôte *D. melanogaster*. Ces bandes protéiques sont par contre absentes du profil protéique de la souche IS_y, avirulente sur cette espèce hôte (Figure 19). Le contenu de chaque bande protéique a ensuite été élué et injecté dans des larves de *D. melanogaster* afin de tester le rôle des différentes fractions protéiques dans la suppression des capacités immunitaires des larves de drosophile. Le taux d'encapsulation des œufs de la souche avirulente IS_y, normalement élevé, est réduit suite à l'injection des bandes 1, 3 et 4. Cependant, seule l'injection de la bande 4 (notée **P4**) reproduit

complètement les effets du parasitisme de la souche virulente IS_m sur la suppression de l'encapsulation (Labrosse *et al.*, 2005b) (Figure 19). De plus, l'injection de la bande protéique P4 à des larves de drosophiles permet d'induire une modification de la forme des lamellocytes dans des proportions similaires à celles obtenues avec l'injection du contenu total de la glande impaire (Labrosse *et al.*, 2005a). L'analyse moléculaire de la bande protéique P4 a permis d'identifier une protéine de 35kDa possédant un domaine **Rho-GAP** (pour *Ras homologous GTPase Activating Protein*) (Labrosse *et al.*, 2005b) Dans les cellules eucaryotes, les protéines Rho-GTPase contrôlent l'adhésion, la motilité et la morphologie cellulaire en régulant la dynamique du cytosquelette d'actine (Ridley, 2001). Ces protéines, actives sous leur forme GTP et inactives sous leur forme GDP, peuvent être rendues inactives par les protéines Rho-GAPs. Grâce à son domaine Rho-GAP, la protéine P4 est ainsi potentiellement capable d'induire des modifications du cytosquelette et donc de la morphologie et des propriétés adhésives des cellules de l'hôte *D. melanogaster*. Ces symptômes prédits sont effectivement observés lors de l'injection de la protéine P4 de *L. bouvardi* dans des larves de *D. melanogaster*, ce qui confirme le rôle de cette protéine dans l'altération de la réponse cellulaire induite par le parasitisme (Labrosse *et al.*, 2005a). L'emploi d'anticorps dirigés contre cette protéine a révélé récemment sa localisation au niveau des VLPs, ce qui confirme le rôle de ces structures dans la modification de la morphologie des lamellocytes (Labrosse, 2003).

Les analyses en conditions dénaturantes des protéines constituant les VLPs purifiés en gradient de sucrose chez *L. heterotoma* et *L. victoriae* ont révélé la présence de quatre bandes majeures chez *L. heterotoma* et de huit chez *L. victoriae* (Chiu *et al.*, 2006). L'une des protéines de *L. heterotoma*, p40, semble être associée à la modification de la forme des lamellocytes puisque l'utilisation de l'anticorps dirigé contre cette protéine bloque *in vitro* la capacité des VLPs de *L. heterotoma* à induire la lyse des lamellocytes. Les VLPs de *L. victoriae* sont de même incapables d'induire la lyse des lamellocytes en présence de cet anticorps. L'une des protéines de *L. victoriae*, p47.5, étant reconnue par l'anticorps anti-p40, une homologie des protéines p40 et p47.5 a été suggérée par les auteurs de l'étude. Ces protéines seraient donc toutes deux impliquées dans la lyse des lamellocytes de *D. melanogaster*. Aucune protéine n'est en revanche révélée dans les glandes impaires de la lignée IS_y de *L. bouvardi* en utilisant l'anticorps p40 (Chiu *et al.*, 2006), de même que l'anticorps dirigé contre la protéine P4 de *L. bouvardi* ne révèle aucune protéine dans les glandes impaires de *L. heterotoma* ou *L. victoriae* (Poirié, communication personnelle). Tout porte à croire que des facteurs de virulence apparemment différents (P4 d'une part, p40 et p47.5 d'autre part) induisent le même type d'effets sur les lamellocytes de l'hôte *D. melanogaster*.

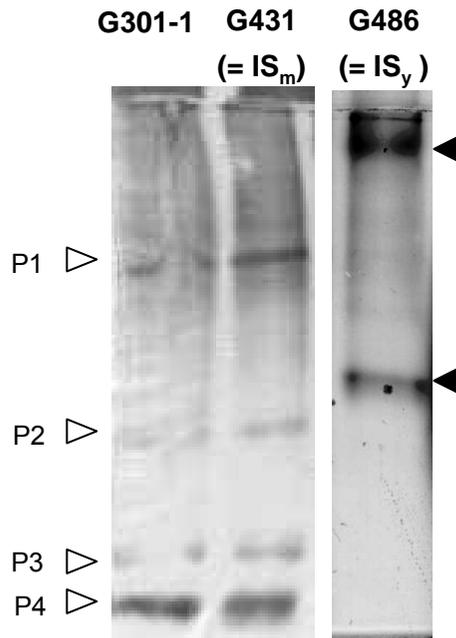


Figure 19 : Profils protéiques (PAGE Natif) des glandes impaires des lignées virulentes G301-1 et G431 (=IS_m) et de la lignée avirulente G486 (=IS_y) du parasitoïde *Leptopilina boulardi*.

Les têtes de flèche blanches indiquent les 4 bandes majeures présentes dans les lignées virulentes avec le nom correspondant. Les têtes de flèche noires indiquent 2 bandes majeures de la lignée avirulente IS_y.

D'après Labrosse et al., 2005b

Un des aspects “typiques” de la stratégie d'immunosuppression employée par les parasitoïdes du genre *Leptopilina* consiste donc en l'altération de la morphologie des lamellocytes et ainsi que de leur capacité d'adhésion par des facteurs contenus dans la glande impaire qui agirait sur les filaments d'actine du cytosquelette des lamellocytes. Ces modifications peuvent éventuellement précéder une destruction cellulaire, entraînant ainsi une diminution du nombre de lamellocytes en circulation. En effet, chez les larves de *D. melanogaster* parasitées par *L. heterotoma*, le nombre de lamellocytes est considérablement réduit par rapport au témoin non parasité (Walker, 1959a ; Nappi et Streams, 1969 ; Rizki et Rizki, 1984). Le nombre de lamellocytes est aussi réduit chez les larves de *D. melanogaster* parasitées par les femelles *L. bouvardi* de la lignée virulente, en comparaison avec les larves parasitées par les femelles avirulentes, mais est tout de même plus élevé que dans les larves témoin non parasitées (Russo *et al.*, 2001 ; Labrosse *et al.*, 2005a). L'injection du facteur P4 n'induisant pas de diminution du nombre de lamellocytes, il semblerait qu'un autre facteur de virulence soit à l'origine de cet effet (Labrosse *et al.*, 2005a).

Enfin, la **destruction des plasmatocytes par apoptose** peut aussi être induite lors du parasitisme (Chiu et Govind, 2002). Lorsque le contenu de la glande impaire de *L. heterotoma* est mis en contact des hémocytes circulants de *D. melanogaster*, plus de 30% des hémocytes réagissent positivement au marquage TUNEL, spécifique des cellules apoptotiques. Les plasmatocytes sont spécifiquement ciblés par ce phénomène puisque plus de 90% des cellules apoptotiques sont des plasmatocytes. Peu de lamellocytes réagissent par contre positivement au marquage TUNEL, ce qui indique que le phénomène d'apoptose n'est pas à l'origine de la lyse de ces cellules. Les VLPs (et en particulier la protéine p40) étant détectées dans des vésicules dans les plasmatocytes mais libres dans le cytoplasme des lamellocytes, les différences d'effets induits par les VLPs sur chacun de ces 2 types cellulaires pourraient être liées à leur localisation dans ces hémocytes (Rizki et Rizki, 1990a ; Chiu *et al.*, 2006).

II.3.2 Altération de l'activité phénoloxydase et/ou de la mélanisation

Le succès parasitaire apparaît très souvent lié à l'inhibition de la mélanisation des corps étrangers. Cette stratégie est bien connue chez les parasitoïdes porteurs de PDVs, comme *Cotesia congregata* (Beckage *et al.*, 1990), *Cotesia rubecula* (Zhang *et al.*, 2004a), *Campoletis sonorensis* (Stoltz et Cook, 1983 ; Shelby *et al.*, 2000) ou *Microplitis demolitor* (Strand et Noda, 1991). La réduction de la mélanisation est observée par exemple chez les chenilles de *Manduca sexta* parasitées par *C. congregata* (Dushay et Beckage, 1993 ; Beckage *et al.*, 1994) et chez les chenilles de *Heliothis virescens* parasitées par *C. sonorensis* (Stoltz et Cook, 1983). Cette inhibition de la mélanisation est généralement liée à l'inhibition de l'enzyme phénoloxydase (PO), mais est dans certains cas corrélée à l'inhibition d'autres enzymes impliquées dans la voie de synthèse de la mélanine.

L'inhibition de l'activité PO observée suite au parasitisme par *C. congregata*, *M. demolitor* ou *C. sonorensis* est directement liée à l'action de leurs PDVs. Dans les 3 cas, l'injection du virus purifié permet de reproduire les effets du parasitisme sur l'inhibition de l'activité PO (Beckage *et al.*, 1990 ; Strand et Noda, 1991 ; Shelby *et al.*, 2000). L'inhibition de la mélanisation provoquée par le PDV associé à l'ichneumonidé *C. sonorensis* est due à la diminution de l'activité de différentes enzymes clef de la voie de synthèse de mélanine dans le plasma de la chenille hôte *H. virescens* (Shelby *et al.*, 2000).

Les effets des PDVs peuvent être améliorés par les **venins** co-injectés, comme chez *M. demolitor* (Strand et Noda, 1991). Dans certains cas, ce sont les venins eux-mêmes qui sont responsables de l'inhibition de mélanisation. Chez *C. rubecula* par exemple, la protéine **Vn50** isolée du venin inhibe la mélanisation dans l'hémolymphe de l'hôte *Pieris rapae* (Asgari *et al.*, 2003). Cette protéine de 50kDa peut inhiber l'activité PO de l'hémolymphe des chenilles *P. rapae* de manière similaire au contenu total du venin du parasitoïde. L'inhibition de l'activité PO n'est cependant pas due à une inhibition directe de l'enzyme PO, mais plutôt à l'inhibition de l'activation du zymogène proPO (Zhang *et al.*, 2004a). Cette protéine présentant des similarités avec les protéases à sérine d'arthropodes, son rôle consterait à entrer en compétition avec les sérines protéases qui activent habituellement la proPO lors de l'infection. Enfin, les protéines à activité phénoloxydase ainsi que les protéines structurellement proches des sérines protéases, contenues dans le venin du parasitoïde idiobionte *Pimpla hypochondriaca* pourraient perturber l'activité PO de l'hôte. Aucune étude fonctionnelle ne corrobore cependant ces hypothèses (Parkinson *et al.*, 2001 ; Parkinson *et al.*, 2002).

Les **composés contenus dans le fluide du calice débarrassé de VLPs** de *Venturia canescens* semblent de même agir sur la mélanisation et l'activité PO de l'hémolymphe de l'hôte *Ephestia kuehniella* (Beck *et al.*, 2000), mais de manière locale et/ou transitoire (partie II.2.2, p40)

Enfin, quelques rares études portent sur les effets du parasitisme des parasitoïdes de drosophiles sur la mélanisation et la phénoloxydase de leurs hôtes. Seules les études concernant les parasitoïdes *Asobara citri* et *Asobara tabida* démontrent clairement l'inhibition de l'activité PO de l'hémolymphe de *D. melanogaster* suite au parasitisme (Moreau *et al.*, 2000 ; Moreau *et al.*, 2003). L'inhibition de la mélanisation des tumeurs par le parasitisme de *L. bouvardi* suggère l'emploi d'une telle inhibition chez ce parasitoïde (Labrosse *et al.*, 2003), mais aucun test enzymatique n'a été effectué à ce jour pour confirmer cette hypothèse.

II.4 Succession de stratégies

Tous les composants de la réponse immunitaire d'encapsulation semblent ainsi ciblés par les parasitoïdes, qui peuvent altérer simultanément ou séquentiellement différentes cibles cellulaires et/ou humorales. Ainsi, les parasitoïdes *Campoletis sonorensis*, *Cotesia congregata*, *Microplitis demolitor* ou *Asobara citri* inhibent d'une part la mélanisation et altèrent d'autre part, de manière non réversible, les cellules immunitaires.

Des stratégies complètement différentes peuvent également être employées à différents stades du parasitisme. Les parasitoïdes *Cotesia rubecula*, *Cotesia kariyai* et *Hyposoter fugitivus* emploient une stratégie de type locale dans les premières heures du parasitisme, puis une stratégie d'immunosuppression systémique (Stoltz et Guzo, 1986 ; Asgari *et al.*, 1997 ; Teramoto et Tanaka, 2004). D'autres parasitoïdes, comme *C. congregata*, ou *Campoletis chlorideae*, emploient une stratégie systémique dans un premier temps, relayée par une stratégie plutôt locale, puisque les capacités d'encapsulation de leurs hôtes sont restaurées quelques jours après parasitisme (Lavigne et Beckage, 1996 ; Yin *et al.*, 2003). Enfin, l'alternance de plusieurs types de facteurs peut être employée, comme chez *C. sonorensis* qui emploie dans un premier temps des protéines ovariennes, puis dans un second temps des protéines codées par les PDVs (Webb et Luckhart, 1996).

III VARIATIONS DE L'ISSUE DE L'INTERACTION HÔTE - PARASITOÏDE

L'ensemble des stratégies de virulence permet aux parasitoïdes de mettre en échec la réponse immunitaire de leurs hôtes et ainsi d'assurer la survie de leur descendance. Le succès d'un parasitoïde spécialiste sur une espèce hôte donnée (du point de vue de la mise en échec de la réponse immunitaire) peut être cependant extrêmement variable. Ces variations peuvent avoir de nombreuses causes, dites proximales lorsqu'elles concernent des facteurs agissant à l'échelle de la vie d'un individu ou ultimes lorsqu'elles agissent à l'échelle des populations en façonnant l'évolution des caractères. Parmi les **facteurs proximaux**, on trouve des facteurs environnementaux qui vont modifier l'état physiologique de l'hôte ou du parasitoïde, ou des facteurs biotiques qui vont dans certains cas faciliter la réussite parasitaire et dans d'autres augmenter les capacités immunitaires d'un hôte. Les **causes ultimes** sont les différentes forces évolutives qui peuvent influencer la sélection de traits sous contrôle génétique, relatifs à la virulence chez les parasitoïdes ou à la résistance chez les hôtes. La nature de ces différentes forces de sélection est au centre d'une problématique centrale. Quelles sont les conditions écologiques qui vont favoriser un haut niveau de virulence dans une population de parasitoïde ou au contraire limiter son niveau de virulence vis-à-vis d'une espèce hôte ? De même, quels facteurs vont favoriser de hauts niveaux de résistance dans les populations naturelles ou au contraire rendre une population faiblement résistante à une espèce de parasitoïde ? Quelques études, portant principalement sur les parasitoïdes de drosophiles, se sont focalisées sur les causes évolutives des variations de succès d'un parasitoïde sur une espèce hôte. Bien que ces études aient permis de fournir quelques éléments de réponse, certains "patterns" de résistance ou de virulence observés dans les populations naturelles restent inexplicables. Enfin, les bases physiologiques des variations de niveaux de résistance et de virulence observées dans les populations naturelles sont encore largement méconnues.

Certains parasitoïdes, dits **généralistes**, peuvent infester un grand nombre d'espèces hôtes, tandis que d'autres, dits **spécialistes**, n'infestent qu'un nombre restreint d'espèces hôtes. Intuitivement, on peut s'attendre à ce que les premiers emploient des "stratégies de virulence généralistes", efficaces sur un grand nombre de cibles différentes, tandis que les seconds emploient des "stratégies spécifiques" aux hôtes qu'ils infestent. Ces considérations soulèvent alors la question des bases mêmes de la spécificité. En effet, quelles sont les caractéristiques d'une stratégie de virulence qui permet d'altérer la réponse immunitaire de plusieurs espèces hôtes, et quelles sont celles d'une stratégie qui n'est efficace que sur un spectre d'hôte plus restreint ? Les études portant sur les variations de succès d'un parasitoïde d'une espèce hôte à l'autre, et donc sur la spécificité des mécanismes de virulence, sont à l'heure actuelle extrêmement disparates et concernent des cas particuliers isolés, ce qui ne permet pas de fournir des réponses claires à cette question.

La 3^e partie de ce chapitre a pour objectif d'établir une revue des études abordant ces 2 questions et qui ont constitué la toile de fond de mon travail de thèse:

Comment expliquer les variations de succès d'un parasitoïde sur une espèce hôte donnée ?

Comment expliquer les variations de succès d'un parasitoïde d'une espèce hôte à l'autre sur la base des spécificités des stratégies de virulence?

III.1 Variations du succès d'un parasitoïde sur une espèce hôte

III.1.2 Causes proximales

De nombreux facteurs peuvent influencer l'état physiologique de l'hôte, modifiant ainsi sa capacité à résister aux parasitoïdes, de même que certains facteurs sont connus pour influencer les capacités de virulence d'un parasitoïde.

L'âge de l'hôte semble être un facteur déterminant dans l'issue de l'interaction immunologique entre l'hôte et son parasitoïde. En effet, de nombreuses études indiquent que des œufs de parasitoïdes peuvent être fréquemment encapsulés dans des hôtes âgés, alors qu'ils ne le sont pas dans de jeunes hôtes. Les œufs du parasitoïde *Anagyrus kamali* sont généralement encapsulés s'ils sont pondus dans les adultes de l'hôte *Maconellicoccus hirsutus* alors que les œufs pondus dans les 2^e et 3^e stades larvaires sont moins souvent encapsulés (Sagarra *et al.*, 2000). De même, le pourcentage d'œufs encapsulés de *Cotesia glomerata* est plus important dans les chenilles âgées de *Pieris rapae*, *P. napi* et *P. brassicae* que dans les jeunes chenilles (Brodeur et Vet, 1995). Enfin, les œufs du parasitoïde *Asobara tabida* sont d'autant plus encapsulés que le stade des hôtes *D. melanogaster* infestés est avancé (Eslin et Prévost, 2000).

L'expérience de ponte des femelles parasitoïdes peut parfois limiter leur succès à altérer la réponse immunitaire des hôtes. Le taux d'encapsulation des œufs de femelles *Leptopilina heterotoma* par exemple, augmente avec le nombre de pontes précédentes de la femelle (Streams, 1968), ce qui est probablement dû à l'épuisement des facteurs immunosuppresseurs dans les glandes impaires des femelles. Les capacités immunosuppresseuses de l'espèce proche *L. boulardi* ne semblent pas au contraire altérées par l'expérience de ponte des femelles parasitoïdes (Labrosse *et al.*, 2003), contrairement à ce qui avait été publié précédemment (Vass et Nappi, 1998a).

Des facteurs abiotiques, tels que la **nutrition** ou la **température**, sont aussi connus pour altérer les capacités des hôtes à former une capsule autour des parasitoïdes (Vass et Nappi, 2000 ; Thomas et Blanford, 2003). Il a ainsi été montré que la capacité des larves de *D. melanogaster* à encapsuler les parasitoïdes *Leptopilina bouleardi* et *Leptopilina heterotoma* est fortement réduite lorsqu'elles sont sous-alimentées (Wajnberg *et al.*, 1985 ; Boulétreau, 1986). Elle peut au contraire être améliorée suite à un apport nutritionnel (Walker, 1959a ; Vass et Nappi, 1998b). Les températures peuvent aussi influencer la réponse immunitaire des insectes (Thomas et Blanford, 2003). Par exemple, la résistance des pucerons au parasitoïde *Aphidius ervi* diminue lorsque les températures augmentent (Bensadia *et al.*, 2006). De même, le taux d'encapsulation des œufs du parasitoïde *Metaphycus stanleyi* par l'hôte *Protopulvinaria pyriformis* est corrélé avec la température ambiante, créant ainsi des variations saisonnières dans l'efficacité du parasitoïde (Blumberg, 1991). Une étude de Fellowes *et al.* (1999b) indique que les effets de la température sur l'encapsulation peuvent être extrêmement variables selon le type d'interaction hôte-parasitoïde. Chez les lignées de *D. melanogaster* sélectionnées pour leur résistance au parasitoïde *Asobara tabida*, le taux d'encapsulation des œufs des parasitoïdes *A. tabida*, *L. bouleardi* et *L. heterotoma* augmente avec la température d'élevage. Par contre, chez les lignées sélectionnées pour leur résistance au parasitoïde *L. bouleardi*, le taux d'encapsulation des œufs de *L. bouleardi* est négativement corrélé avec la température, celui des œufs d'*A. tabida* positivement corrélé et celui des œufs de *L. heterotoma* constant quelle que soit la température.

Des **micro-organismes** présents dans le corps de l'hôte au moment de la ponte de l'œuf de parasitoïde peuvent déterminer l'issue de l'interaction immunitaire entre un hôte et un parasitoïde. Un hôte affaibli par exemple par la présence de bactéries, virus ou champignons est moins à même de mettre en place une réaction immunitaire efficace contre un parasitoïde (Vinson et Iwantsch, 1980 ; Brooks, 1993). De façon similaire, l'élimination de la bactérie *Wolbachia* chez le parasitoïde *Leptopilina heterotoma* augmente significativement son succès à mettre en échec la réponse immunitaire de l'hôte *D. simulans* (Hubbard *et al.*, données non publiées).

Plus étonnamment, la bactérie secondaire symbiotique *Hamiltonella defensa* (aussi appelée type-T ou PABS) confère aux pucerons *Acyrtosiphon pisum* qu'elle infeste une résistance partielle aux parasitoïdes *Aphidius ervi* et *Aphidius eadyi* (Oliver *et al.*, 2003 ; Ferrari *et al.*, 2004). Cette bactérie provoque la mort des larves de parasitoïdes en développement par un mécanisme différent de l'encapsulation, qui ne semble pas exister chez ces insectes (Li *et al.*, 2002). L'inoculation d'un isolat de la bactérie à des lignées de pucerons de fonds génétiques distincts confère des niveaux de résistance similaires, alors que l'inoculation de différents isolats à des pucerons de même fond génétique induit des niveaux de résistance variables (Oliver *et al.*, 2005). Les variations de résistance au parasitoïde *A. ervi*, souvent observées dans les populations naturelles (Henter et Via, 1995 ; Hufbauer et Via, 1999), semblent ainsi plus attribuables à l'hétérogénéité des bactéries secondaires qu'au génotype des pucerons (Oliver *et al.*, 2005).

Tous les isolats de *H. defensa* testés jusqu'à présent possèdent un bactériophage (Sandström *et al.*, 2001). Une étude récente a mis en évidence la présence de toxines, codées et exprimées par ces phages, qui sont supposées être à l'origine de la mort des larves de parasitoïde (Moran *et al.*, 2005).

Enfin, la présence d'autres parasitoïdes est parfois nécessaire pour permettre à un parasitoïde d'échapper à la réaction immunitaire de ses hôtes. Le **nombre d'œufs pondus par hôte** peut influencer de manière non négligeable le succès parasitaire. Par exemple, chez *Cotesia glomerata*, une espèce de parasitoïde grégaire, la protection des larves n'est efficace qu'à partir de 5 œufs pondus dans l'hôte *Pieris rapae* (Kitano et Nakatsujii, 1978). Le venin injecté en même temps que les œufs étant à l'origine de l'inhibition de leur encapsulement, il semble qu'une quantité minimale de venin soit nécessaire à la protection des œufs (Kitano, 1986). De même, un effet de saturation du système immunitaire de l'hôte *Maconellicoccus hirsutus* a été observé lorsque plus de 10 œufs de *Anagyrus kamali* sont pondus dans un seul hôte (Sagarra *et al.*, 2000).

La **présence d'un parasitoïde d'une autre espèce** peut parfois être nécessaire pour éviter à un parasitoïde d'être encapsulé. Ces espèces profitent de la suppression du système immunitaire provoquée par d'autres espèces de parasitoïdes, employant ainsi une stratégie de type "kleptoparasitisme". Ceci a été montré notamment chez *Asobara tabida* (Kraaijeveld, 1999). Le succès parasitaire de cette espèce est habituellement très faible sur l'hôte *Drosophila simulans* (0.5%). Cependant, lorsque les larves hôtes ont été préalablement parasitées par le parasitoïde *L. bouvardi* qui est capable de se développer sur cet hôte, la survie d'*A. tabida* peut atteindre les 15%. De même, l'hôte *Orgyia leucostigma* devient permissif à deux espèces de parasitoïdes normalement encapsulées s'il est préalablement parasité par *Cotesia melanoscela* (Guzo et Stoltz, 1985).

L'ensemble des facteurs proximaux détermine, à l'échelle de l'individu, le succès d'un parasitoïde à éviter la réponse immunitaire de son hôte. Cependant, des variations de succès parasites sont encore observées lorsque l'issue des interactions hôtes/parasitoïde est testée en conditions contrôlées de laboratoire. L'issue des interactions ne dépend plus dans ce cas de facteurs "externes", mais du niveau de résistance et de virulence inhérents à l'hôte et au parasitoïde, déterminés génétiquement et soumis à sélection.

III.1.2 Causes ultimes

- Résistance et virulence sont génétiquement déterminés

La présence de variation génétique dans les capacités de résistance et de virulence a pu être mise en évidence chez les drosophiles et leurs parasitoïdes par l'emploi de **lignées isofemelles**. Une lignée isofemelle correspond à une souche créée à partir d'une unique femelle inséminée dans la nature et dont les descendants sont ensuite croisés entre eux durant plusieurs générations afin d'obtenir une lignée dont la plupart des loci sont homozygotes. Un ensemble de lignées isofemelles permet de reconstituer la variabilité d'une population (Parsons, 1980 ; Delpuech *et al.*, 1993 ; David *et al.*, 2005).

De fortes **variations intra-populations** dans la capacité à encapsuler le parasitoïde *Leptopilina boulardi* ont pu être mises en évidence chez *Drosophila melanogaster* à l'aide de cette méthode (voir Boulétreau, 1986 ; Kraaijeveld *et al.*, 1998 pour revue). Par exemple, des taux d'encapsulation variant de 12 à 90% d'une lignée isofemelle à l'autre ont été observés chez 22 lignées isofemelles établies à partir d'une population africaine de *D. melanogaster* (Carton et Boulétreau, 1985 ; Carton et Nappi, 1991). Une forte corrélation des taux d'encapsulation d'une génération à l'autre au sein de chaque lignée a été observée, ce qui a permis de mettre en évidence des bases génétiques à la variation de la résistance. L'**héritabilité** au sens large de ce caractère a été estimée à 0.43 dans cette étude, suggérant un potentiel de réponse à la sélection.

Seules 2 études concernent en revanche les variations intra-population de virulence des parasitoïdes. L'étude de Carton *et al.* (1989), réalisée sur 14 lignées isofemelles issues d'une population nord-africaine du parasitoïde *L. boulardi* a pu mettre en évidence les bases génétiques de la capacité à éviter l'encapsulation dans l'hôte *D. simulans*. L'analyse des lignées isofemelles sur 2 générations successives a révélé une héritabilité variant de 0.31 à 0.5 (Carton *et al.*, 1989). Par ailleurs, une variation génétique significative de la virulence vis à vis du puceron *Acyrtosiphon pisum* a été mise en évidence au sein d'une population du parasitoïde *Aphidius ervi* par une méthode comparant les niveaux de virulence de tous les descendants d'un seul mâle avec les niveaux de virulence de lots constitués par la descendance d'autres mâles (Henter, 1995).

Les **bases génétiques** de la capacité des larves de *D. melanogaster* à encapsuler les parasitoïdes *L. boulardi* et *Asobara tabida* ont été recherchées par des croisements entre lignées sensibles et résistantes à ces parasitoïdes. Une base génétique simple, avec un locus spécifiquement responsable de la **résistance** à chaque espèce de parasitoïde a été mise en évidence (Carton et Nappi, 2001 pour revue). La capacité des larves de *D. melanogaster* à encapsuler le parasitoïde *L. boulardi* est contrôlée par un locus majeur diallélique, appelé **Rlb** (pour **R**ésistance à **L**eptopilina **b**oulardi) tandis que leur capacité à encapsuler le parasitoïde *A. tabida* est contrôlée par le locus majeur **Rat** (pour **R**ésistance à **A**sobara **t**abida),

Déterminisme génétique de la virulence chez *Leptopilina heterotoma*

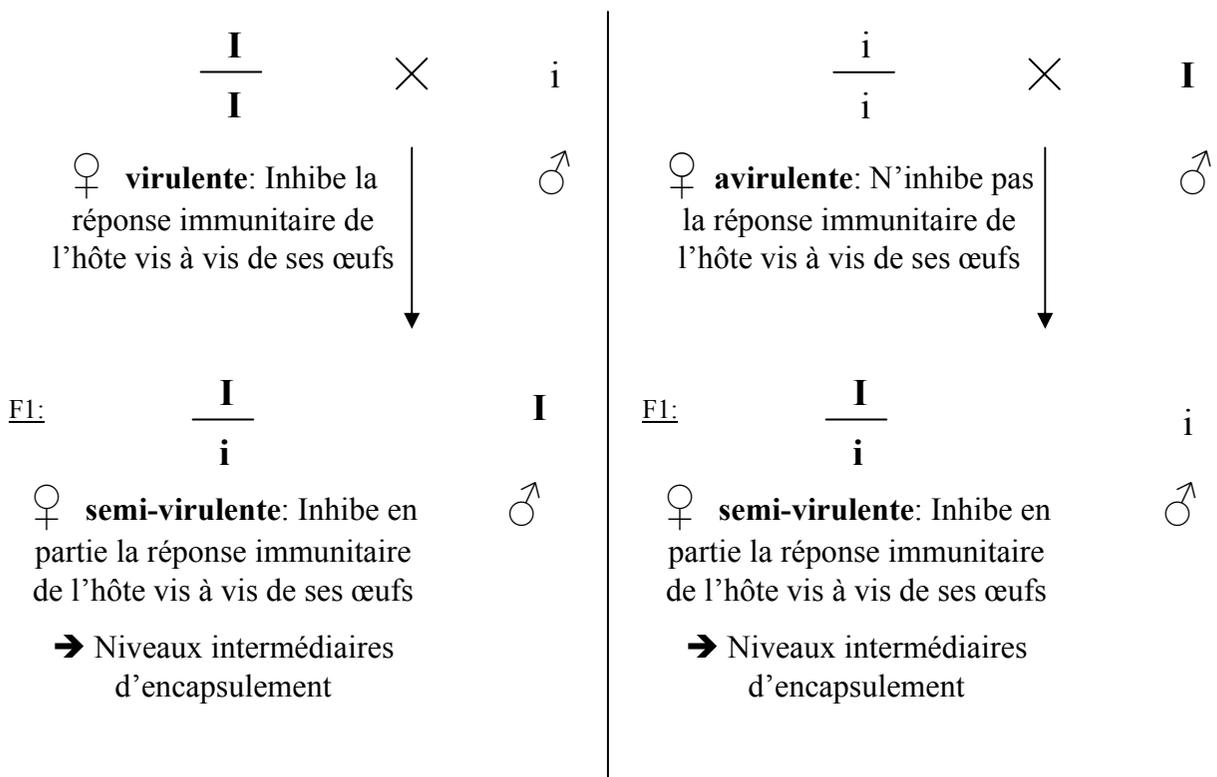


Figure 20 : Déterminisme génétique de la virulence vis à vis de *Drosophila melanogaster* chez le parasitoïde *Leptopilina heterotoma*.

Les croisements réciproques entre les lignées virulentes (femelles $\frac{\mathbf{I}}{\mathbf{I}}$; mâles \mathbf{i}) et avirulentes (femelles $\frac{\mathbf{i}}{\mathbf{i}}$; mâles \mathbf{I}) du parasitoïde *Leptopilina heterotoma* sont représentés schématiquement, en supposant que la virulence est sous la dépendance d'un gène (\mathbf{I}) diallélique. L'allèle \mathbf{I} permet l'inhibition de la réponse immunitaire de l'hôte *Drosophila melanogaster* tandis que l'allèle \mathbf{i} ne code pas pour les facteurs responsables de l'inhibition. L'allèle \mathbf{I} est semi-dominant sur l'allèle \mathbf{i} .

Chez les hyménoptères (espèces haplodiploïdes), les femelles sont diploïdes tandis que les mâles sont haploïdes. Ces derniers sont issus d'ovules non fécondés, via le phénomène de parthénogenèse arrhénotoque.

D'après Walker, 1962

différent de *Rlb* (Poirié *et al.*, 2000). Au locus *Rlb*, porté dans la région 55E2-55F3 du chromosome 2 (Hita *et al.*, 1999), l'allèle responsable de la résistance (*Rlb*⁺) est dominant sur l'allèle responsable de la sensibilité (*Rlb*⁻) (Carton *et al.*, 1992). Au locus *Rat*, l'allèle responsable de la résistance (*Rat*⁺) est dominant sur l'allèle responsable de la sensibilité (*Rat*⁻) (Benassi *et al.*, 1998). Ce locus est situé sur le chromosome 2 mais est distant de 35 centimorgans du locus *Rlb* (Orr et Irving, 1997 ; Poirié *et al.*, 2000).

Les bases génétiques de la capacité des parasitoïdes à échapper aux réactions immunitaires de leurs hôtes ont de même été recherchées. A l'aide de croisements entre 2 souches du parasitoïde *Leptopilina heterotoma* différant par leur niveau de **virulence** vis à vis de *D. melanogaster*, l'action de facteurs maternels impliqués dans la réussite parasitaire ainsi que l'origine chromosomique de ces facteurs a été mise en évidence. En effet, le taux d'encapsulation des œufs pondus par une femelle de la souche virulente est toujours faible, quelle que soit la souche du père. De même, le taux d'encapsulation des œufs de femelles de la souche avirulente est toujours élevé quelle que soit la souche d'origine du père. Cela indique que la réussite parasitaire ne dépend pas du génotype de l'œuf, mais de facteurs d'origine maternelle (venins et VLPs, partie II.1.2, p32) (Walker, 1959a). D'autre part, le taux d'encapsulation des œufs issus des croisements entre parents F₁ étant intermédiaire à ceux obtenus pour les œufs des 2 souches parentales, et ce quel que soit le sens de croisement, l'action d'un gène semi-dominant a été proposée (Walker, 1959a ; Walker, 1962) (Figure 20).

Plus récemment, un ensemble de croisements entre 2 souches du parasitoïde *L. boulardi*, l'une virulente et l'autre avirulente sur l'hôte *D. melanogaster* a permis de démontrer que la différence de virulence entre ces 2 souches vis à vis de cet hôte est sous le contrôle d'un locus majeur diallélique, appelé *IS_m* (pour **I**mmunosuppression de *D. melanogaster*) (Dupas *et al.*, 1998). L'allèle *IS_m*⁺, conférant aux femelles *L. boulardi* la capacité d'empêcher l'encapsulation de leurs œufs par *D. melanogaster* est semi-dominant par rapport à l'allèle *IS_m*⁻. L'issue de l'interaction entre le parasitoïde *L. boulardi* et l'hôte *D. melanogaster* est ainsi sous la dépendance de fortes interactions génétiques, tel qu'il est présenté dans la Figure 21 (voir Carton et Nappi, 2001 pour revue).

Enfin, la différence de virulence observée entre 2 souches du parasitoïde *L. boulardi* vis à vis de l'hôte *Drosophila yakuba* est sous le contrôle d'un autre locus, appelé *IS_y* (pour **I**mmunosuppression de *D. yakuba*) (Dupas et Carton, 1999). L'allèle *IS_y*⁺, conférant aux femelles *L. boulardi* la capacité d'empêcher l'encapsulation de leurs œufs par *D. yakuba* est récessif par rapport à l'allèle *IS_y*⁻. Les loci *IS_m* et *IS_y* contrôlent ainsi spécifiquement la virulence de l'espèce *L. boulardi* vis à vis de *D. melanogaster* et *D. yakuba* respectivement (Dupas et Carton, 1999).

↳ Pour parfaire notre connaissance des interactions génétiques dans ce système et connaissant le déterminisme génétique de la virulence vis à vis de l'espèce *D. yakuba*, j'ai recherché au cours de mon travail de thèse des variations de résistance au parasitoïde *L. boulardi* chez l'hôte *D. yakuba*, ainsi que le déterminisme génétique de cette résistance.

Bases génétiques de l'interaction *Leptopilina boulardi* – *D. melanogaster*

		Hôte: <i>D. melanogaster</i>	
		Lignée S R_{lb}^-/R_{lb}^-	Lignée R R_{lb}^+/R_{lb}^+
Parasitoïde: <i>L. boulardi</i>	Lignée IS _m IS_m^+/IS_m^+	Pas d'encapsulation 	Pas d'encapsulation 
	Lignée IS _y IS_m^-/IS_m^-	Pas d'encapsulation 	Encapsulation 

Figure 21 : Diagramme illustrant l'issue des interactions entre le parasitoïde *Leptopilina boulardi* et l'hôte *Drosophila melanogaster* en fonction des interactions génétiques entre un locus pour la résistance de l'hôte et un locus pour la virulence du parasitoïde.

Les allèles de l'hôte R_{lb}^+ et R_{lb}^- codent respectivement pour la résistance et la sensibilité au parasitoïde de la lignée IS_y. Les allèles du parasitoïde IS_m^+ et IS_m^- codent respectivement pour la virulence et l'avirulence.

D'après Carton & Nappi, 2001

- *Pressions de sélection*

Les diverses causes évolutives pouvant influencer les niveaux de résistance et de virulence des populations naturelles ont été intensivement recherchées (Kraaijeveld et Godfray, 1999 pour revue). Plusieurs types de sélection semblent intervenir pour expliquer l'évolution de ces caractères: la sélection directe de la résistance (ou de la virulence) par le partenaire de l'interaction, la contre-sélection de ces caractères due aux coûts associés à leur mise en place (et par exemple à l'augmentation de leur efficacité) et la sélection (ou contre sélection) indirecte de ces caractères par un tiers partenaire.

(1) Sélection directe par le partenaire de l'interaction

La fitness des parasitoïdes étant en relation directe avec leur capacité à infester avec succès leur hôte, il est probable qu'une intense pression de sélection tendant à favoriser la virulence du parasitoïde soit exercée par l'espèce hôte. La virulence d'un parasitoïde contre un hôte donné devrait donc être maximisée en présence de l'hôte. De même, le succès du parasitoïde conduisant systématiquement à la mort de l'hôte avant qu'il n'ait pu assurer sa descendance, de fortes pressions parasitaires devraient tendre à faire augmenter le niveau de résistance d'une population hôte.

Ces hypothèses sont appuyées par des expériences de **sélection artificielle** qui ont été menées sur des lots de parasitoïdes initialement polymorphes pour la virulence vis à vis d'une espèce hôte et sur des lots d'hôtes initialement polymorphes pour leur résistance vis à vis du parasitoïde concerné. La résistance vis à vis des parasitoïdes *L. bouvardi* ou *A. tabida* par exemple, peut être considérablement augmentée dans des lots de *D. melanogaster* par sélection des individus présentant une capsule à chaque génération. En cinq générations, les taux d'encapsulation des œufs de *L. bouvardi* ou *A. tabida* sont ainsi passés de 0.5% à 45% et de 5 à 60% respectivement (Kraaijeveld et Godfray, 1997 ; Fellowes *et al.*, 1998). Les niveaux de virulence des parasitoïdes *L. bouvardi* et *A. tabida* vis à vis de *D. melanogaster* peuvent de même être significativement augmentés lorsque des lots de parasitoïdes sont maintenus sur plusieurs générations sur des hôtes *D. melanogaster* résistants (Dupas et Boscaro, 1999 ; Kraaijeveld *et al.*, 2001a).

(2) Contre-sélection par les coûts

Chaque individu acquiert durant sa vie un nombre limité de ressources qu'il va devoir allouer à différents traits d'histoire de vie (fécondité, viabilité des œufs, capacités compétitives, durée de vie, immunité ...). Ainsi, de nombreux auteurs affirment que l'augmentation de l'investissement dans un trait d'histoire de vie tel que le niveau de résistance d'un hôte (ou le niveau de virulence d'un parasitoïde) doit être contrebalancée par un moindre investissement dans d'autres traits d'histoire

de vie, ce qui peut se répercuter sur la fitness des individus (Sheldon et Verhulst, 1996 ; Owens et Wilson, 1999 ; Rolff et Siva-Jothy, 2003 ; Schmid-Hempel et Ebert, 2003). Dans certaines conditions, une résistance (ou une virulence) accrue pourrait ainsi être contre sélectionnée par les **coûts** qui lui sont associés. Une résistance coûteuse à un parasitoïde par exemple serait contre sélectionnée lorsque ce parasitoïde est absent de la niche écologique de l'hôte, maintenant ainsi le polymorphisme de résistance lorsque cette absence est transitoire, ou éliminant la résistance de la population si cette absence est suffisamment durable.

Deux types de coût associés à la **résistance** sont généralement identifiés: les coûts constitutifs, qui correspondent aux coûts de maintenance de la "machinerie immunitaire" en l'absence de parasitisme, et les coûts inductibles qui correspondent aux coûts de la mise en place de la réponse lors de l'infection parasitaire. Des **coûts constitutifs** ont été mis en évidence dans des lignées de *D. melanogaster* soumises à sélection afin d'augmenter leur résistance, soit au parasitoïde *A. tabida*, soit au parasitoïde *L. boulandi* (Kraaijeveld et Godfray, 1997 ; Fellowes *et al.*, 1998 ; Green *et al.*, 2000 ; voir Kraaijeveld *et al.*, 2002 pour revue). Différents traits d'histoire de vie ont été mesurés, mais seules les capacités compétitrices des larves sont réduites chez les lignées sélectionnées pour leur résistance par rapport aux lignées témoin. De plus, ces résultats ne sont obtenus que dans des conditions sévères de compétition larvaire, dont on ne connaît pas la réalité biologique. Aucune différence n'ayant été mise en évidence en ce qui concerne des traits liés à la fitness des adultes (fécondité, viabilité des œufs), ces résultats sont à considérer avec une extrême prudence. Enfin, des **coûts inductibles**, liés à la mise en place de la réponse immunitaire, ont aussi été mesurés chez des drosophiles ayant formé une capsule. La fécondité des males ayant encapsulé le parasitoïde *A. tabida* ou encore la fécondité des femelles ayant encapsulé *A. tabida* ou *L. boulandi* est significativement réduite par rapport à celle des drosophiles qui n'ont pas été parasitées (Carton et David, 1983 ; Fellowes *et al.*, 1999a). Cependant, même si la fitness d'une drosophile adulte ayant encapsulé un parasitoïde est réduite par rapport à celle d'une drosophile saine, elle reste supérieure à celle d'une drosophile parasitée incapable de résister au parasitoïde, qui meurt avant d'avoir laissé une descendance. Ces coûts inductibles influencent ainsi probablement peu l'évolution de la résistance dans les populations naturelles.

Les **coûts constitutifs** associés au maintien des capacités de **virulence** vis à vis d'une espèce hôte donnée ont été mesurés chez le parasitoïde *L. boulandi* (Dupas et Boscaro, 1999) en suivant l'évolution de la virulence vis à vis des espèces *D. melanogaster* et *D. yakuba* sur plusieurs générations dans des conditions où les pressions de sélection vis à vis de ces espèces hôtes étaient relâchées. Plus précisément, les coûts associés à la virulence vis à vis de *D. melanogaster* ou à la virulence vis à vis de *D. yakuba* ont été estimés en maintenant des pools de lignées de parasitoïde initialement polymorphes sur une population de *D. melanogaster* sensible (dans laquelle le parasitoïde peut se développer quel que soit son génotype).

Au bout de 6 à 10 générations, la virulence vis à vis de *D. yakuba* étant réduite dans tous les pools de l'étude, il a été conclu qu'une forte diminution de fitness (ou un coût sélectif) est associée à la virulence vis à vis de *D. yakuba*. En comparaison, la virulence vis à vis de *D. melanogaster* a été augmentée ou diminuée selon les pools considérés, probablement du fait de la dérive génétique. Aucun coût associé à la virulence vis à vis de *D. melanogaster* n'a ainsi pu être mis en évidence, soit parce qu'il n'en n'existe pas, soit parce que ce coût est faible et donc masqué par les effets importants de la dérive génétique propre à cette expérience. Cette étude indique cependant que le coût de la virulence d'un même parasitoïde contre 2 espèces hôtes peut être différent. Un coût à la virulence vis à vis de *D. melanogaster* est également postulé chez le parasitoïde *A. tabida* (Kraaijeveld *et al.*, 2001a). En effet, les œufs des lignées sélectionnées pour leur virulence ont un âge d'éclosion dans l'hôte légèrement plus avancé que celui des œufs des lignées témoins. Or, un seul parasitoïde pouvant survivre par hôte, les larves de parasitoïdes doivent rapidement tuer les compétiteurs dès leur éclosion. Selon les auteurs, un retard de quelques heures à l'éclosion pourrait ainsi suffire à les défavoriser dans les cas de superparasitisme, qui sont fréquents observés dans la nature.

(3) *Sélection indirecte par un troisième partenaire*

L'évolution de la résistance d'une population hôte vis à vis d'une espèce parasitoïde ou de la virulence d'une population parasitoïde contre une espèce hôte pourrait être contrainte par la présence d'autres espèces avec lesquelles elle interagit. Une espèce hôte donnée par exemple peut être attaquée par plusieurs espèces de parasitoïdes et risque aussi d'être infectée par différents types de pathogènes (champignons, bactéries, virus, nématodes...). Ainsi, l'augmentation de la résistance à une espèce de parasitoïde ou de pathogène pourrait influencer positivement l'augmentation de la résistance à une autre espèce de parasitoïde/pathogène, notamment dans le cas d'une réponse de type "généraliste" (**corrélation positive**). Au contraire, l'augmentation de l'investissement dans un composant de l'immunité pour contrer un mécanisme de virulence particulier pourrait se faire au détriment d'un autre composant de l'immunité, diminuant ainsi l'efficacité de la réponse vis à vis d'un autre parasitoïde/pathogène (**corrélation négative**). Ainsi, la réponse évolutive "sélection d'un mécanisme immunitaire" pourrait conduire à des changements d'efficacité d'autres composantes de la réponse immunitaire par le biais de pressions de sélections convergentes ou divergentes. De même, certains facteurs de virulence sélectionnés chez les parasitoïdes, efficaces contre une espèce hôte donnée, pourraient augmenter la virulence vis à vis d'une autre espèce hôte ou au contraire diminuer l'efficacité du parasitoïde dans une autre espèce hôte si ces facteurs de virulence sont par exemple plus immunogènes chez cette dernière espèce.

De potentiels "**trade-offs**" entre les différents composants de l'immunité chez les invertébrés ont été recherchés activement ces dernières années, et de nombreuses corrélations négatives ou positives ont été mises en évidence chez divers insectes. L'activité antibactérienne, par exemple, est

corrélée négativement à l'activité phénoloxydase chez le criquet *Gryllus bimaculatus* (Rantala et Kortet, 2003), le bourdon *Bombus terrestris* (Moret et Schmid-Hempel, 2001) et le coléoptère *Tenebrio molitor* (Moret et Siva-Jothy, 2003) ou à la densité hémocytaire chez la chenille *Spodoptera littoralis* (Cotter *et al.*, 2004) et chez le criquet *Teleogryllus oceanicus* (Simmons et Roberts, 2005) alors que la réponse anti-bactérienne est positivement corrélée à la mélanisation de billes synthétiques chez le moustique *Anopheles gambiae* (Lambrechts *et al.*, 2004). Par ailleurs, la densité hémocytaire chez le lépidoptère *Spodoptera littoralis* est positivement corrélée à l'activité phénoloxydase (Cotter *et al.*, 2004). Ces corrélations observées entre différents composants de l'immunité, tous considérés comme des mesures de la fonction immunitaire globale (ou “**immunocompétence**”) ne sont cependant jamais expliquées en terme d'efficacité vis à vis des divers pathogènes/parasites qui peuvent influencer l'évolution de ces traits. Ces mesures “sauvages” de l'immunocompétence peuvent ainsi être mal interprétées en terme d'adaptation aux diverses pressions de sélection, puisqu'une réponse immunitaire *maximale* n'est pas nécessairement *optimale* par rapport à un pathogène/parasite donné (et qu'une immunocompétence jugée faible peut être très efficace vis à vis d'un pathogène/parasite donné) (Viney *et al.*, 2005).

D'autres types de corrélations, entre les **capacités à résister à différents parasitoïdes/pathogènes** ont été recherchées. Chez le puceron *Acyrtosiphon pisum*, la capacité à résister au parasitoïde *Aphidius ervi* est positivement corrélée avec la capacité à résister au parasitoïde *A. eadyi*, mais est indépendante de la capacité de ces pucerons à résister au champignon *Erynia neoaphidis* (Ferrari *et al.*, 2001). Des expériences de protection croisée menées par Fellowes *et al.* (1999b) et Kraaijeveld & Godfray (1999) ont mesuré chez *D. melanogaster* les capacités de lignées résistantes à un parasitoïde donné à résister à d'autres espèces de parasitoïdes (Tableau 6). Leurs résultats indiquent qu'il n'y a pas de “trade-off” entre les résistances à différentes espèces de parasitoïdes mais plutôt, dans certains cas, une résistance accrue à un parasitoïde chez les lignées sélectionnées pour leur résistance à un autre parasitoïde. La résistance vis à vis de *L. heterotoma* par exemple est augmentée dans les lignées sélectionnées pour leur résistance aux parasitoïdes *A. tabida* et *L. boulandi*. Ces protections croisées ne sont cependant pas nécessairement symétriques, puisque la sélection pour une résistance accrue à *A. tabida* n'augmente pas significativement la résistance au parasitoïde *L. boulandi* alors que la réciproque est vraie. Cela explique sans doute l'absence de corrélation entre la résistance à *L. boulandi* et la résistance à *A. tabida* dans les populations naturelles (Kraaijeveld et Van Alphen, 1995), ou la capacité des larves de souches de *D. melanogaster* sensibles au parasitoïde *L. boulandi* à résister au parasitoïde *A. tabida* (Vass *et al.*, 1993). Selon les auteurs, l'asymétrie observée dans les corrélations des réponses à la sélection suggère que le système immunitaire de *D. melanogaster* a 2 grandes composantes: une composante générale, qui est efficace contre les parasitoïdes en général (tels que *A. tabida* ou *L. heterotoma*) et une composante spécifique, nécessaire pour résister spécifiquement à *L. boulandi* (Fellowes *et al.*, 1999b).

Tableau 6 : Résistance à différents parasitoïdes dans des souches de *Drosophila melanogaster* sélectionnées pour leur résistance vis à vis d'un autre parasitoïde. Les capacités à encapsuler les œufs de parasitoïdes *Asobara tabida* et *Leptopilina boulardi* ont été augmentées par sélection artificielle. Les capacités à d'encapsuler d'autres espèces de parasitoïdes ont été ensuite testées chez les différentes lignées obtenues. ↗ : résistance significativement augmentée. D'après Fellowes et al. (1999b) et Kraaijeveld & Godfray (1999)

Résistance sélectionnée sur :	Résistance testée sur :	Effet :
<i>Asobara tabida</i>	<i>Asobara tabida</i>	↗
	<i>Leptopilina heterotoma</i>	↗
	<i>Leptopilina boulardi</i>	aucun
	<i>Asobara persimilis</i>	aucun
<i>Leptopilina boulardi</i>	<i>Leptopilina boulardi</i>	↗
	<i>Leptopilina heterotoma</i>	↗
	<i>Asobara tabida</i>	↗

(4) *Autres*

Enfin, il est envisageable que des facteurs abiotiques tels que la température ambiante, variable d'une région à l'autre, puissent influencer l'investissement optimal des populations dans la résistance (ou la virulence).

Adaptation locale versus variation du niveau global de résistance/virulence

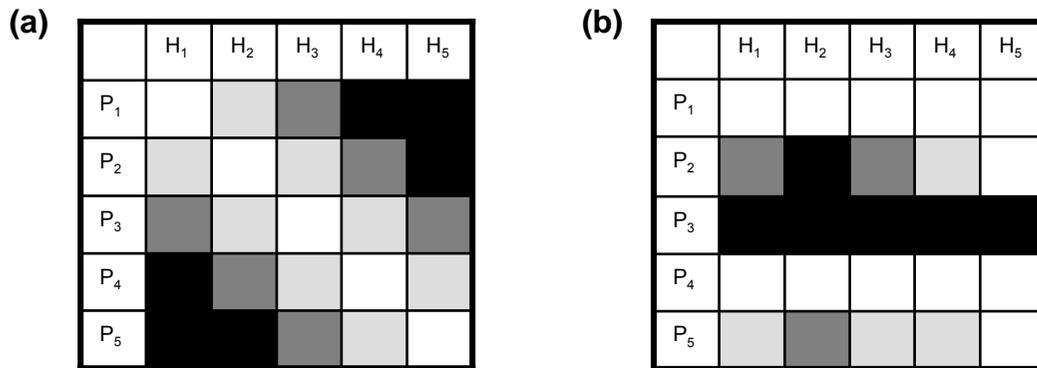


Figure 22: Représentation schématique du succès parasitaire dans le cas d'adaptations locales (a) ou dans le cas de variations du niveau général de résistance et de virulence d'une population à l'autre (b).

P₁, P₂... P₅ représentent des populations de parasitoïdes provenant de différentes origines géographiques. La population P₂ est la population la plus proche de la population P₁ tandis que la population P₅ est la plus éloignée. H₁, H₂... H₅ représentent des populations hôtes provenant de différentes origines géographiques (1-5). La population H₂ est la population la plus proche de la population H₁ tandis que la population H₅ est la plus éloignée. Blanc : Réussite parasitaire importante, Gris clair : réussite parasitaire modérée, Gris foncé : réussite parasitaire faible, Noir : Réussite parasitaire nulle.

(a). **Adaptation locale:** La réussite parasitaire est maximale lorsque les populations hôtes et parasitoïdes sont sympatriques (portant le même numéro). Elle est d'autant plus réduite que populations hôtes et parasitoïdes sont éloignées géographiquement

(b). **Variation du niveau global de résistance et de virulence.** Le succès parasitaire est indépendant de la distance géographique entre les populations des parasitoïde et de leurs hôtes. Il dépend du niveau intrinsèque de résistance et de virulence des hôtes et des parasitoïdes. D'après la matrice d'interaction représentée, les populations parasitoïdes P₁ et P₄ sont fortement virulentes, puisque leur succès parasitaire est maximal quel que soit le niveau de résistance de l'hôte. La population P₂ est dite "**avirulente**", puisque sa réussite parasitaire dépend du niveau de résistance de l'hôte. La population P₃ est "**inadaptée**" à toutes les populations de l'espèce hôte considérée, qui est ainsi "**non permissive**" pour cette population de parasitoïde.

La population hôte H1 est sensible, puisqu'elle permet la réussite parasitaire de toutes les populations de parasitoïdes à l'exception de la population P3 (inadaptée à cette espèce hôte). La population H3 est résistante, puisqu'elle réduit le succès parasitaire des parasitoïdes plus ou moins avirulents (P₂ et P₅).

- *Des patterns géographiques en partie expliqués*

La combinaison des pressions de sélections décrites ci-dessus, exercées par les ennemis naturels et par la nature et l'ampleur des coûts associés est supposée agir afin de modeler les niveaux de résistance et de virulence des populations naturelles, qui peuvent ainsi fortement **varier d'une population à l'autre**. Par exemple, au Kenya, le niveau de virulence du parasitoïde *Cotesia sesamiae* sur l'hôte *Busseola fusca* varie fortement entre les populations du littoral et les populations localisées dans les terres. En effet, les populations du littoral sont totalement encapsulées par cet hôte alors que les populations localisées dans les terres ont un fort succès parasitaire dans *B. fusca* (Ngi-Song *et al.*, 1998 ; Mochiah *et al.*, 2001). Ce "pattern géographique" semble s'expliquer assez simplement puisque le parasitoïde *C. sesamiae* est avirulent (totalement encapsulé) dans les localités où l'hôte *B. fusca* n'est pas présent.

Les "**patterns géographiques**" de virulence et de résistance ont été décrits en détail dans l'interaction entre le parasitoïde *Asobara tabida* et l'hôte *D. melanogaster*, ainsi que dans l'interaction entre *Leptopilina bouvardi* et l'hôte *D. melanogaster* (Dupas et Boscaro, 1999 ; Kraaijeveld et Godfray, 1999 ; Dupas *et al.*, 2002). Il est à noter cependant que chez ces espèces, la mesure du niveau de résistance et de virulence d'une population hôte ou parasitoïde s'effectue généralement à l'aide de souches de référence selon le principe suivant:

- Le **niveau de résistance** d'une population hôte est estimé par sa capacité à encapsuler une souche de parasitoïde "avirulente" de référence. Les œufs de ce parasitoïde sont encapsulés par les hôtes **résistants** mais ne le sont pas par les hôtes dits **sensibles**.

- Le **niveau de virulence** d'une population de parasitoïdes est estimé par sa capacité à éviter l'encapsulation des œufs par une souche hôte "résistante" de référence. Cette souche standard encapsule les parasitoïdes **avirulents**, mais n'encapsule pas les parasitoïdes **virulents**.

Ce type de mesure sous-entend que **résistance et virulence sont des caractères qui échappent à de potentielles adaptations locales**. En effet, dans un cas d'adaptation locale, la virulence d'une population de parasitoïdes ne serait élevée que contre la population hôte avec laquelle elle interagit (population hôte sympatrique), alors qu'elle serait faible sur une population provenant d'une autre origine géographique (population hôte allopatrique) (Figure 22a). De même, une population résistante contre la population sympatrique de parasitoïdes ne serait pas résistante à une population de parasitoïde d'origine géographique différente. Par opposition, lorsque virulence et résistance sont considérés comme des caractères échappant à de potentielles adaptations locales, le succès d'une population de parasitoïde sur une population hôte peut refléter son succès sur toutes les autres populations hôtes (Figure 22b). Dans le cas présent, diverses expériences ont permis de rejeter l'hypothèse d'une potentielle adaptation locale. Par

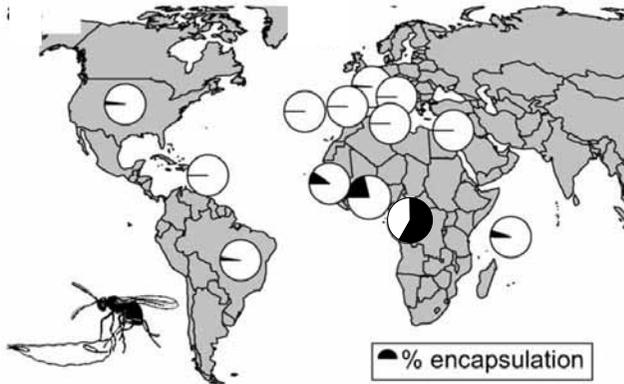
exemple, les drosophiles résistantes à une population d'*A. tabida* le sont aussi à d'autres populations de cette espèce de parasitoïde (Kraaijeveld et Godfray, 1999). De même, les populations du parasitoïde *L. boulandi* virulentes vis à vis de la population sympatrique de *D. melanogaster* le sont aussi vis à vis de population allopatriques (Boulétreau, 1986). Ainsi, le succès du parasitoïde *L. boulandi* en conditions sympatriques peut être correctement prédit par les niveaux de résistance et de virulence des populations hôtes et parasitoïde présentes qui ont été estimés sur des lignées de référence (Dupas *et al.*, 2002) (Figure 23).

Le “pattern géographique” de la **virulence** du parasitoïde *A. tabida* vis à vis de *D. melanogaster* est particulièrement éloquent, avec un cline nord-sud fortement établi (Kraaijeveld et van Alphen, 1994) (Figure 24). Le niveau de virulence des populations du nord est faible (< 20% de succès parasitaire) alors que les populations méditerranéennes ont un niveau de virulence plus élevé (60-95%). Ce cline semble s'expliquer par la présence de l'hôte alternatif *D. subobscura* dans le nord de l'Europe, sur lequel toutes les populations d'*A. tabida* sont capables de se développer. Les populations d'*A. tabida* du nord de l'Europe ayant à leur disposition cet hôte alternatif, les pressions de sélection pour augmenter la virulence vis à vis de *D. melanogaster* sont relâchées, ce qui permet l'expression des coûts de virulence et entraîne une diminution de la virulence vis à vis de cette espèce. Ces hypothèses sont appuyées par le fait que les femelles de la population Néerlandaise WOPV, avirulente sur *D. melanogaster*, préfèrent pondre dans des larves de *D. subobscura* lorsqu'elles ont le choix (Kraaijeveld *et al.*, 1995). De même, des lignées du parasitoïde sélectionnées pour leur virulence vis à vis de *D. melanogaster* acceptent plus volontiers de pondre dans des larves de *D. melanogaster* que les lignées témoin non sélectionnées (Rolff et Kraaijeveld, 2001).

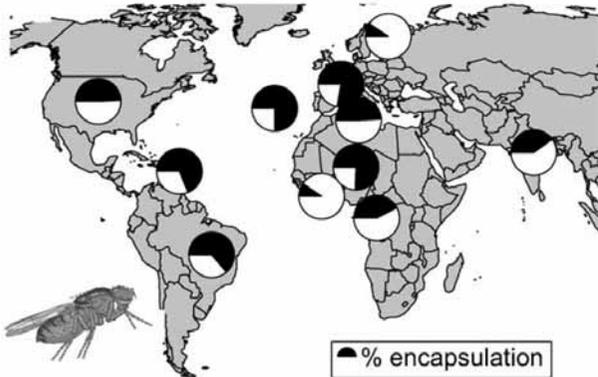
La **résistance** de l'hôte *D. melanogaster* à une souche standard de ce même parasitoïde est assez structurée géographiquement, avec un fort niveau d'encapsulation chez les populations d'Europe centrale, et un niveau de résistance plus faible au nord, ainsi que sur le pourtour méditerranéen (Kraaijeveld et Van Alphen, 1995) (Figure 25). Au nord, les pressions de sélection sur la résistance au parasitoïde sont relâchées puisque ce dernier s'attaque préférentiellement à l'hôte alternatif *D. subobscura*. En Espagne, la résistance à *A. tabida* n'est pas nécessaire puisque ce parasitoïde est absent. Par contre, la faible résistance des populations méditerranéennes est encore inexplicée puisque le parasitoïde *A. tabida* est présent.

Variations géographiques dans le couple *Leptopilina bouhardi* – *D. melanogaster*

a. Encapsulement de *L. bouhardi* en conditions sympatriques



b. Niveau de résistance de différentes populations de *D. melanogaster*



c. Niveau de virulence de différentes populations de *L. bouhardi*

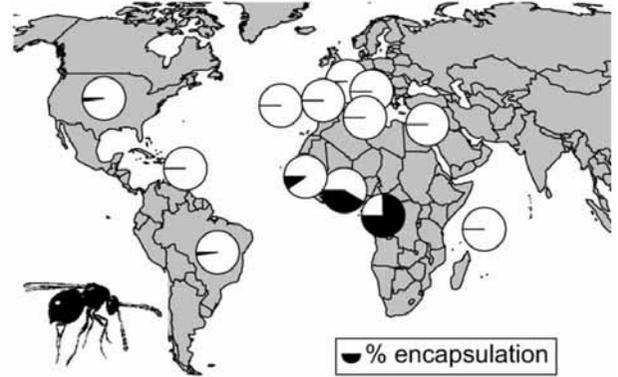


Figure 23 : Variations géographique (a) de l'encapsulement des œufs de *Leptopilina bouhardi* dans l'hôte *Drosophila melanogaster* en conditions sympatriques, (b) du niveau de résistance de *D. melanogaster* et (c) du niveau de virulence de *L. bouhardi*.

Le pourcentage de larves de *D. melanogaster* encapsulant les œufs de *L. bouhardi* est représenté par la portion noire des disques.

(a) Les taux d'encapsulement ont été obtenus après infestation expérimentale de populations de *D. melanogaster* par des populations sympatriques de *L. bouhardi*

(b) Les taux d'encapsulement ont été obtenus après infestation expérimentale de populations de *D. melanogaster* d'origines géographiques variées par la lignée de référence IS_y de *L. bouhardi*, dite "avirulente" sur *D. melanogaster* (génotype IS_m⁻/IS_m⁻)

(c) Les taux d'encapsulement ont été obtenus après infestation expérimentale de la souche résistante de référence de *D. melanogaster* par des populations de *L. bouhardi* d'origines géographiques variées

D'après Dupas et al., 2002

Variations géographiques dans le couple *Asobara tabida* – *D. melanogaster*

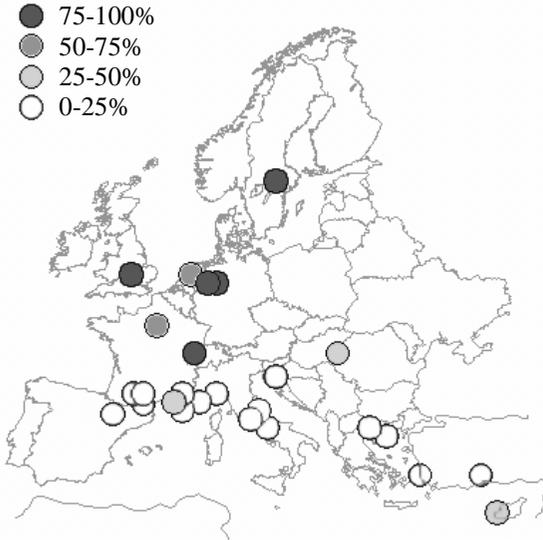


Figure 24 : Niveau de virulence de différentes populations européennes du parasitoïde *Asobara tabida* sur l'espèce hôte *Drosophila melanogaster*.

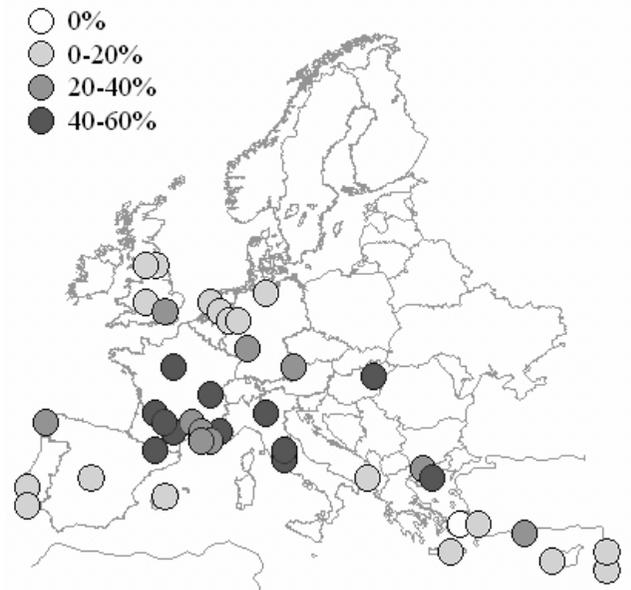
Les disques de différentes teintes représentent les différents niveaux de pourcentage d'œufs de parasitoïde encapsulés par la souche de référence allemande 'inHam' de *D. melanogaster*

D'après Kraaijeveld & van Alphen, 1994

Figure 25 : Niveau de résistance de différentes populations européennes de *Drosophila melanogaster* au parasitoïde *Asobara tabida*

Les disques de différentes teintes représentent les différents niveaux de pourcentage de larves hôte encapsulant les œufs de parasitoïde de la souche de référence turque 'Tasagil'

D'après Kraaijeveld & van Alphen, 1995



La **virulence** de l'espèce *L. bouleardi* sur *D. melanogaster* est en comparaison beaucoup moins variable que celle de *A. tabida* (Dupas et Boscaro, 1999 ; Dupas *et al.*, 2002) (Figure 23c). En effet, la plupart des populations étudiées à ce jour sont très hautement virulentes sur *D. melanogaster*. Seules les populations d'Afrique tropicale (et en particulier une population localisée à Brazzaville, au Congo) présentent une virulence réduite vis à vis de cette espèce hôte. La virulence vis à vis de *D. melanogaster* est élevée dans les régions où *D. melanogaster* et/ou *D. simulans* est le principal hôte (Carton et Nappi, 1991 ; Dupas et Boscaro, 1999) (Tableau 7 et Figure 26). Elle est par contre fortement réduite dans les régions où le nombre d'hôtes potentiels est élevé, tel qu'il est observé en Afrique tropicale. Dans la région de Brazzaville (Congo), les parasitoïdes sont fortement encapsulés par *D. melanogaster* malgré la présence de *D. melanogaster* et *D. simulans* (Vouidibio, 1985). Dans cette région, des coûts associés à la virulence vis à vis de *D. melanogaster* pourraient être révélés grâce au relâchement des pressions de sélection associé au passage sur un hôte alternatif. Cependant, de tels coûts n'ont pas été mis en évidence à ce jour. L'implication d'un hôte alternatif, plus permissif au développement du parasitoïde reste de même à démontrer. Le spectre d'hôte de cette population semble cependant plus étendu que dans le reste du monde, puisque dans cette aire géographique, 6 espèces de drosophiles sur les 12 examinées sont parasitées par *L. bouleardi* (Carton, 1987 ; Carton et Nappi, 1991). Quatre de ces espèces (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. yakuba* et *D. teissieri*) permettent le développement de ce parasitoïde (Tableau 8). Ces espèces sont fortement apparentées phylogénétiquement et appartiennent toutes au sous groupe *melanogaster* (Lachaise *et al.*, 2000).

Tableau 7 : Taux d'encapsulation des œufs du parasitoïde *Leptopilina bouleardi* dans des souches sympatriques de *Drosophila melanogaster*. D'après Carton & Nappi 1991

Localité	Présence de <i>D.melanogaster</i>	Présence de <i>D.simulans</i>	Nombre d'espèces hôtes	Taux d'encapsulation	Nombre de larves étudiées
Nasrallah (Tunisie)	Courant	Courant	2	0.0 %	243
Riberao Prato (Brésil)	Rare	Courant	1(2)	2.1 %	95
Guadeloupe (Iles Caraïbes)	Courant	Non	1	0.7 %	284
Malaucène (France)	Courant	Sporadique	1 (2?)	0.0 %	232
Brazzaville (Congo)	Courant	Courant	6	42.4 %	201

Variations géographiques de virulence chez *Leptopilina boulardi*

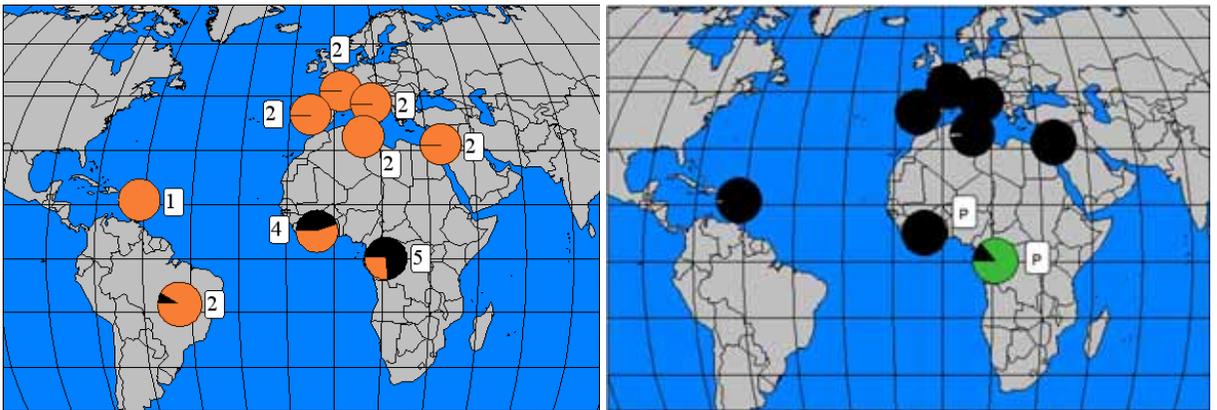


Figure 26 : Variations géographiques du niveau de virulence de *Leptopilina boulardi* sur les hôtes *Drosophila melanogaster* (a) et *Drosophila yakuba* (b)

Le pourcentage de larves de drosophiles encapsulant les œufs de *L. boulardi* est représenté par la portion noire des disques.

Les taux d'encapsulation ont été obtenus après infestation expérimentale de la souche résistante de référence R de *D. melanogaster* (a) ou la souche résistante de référence R₁ de *D. yakuba* par des populations de *L. boulardi* d'origines géographiques variées.

Les chiffres indiqués à côté des disques représentent le nombre d'espèces hôtes disponibles pour le parasitoïde. La lettre P indiquée à côté des disques indique la présence de l'espèce *D. yakuba*.

D'après Dupas et al., 1999

Tableau 8 : Taux d'infestation et taux d'encapsulation d'une souche congolaise de *L. bouleardi* (souche G-346, originaire de Brazzaville) dans 4 espèces permissives à son développement. D'après Carton & Nappi 1991

	Nb de larves étudiées	Taux d'infestation	Taux d'encapsulation
<i>D. melanogaster</i>	201	61 ± 3.2 %	42 ± 2.4 %
<i>D. simulans</i>	138	49 ± 6.9 %	25 ± 6.3 %
<i>D. yakuba</i>	121	50 ± 11 %	47 ± 5.0 %
<i>D. teissieri</i>	141	48 ± 6.3 %	78 ± 3.6 %

De manière inattendue, la virulence de *L. bouleardi* vis à vis de *D. yakuba* est élevée dans la région de Brazzaville (Dupas et Boscaro, 1999) (Figure 26). Cette espèce n'étant présente qu'en Afrique tropicale, l'absence de virulence vis à vis de cette espèce dans toutes les autres populations de *L. bouleardi* testées à ce jour s'explique aisément, à l'exception de la population de Lamto, en Côte d'Ivoire, chez laquelle la virulence vis à vis de *D. yakuba* est nulle malgré la présence de cet hôte. Par ailleurs, la forte virulence de la population de Brazzaville vis à vis de *D. yakuba* a fait de cette espèce un candidat potentiel en tant que 'hôte alternatif' de *L. bouleardi* dans cette région.

↳ Le comportement de sélection d'hôte a été testé au cours de ma thèse, notamment afin de déterminer si *D. yakuba* est une espèce potentiellement choisie par des femelles issues de la population de Brazzaville.

Enfin, la **résistance** de *D. melanogaster* à *L. bouleardi* est généralement élevée, observée en absence du parasitoïde et ne semble pas présenter de structuration géographique particulière (Dupas *et al.*, 2002) (Figure 23b). Il semblerait, contre toute attente, que la résistance à *L. bouleardi* soit un caractère neutre, puisque l'indice de différenciation génétique F_{st} calculé est du même ordre que celui obtenu avec un marqueur neutre des populations de drosophiles (Michalakis et Veuille, 1996 ; Dupas *et al.*, 2002).

↳ Les variations de résistance des populations de *D. yakuba* au parasitoïde *L. bouleardi* dans les différentes populations d'Afrique tropicale ont été étudiées au cours de ma thèse.

- Mécanismes physiologiques (soumis à sélection)

Les bases physiologiques sous-jacentes à ces variations de résistance ou de virulence au sein d'une espèce hôte sont largement méconnues, malgré une connaissance accrue récemment de la réponse immunitaire des hôtes d'une part (partie I) et des stratégies de virulence de nombreux parasitoïdes d'autre part (partie II). Ainsi, les variations de résistance à un parasitoïde observées dans une espèce donnée vont être généralement imputées à des différences "d'immunocompétence", qui restent alors une "boîte noire" dont on ne connaît pas la nature exacte. De même, les bases physiologiques à l'origine des variations de virulence observées chez les espèces parasitoïdes restent un mystère dans la plupart des cas. A ma connaissance, seuls les couples parasitoïde/hôte *A. tabida* - *D. melanogaster* et *L. bouvardi* - *D. melanogaster* ont été étudiés pour ces deux aspects.

En ce qui concerne le couple *A. tabida* - *D. melanogaster*, les mécanismes physiologiques à l'origine des variations de résistance et de virulence ont été mis en évidence en étudiant les différences entre lignées soumises à sélection et lignées témoin. Il a été établi que l'augmentation de la résistance au parasitoïde *A. tabida* dans les lignées sélectionnées de *D. melanogaster* est liée à une augmentation drastique du nombre total d'hémocytes qui est environ 2 fois supérieur dans les lignées sélectionnées pour une résistance accrue par rapport aux lignées témoin (Kraaijeveld *et al.*, 2001b) (Figure 27). Le niveau d'activité de la phénoloxydase semble par contre équivalent entre lignées témoin et lignées sélectionnées (données non publiées indiquées dans Kraaijeveld *et al.*, 2002). En ce qui concerne la virulence du parasitoïde *A. tabida* vis à vis de l'hôte *D. melanogaster*, une forte corrélation entre l'augmentation de la virulence et le degré d'enveloppement des œufs du parasitoïde dans les tissus de l'hôte a été mise en évidence (Kraaijeveld *et al.*, 2001a) (Figure 28). Ce parasitoïde est en effet connu pour échapper à l'encapsulation de *D. melanogaster* en s'entourant de tissus hôtes quelques heures après parasitisme (Monconduit et Prévost, 1994 ; Eslin *et al.*, 1996). Cette corrélation semble aussi exister dans les populations naturelles puisque les œufs des souches méditerranéennes du parasitoïde, fortement virulentes vis à vis de *D. melanogaster*, ont un chorion plus adhésif, ce qui facilite leur camouflage dans les tissus hôtes (Kraaijeveld et van Alphen, 1994). Le cas extrême est représenté par la souche WOV (ou WOPV, originaire des Pays Bas), qui est connue pour avoir un chorion non-adhésif, ce qui la rend particulièrement vulnérable à l'encapsulation par *D. melanogaster*. En plus de cette caractéristique, cette souche n'inhibe pas l'activité phénoloxydase des larves de *D. melanogaster*, contrairement à la souche A1 originaire de Lyon, virulente sur *D. melanogaster* (Moreau *et al.*, 2000). Schématiquement, les variations du résultat de l'interaction entre *A. tabida* et *L. bouvardi* sont donc le résultat d'une "course" entre l'hôte qui a tout intérêt à avoir à sa disposition un nombre important de cellules immunitaires afin d'augmenter les chances de détecter et encapsuler rapidement l'œuf de parasitoïde, et le parasitoïde qui s'entoure "le plus rapidement possible" des tissus hôtes afin d'échapper à l'encapsulation (Eslin et Prévost, 2000).

Mécanismes physiologiques (sélectionnables)
sous-jacents aux variations de résistance et de virulence
dans le couple *Asobara-tabida* – *D. melanogaster*

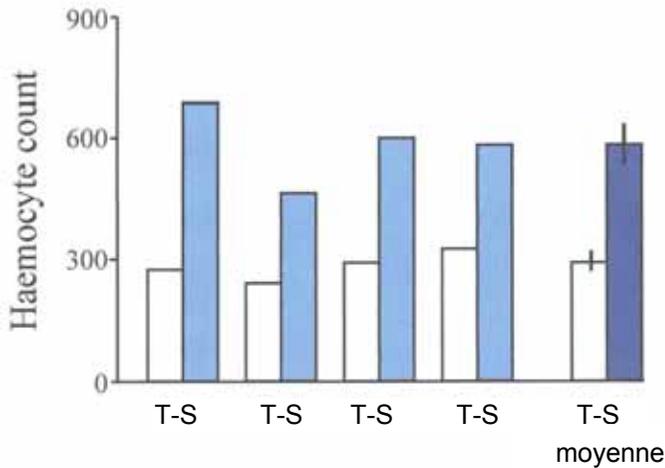


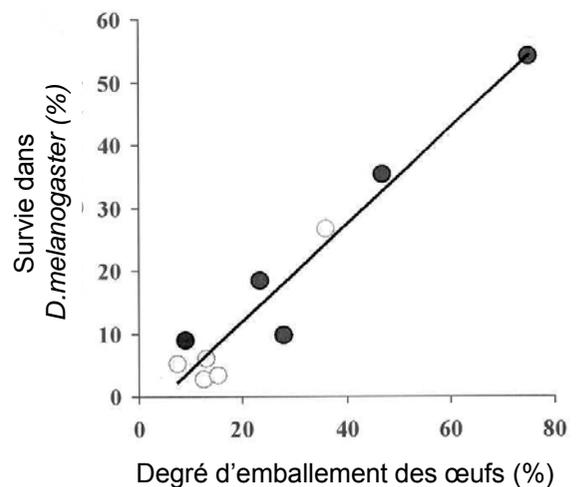
Figure 27 : Comparaison du nombre total d'hémocytes observé dans des lignées de *Drosophila melanogaster* sélectionnées pour leur résistance au parasitoïde *Asobara tabida* (S) par rapport aux lignées témoin (C).

D'après Kraaijeveld et al., 2001b

Figure 28 : Corrélation entre le degré d'enveloppement dans les tissus hôte et la survie des œufs du parasitoïde *Asobara tabida* dans *Drosophila melanogaster*.

Les cercles ouverts correspondent aux lignées témoin tandis que les disques gris représentent les lignées sélectionnées pour leur virulence.

D'après Kraaijeveld et al., 2001a



Les mécanismes physiologiques sous-jacents aux variations de virulence et de résistance dans le couple *L. bouvardi* - *D. melanogaster* sont également partiellement expliqués. L'étude des variations de l'issue des interactions dans ce couple repose sur des comparaisons "deux à deux" entre des lignées isofemelles sensibles et résistantes de l'hôte et de lignées virulentes et avirulentes de parasitoïdes. L'avantage de ce système est de connaître la nature exacte des interactions génétiques qui sous-tendent les variations physiologiques observées (voir p60 et Figure 21). La comparaison des profils hématocytaires de larves de *D. melanogaster* résistantes et sensibles à la lignée IS_y de *L. bouvardi* (c'est à dire encapsulant ou non les œufs de ce parasitoïde) semble indiquer que la prolifération hématocytaire, observée dans tous les cas, est plus rapide chez les larves résistantes que chez les larves de la lignée sensible (Russo *et al.*, 2001) (Figure 29). Des expériences sont actuellement en cours afin de déterminer si cette rapide prolifération cellulaire est sous le contrôle du locus *Rlb* (Poirié, communication personnelle). Par ailleurs, la comparaison des profils hématocytaires de larves de drosophiles de la lignée résistante, parasitées soit par la lignée IS_m, soit par la lignée IS_y - respectivement virulentes et avirulentes vis à vis de *D. melanogaster* - semble indiquer que la non-virulence de la lignée IS_y est liée à l'absence de modification de la forme des lamellocytes, le type hématocytaire participant majoritairement à la formation de la capsule chez *D. melanogaster* (Russo *et al.*, 2001). La modification de la forme des lamellocytes par la lignée IS_m est due à l'action d'une protéine RhoGAP, appelée "facteur P4", qui est contenue dans les glandes impaires des femelles et injectée dans les larves au moment de l'oviposition (Labrosse *et al.*, 2005a ; Labrosse *et al.*, 2005b) (partie II.3.1, p49-50). La comparaison des profils protéiques des glandes impaires de femelles provenant d'origine géographiques variées indique que la bande protéique P4 est présente dans toutes les lignées virulentes contre *D. melanogaster* et absente du profil protéique de la lignée IS_y (Labrosse *et al.*, 2005b) (Figure 30). Les anticorps dirigés spécifiquement contre la protéine P4 reconnaissent d'ailleurs des protéines à la taille attendue dans la souche G301-1, originaire de Guadeloupe et également virulente contre *D. melanogaster*. La virulence de *L. bouvardi* vis à vis de *D. melanogaster* semble ainsi corrélée à la présence du facteur P4 qui modifie la forme des lamellocytes.

↪ La majeure partie de mon travail de thèse a consisté en l'étude des bases physiologiques qui sous-tendent les variations de virulence et de résistance dans le couple *L. bouvardi* - *D. yakuba*.

Mécanismes physiologiques (sélectionnables)
sous-jacents aux variations de résistance et de virulence
dans le couple *Leptopilina boulardi* – *D. melanogaster*

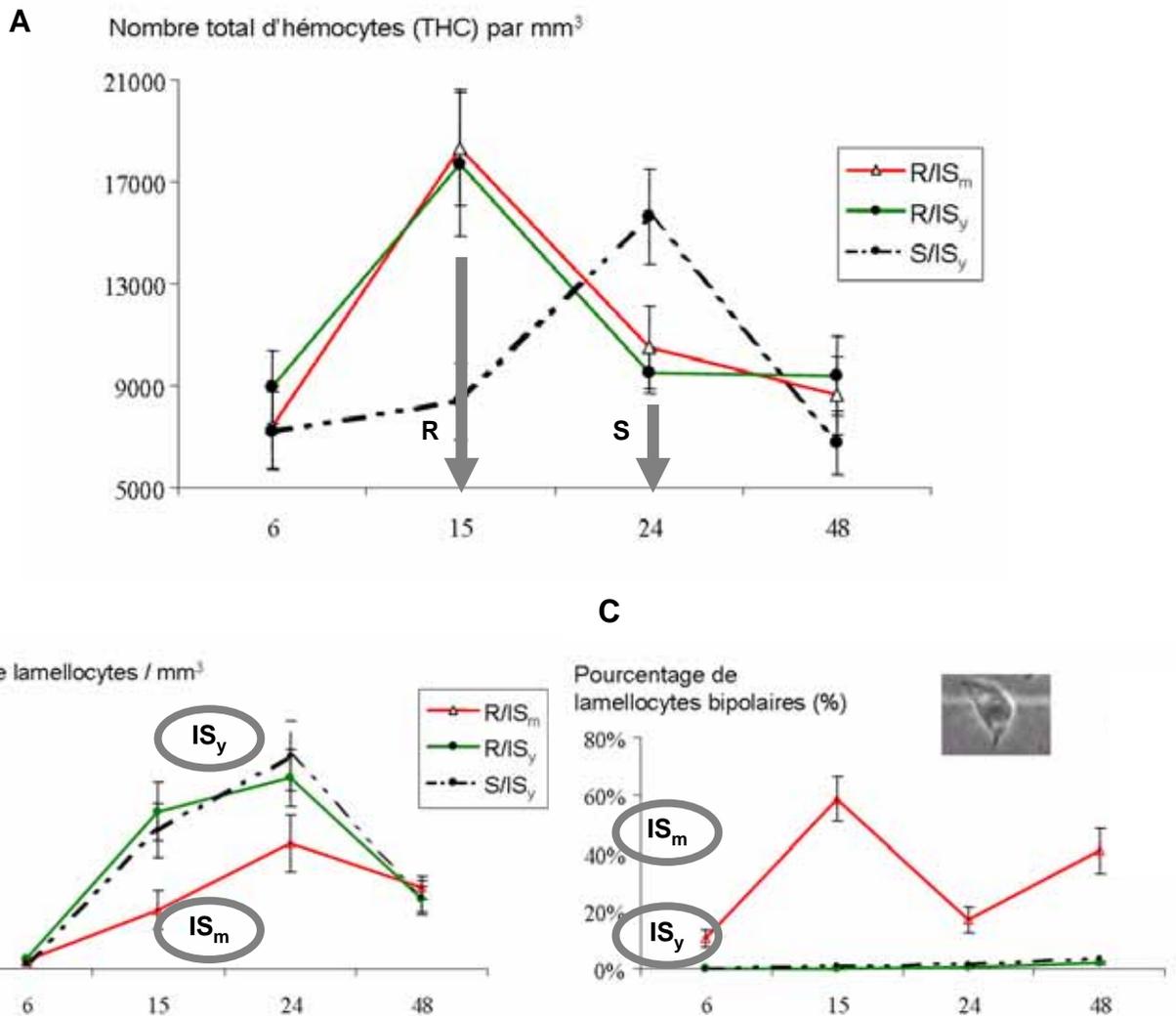


Figure 29 : Comparaison des profils hémocytaires de larves de *Drosophila melanogaster* ayant des niveaux de résistance différents (R et S), à différents moments après parasitisme par deux souches du parasitoïde *Leptopilina boulardi* ayant des niveaux de virulence différents (IS_y et IS_m). **A.** Comparaison du nombre total d'hémocytes. **B.** Comparaison du nombre de lamellocytes. **C.** Comparaison du pourcentage de lamellocytes bipolaires (pathologie hémocyttaire)

Pour chaque graphique, le profil hémocyttaire de larves sensibles (lignes brisées) et résistantes (lignes pleines) parasitées par la lignée de parasitoïde IS_y sont comparées, ainsi que le profil hémocyttaire de larves résistantes parasitées par la lignée de parasitoïde IS_y (cercles noirs) ou la lignée IS_m (triangle blanc).

Selon ces résultats, la résistance de *D. melanogaster* à la lignée IS_y semble expliquée par une prolifération hémocyttaire après infestation plus rapide après l'infestation (A) tandis que la virulence de la lignée IS_m semble expliquée par une diminution du nombre de lamellocytes (B) ainsi que par l'induction de la forme bipolaire des lamellocytes (C).

D'après Russo et al., 2001

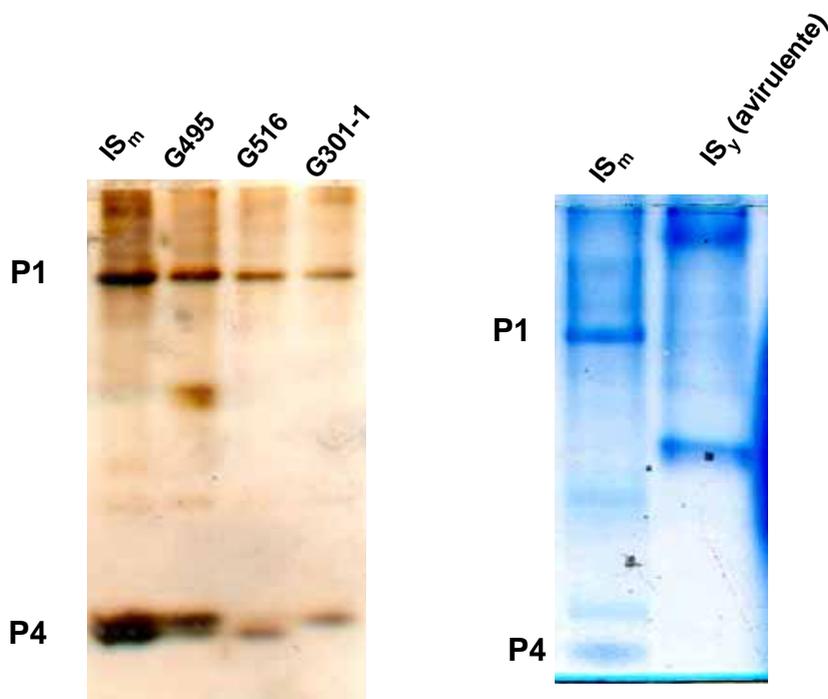


Figure 30 : Comparaison des profils protéiques (PAGE Natif) des glandes impaires de lignées de diverses origines géographiques du parasitoïde *Leptopilina boulardi*.

De gauche à droite: Lignée IS_m (G431), originaire de Nasrallah, Tunisie ; Lignée G495, originaire de Lamto, Côte d'Ivoire ; Lignée G516, originaire de Toulouse, France ; Lignée G301-1, originaire de Guadeloupe ; Lignée IS_y , originaire de Brazzaville, Congo.

Toutes les lignées analysées, à l'exception de la lignée IS_y , sont virulentes sur *D. melanogaster*. Les bandes protéiques P1 et P4 sont présentes chez toutes les lignées virulentes, mais absentes du profil de la lignée IS_y .

La bande P4 est double chez les lignées IS_m et G495, mais simple chez G516 et G301-1. Ces 2 bandes correspondent à 2 formes de la même protéine.

D'après Labrosse et al., 2005b

III.2 Variations du succès d'un parasitoïde d'une espèce hôte à l'autre

Le succès d'un parasitoïde, qu'il soit généraliste ou spécialiste, n'est possible que sur une gamme restreinte d'espèces hôtes, appelée **spectre d'hôte**. Ce spectre d'hôte est défini premièrement par l'écologie du parasitoïde et des hôtes qui doivent partager le même habitat, par les capacités du parasitoïde à percevoir les signaux émis par ces hôtes afin de les localiser et enfin par les capacités du parasitoïde à se développer aux dépens de ces hôtes (adéquation physiologique, capacité à contourner les défenses immunitaires...). Les espèces hôtes permettant le développement du parasitoïde sont appelées **permissives** tandis que les espèces hôtes inadéquates sont appelées **non-permissives**. Les espèces hôtes **semi-permissives** sont celles qui permettent le développement d'une partie seulement des œufs de parasitoïdes ou qui nécessitent certaines conditions pour être adéquates au développement du parasitoïde (superparasitisme, infestation de jeunes stades larvaires...). Il est intéressant de noter qu'une espèce hôte donnée peut être permissive au développement d'un parasitoïde qui n'a jamais été en contact avec cette espèce hôte au cours de son évolution (cas des introductions en lutte biologique notamment) (Hollanen et Pimentel, 1984). Certains parasitoïdes paraissent avoir des stratégies de virulence "universelles", efficaces sur des espèces hôtes apparemment différentes. On pourrait alors imaginer que la spécificité parasitaire ne se définit pas dans ce cas à l'échelle de l'espèce hôte mais à l'échelle des cibles visées lors du parasitisme par les facteurs de virulence du parasitoïde. Si les "cibles hôtes" sont relativement bien conservées d'une espèce à l'autre, un parasitoïde à priori "non-adapté" à une espèce hôte donnée pourrait se développer sur cette nouvelle espèce.

Le spectre d'hôte d'un parasitoïde est ainsi déterminé par la combinaison d'un nombre important de facteurs, ce qui rend son étude extrêmement complexe. On peut toutefois considérer que la capacité d'un parasitoïde à se développer dans une gamme d'hôtes potentiels joue un rôle crucial dans la détermination de son spectre d'hôte, puisque sa survie est directement dépendante de ses capacités de virulence. Ces capacités de virulence, variables d'une espèce hôte à l'autre, conduisent alors à la sélection de comportements qui vont favoriser l'oviposition dans les espèces les plus permissives. On observe ainsi chez de nombreuses espèces de parasitoïdes des **comportements "optimaux" de sélection d'hôtes**, qui conduisent les parasitoïdes à choisir préférentiellement les espèces hôtes dans lesquelles leur progéniture a une probabilité maximale de réussir son développement (voir van Alphen et Vet, 1986 ; Vinson, 1998 pour revue). Les modèles dits "*d'optimal foraging*" prédisent ainsi qu'en situation de choix, les femelles parasitoïdes devraient plutôt choisir l'espèce hôte la plus adéquate au développement de leur progéniture, à moins que la probabilité de rencontre avec cette espèce soit si faible que l'acceptation d'hôtes de moindre qualité lui permette de produire plus de descendants qu'en les rejetant (MacArthur et Pianka, 1966 ; Krebs et Davies, 1981 ; Charnov et Stephens, 1988). La plupart des études menées à ce jour (qui ne seront pas

discutées ici) vont dans le sens de ces prédictions (van Lenteren et Bakker, 1978 ; van Alphen et Janssen, 1982 ; Driessen *et al.*, 1991 ; Mohamed *et al.*, 2003), mais certains exemples montrent aussi une inadéquation entre la préférence d'une espèce hôte et sa permissivité (Brodeur et Vet, 1995).

De manière surprenante, très peu d'études ont tenté d'expliquer d'un point de vue physiologique les variations d'encapsulation d'un parasitoïde sur différentes espèces hôtes, ce qui permet d'en dresser une liste quasi exhaustive.

La plupart de ces études portant sur les parasitoïdes porteurs de PDVs, des corrélations entre les capacités immunosuppressives des parasitoïdes et les profils d'**expression des PDVs** dans les différents hôtes concernés ont été recherchés (Harwood *et al.*, 1998 ; Trudeau et Strand, 1998 ; Cui *et al.*, 2000 ; Kadash *et al.*, 2003). Chez *Cotesia kariyai* par exemple, l'expression du PDV injecté par le parasitoïde est détectée dans l'hôte habituel *Pseudaletia separata* mais pas dans l'hôte non permissif *Spodoptera litura* (Hayakawa *et al.*, 1994). De même, une corrélation entre la quantité de protéines virales produites et la permissivité de différentes espèces hôtes a été observée chez *Cotesia congregata* (Harwood *et al.*, 1998). Enfin, l'expression de gènes viraux de *Microplitis mediator* dans les hémocytes de l'hôte non permissif *Heliothis virescens* est transitoire, tandis que leur expression persiste jusqu'à l'émergence du parasitoïde chez l'hôte permissif *Pseudoplusia includens* (Kadash *et al.*, 2003).

Une étude intégrant aussi le rôle des protéines ovariennes a cependant été effectuée pour le parasitoïde *Campoletis sonorensis* (Cui *et al.*, 2000). Ce parasitoïde généraliste est connu pour se développer dans une grande variété d'espèces de lépidoptères, qui peuvent être plus ou moins adéquates pour son développement. Dans l'étude de Cui *et al.* (2000), les œufs de *C. sonorensis* ne sont pas encapsulés dans les hôtes permissifs *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens* et *Heliothis zea* tandis qu'ils sont systématiquement encapsulés dans l'espèce non-permissive *Manduca sexta*. Les hôtes *Agrotis ipsilon* et *Spodoptera exigua* sont semi-permissifs dans la mesure où ils permettent le développement complet de *C. sonorensis*, mais uniquement en condition de superparasitisme. Dans l'hôte *H. virescens*, le succès parasitaire de *C. sonorensis* est lié à l'altération du cytosquelette des hémocytes, dans un premier temps par l'action de protéines ovariennes co-injectées avec l'œuf, puis grâce à l'expression des PDVs 24 heures après l'infection (Luckhart et Webb, 1996) (partie II.3.1, p45). Lors de leur action sur les hémocytes, les protéines ovariennes sont internalisées dans les cellules puis dégradées, ce qui conduit à la diminution progressive de leur concentration dans l'hémolymphe de l'hôte *H. virescens*. Cette diminution de la concentration en protéines ovariennes est aussi observée chez les hôtes *M. sexta*, *A. ipsilon*, *S. exigua*, *T. ni* et *H. zea* parasités par *C. sonorensis*. Par ailleurs, l'encapsulation de *C. sonorensis* n'est pas immédiat, mais prend place 3-4 jours après parasitisme chez les hôtes semi- et non-permissifs (Cui *et al.*, 2000). L'échec du parasitisme de *C. sonorensis* dans ces hôtes n'est donc pas dû à l'absence d'effet des protéines ovariennes, puisque celles-ci

semblent protéger l'œuf de *C. sonorensis* durant les premiers jours du parasitisme. Cet échec semble en revanche lié à la diminution de la concentration de certaines protéines codées par les PDVs, observée quelques jours après parasitisme chez ces hôtes (Cui *et al.*, 2000). En effet, la concentration de la protéine virale VHv1.4 décline à partir du 3^e jour dans l'hôte non-permissif *M. sexta* et dans l'hôte semi-permissif *A. ipsilon*, alors qu'elle reste constante chez les hôtes permissifs *H. virescens*, *H. zea* et *T. ni*. La diminution de la concentration de VHv1.4 pourrait être due soit à l'élimination des cellules infectées par le PDV par apoptose, soit à l'inhibition de l'expression des gènes viraux (Cui *et al.*, 1997). Les protéines virales riches en motifs cystéine de *C. sonorensis* sont connues pour être impliquées dans l'altération de la fonction hémocytaire de l'hôte *H. virescens* (Webb et Luckhart, 1996 ; Cui *et al.*, 1997). La diminution de leur concentration chez les hôtes semi- et non-permissifs pourrait également conduire à l'absence de pathologie hémocytaire. Une corrélation entre le succès parasitaire et l'inhibition des capacités d'étalement des hémocytes a été par ailleurs observée dans l'hôte semi-permissif *Spodoptera frugiperda*, dans lequel 60% des œufs de *C. sonorensis* réussissent leur développement (Prévost et Vinson, 1987 ; Prévost *et al.*, 1990). De même, l'attachement de VHv1.4 aux granulocytes habituellement observé chez *H. virescens* n'est pas observé dans l'hôte non-permissif *M. sexta*, alors qu'il est observé chez tous les autres hôtes (Cui *et al.*, 1997, 2000). Enfin, l'activité phénoloxydase est réduite de manière permanente dans les hôtes permissifs alors qu'elle se rétablit progressivement dans les hôtes non-permissifs, probablement à cause de la diminution de l'expression des PDVs (Cui *et al.*, 2000).

L'immunosuppression ne garantit pas toujours le succès d'un parasitoïde à se développer dans un hôte. Ainsi, les PDVs de *Microplitis demolitor* peuvent s'exprimer et provoquer la suppression de l'encapsulement chez *Spodoptera frugiperda* sans pour autant permettre le développement des larves de parasitoïde (Trudeau et Strand, 1998). En effet, les œufs du parasitoïde meurent dans les 24 heures qui suivent leur oviposition, alors que les capacités d'étalement des hémocytes ainsi que les capacités d'encapsulement sont fortement réduites pendant les 3 jours suivant l'oviposition.

De fortes variations d'encapsulement d'une espèce hôte à l'autre sont aussi observées chez les parasitoïdes de drosophile, qui peuvent pondre leurs œufs dans une grande variété d'espèces hôtes (Carton *et al.*, 1986 ; Fleury *et al.*, 2004 ; Traynor et Mayhew, 2005). La survie des espèces *Asobara tabida* et *Leptopilina heterotoma* varie de 0 à 90% dans les 9 espèces de drosophiles testées par Janssen (1989). De même, le succès parasitaire de *Leptopilina boulardi* varie de 0 à 60% dans les 7 espèces hôtes de drosophiles testées par Carton et Kitano (1981). Le succès parasitaire de *L. boulardi* semble fortement corrélé à la mise en échec de l'encapsulement de ses œufs dans les différentes espèces hôtes puisqu'une corrélation négative est observée entre le succès parasitaire et le pourcentage d'œufs encapsulés dans les 7 espèces de drosophiles du sous-groupe *melanogaster* (Carton et Kitano, 1981) (Figure 31).

Variations de succès de *Leptopilina boulardi* dans
différentes espèces de drosophiles

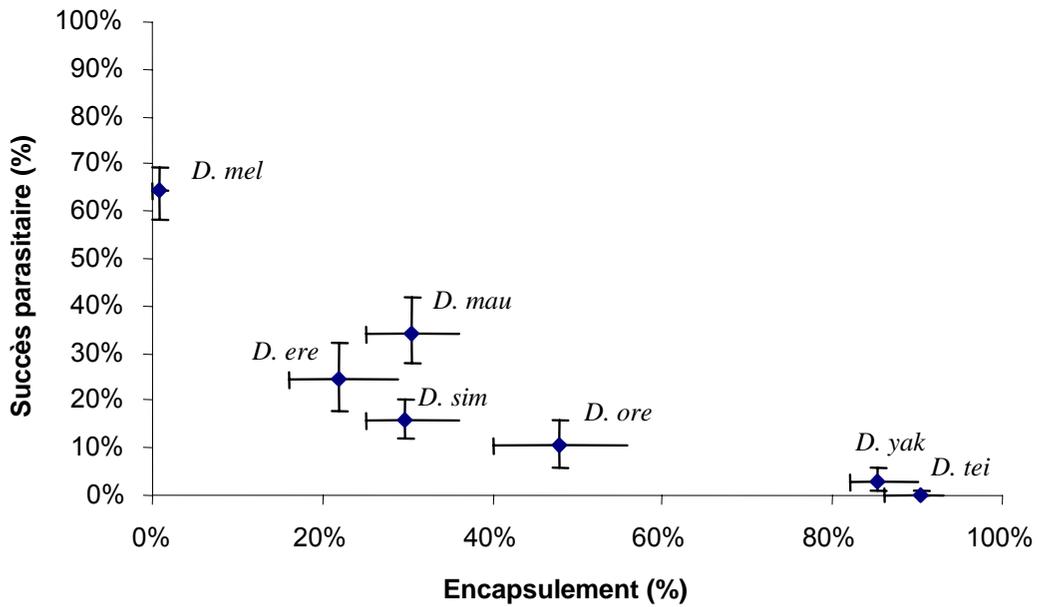


Figure 31 : Corrélation entre le succès parasitaire de *Leptopilina boulardi* (évalué par le taux d'émergence de parasitoïdes adultes) et le taux d'encapsulement de ses œufs dans 7 espèces de drosophiles du sous-groupe *melanogaster*: *D.melanogaster* (*D. mel*), *D. erecta* (*D. ere*), *D. mauritiana* (*D. mau*), *D. simulans* (*D. sim*), *D. orena* (*D. ore*), *D. yakuba* (*D. yak*), *D. teissieri* (*D. tei*).

La souche de *L. boulardi* utilisée pour cette étude est la souche G301-1, d'origine Guadeloupéenne

D'après Carton & Kitano, 1981

Le nombre d'hémocytes circulants (**THC**, pour *Total Hemocytes Count*) semble être l'un des facteurs conditionnant la réussite de la réaction d'encapsulation. L'étude comparative de Eslin et Prévost (1996) menée sur 6 espèces de drosophiles a permis de mettre en évidence une corrélation positive entre le taux d'encapsulation des œufs d'*A. tabida* et le THC de larves saines ou parasitées (Figure 32). Ce taux d'encapsulation est nul chez l'espèce *Drosophila subobscura* qui ne semble pas posséder de lamellocytes (Eslin et Doury, communication personnelle). Les variations de THC ne semblent pas par contre expliquer les variations de succès de *L. bouvardi* sur les différentes espèces de drosophile (Figure 33). En effet, un nombre élevé d'hémocytes ne permet pas toujours d'encapsuler le parasitoïde (comme chez *D. simulans*) et un nombre faible d'hémocytes peut suffire à encapsuler le parasitoïde (comme chez *D. yakuba*).

Pour le parasitoïde *Asobara citri*, 45% des œufs sont encapsulés chez *D. simulans* qui a un THC 4-5 fois plus important que *D. melanogaster* et qui n'encapsule pas ce parasitoïde (Eslin et Prévost, 1996 ; Moreau *et al.*, 2005). Malgré la faible capacité d'*A. citri* à inhiber l'encapsulation de *D. simulans*, des altérations de la réponse immunitaire similaires à celles observées durant le parasitisme de l'hôte permissif *D. melanogaster* ont été observées chez cette espèce. 96 heures après parasitisme, l'organe hématopoïétique de *D. simulans* présente les mêmes modifications que l'organe hématopoïétique de *D. melanogaster*. Lorsque cet organe est comparé à celui de larves de drosophiles non parasitées, la taille des lobes antérieurs est significativement réduite (Moreau *et al.*, 2005). De même, une diminution du THC par rapport au THC de larves saines est observé, mais le nombre de lamellocytes n'est pas réduit (et augmente même légèrement) chez *D. simulans*, contrairement à ce qui est observé chez *D. melanogaster* (Moreau *et al.*, 2003 ; Moreau *et al.*, 2005). Il semble que la faible augmentation de lamellocytes puisse se produire avant l'altération totale des lobes antérieurs de l'organe hématopoïétique de *D. simulans*, ce qui serait suffisant pour permettre dans 45% des cas la formation d'une capsule.

Les variations d'encapsulation d'une espèce parasitoïde dans différentes espèces hôtes peuvent être expliquées, dans certains cas, par différentes "capacités immunitaires" ("**immunocompétence**") des hôtes, tel qu'il est observé dans les interactions *A. tabida*-drosophiles, ou par des différences de spécificité d'action des facteurs immunosuppresseurs. Il convient donc de distinguer d'une part les différences d'immunocompétence des hôtes auxquelles un parasitoïde peut être sensible, et d'autre part les variations de sensibilité des différentes espèces hôtes aux facteurs de virulence des parasitoïdes. Cette distinction, essentielle à la compréhension des bases sous-jacentes à l'étendue des spectres d'hôtes repose sur la connaissance précise des mécanismes physiologiques et moléculaires des stratégies de virulence considérées.

↳ Un des objectifs de mon travail de thèse a consisté à déterminer les causes de l'échec de la lignée IS_m de *Leptopilina bouvardi* à éviter l'encapsulation par l'hôte *Drosophila yakuba*, alors qu'elle inhibe avec succès l'encapsulation de l'hôte *Drosophila melanogaster*.

Variations de succès d'*Asobara tabida* dans différentes espèces de drosophiles

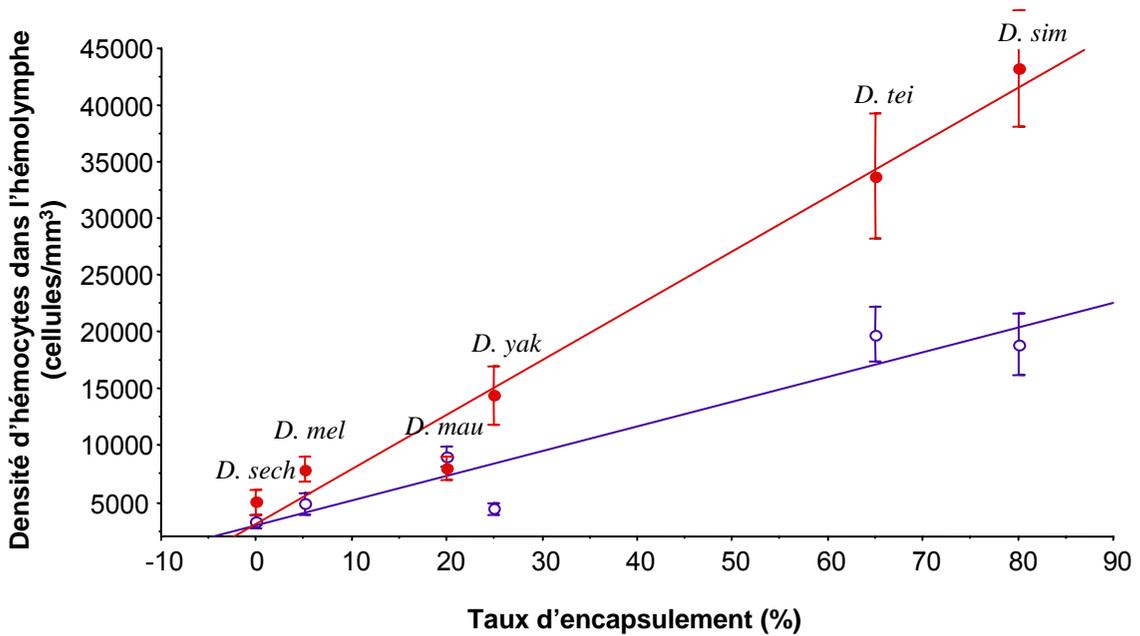


Figure 32 : Corrélation entre le taux d'encapsulation du braconidé *Asobara tabida* et le nombre total d'hémocytes chez les larves parasitées (●) et non parasitées (○) de 6 espèces de drosophiles du sous-groupe *melanogaster* : *D. sechellia* (*D. sech*), *D. melanogaster* (*D. mel*), *D. mauritiana* (*D. mau*), *D. yakuba* (*D. yak*), *D. teissieri* (*D. tei*) et *D. simulans* (*D. sim*).

D'après Eslin & Prévost, 1998

Variations de succès de *Leptopilina bouleari* dans différentes espèces de drosophiles

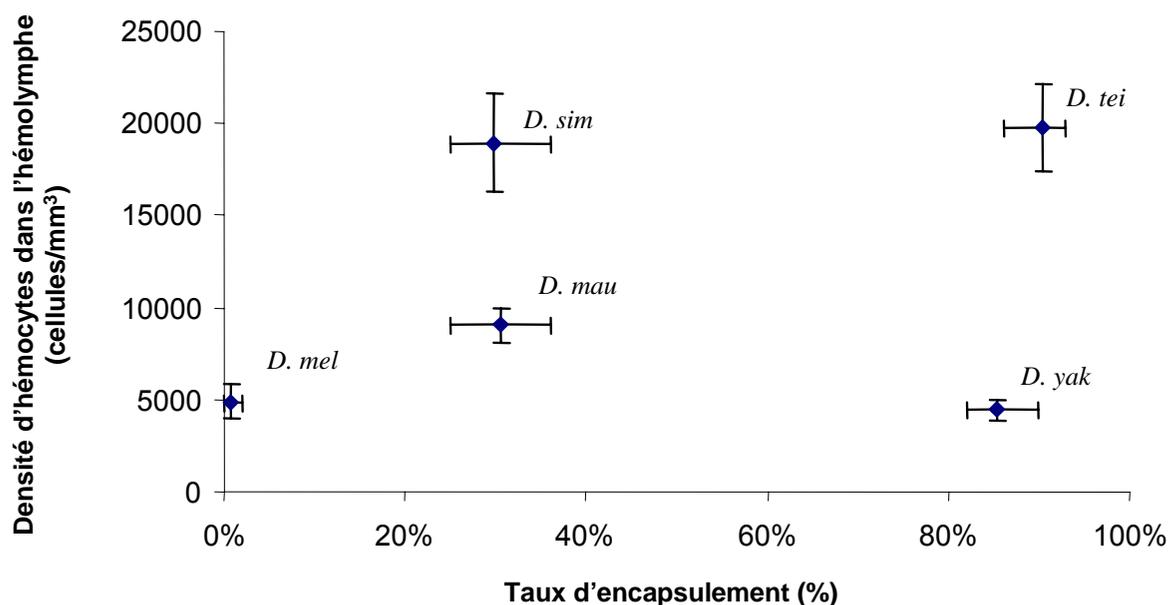


Figure 33 : Absence de corrélation entre le taux d'encapsulation de *Leptopilina bouleari* et nombre total d'hémocytes chez les larves non parasitées de 5 espèces de drosophiles du sous-groupe *melanogaster*: *D. melanogaster* (*D. mel*), *D. simulans* (*D. sim*), *D. mauritiana* (*D. mau*), *D. yakuba* (*D. yak*) et *D. teissieri* (*D. tei*).

La souche de *L. bouleari* utilisée pour cette étude est la souche G301-1, d'origine Guadeloupéenne

Figure réalisée à partir des données de Eslin & Prévost, 1998 et Carton & Kitano, 1981

IV CONCLUSION DE LA SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Plusieurs constats peuvent être établis à la lumière des données bibliographiques réunies ci-dessus. Premièrement, malgré une bonne connaissance des mécanismes physiologiques et moléculaires de la réaction d'encapsulation, les composantes de l'immunité réellement soumises à une sélection potentielle par les ennemis naturels tels que les parasitoïdes sont encore largement méconnues.

Deuxièmement, les stratégies de virulence des parasitoïdes vis à vis de leurs hôtes sont bien caractérisées dans quelques couples hôte/parasitoïde, mais les variations d'efficacité de ces stratégies, dues aux variations de résistance de l'hôte ou due aux variations de virulence du parasitoïde sont dans l'ensemble largement méconnues.

Troisièmement, des corrélations positives ou négatives ou des absences de corrélation entre les réponses des insectes à leur parasites/pathogènes ou entre les différentes composantes de l'immunité sont de plus en plus souvent mesurées sans connaître les pressions de sélection qui sont réellement exercées par les ennemis naturels présents dans l'aire géographique considérée. Il apparaît ainsi nécessaire de comprendre les bases physiologiques et moléculaires sous-jacentes aux variations de résistance et de virulence dans un couple hôte-parasitoïde afin de déterminer quels composantes de l'immunité de l'hôte ou de la virulence du parasitoïde vont être soumises à sélection par le partenaire de l'interaction.

Enfin, les spectres d'hôtes des parasitoïdes pouvant être plus ou moins restreints selon le parasitoïde considéré, l'un des axes possibles pour comprendre la spécificité parasitaire est de caractériser les stratégies et facteurs de virulence d'un parasitoïde qui vont être spécifiquement efficaces sur une espèce hôte et les stratégies/facteurs de virulence qui vont pouvoir être employés sur plusieurs espèces hôtes.

↳ L'étude du couple *L. bouvardi* - *D. yakuba* a permis d'apporter quelques éléments de réponse concernant les variations de succès (2^e point évoqué) ; la comparaison des effets du parasitoïde sur les 2 espèces hôtes *D. yakuba* et *D. melanogaster* a également permis d'émettre des hypothèses concernant les facteurs impliqués dans la spécificité parasitaire (4^e point).

Présentation du modèle biologique :

Biologie des espèces,
présentation des lignées et
définitions



I BIOLOGIE DES ESPÈCES ETUDIÉES

I.1 Espèce hôte: *Drosophila yakuba* Burla (1954)

Drosophila yakuba est une espèce de drosophile du sous-groupe *melanogaster*, proche phylogénétiquement de l'espèce *D. melanogaster* et que l'on trouve exclusivement en Afrique tropicale (Figures 34 et 35) (Lachaise *et al.*, 1988). Comme de nombreuses autres drosophiles, les femelles de cette espèce pondent leurs œufs sur des fruits en décomposition qui fourniront une source de nourriture durant les 3 premiers stades de développement. Les larves de 3^e stade s'éloignent de cet environnement et s'empupent dans un environnement sec afin d'effectuer leur métamorphose. L'adulte sort quelques jours plus tard de la puppe et peut alors s'accoupler, ce qui constitue le commencement d'un nouveau cycle. Le cycle de reproduction de cette espèce a une durée moyenne de 10 jours à 25°C et de 15 jours à 20°C (Figure 36).

I.2 Espèce parasitoïde: *Leptopilina boulardi* Barbotin, Carton et Kelner-Pillault, (1979)

Leptopilina boulardi (Hymenoptera, Cynipoidea, Figitidae) d'abord appelé *Cothonaspis boulardi*, est un **endoparasitoïde koïnobionte solitaire, spécialiste** de larves de drosophiles frugivores du sous-groupe *melanogaster* (Nordlander, 1980 ; Vet et van Alphen, 1985 ; Carton *et al.*, 1986)(Figure 37). On trouve cette espèce en région méditerranéenne, en Afrique tropicale et dans quelques régions d'Amérique où le climat est méditerranéen ou tropical (Allemand *et al.*, 2002).

C'est une espèce **proovigénique** puisque les femelles naissent avec l'essentiel de leurs ovocytes à maturité, soit de 70 à 200 œufs selon les estimations (Le Ralec, 1991 ; Vårdal *et al.*, 2003). Ce parasitoïde solitaire pond généralement un seul œuf par hôte pour éviter les phénomènes de compétition larvaire qui entraînent la mort de tous les parasitoïdes surnuméraires. Il est à noter cependant que des agents infectieux semblent induire un comportement de superparasitisme, les femelles infectées déposant de nombreux œufs dans une seule larve hôte (Varaldi *et al.*, 2003). Les femelles *L. boulardi* déposent leurs œufs dans la cavité générale des larves drosophiles généralement de 2^e stade (Carton *et al.*, 1986). Le 1^{er} stade larvaire du parasitoïde se déroule pendant que la drosophile continue son développement jusqu'au stade pupal. Les 2^e et 3^e stades larvaires du parasitoïde s'effectuent alors au détriment de cette puppe, qui sera complètement consommée à l'émergence des adultes. A 25°C, dans l'hôte *D. melanogaster*, la durée de développement du parasitoïde est d'environ 21 jours pour les mâles, et 22 jours pour les femelles (Figure 38) (Kopelman et Chabora, 1984).



Figure 34 : Mâle *Drosophila yakuba* adulte.

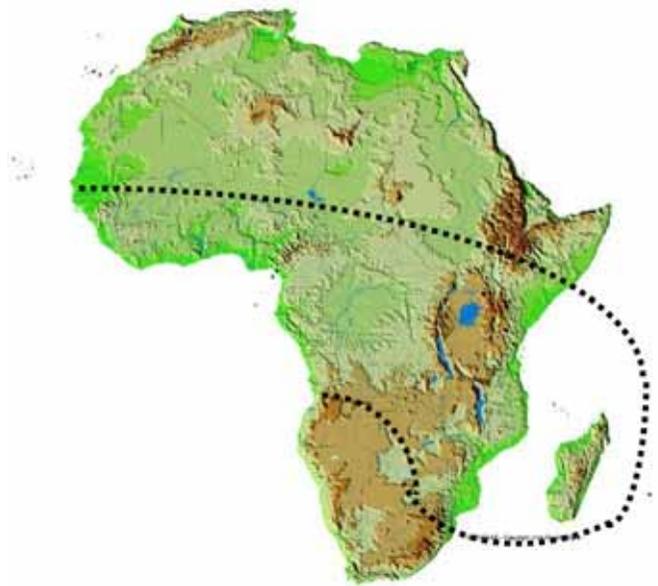


Figure 35 : Aire de répartition de *Drosophila yakuba*
D'après Lachaise et al., 1988

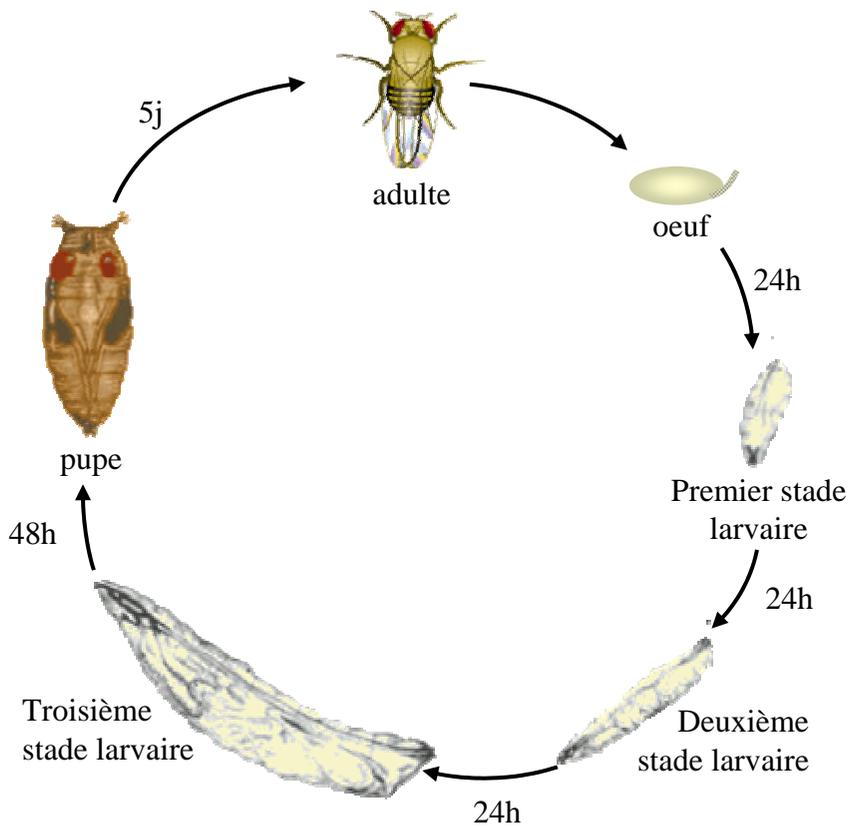


Figure 36 : Cycle de vie de *Drosophila yakuba* et *Drosophila melanogaster*. Ce cycle est d'environ 10 jours à 25°C

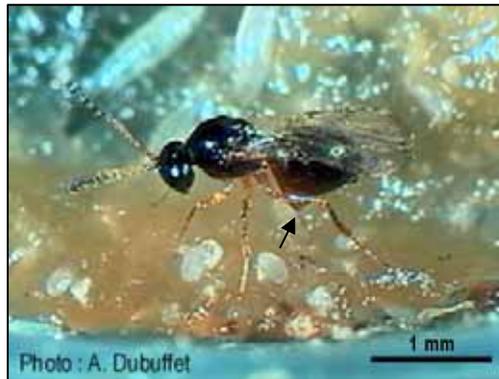


Figure 37: Femelle *Leptopilina boulardi* sondant le milieu à l'aide de son ovipositeur (flèche) afin de localiser une larve de drosophile.

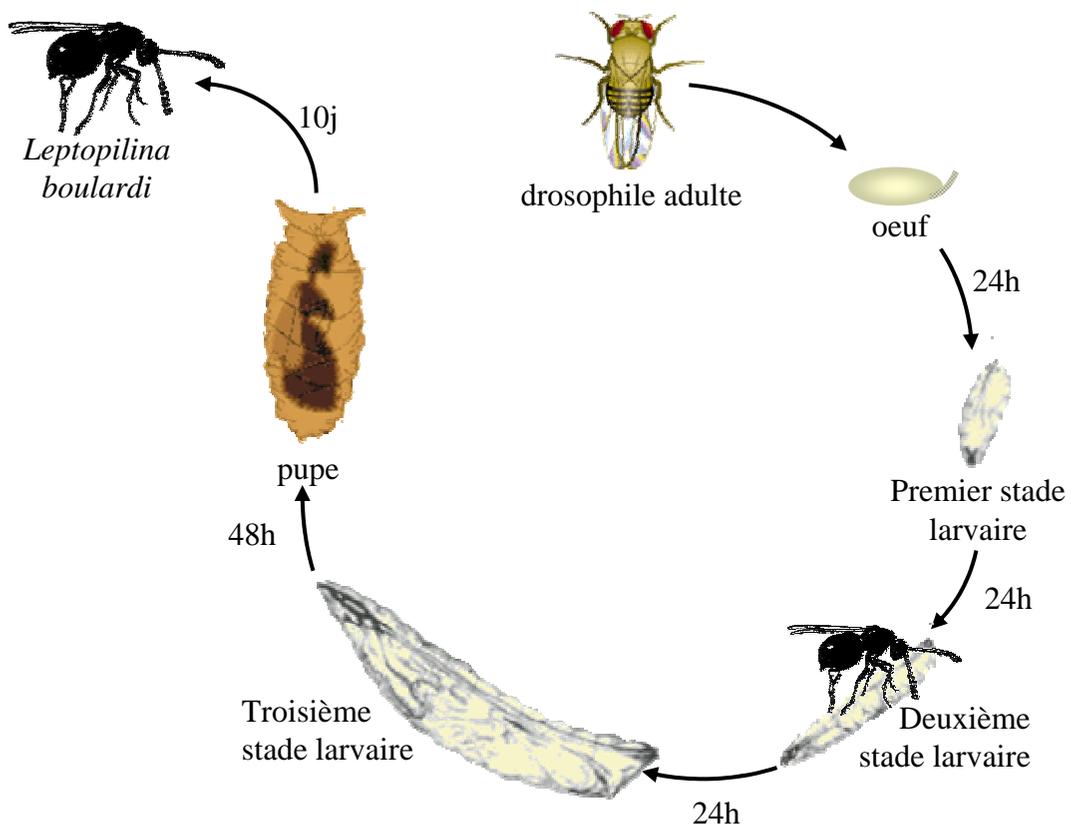


Figure 38: Cycle de développement de *Leptopilina boulardi*. A 25°C ce cycle a une durée d'environ 21 jours pour les mâles et 22 pour les femelles. Les deux premiers stades larvaires sont internes à la larve hôte. Le troisième stade larvaire sort de la pupa hôte dans laquelle il a consommé tous les tissus hôtes. Il utilise le puparium de l'hôte dans lequel il effectue sa métamorphose.

II SOUCHES UTILISÉES DANS L'ÉTUDE

II.1 Drosophiles

Drosophila yakuba Burla (1954)

Lignées isofemelles de référence

- Lignée résistante de référence n° 1880D, étiquetée **R₁** (stock de Gif-sur-Yvette): Lignée isofemelle sélectionnée à partir de la souche 1880 pour sa sensibilité à la lignée IS_y de *Leptopilina bouvardi*. Originaire de Unzungouwa (Tanzanie) et récoltée en avril 1995 par D. Lachaise.

- Lignée n°1907, étiquetée **R₂** (stock de Gif-sur-Yvette): Lignée isofemelle choisie pour sa résistance à la lignée IS_y de *Leptopilina bouvardi*. Originaire de Méru (Tanzanie) et récoltée en avril 1995 par D. Lachaise.

↳ Ces souches ont été utilisées afin d'étudier les bases physiologiques et génétiques des interactions entre *L. bouvardi* et *D. yakuba*

Souches multifemelles ou reconstituées à partir de lignées isofemelles

- Souche **1915** (stock de Gif-sur-Yvette): Souche multifemelle originaire de Taï (Côte d'Ivoire). Récoltée en 1983 par D. Lachaise.

- Souche **1917** (stock de Gif-sur-Yvette): Souche reconstituée à partir de 24 lignées isofemelles, originaire du sud de l'île de Sao Tome. Récoltée en 2000 par D. Lachaise.

- Souche **1919** (stock de Gif-sur-Yvette): Souche reconstituée à partir de 7 lignées isofemelles, originaire de l'île de Sao Tome. Récoltée en 2001 par D. Lachaise.

- Souche **1921** (stock de Gif-sur-Yvette): Souche reconstituée à partir de 6 lignées isofemelles, originaire de l'île de Principe. Récoltée en 2001 par D. Lachaise.

- Souche **1916** (stock de Gif-sur-Yvette): Souche reconstituée à partir de 14 lignées isofemelles, originaire de Lopé (Gabon). Récoltée en 1998 par D. Lachaise.

- Souche **1920** (stock de Gif-sur-Yvette): Souche multifemelle, originaire du Mont Elgon (Kenya). Récoltée en 1984 par D. Lachaise.

- Souche **1918** (stock de Gif-sur-Yvette): Souche multifemelle, originaire du Mont Kenya (Kenya). Récoltée en 1984 par D. Lachaise.

↳ Ces souches originaires de diverses localités ont été utilisées afin de caractériser la fréquence de la résistance au parasitoïde *L. bouvardi* sur l'aire de répartition de *D. yakuba*.

- Souche **B1'** (stock de Gif-sur-Yvette): Souche multifemelle originaire d'Amani (Tanzanie) (850m). Récoltée en septembre 2002 par D. Lachaise.

↳ Cette souche a été utilisée pour les expériences concernant le comportement de choix d'espèce hôte des femelles *L. bouvardi*.

***D. melanogaster* Meigen (1830)**

- **Souche 1333** (stock de Gif-sur-Yvette): Souche multifemelle issue d'une population naturelle de Tunisie, sympatrique de la souche de parasitoïde IS_m.

↳ Cette souche est utilisée pour l'élevage du parasitoïde *L. bouvardi* (lignées IS_m et IS_y).

- **Souche Banco 4** (stock de Gif-sur-Yvette): Souche multifemelle originaire de Côte d'Ivoire. Récoltée en septembre 2001 par D. Lachaise.

↳ Cette souche a été utilisée pour les expériences concernant le comportement de choix d'espèce hôte des femelles *L. bouvardi*.

Toutes ces souches sont élevées à 25°C sur un milieu drosophile standard (farine de maïs, levure de bière, agar).

II.2 Parasitoïdes

- Lignée de référence n° G431, étiquetée **IS_m** (stock de Gif-sur-Yvette): Lignée isofemelle, originaire de l'oasis de Nasrallah, Tunisie, récoltée en 1983 par F. Frey

- Lignée de référence n° G486, étiquetée **IS_y** (stock de Gif-sur-Yvette): lignée isofemelle sélectionnée à partir de l'élevage de masse G483, originaire d'un parc de Brazzaville, Congo, et récoltée en juillet 1977 par R. Allemand.

Tous les parasitoïdes sont élevés à 25°C sur la souche n° 1333 de *D. melanogaster* décrite ci-dessus. Les adultes sont gardés à 17°C sur milieu gélosé sucré additionné de miel.

III MATRICE D'INTERACTION ET TERMES EMPLOYÉS

Les capacités du parasitoïde *L. boulandi* à éviter l'encapsulation de ses œufs par l'hôte dépendent principalement (1) du niveau de virulence de la lignée de parasitoïde considérée ; (2) de l'espèce hôte infestée et dans certains cas (3) du niveau de résistance de l'hôte.

III.1 Matrice d'interaction

Nous disposons au laboratoire de 2 lignées de parasitoïdes représentatives des niveaux de virulence observés en situation naturelle (Figure 39). La matrice d'interaction de ces lignées avec les lignées de référence de *D. melanogaster* et *D. yakuba* est donnée en Figure 40. Les valeurs des taux d'encapsulation obtenus dans chacune de ces interactions sont données dans l'annexe 1.

La lignée IS_m (représentative des populations méditerranéennes) a un très fort succès parasitaire sur *D. melanogaster* puisque ses œufs ne sont jamais encapsulés dans cette espèce, et ce quel que soit le niveau de résistance de l'hôte (Carton & Frey, non publié). *D. melanogaster* est donc une espèce “permissive” pour cette lignée de parasitoïde.

La lignée IS_m est par contre “inadaptée” à l'hôte *D. yakuba* puisque ses œufs sont systématiquement encapsulés dans cette espèce, quel que soit le niveau de résistance de l'hôte (voir article 3 de la thèse). *D. yakuba* peut ainsi être considérée comme une espèce “non permissive” pour cette lignée.

→ Par conséquent, le succès de cette lignée est “espèce-hôte dépendant”

↳ L'étude de cette lignée sur les 2 espèces hôtes peut fournir des informations sur les bases de la spécificité d'espèce hôte.

La lignée IS_y (représentative de la population congolaise) a un succès variable sur l'espèce hôte *D. melanogaster* puisque ses œufs ne sont pas encapsulés dans la souche S (“sensible à IS_y”) alors qu'ils le sont dans la souche R (“résistante à IS_y”) de cette espèce.

Elle a de même un succès variable sur l'espèce hôte *D. yakuba* puisque ses œufs ne sont pas encapsulés dans la souche R₁ (“sensible à IS_y”) alors qu'ils le sont dans la souche R₂ (“résistante à IS_y”) de cette espèce.

→ Le succès de cette lignée est donc “résistance de l'hôte dépendant”.

↳ Cette lignée permet de révéler un polymorphisme de résistance chez les 2 espèces hôtes et donc de l'étudier.

↳ la comparaison des lignées IS_m et IS_y sur les lignées résistantes de référence R et R₁ permet d'étudier les variations intra spécifiques de virulence sur chacune des 2 espèces hôtes.

III.2 Termes spécifiques à l'étude

Virulence: capacité d'une femelle parasitoïde à éviter l'encapsulation de ses œufs dans les lignées "résistantes de référence" de l'espèce hôte considérée.

Lignée résistante de référence: lignée hôte qui permet de révéler le niveau de virulence des différentes populations ou lignées de parasitoïde, donc le polymorphisme de virulence. Cette lignée n'est, par conséquent, pas résistante à toutes les lignées de parasitoïdes.

→ Selon cette définition, la lignée **R** de *D. melanogaster* et la lignée **R₁** de *D. yakuba* sont des "lignées résistantes de référence".

Résistance: capacité d'un hôte à encapsuler les œufs de la "lignée avirulente de référence" du parasitoïde considéré.

Lignée avirulente de référence: lignée de parasitoïde qui permet de révéler le niveau de résistance des différentes populations ou lignées hôtes, donc le polymorphisme de résistance. Cette lignée échappe à l'encapsulation dans les lignées "sensibles" de parasitoïdes mais est encapsulée dans les lignées "résistantes".

→ Selon cette définition, la lignée **IS_y** est une "lignée avirulente de référence" dans les systèmes *D. melanogaster* et *D. yakuba* puisqu'elle permet de révéler un polymorphisme de résistance chez ces 2 espèces.

↖ La lignée **IS_y** de *L. bouhardi* étant cependant la seule à ce jour connue pour éviter l'encapsulation dans les lignées résistantes de référence de *D. yakuba*, elle est appelée "virulente sur *D. yakuba*" par abus de langage.

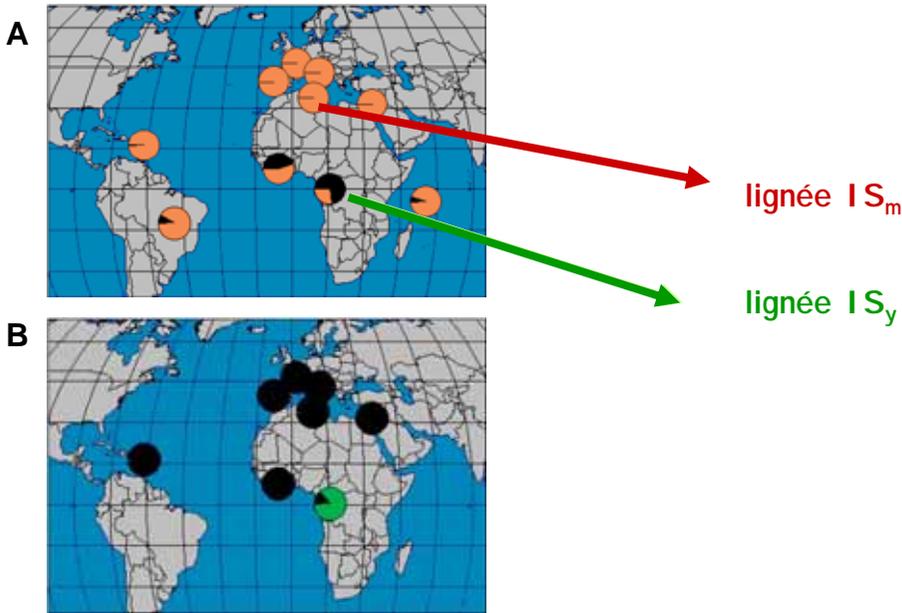


Figure 39 : Variations géographiques du niveau de virulence de *Leptopilina boulardi* sur les hôtes *Drosophila melanogaster* (A) et *Drosophila yakuba* (B)

Le pourcentage de larves de drosophiles encapsulant les œufs de *L. boulardi* est représenté par la portion noire des disques. Les taux d'encapsulation ont été obtenus après infestation expérimentale de la souche résistante de référence R de *D. melanogaster* (A) ou la souche résistante de référence R₁ de *D. yakuba* (B) par des populations de *L. boulardi* d'origines géographiques variées.

Les flèches indiquent les populations à partir desquelles les lignées IS_y et IS_m ont été obtenues

D'après Dupas et al., 1999

		Hôte: <i>D. melanogaster</i>		Hôte: <i>D. yakuba</i>	
		lignée S 1088	lignée R 1089	lignée R ₁ 1880-D	lignée R ₂ 1907
parasitoïde: <i>L. boulardi</i> 	lignée IS _m	Pas d'encapsulation 	Pas d'encapsulation 	Encapsulation 	Encapsulation
	lignée IS _y	Pas d'encapsulation 	Encapsulation 	Pas d'encapsulation 	Encapsulation

Figure 40 : Diagramme illustrant l'issue des interactions entre le parasitoïde *Leptopilina boulardi* et les espèces hôtes *Drosophila melanogaster* et *D. yakuba* en fonction des lignées parasitoïde et hôte considérées.

CHAPITRE 1

Variation de comportement
de sélection d'hôte au sein de
l'espèce *Leptopilina boulandi*



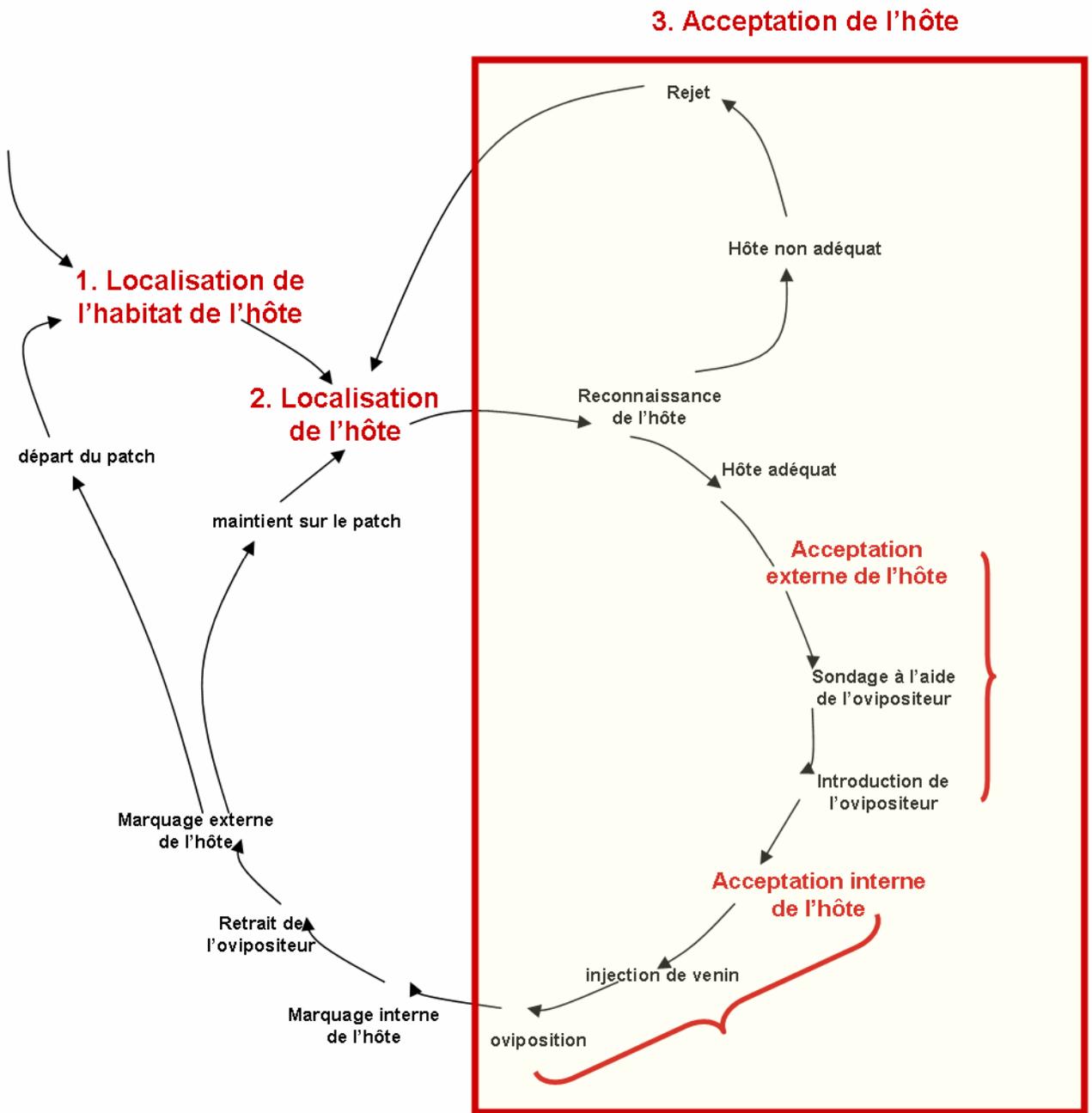


Figure 41 : Comportement de sélection d'hôte et séquences comportementales du cycle d'attaque d'un endoparasitoïde.

La séquence d'évènements concernant le comportement d'acceptation de l'espèce hôte est encadrée en rouge. Les comportements qui ont été observés dans l'article 1 de ma thèse sont indiqués par les accolades dans le cadre.

D'après Vinson, 1998

PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE

Trouver un hôte “de qualité” est crucial pour une femelle parasitoïde qui doit assurer la survie de sa descendance. Elle va donc devoir sélectionner un habitat dans lequel elle va maximiser ses chances de trouver un hôte adéquat (1), localiser l'hôte dans cet habitat (2), puis décider, après inspection, si elle accepte de pondre dans l'hôte qu'elle a découvert (3). Ces 3 étapes, regroupées sous le terme de **comportement de sélection d'hôte**, constituent une série de décisions prises par la femelle parasitoïde qui dépendent de sa perception des signaux émis par l'habitat et/ou l'hôte et de son expérience préalable (Vinson, 1976 ; Arthur, 1981 ; van Alphen et Vet, 1986 ; Vet et Dicke, 1992 ; Vinson, 1998 ; Vet *et al.*, 2002) (Figure 41).

Les drosophiles étant souvent inféodées à un habitat particulier ou microhabitat (fruits en fermentation, coulées de sève d'arbre, champignons ou feuilles en décomposition...), les parasitoïdes de drosophiles sont généralement spécifiques du même type d'habitat que leurs hôtes et ont des préférences innées pour les odeurs de ce type de microhabitat (van Alphen et Vet, 1986 pour revue). *L. boulandi* par exemple reconnaît spontanément les odeurs de fruits dans lesquels se développe l'espèce hôte *D. melanogaster*, mais à condition que des odeurs de drosophiles adultes y soient associées (Couty *et al.*, 1999). Une fois l'habitat localisé, les femelles *Leptopilina* localisent leurs hôtes par les traces kairomonales¹ déposées par les larves de drosophiles, en sondant le milieu à l'aide de leur ovipositeur sur lequel des chimiorécepteurs sont localisés (Vet et Bakker, 1985 ; Vet et van Alphen, 1985 ; Le Ralec, 1991 ; Vet *et al.*, 1993 ; Le Ralec *et al.*, 1996). Cette détection semble assez spécifique puisque *L. boulandi*, qui est spécialiste des drosophiles du sous-groupe *melanogaster*, répond aux kairomones de *D. melanogaster* et *D. simulans* (du sous-groupe *melanogaster*) mais pas à celles de *D. hydei*, *D. phalerata* et *Scaptomyza pallida* (qui ne font pas partie de ses hôtes) (Vet *et al.*, 1993). Lorsque l'hôte est détecté sur le “patch”, la femelle “estime la qualité” de l'hôte et décide alors soit de l'accepter, soit de le rejeter. Pour *L. boulandi*, un hôte de qualité est une larve de drosophile de 2^e stade larvaire, qui n'est pas déjà parasitée par l'un de ses congénères (le superparasitisme entraînant la mort de tous les parasitoïdes surnuméraires) (Carton *et al.*, 1986). Notons cependant que certains agents infectieux semblent perturber la décision de rejet d'hôtes déjà parasités, induisant la ponte de nombreux œufs dans une seule larve de drosophile (Varaldi *et al.*, 2003). Enfin, certaines espèces hôtes étant permissives au développement de l'espèce de parasitoïde considérée et d'autres non, la qualité d'un hôte dépend bien entendu de l'espèce à laquelle il appartient.

¹ Signal chimique qui bénéficie à l'espèce qui reçoit le signal

Lorsque la probabilité de succès d'un parasitoïde varie entre les espèces hôtes, on s'attend à ce que la sélection naturelle favorise les parasitoïdes qui sont capables de choisir les "bons hôtes" et de rejeter les "mauvais" en situation de choix. ("Théorie de l'optimal foraging", voir : MacArthur et Pianka, 1966 ; Krebs et Davies, 1981 ; Charnov et Stephens, 1988). *L. clavipes*, *A. tabida* ou *L. heterotoma*, par exemple, sont connus pour préférer pondre dans l'espèce de drosophile qui offre la probabilité de réussite à leur descendance la plus élevée en situation de choix (van Lenteren et Bakker, 1978 ; van Alphen et Janssen, 1982 ; Driessen *et al.*, 1991). Cependant, si des comportements "optimaux" de sélection d'hôte sont souvent décrits, les variations intra-spécifiques de ces comportements ne sont pour ainsi dire jamais explorées. Pourtant, si l'espèce hôte "la plus permissive" dépend de la population de parasitoïde considérée, alors la préférence d'espèce hôte pourrait varier d'une population de parasitoïde à l'autre.

Lorsque la probabilité de rencontrer le "bon" hôte est très faible, la théorie de sélection optimale d'espèce hôte prédit aussi qu'accepter un "mauvais" hôte peut être un compromis qui permet au final d'avoir plus de descendants qu'en le rejetant totalement. Cette deuxième partie de la prédiction sous-tend que les préférences innées des femelles parasitoïdes peuvent être modulées par leur connaissance du patch d'hôte qu'elles exploitent et donc que le taux de rejet de la "moins bonne" espèce dépend de leur expérience c'est à dire nécessite un certain apprentissage. A ma connaissance, les changements comportementaux des femelles parasitoïdes suite à un apprentissage ont surtout été étudiés vis à vis d'odeurs associées à la présence d'un hôte, ou vis à vis d'odeurs déposés par d'autres parasitoïdes pour signaler la présence de leurs œufs dans (ou sur) un hôte (Vet *et al.*, 1991 ; Poolman Simons *et al.*, 1992 ; van Baaren et Boivin, 1998 ; Vet *et al.*, 2002 pour revue). Les changements comportementaux des femelles parasitoïdes vis à vis d'une espèce hôte en fonction de leur connaissance du patch (en terme d'espèces hôtes) sont en comparaison quasiment inconnus.

Pour *L. bouhardi*, l'espèce hôte "la plus permissive" dépend de la lignée de parasitoïde considérée. Elle correspond clairement à *D. melanogaster* pour la lignée IS_m, mais elle est difficilement définissable pour la lignée IS_y. En effet, le succès de cette lignée sur les espèces hôtes *D. melanogaster* et *D. yakuba* dépend de la résistance des larves qu'elle infeste.

J'ai étudié le comportement de sélection d'hôte de femelles IS_m et IS_y placées sur un patch contenant une quantité équivalente de larves de *D. melanogaster* et *D. yakuba*, dans le but de déterminer :

1) Si une **variation intra-spécifique de comportement de sélection d'hôte** existe au sein de l'espèce *L. bouhardi*. Il s'agissait de déterminer si les 2 lignées, présentant des capacités de virulence différentes vis à vis de *D. melanogaster* et *D. yakuba*, ont les mêmes préférences d'hôte et si ces

préférences sont en accord avec leurs capacités de virulence vis à vis de l'espèce hôte "préférée".

2) Si le comportement de choix d'espèce hôte change au cours de l'exploitation du patch.

L'article 1 présente les résultats qui ont été obtenus concernant ces questions.

Article 1

Do parasitoid preferences for different host species match virulence ?

Aurore Dubuffet, Clara Isabel Rodríguez Álvarez, Jean-Michel Drezen, Jacques J. M. van Alphen and Marylène Poirié

Physiological Entomology (2006) 31(2), 170-177

Do parasitoid preferences for different host species match virulence?

AURORE DUBUFFET¹, CLARA ISABEL RODRÍGUEZ ÁLVAREZ¹, JEAN-MICHEL DREZEN¹, JACQUES J. M. VAN ALPHEN² and MARYLENE POIRIÉ¹ *

¹Université François-Rabelais, CNRS, Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte (IRBI), UMR 6035, Tours, France and ²Institute of Evolutionary and Ecological Sciences, University of Leiden, The Netherlands

Abstract. *Leptopilina boulardi* is a parasitoid wasp specialist of *Drosophila* larvae of the *melanogaster* subgroup. In Mediterranean areas, natural populations are highly virulent against their main host *Drosophila melanogaster*. In Congo, populations are less virulent against *D. melanogaster* but are able to develop successfully inside the tropical African species *Drosophila yakuba*. Host preferences are compared between two laboratory isofemale lines of *L. boulardi*, obtained from populations of Congo and Tunisia, respectively, and differing in virulence levels against *D. melanogaster* and *D. yakuba*. Host selection is studied by offering female parasitoids a choice between larvae of the two host species. In agreement with optimal foraging models, the line highly virulent against *D. melanogaster* shows a clear preference for this host species. The other line, less virulent against *D. melanogaster* but more virulent against *D. yakuba*, prefers to oviposit on *D. yakuba*. Such preferences can be observed after a period of host-patch exploitation only, suggesting that experience plays an important role in the host-selection process. These results evidence the existence of intraspecific variability in preference between two host species in *L. boulardi*, a major requisite in theoretical models of parasite specialization by the host. They also sustain the hypothesis that intraspecific variation in parasitoid preferences between host species might mirror intraspecific variation in virulence.

Key words. Experience, *Drosophila*, host-selection behaviour, intraspecific variation, optimal foraging, virulence.

Introduction

The fitness of a parasitoid is closely related to its behavioural and physiological adaptations to the infested host. These adaptations can be observed at each level of the four steps leading to successful parasitism: host-habitat location, host location, host acceptance and host suitability (Doutt,

1964; Vinson, 1976). Adaptations to the first three steps, comprising the host-selection process, are expected to be selected in accordance with host suitability to optimize parasitoid fitness. Optimal foraging models thus predict that, in a situation of choice, females should prefer the more suitable host species, except if the encounter probability with the best host species is so low that accepting low quality hosts will produce more offspring than rejecting them (MacArthur & Pianka, 1966; Krebs & Davies, 1981). Such an assumption requires, besides genetic variation, a flexibility in host-acceptance behaviour, allowing a parasitoid to adjust its foraging strategy as it determines which host species are available. Many parasitoid species, including the *Drosophila* parasitoids *Asobara tabida*, *Leptopilina heterotoma* and *Leptopilina clavipes*, have been shown to prefer the host species that gives the best survival chance to

Correspondence: A. Dubuffet, Université François-Rabelais, Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte, UMR CNRS 6035, Faculté des Sciences et Techniques, Parc Grandmont, 37200 Tours, France. Tel.: +33 (0)2 47 36 73 65; fax: +33 (0)2 47 36 69 66; e-mail: dubuffet@univ-tours.fr

*Present address: Université de Nice-Sophia Antipolis, INRA, UMR 1112, Sophia Antipolis, France.

their progeny (van Lenteren & Bakker, 1978; van Alphen & Janssen, 1982; van Alphen & Vet, 1986; Driessen *et al.*, 1991). As emphasized by Althoff & Thompson (2001), only a few studies have focused on intraspecific variations in behavioural and physiological adaptations of a parasitoid species to its hosts. Intra-specific variability is yet of great importance, especially for parasitoid species with a large geographical distribution, because it might allow adaptation of different populations to different host species occurring in different parts of the parasitoid area. Occurrence of variations in preference between host species and physiological adaptation to these species is regarded as the first step of host race formation, and might lead to species diversification (Tauber & Tauber, 1989; Via, 2001). To the authors' knowledge, *A. tabida* is a unique example of a parasitoid species in which intraspecific variation of both physiological and behavioural adaptations to one host species has been observed (Kraaijeveld *et al.*, 1995). French populations of this species have a higher success probability when parasitizing *Drosophila melanogaster* Meigen (Diptera: Drosophilidae) than Dutch ones. In agreement with the optimal host-selection theory, French wasps appear to oviposit more readily in *D. melanogaster* than Dutch wasps (Mollema, 1991; Kraaijeveld *et al.*, 1995). The host-selection behaviour of *A. tabida* has a heritable component (Mollema, 1991) and its level of acceptance of *D. melanogaster* has been positively correlated with increased survival in this host species in response to selection (Rolff & Kraaijeveld, 2001). Curiously, the idea that parasitoids of the same species might show different preferences between two host species (some of them preferring species A to species B and others preferring species B to species A) has never been tested. The important question thus remains whether intraspecific variability in preference between two host species can occur in parasitoids, and whether it can be associated to differences in virulence levels against these host species. This would allow host shifts, which are considered to be a major evolutionary driving force.

The endoparasitoid wasp *Leptopilina boulardi* Barbotin *et al.* (Hymenoptera: Cynipoidea, Figitidae) is a specialist of *Drosophila* larvae of the *melanogaster* subgroup that develop in fermenting fruits (Vet & van Alphen, 1985; Carton *et al.*, 1986). Across its geographical range (Mediterranean areas and tropical Africa), its ability to evade the host immune responses against its main host species *D. melanogaster* varies

(Dupas & Boscaro, 1999). Virulence, defined here as the ability to counteract host immune defences (encapsulation of the parasitoid egg), is rather high in most populations, except in Tropical Africa, and particularly in Congo (Dupas & Boscaro, 1999). Interestingly, the decrease in virulence ability against *D. melanogaster* in Congo is observed together with an increase in virulence against another host species, *Drosophila yakuba* Burla, in which *L. boulardi* development is elsewhere unsuccessful (Dupas & Boscaro, 1999). Virulence against each host species is due to two different unlinked loci, IS_m (for Immune Suppression of *D. melanogaster*) and IS_y (for Immune Suppression of *D. yakuba*) (Dupas & Carton, 1999). The present study aims to determine whether *L. boulardi* females show intraspecific variability in host preference between *D. melanogaster* and *D. yakuba*, and whether differences in preference between these host species can match differences in virulence levels. The question of whether foraging behaviour is flexible is also addressed by analysing changes in host-selection behaviour during host patch exploitation.

To answer these questions, comparisons are made using host-choice experiments between the host-selection behaviour of two isofemale lines of *L. boulardi*, differing by virulence alleles at both loci: one line is homozygous for IS_m^+ alleles conferring virulence against *D. melanogaster* and the other is homozygous for IS_y^+ alleles conferring virulence against susceptible strains of *D. yakuba* (Dupas & Carton, 1999). Females of the two lines thus differ by their potential fitness in each host species (Table 1), with the use of isofemale lines ensuring homogeneous virulence abilities among females of the same line. The number of encounters with *D. melanogaster* and *D. yakuba* larvae as well as percentage of oviposition in each encountered host species is compared between the two parasitoid lines. Furthermore, changes of these behavioural components with females' experience is quantified. The results are discussed from an evolutionary point of view.

Materials and methods

Strains

The two isofemale lines of *L. boulardi* were those previously used by Dupas & Boscaro (1999). They are well

Table 1. General virulence levels of IS_m and IS_y lines of *Leptopilina boulardi* lines against *Drosophila melanogaster* and *Drosophila yakuba*.

	Virulence against <i>D. melanogaster</i>	Virulence against <i>D. yakuba</i>
IS_m line (G431)(IS_m^+/IS_m^+ ; IS_y^-/IS_y^-)	High 100%	None (0%)
IS_y line (G486)(IS_m^-/IS_m^- ; IS_y^+/IS_y^+)	Variable (0–100% depending on the resistance status of host strain)	Variable (0–100% depending on the resistance status of host strain)

Virulence levels were estimated using the encapsulation rate performed by reference strains of *D. melanogaster* and *D. yakuba*, respectively. These reference strains were selected from natural populations and represent all susceptible and resistant phenotypes observed in the field (Dupas *et al.*, 2002; Dubuffet, unpublished).

characterized lines, thoroughly studied in terms of genetics and physiological mechanisms of virulence (Dupas & Boscaro, 1999; Russo *et al.*, 2001; Labrosse *et al.*, 2003; Labrosse *et al.*, 2005a). The G431 line (or IS_m line) originated from a single female collected in the Nasrallah oasis in Tunisia in 1986. This line is able to develop on all reference strains of *D. melanogaster* but is unable to survive in *D. yakuba* (see Table 1). The G486 line (or IS_y line) came from a single female originating from a mass culture of a Brazzaville (Congo) population collected in 1977. By contrast to the IS_m line, it can develop on susceptible *D. yakuba* strains but is unable to develop on resistant strains of *D. melanogaster* (Carton *et al.*, 1992) (Table 1). General virulence properties of IS_m and IS_y lines reported in Table 1 were obtained using reference strains of *D. melanogaster* and *D. yakuba*, selected from natural populations, that represent all resistance and susceptible phenotypes observed in the field (Dupas *et al.*, 2002; Dubuffet, unpublished). Both IS_m and IS_y lines were reared on a susceptible *D. melanogaster* strain (reference strain number 1333), at 25 °C. After emergence, adults of both lines were kept at 18 °C on an agar medium with honey.

The *Drosophila* strains originated from natural populations caught from localities far away from the collection areas of the parasitoid lines to avoid a potential local adaptation phenomenon. They were Amani B1 from Ivory Coast, for *D. yakuba* (collected by D. Lachaise in 2002), and Banco 4 from Tanzania for *D. melanogaster* (collected by D. Lachaise in 2002). They were reared at 25 °C on a standard *Drosophila* cornmeal–yeast–agar medium.

Choice experiments

The method used was similar to that described by Kraaijeveld *et al.* (1995). Experiments were carried in Petri dishes containing an agar medium covered by a thin layer of *Drosophila* standard medium of 2 cm in diameter. Just prior to an experiment, 15 second-instar larvae of each *Drosophila* species were put together on the medium. Larvae were carefully chosen to ensure that they were of similar size to minimize 'size-dependent' host selection. To distinguish host species during the experiments, larvae of one species were fed with carmine-coloured medium for 1 day prior to the experiment. The red intestine is then apparent through the body wall. To ensure that the carmine colour did not interfere with *L. bouleardi* behaviour, larvae of one host species were coloured in half of the experiments and larvae of the other species in the other half. During the experiments, each parasitized larva was immediately replaced by a nonparasitized larva of the same species to maintain identical probabilities of encounter with the two host species. Parasitized larvae were kept at 25 °C for 2 days and then dissected to confirm the presence of parasitoid larvae or eggs.

Leptopilina bouleardi females were collected 3–4 days after emergence. They were experienced on patches containing *D. yakuba* larvae at 20 °C for 2 h, just prior to each experiment, to make them start searching more readily (Rolff &

Kraaijeveld, 2001). A single female was then placed on an experimental patch and its host-selection behaviour was observed for 30 min. Thirty females of each parasitoid line, having encountered at least 10 larvae, were analysed.

Encounters and their outcomes (oviposition or rejection) were recorded using the freeware Etholog 2.2. (Ottoni, 2000). A host larva was considered as 'encountered' as soon as the parasitoid female tried to introduce the ovipositor inside its body. In *L. bouleardi*, a short-duration insertion of the ovipositor into a larva (<5 s) indicates a rejection whereas a longer insertion (>10 s) corresponds to an oviposition, whatever the host species attacked (Vet & Bakker, 1985). No ambiguous ovipositor piercing behaviour lasting between 5–10 s was observed in the experiments.

Statistical analysis

The number of encounters with each host species in the two parasitoid lines were analysed using a Wilcoxon matched-pairs signed-rank test. Percentages of oviposition (number of accepted hosts/number of encountered hosts of a given species) in the two host species were compared by a chi-square test.

The flexibility of female's behaviour was graphically analysed both at the encounter and oviposition levels. Changes at the encounter level were shown by plotting the percentage of females encountering *D. melanogaster* as a function of the number of hosts of both species previously encountered. Changes in the oviposition behaviour were shown by plotting the percentage of females accepting a given host species for oviposition as a function of the number of hosts of both species previously encountered. Curves were obtained using the LOWLESS Smoother method with a tension of 0.5. All statistical and graphical analyses were made using the software Systat 10 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Results

Encounter rates

The number of encounters with *D. melanogaster* and *D. yakuba* larvae was recorded for each parasitoid female during a 30-min period and a mean encounter rate per female per 10 min was calculated for the two parasitoid lines (Fig. 1). Changes in the encounter behaviour during experiments are shown in Figure 2.

Females of the IS_m line encountered significantly more *D. melanogaster* larvae than *D. yakuba* larvae (Fig. 1; Wilcoxon signed-ranks test; $n = 30$; $Z = 3.801$; $P < 0.001$). Moreover, Figure 2(a) shows that the percentage of females encountering *D. melanogaster* appears to increase as a function of the number of hosts previously encountered. At the beginning of the experiment, approximately 50% of the females encountered *D. melanogaster* larvae compared with 70% at the end of the experiment. By contrast, females of the IS_y line did not show differences in

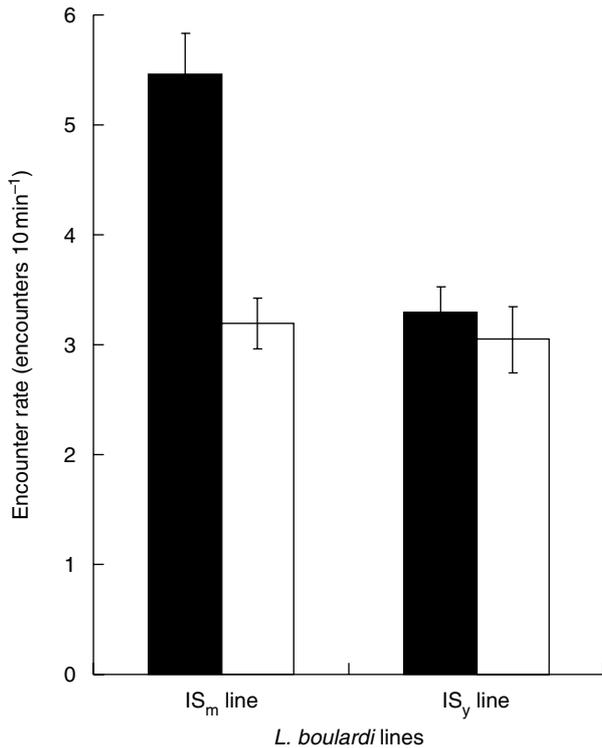


Fig. 1. Mean \pm SE encounter rates (number of larvae encountered 10 min⁻¹) with *Drosophila melanogaster* (black bars) and *Drosophila yakuba* larvae (white bars), for females of IS_m and IS_y *Leptopilina boulandi* lines.

encounter rates between host species (Fig. 1; Wilcoxon signed-ranks test; $n = 30$; $Z = 0.836$; $P = 0.403$) and their behaviour did not change during the time of the experiment.

Oviposition behaviour

Percentages of oviposition by females of the two parasitoid lines in each encountered host species during the host

patch exploitation are shown in Figure 3. Changes in this behaviour are presented in Figure 4.

Females of both lines oviposited in both host species. However, females of the IS_m line oviposited more frequently in *D. melanogaster* larvae ($93.9 \pm 1.1\%$) than in *D. yakuba* larvae ($74.0 \pm 2.6\%$) ($\chi^2 = 60.54$; d.f. = 1; $P < 0.001$). By contrast, females of the IS_y line accepted *D. yakuba* larvae more often for oviposition ($91.4 \pm 1.8\%$) than *D. melanogaster* larvae ($77.7 \pm 2.5\%$) ($\chi^2 = 18.40$; d.f. = 1; $P < 0.001$). During the experiment, the percentage of females ovipositing in the less-preferred species (*D. yakuba* for the IS_m line and *D. melanogaster* for the IS_y line) decreased in both parasitoid lines. Figure 4(a) shows that the percentage of IS_m females ovipositing in *D. yakuba* decreased with the number of larvae previously encountered whereas the percentage of females ovipositing in *D. melanogaster* remained constant. By contrast, the percentage of IS_y females ovipositing in *D. yakuba* was constant during the experiment whereas the percentage of IS_y females ovipositing in *D. melanogaster* decreased with the number of larvae previously encountered (Fig. 4b).

Discussion

Intra-specific variability in host preference and optimal foraging theories

The reproductive success of a parasitoid depends on its ability to select hosts in which its progeny has the highest probability to develop. If given the choice between different host species, a female should generally reject the less profitable species because of the lower expected fitness return. This would save some eggs and the time needed for oviposition, which could be used to search for hosts of the most profitable species. One interesting feature in the parasitoid species *L. boulandi* is that the more suitable host species might differ between females that carry different specific virulence alleles. In agreement with the optimal foraging theory, IS_m females, homozygous for IS_m⁺ alleles that confer virulence against all *D. melanogaster* strains, clearly prefer *D. melanogaster*, the more suitable host species. They reject *D. yakuba*, in which they are unable to develop, after a

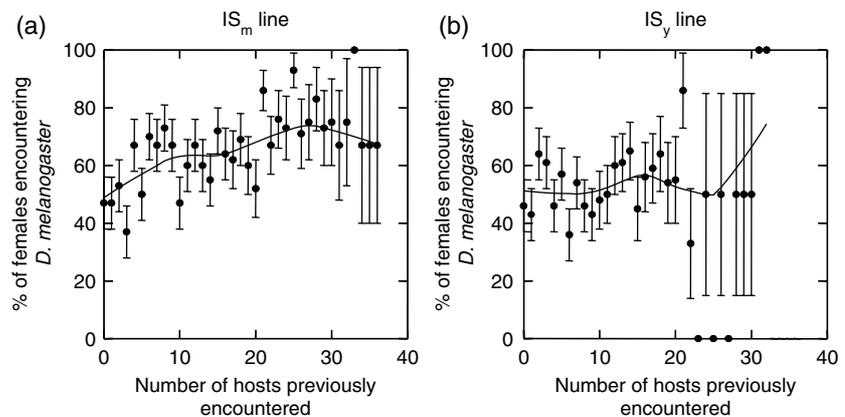


Fig. 2. Percentage (\pm SE) of females encountering *Drosophila melanogaster* as a function of the number of previous encounters for (a) IS_m and (b) IS_y females. Curves were fitted to the data using the LOWESS Smoother method with a tension of 0.5.

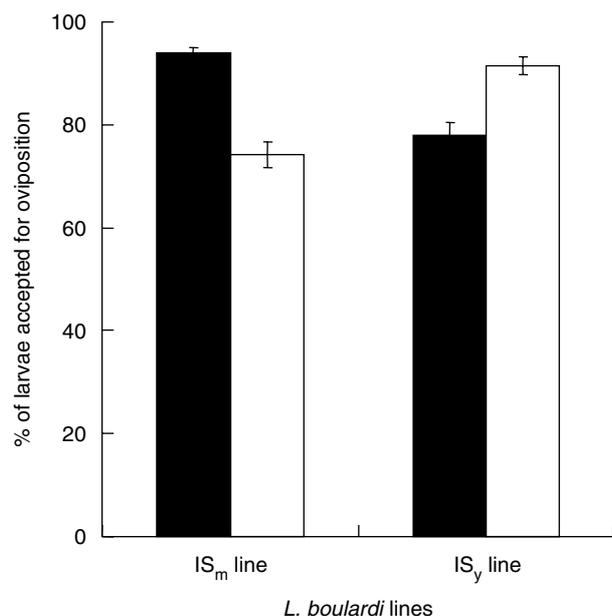


Fig. 3. Percentages (\pm SE) of *Drosophila melanogaster* (black bars) and *Drosophila yakuba* (white bars) larvae accepted for oviposition by IS_m and IS_y lines of *Leptopilina bouvardi*.

period of sampling. IS_y parasitoid females are homozygous for IS_m⁻ alleles and thus unable to develop on resistant *D. melanogaster* larvae, but also homozygous for IS_y⁺ alleles, which allows parasitism success on susceptible *D. yakuba* larvae. Whichever species is more suitable for IS_y parasitoids thus depends on the resistance vs. susceptible phenotypes of the parasitized host, which parasitoid females are highly unlikely to discriminate. Because parasitoid lines are exclusively reared on susceptible *D. melanogaster* flies in laboratory conditions, the host-choice behaviour of IS_y females (absence of preferences at the encounter level but rejection of *D. melanogaster* larvae after a period of sampling) has most probably been selected under field environmental conditions.

The relationships between host-selection behaviour and host suitability have often been studied in parasitoid species but intraspecific variations in both host-selection behaviour and virulence ability have been neglected. Studies with the parasitoid wasp *A. tabida* have shown that its success on *D. melanogaster* can vary, and that accordingly, *A. tabida* females can differ in their acceptance level of *D. melanogaster* larvae (Kraaijeveld *et al.*, 1995; Rolff & Kraaijeveld, 2001). However, these differences were not correlated with any change in virulence or acceptance of another host species. The data in the present study show that intraspecific variability in female preference between two host species (one or the other being more often rejected) can occur in parasitoid species, together with intraspecific variability in virulence against these two species. This demonstration represents a major requisite in theoretical models of parasitoid specialization by the host.

Does behavioural adaptation parallel physiological adaptation to different hosts?

Interestingly, the lower acceptance level of one host species is associated, in the experiments, with lower virulence properties against this host species. This raises the hypothesis that physiological traits (virulence) may match behavioural traits, a second major point in the theory of host shifts. Because it is rather unlikely that virulence genes have a pleiotropic effect on host-choice behaviour, this observation might be explained by parallel selection of virulence properties and host choice.

The correlation between virulence and behavioural traits needs to be confirmed by testing more parasitoid strains. Furthermore, care must be taken considering that IS_m and IS_y females belong to isofemale lines that are probably genetically constrained. Unfortunately, *L. bouvardi* virulence against *D. yakuba* is exclusively observed in tropical Africa, especially in Congo, and the authors could not obtain other *L. bouvardi* parasitoids from this region. Consequently, IS_y females are the only available parasitoids virulent against *D. yakuba* and, interestingly, do not appear to be highly adapted to the laboratory rearing host, *D. melanogaster*.

Virulence levels are difficult to estimate in natural parasitoid populations or in heterogeneous lines, and the number and nature of the loci involved in virulence are usually unknown. The advantage of using well-characterized lines of *L. bouvardi* is that they possess independent specific virulence genes against two different hosts, whose nature and physiological effects are currently under analysis (Dupas *et al.*, 1998; Dupas & Carton, 1999; Labrosse *et al.*, 2005a; Labrosse *et al.*, 2005b; Dubuffet, unpublished data). In the theoretical context of specialization by the host, the fact that physiological adaptive traits are determined by major genes would facilitate the selection process.

Flexibility of female behaviour

Interestingly, *L. bouvardi* host preferences are not expressed as soon as the female parasitoid arrive on the host patch, sustaining the idea that experience is an important factor in female behaviour (Vinson, 1998). At the beginning of experiments, females of the two parasitoid lines have no clear preferences, encountering and ovipositing in *D. melanogaster* and *D. yakuba* in the same proportion. Then, these two parameters change over time with the number of hosts previously encountered: females of the IS_m line encounter more and more *D. melanogaster* larvae, and their acceptance of *D. yakuba* larvae for oviposition significantly decreases. In the same way, IS_y females reject more and more *D. melanogaster* larvae for oviposition. Although previous experience with *D. yakuba* just before the experiments could have create a bias in favour of acceptance of *D. yakuba*, the results reveal real preferences of both parasitoid lines, each wasp line focusing on one host species and rejecting more and more the other species.

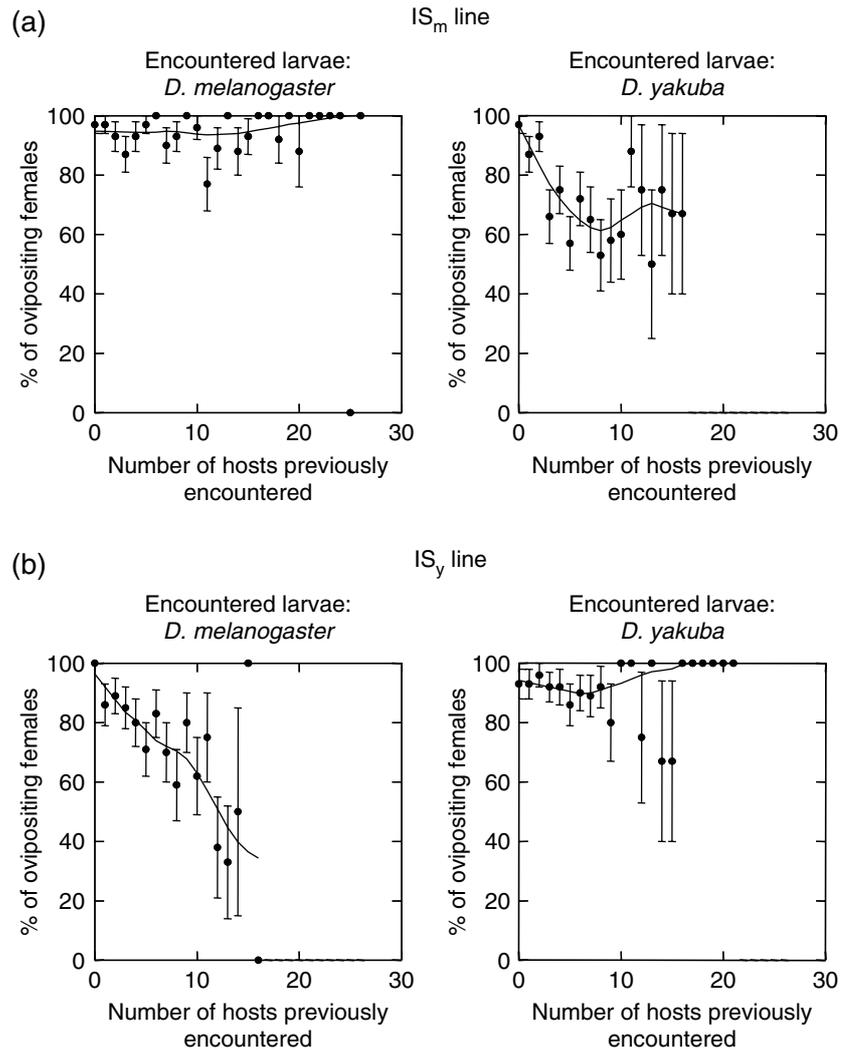


Fig. 4. Percentage of females (\pm SE) accepting *Drosophila melanogaster* or *Drosophila yakuba* larvae for oviposition as a function of the number of hosts previously encountered for (a) IS_m and (b) IS_y females. Curves were fitted to the data using the LOWLESS Smoother method with a tension of 0.5.

Such a decrease of oviposition frequency in the less-preferred species was suggested by Mollema (1991), who observed an increased rejection of *D. melanogaster* larvae by *A. tabida* after three 30-min periods of sampling. The idea that the wasp modifies its host-selection strategy when it gains information about the quality of its environment has already been proposed by van Alphen & Janssen (1982). Wasps may reject the poor-quality host species only if a more suitable host species is present. The present study clearly demonstrates that the flexibility of a parasitoid behavioural response would authorize such a change in the foraging strategy and that such a change in behaviour can occur very quickly, within a 30-min period.

Ecological and evolutionary aspects

Leptopilina boulardi has a wide geographical distribution and ecological conditions, such as the host species possibly encountered, thus vary from one area to another. The

resulting selection pressures might then differ between parasitoid populations, leading to divergent adaptive responses. In Mediterranean areas, *D. yakuba* does not occur and high frequencies of *D. melanogaster* larvae are observed (Lachaise *et al.*, 1988). Ecological constraints might have led to selection of virulence alleles acting against *D. melanogaster* (like IS_m^+ alleles) together with alleles conferring host preference for *D. melanogaster*. High virulence against *D. melanogaster* and preference for this species is then expected for the IS_m line that originates from a Mediterranean female. The situation is more complex in Congo, where more than four *Drosophila* species (including *D. melanogaster* and *D. yakuba*) are infested by *L. boulardi*. Occurrence of these species can change with localities and seasons (Vouidibio, 1985) and no accurate prediction on the selection outcome for behavioural or physiological traits can be made. However, it should be noted that, in a large population sampling, virulence against *D. yakuba* is only observed in the geographical area where this host species occurs (Dupas & Boscaro,

1999). IS_y females, which originate from Congo, carry IS_y^+ virulence alleles and reject *D. melanogaster* after a period of sampling in a choice situation. They might thus originate from a situation where both physiological and behavioural adaptations to *D. yakuba* are favoured. Acquisition of population data and estimation of ecological parameters are now a prerequisite to completely explain the host-choice behaviour of *L. boulandi* females.

Understanding selection of physiological and behavioural traits that ensure adaptation of a parasitoid to its host requires the combination of several multidisciplinary approaches and ecological aspects. The data presented in the present study strongly support the idea that, in parasitoid populations, behavioural and physiological adaptations to different host species can occur and suggest that selection of physiological adaptations to a host species might parallel that of behavioural adaptations. These results appear to be of major interest in studies developed to understand host-shift phenomena (Tauber & Tauber, 1989), notably in cases of a trade-off in virulence properties against two host species (Jokela *et al.*, 2000), as reported in our model (Dupas & Boscaro, 1999).

Acknowledgements

The present study was supported by the French GDR 2153. Aurore Dubuffet received financial support from the François Rabelais University. We are grateful to Daniel Lachaise and Yves Carton for providing *Drosophila* strains and *L. boulandi* lines, respectively, to Yves Carton, Laure Kaiser and Georges Periquet for fruitful discussions, and to Jérôme Casas and Eric Wajnberg for help with statistical analyses.

References

- Althoff, D.M. & Thompson, J.N. (2001) Geographic structure in the searching behaviour of a specialist parasitoid: combining molecular and behavioural approaches. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 406–417.
- Carton, Y., Boulétreau, M., van Alphen, J.J.M. & van Lenteren, J.C. (1986) The *Drosophila* parasitic wasps. *The Genetics and Biology of Drosophila* (ed. by M. Ashburner, H. L. Carson and J. N. Thompson), Vol. 3C, pp. 347–394. Academic Press, New York, New York.
- Carton, Y., Frey, F. & Nappi, A.J. (1992) Genetic determinism of the cellular immune reaction in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, **69**, 393–399.
- Doutt, R.L. (1964) Biological characteristics of entomophagous adults. *Biological Control of Insect Pests and Weeds* (ed. by P. DeBach), pp. 145–167. Chapman & Hall, U.K.
- Driessen, G., Hemerik, L. & Boonstra, B. (1991) Host selection behaviour of the parasitoid *Leptopilina clavipes*, in relation to survival in hosts. *Netherlands Journal of Zoology*, **41**, 99–111.
- Dupas, S. & Boscaro, M. (1999) Geographic variation and evolution of immune suppressive genes in a *Drosophila* parasitoid. *Ecography*, **22**, 284–291.
- Dupas, S. & Carton, Y. (1999) Two non-linked genes for specific virulence of *Leptopilina boulandi* against *Drosophila melanogaster* and *D. yakuba*. *Evolutionary Ecology*, **13**, 211–220.
- Dupas, S., Frey, F. & Carton, Y. (1998) A single parasitoid segregating factor controls immune suppression in *Drosophila*. *Journal of Heredity*, **89**, 306–311.
- Dupas, S., Carton, Y. & Poirié, M. (2002) The genetic dimension of the coevolution of virulence resistance in *Drosophila* – parasitoid wasp relationships. *Heredity*, **90**, 84–89.
- Jokela, J., Schmid-Hempel, P. & Rigby, M.C. (2000) Dr. Pangloss restrained by the Red Queen – steps towards a unified defense theory. *Oikos*, **89**, 267–274.
- Kraaijeveld, A.R., Nowee, B. & Najem, R.W. (1995) Adaptive variation in host selection behaviour of *Asobara tabida*, a parasitoid of *Drosophila* larvae. *Functional Ecology*, **9**, 113–118.
- Krebs, J.R. & Davies, N.B. (1981) *An Introduction to Behavioural Ecology*. Blackwell Scientific Publications, U.K.
- Labrosse, C., Carton, Y., Dubuffet, A. *et al.* (2003) Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulandi*. *Journal of Insect Physiology*, **49**, 513–522.
- Labrosse, C., Eslin, P., Doury, G. *et al.* (2005a) Haemocyte changes in *D. Melanogaster* in response to long gland components of the parasitoid wasp *Leptopilina boulandi*: a Rho-GAP protein as an important factor. *Journal of Insect Physiology*, **51**, 161–170.
- Labrosse, C., Stasiak, K., Lesobre, J. *et al.* (2005b) A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulandi* (Hymenoptera, Figitidae)–*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 93–103.
- Lachaise, D., Cariou, M.-L.R.D.J., Lemeunier, F.L., T. & Ashburner, M. (1988) Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Evolutionary Biology* (ed. by M. Hecht, B. Wallace and G. T. Prance), Vol. 22, pp. 159–225. Plenum Publishing Corporation, New York.
- MacArthur, R.H. & Pianka, E.R. (1966) On optimal use of a patchy environment. *The American Naturalist*, **916**, 603–609.
- Mollema, C. (1991) Heritability estimates of host selection behaviour by the *Drosophila* parasitoid *Asobara tabida*. *Netherlands Journal of Zoology*, **41**, 174–183.
- Ottani, E.B. (2000) Etholog 2.2 - a tool for the transcription and timing of behaviour observation sessions. *Behaviour Research Methods, Instruments, & Computer*, **32**, 446–449.
- Rolff, J. & Kraaijeveld, A.R. (2001) Host preference and survival in selected lines of a *Drosophila* parasitoid, *Asobara tabida*. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 742–745.
- Russo, J., Brehélin, M. & Carton, Y. (2001) Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulandi*. *Journal of Insect Physiology*, **47**, 167–172.
- Tauber, C.A. & Tauber, M. (1989) Sympatric speciation in insects: perception and perspectives. *Speciation and its Consequences* (ed. by D. Otte and J. A. Endler), pp. 307–344. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- van Alphen, J.J.M. & Janssen, A.R.M. (1982) Host selection by *Asobara tabida* Nees (Braconidae; Alysiinae) a larval parasitoid of fruit inhabiting *Drosophila* species. *Netherlands Journal of Zoology*, **32**, 194–214.
- van Alphen, J.J.M. & Vet, L.E.M. (1986) An evolutionary approach to host finding and selection. *Insect Parasitoids, 13th Symposium of the Royal Entomological Society of London* (ed. by J. Waage and D. Greathead), pp. 23–61. Academic Press, U.K.

- van Lenteren, J.C. & Bakker, K. (1978) Behavioral aspects of the functional responses of a parasite (*Pseudeucoila bochei* Weld) to its host (*Drosophila melanogaster*). *Netherlands Journal of Zoology*, **28**, 213–233.
- Vet, L.E.M. & Bakker, K. (1985) A comparative functional approach to the host detection behaviour of parasitic wasps. II. A quantitative study on eight eucoilid species. *Oikos*, **44**, 487–489.
- Vet, L.E.M. & van Alphen, J.J.M. (1985) A comparative functional approach to the host detection behavior of parasitic wasps. I. A qualitative study on Eucoilidae and Alysiinae. *Oikos*, **44**, 478–486.
- Via, S. (2001) Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 381–390.
- Vinson, S.B. (1976) Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **21**, 109–133.
- Vinson, S.B. (1998) The general host selection behavior of parasitoid hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biological Control*, **11**, 79–96.
- Vouidibio, J. (1985) Ecologie des populations et biologie évolutive des drosophiles en Afrique équatoriale (Congo). PhD Thesis, University of Paris XII & University Marien Ngouabi, Brazzaville (Congo).

Accepted 8 November 2005

First published online 16 January 2006

Résultats principaux de l'article 1

1. Il existe une variation intra-spécifique dans le comportement de choix d'espèce hôte chez *L. bouvardi*

Lorsque l'on place une femelle *L. bouvardi* pendant une demi-heure sur un patch contenant de façon constante un nombre égal de larves non parasitées des espèces *D. melanogaster* et *D. yakuba*, son comportement de choix d'espèce hôte diffère selon la lignée à laquelle elle appartient. En effet, la lignée IS_m introduit souvent son ovipositeur dans des larves de *D. melanogaster* et accepte plus souvent de déposer un œuf dans cette espèce tandis que la lignée IS_y introduit autant de fois son ovipositeur dans des larves de *D. melanogaster* que dans des larves de *D. yakuba* mais accepte plus souvent de déposer un œuf dans les larves de *D. yakuba*.

2. Cette variation intra-spécifique dans le comportement de choix d'espèce hôte pourrait être en relation avec la variation de virulence observée chez les 2 lignées

La lignée IS_m, très virulente sur *D. melanogaster* et incapable d'empêcher l'encapsulation de ses œufs dans l'hôte *D. yakuba*, choisit plutôt *D. melanogaster* lorsqu'elle a le choix entre les 2 espèces hôtes. Ce comportement est en accord avec ses capacités de virulence puisqu'elle va préférentiellement choisir l'espèce dans laquelle sa descendance a une probabilité maximale d'échapper à l'encapsulation, confirmant ainsi les théories "d'optimal foraging".

➔ La lignée IS_m est donc bien adaptée à l'espèce *D. melanogaster*, tant au niveau comportemental que physiologique.

La lignée IS_y, dont la réussite dépend du niveau de résistance de l'espèce hôte rencontrée, a un comportement de sélection d'hôte moins contrasté que la lignée IS_m. Elle ne semble pas avoir de préférence d'hôte après examen "externe" (elle introduit autant de fois son ovipositeur dans *D. melanogaster* que dans *D. yakuba*), mais accepte ensuite plus volontiers de pondre un œuf dans les larves de l'espèce *D. yakuba* dans lesquelles elle a introduit son ovipositeur.

➔ La réussite parasitaire de cette lignée ne dépend pas directement de l'espèce hôte qu'elle infeste mais du niveau de résistance de chaque hôte, l'absence de préférence après examen externe des larves hôtes paraît conforme à ce que l'on pouvait attendre. Le rejet de l'hôte *D. melanogaster* après examen "interne" est par contre inattendu. La connaissance des conditions écologiques ayant pu favoriser un tel comportement dans la population dont la lignée IS_y est issue serait nécessaire pour proposer une explication à nos observations.

3. Le comportement de choix d'espèce hôte peut rapidement changer au cours de l'exploitation du patch d'hôtes chez *L. bouhardi*

Lorsque les femelles *L. bouhardi* sont placées sur un patch d'hôte contenant des larves *D. melanogaster* et *D. yakuba* en proportions égales, leurs préférences ne s'expriment qu'après avoir rencontré un certain nombre de larves. Alors que leur comportement vis à vis de l'espèce hôte "préférée" (*D. melanogaster* pour la lignée IS_m et *D. yakuba* pour la lignée IS_y) reste constant durant la durée de l'expérience, leur comportement vis à vis de l'autre espèce hôte change, cette espèce étant de plus en plus fréquemment rejetée au fur et à mesure que le nombre de rencontres augmente. Il est possible que la femelle parasitoïde adapte son comportement au fur et à mesure qu'elle acquiert de l'information sur son environnement, c'est à dire ici la présence constante des 2 espèces hôtes sur le patch. Il est également possible que les capacités de discrimination des espèces hôtes changent avec l'expérience des femelles parasitoïdes.

CHAPITRE 2

Variation de stratégie de virulence au sein de l'espèce *Leptopilina bouvardi* et spécificité parasitaire

parasitoid:
L. bouvardi



	<i>D. melanogaster</i> Resistant reference line 1089 (R line)	<i>D. yakuba</i> Resistant reference line 1880-D (R, line)
IS_m line	Escape the host immune system 	Encapsulation 
IS_y line	Encapsulation 	Escape the host immune system 

PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE

Variation intraspécifique de virulence sur une espèce hôte

Deux pré-requis sont nécessaires afin d'étudier les bases physiologiques du polymorphisme de virulence d'une espèce parasitoïde vis à vis d'une espèce hôte dans les populations naturelles.

- il faut bien sûr que ce polymorphisme existe
- il faut connaître le(s) mécanisme(s) employé(s) par le type "virulent" pour échapper à l'encapsulation par l'hôte. On pourra alors déterminer quels sont les points particuliers de ces mécanismes qui diffèrent chez un parasitoïde "avirulent".

Lorsque ces conditions sont remplies, il faut ensuite vérifier si les différences observées dans le modèle biologique "binaire" virulent / avirulent (études en laboratoire) expliquent la variation de virulence observée en conditions naturelles.

Les conditions décrites ci-dessus n'ont à ma connaissance été remplies à ce jour que pour les espèces *Asobara tabida* et *Leptopilina boulardi*.

En ce qui concerne le parasitoïde *A. tabida*, la comparaison de 2 lignées, respectivement avirulentes et virulentes sur *D. melanogaster*, a permis d'établir que les œufs des parasitoïdes virulents échappent à l'encapsulation en s'entourant des tissus hôtes (Monconduit et Prévost, 1994 ; Eslin *et al.*, 1996). Cette caractéristique a ensuite été observée dans différentes populations européennes et il a été établi que le succès des différentes populations d'*A. tabida* est assez bien corrélé avec la capacité des individus de ces populations à s'entourer des tissus hôtes. Dans ce cas, les bases physiologiques de la variation de virulence semblent assez simples puisqu'elles sont attribuables à des variations d'adhésivité du chorion des œufs (Kraaijeveld *et al.*, 2001a) (Figure 28 p77).

Les variations du succès parasitaire de *L. boulardi* sur *D. melanogaster* semblent elles aussi directement liées à un facteur intervenant dans la stratégie de virulence, résumée dans le Tableau 9.

L. boulardi est connu pour injecter lors de l'oviposition, des facteurs de virulence contenus dans une **glande à venin** (glande impaire), qui inhibent les capacités des larves de *D. melanogaster* à former une capsule (Labrosse *et al.*, 2003). Cette inhibition est encore observée 48 heures après parasitisme, lorsque les dissections des larves hôtes sont effectuées (Labrosse *et al.*, 2003). De plus, l'**immunosuppression systémique** induite par les lignées virulentes de *L. boulardi* permet aussi bien à la lignée avirulente de *L. boulardi* qu'à un autre parasitoïde habituellement

encapsulé dans cet hôte, une souche avirulente d'*A. tabida*, de se développer jusqu'au stade adulte (Labrosse *et al.* 2003 ; observations personnelles, non publié). Cette immunosuppression peut donc être considérée comme **durable**.

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des connaissances concernant la stratégie de virulence employée par la lignée IS_m vis à vis de *D. melanogaster*. Les numéros indiqués dans le tableau renvoient aux articles suivants: ⁽¹⁾ (Russo *et al.*, 2001) ; ⁽²⁾ (Labrosse *et al.*, 2003) ; ⁽³⁾ (Labrosse *et al.*, 2005a) ; ⁽⁴⁾ (Labrosse *et al.*, 2005b) ; ⁽⁵⁾ (Nappi *et al.*, 2004b).

Stratégie de virulence de IS _m sur <i>D. melanogaster</i>		
Type de stratégie		Facteur impliqué
Immunosuppression systémique durable (toujours observée 48 heures post-infection) ^{(2) (5)}		Venin (P4) ^{(2) (4)}
Cibles		Facteur impliqué
Nombre total d'hémocytes (THC)	Non ^{(1) (3) (5)}	
Lamellocytes	Oui : altération de la forme ^{(1) (3)}	Venin (P4) ⁽³⁾
	Oui : nombre moins important que lors du parasitisme par la lignée avirulente IS _y ^{(1) (5)}	Venin (pas P4) ⁽³⁾
Mélanisation	Oui : inhibition de la mélanisation des tumeurs ⁽²⁾	?
Activité PO	?	

L'un des aspects de cette immunosuppression pourrait consister en l'inhibition de la voie de mélanisation. En effet, les tumeurs formées par la souche tumorale Hop^{Tum-1} de *D. melanogaster* sont moins mélanisées lorsque les larves ont été parasitées par la lignée virulente IS_m de *L. bouhardi* (Labrosse *et al.*, 2003). Ceci suggère une inhibition de l'activité de l'enzyme PO, fortement impliquée dans le processus de mélanisation, mais aucune étude n'a à ce jour clairement démontré une telle inhibition.

Le nombre total d'hémocytes (THC) observé dans les larves de *D. melanogaster* suite à leur parasitisme par la lignée virulente IS_m ou à l'injection de venin de cette lignée n'est pas différent de celui observé dans les larves infectées par la lignée 'avirulente' IS_y ou injectées avec le venin de cette lignée (Russo *et al.*, 2001 ; Labrosse *et al.*, 2005a). Le **nombre de lamellocytes** est en revanche affecté puisqu'il est moins important dans les drosophiles infectées par la lignée IS_m ou injectées avec le venin de cette

lignée par rapport aux témoins parasités par IS_y ou injectés avec le venin de IS_y (Russo *et al.*, 2001 ; Nappi *et al.*, 2004b ; Labrosse *et al.*, 2005a). La **forme des lamellocytes** est aussi altérée suite au parasitisme par la lignée IS_m ou à l'injection de son venin (Russo *et al.*, 2001 ; Labrosse *et al.*, 2005a) : ces hémocytes, habituellement discoïdaux adoptent une forme bipolaire, caractéristique des lamellocytes de larves de *D. melanogaster* infectées par les parasitoïdes du genre *Leptopilina* (Rizki *et al.*, 1990 ; Morales *et al.*, 2005).

L'un des facteurs de virulence isolés dans la glande à venin de femelles IS_m, le facteur **P4**, peut induire à lui seul l'immunosuppression systémique (Labrosse *et al.*, 2005b). L'injection du facteur P4 reproduit certains effets du parasitisme ou de l'injection de l'ensemble des facteurs contenus dans la glande à venin, en induisant la modification de la forme des lamellocytes, qui deviennent alors bipolaires (Russo *et al.*, 2001 ; Labrosse *et al.*, 2005a). L'injection du facteur P4 ne permet pas en revanche de reproduire les effets sur le nombre de lamellocytes. Ce facteur est détecté par Western blot dans les glandes à venin de femelles virulentes sur *D. melanogaster* (lignées IS_m et G301-1, provenant de Tunisie et de Guadeloupe), mais pas dans les glandes à venin de femelles IS_y (originaires du Congo), avirulentes sur *D. melanogaster* (Labrosse *et al.*, 2005b).

Les variations de succès parasitaire de *L. boulardi* sur *D. melanogaster* semblent donc assez bien corrélées à la présence ou l'absence du facteur P4, bien qu'une étude incluant un nombre plus important de lignées provenant de différentes localités soit nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

Un polymorphisme de virulence vis à vis de l'hôte *D. yakuba* a également été mis en évidence dans les populations naturelles de *L. boulardi* (Dupas et Boscaro, 1999) (Figure 39 p97) et nous disposons au laboratoire de 2 lignées dont les niveaux de virulence vis à vis d'une lignée résistante de référence de *D. yakuba* sont opposés (Figure 40 p97). La lignée IS_m de *L. boulardi* est toujours encapsulée par la lignée R₁ de l'hôte *D. yakuba* tandis que les œufs de la lignée IS_y sont rarement encapsulés dans cette lignée hôte. Un modèle "binaire" virulent / avirulent est donc disponible pour étudier les bases physiologiques de la variation de virulence de *L. boulardi* vis à vis de *D. yakuba*. Seule la lignée R₁ de *D. yakuba*, qui permet l'expression du polymorphisme de virulence est utilisée dans l'étude de ces variations, afin de distinguer les effets dus à la lignée de parasitoïde considérée des effets dus à la résistance de l'hôte.

Lorsque j'ai commencé ma thèse, le mécanisme de virulence utilisé par la lignée IS_y pour éviter l'encapsulement de ses œufs par les larves de *D. yakuba* était totalement inconnu. Nous pensions qu'un mécanisme similaire à celui employé par la lignée IS_m pour éviter l'encapsulement par *D. melanogaster* était employé, et que les facteurs de virulence de IS_m étaient plutôt spécifiques de *D. melanogaster* tandis que certains facteurs de IS_y étaient plutôt spécifiques de *D. yakuba*. Partant sur ces hypothèses, j'ai

cherché à connaître la stratégie de virulence employée par la lignée IS_y pour échapper à l'encapsulement dans l'hôte *D. yakuba*. Nous verrons dans ce chapitre que ces hypothèses ne se sont que partiellement vérifiées.

Le but de cette étude était notamment de déterminer :

1) Le mécanisme général employé par IS_y pour échapper à l'encapsulement par *D. yakuba* (**protection locale/systemique**)

2) Les composantes de l'immunité de *D. yakuba* ciblées par le parasitoïde

a) effets du parasitisme sur la composante cellulaire de la réponse immunitaire

b) effet du parasitisme sur l'activité de l'enzyme phénoloxydase (PO) et la mélanisation

3) Les facteurs de virulence mis en jeu

→ L'objectif global était donc de déterminer le(s) facteur(s) pouvant être à l'origine des variations de virulence vis à vis de l'espèce hôte *D. yakuba* dans les populations naturelles.

Par ailleurs, la stratégie de virulence employée par cette lignée vis à vis de *D. yakuba* a été comparée à celle employée par la lignée IS_m vis à vis de *D. melanogaster* (Tableau 9), afin de déterminer si le même type de stratégie est employé dans les 2 cas ou si différentes stratégies sont employées par les 2 lignées.

Variation de succès d'une espèce hôte à l'autre

Les bases physiologiques de la variation d'efficacité d'une espèce parasitoïde vis à vis de différentes espèces hôtes sont elles aussi peu étudiées, et peu de modèles biologiques ont permis jusqu'à présent d'obtenir des éléments clairs permettant de comprendre cette variation (exposé bibliographique, III.2, p81). Parmi ces rares exemples, on trouve le parasitoïde *A. tabida* dont le succès sur différentes espèces de drosophiles est très clairement corrélé au nombre d'hémocytes en circulation chez ces hôtes (Figure 32 p86).

Les bases physiologiques des variations de succès de *L. bouvardi* sur différentes espèces hôtes du sous-groupe *melanogaster* sont en revanche complètement inconnues. Les variations de taux d'encapsulement des œufs

dans différentes espèces hôtes ne dépendent clairement pas du nombre d'hémocytes en circulation dans ces différentes espèces (corrélation effectuée à partir de Eslin et Prévost (1998) et de Carton et Kitano (1981), non publié, Figure 33 p87).

L'essentiel de mon travail de thèse portant sur la comparaison de données disponibles sur le système *L. bouvardi* / *D. melanogaster* avec celles (à obtenir) du système *L. bouvardi* / *D. yakuba*, les bases physiologiques de la variation de succès de *L. bouvardi* sur ces deux espèces hôtes ont pu être abordées.

Il s'agissait notamment de déterminer pour la lignée IS_m (dont le succès est clairement "espèce-hôte dépendant") quels étaient les effets du parasitisme spécifiquement observés chez *D. melanogaster* (et pas chez *D. yakuba*) afin d'élaborer des hypothèses concernant la ou les raisons de l'échec de IS_m sur l'hôte *D. yakuba*.

L'article 2 (partie I) décrit le mécanisme général employé par la lignée IS_y pour échapper à l'encapsulement chez *D. yakuba*, l'implication des facteurs contenus dans la glande impaire des femelles IS_y dans ce mécanisme de virulence, ainsi que les effets du parasitisme par IS_m et IS_y sur l'immunité cellulaire de *D. yakuba*.

La partie II démontre l'effet *in vitro* des facteurs contenus dans la glande impaire des femelles sur l'activité PO de l'hémolymphe de *D. yakuba*, ainsi que l'absence d'effet des facteurs contenus dans la glande impaire des femelles IS_m.

Enfin, la description du profil protéique de la glande impaire des femelles IS_y ainsi que les premières analyses concernant la nature des facteurs de virulence sont décrits dans la partie III.

I ARTICLE 2: VIRULENCE STRATEGIES USED BY THE PARASITOID WASP LEPTOPILINA BOULARDI AGAINST ITS DROSOPHILA HOSTS

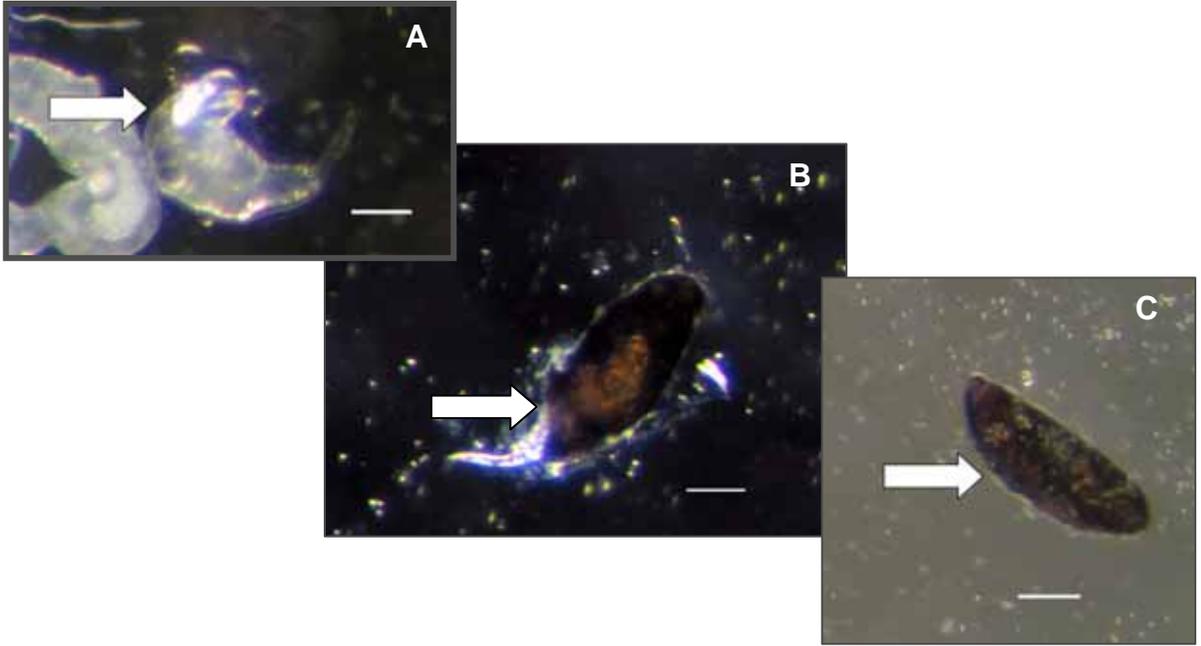


Figure 42 : Possible states of the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* 48 hours post-infestation of a *Drosophila yakuba* larva.

A. Free larva : the first instar larva of the parasitoid is alive and free in the host haemocoel.

B. Opened capsule : a capsule has been formed around the parasitoid egg. However, the capsule was not strong enough and the first instar larva that has emerged from the egg is finally able to escape.

C. Completed capsule : a strong capsule has been formed around the parasitoid egg, that will finally die.

Bars : 100 μ m

Photos: A. Dubuffet

Article 2

Virulence strategies used by the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* against its *Drosophila* hosts

Aurore Dubuffet, Géraldine Doury, Carole Labrousse, Jean-Michel
Drezen, Yves Carton and Marylène Poirié

En préparation pour Developmental and Comparative Immunology

1 Introduction

Avoiding host immune defenses is essential to all organisms with an endoparasitic lifestyle, such as endoparasitoid wasps. These insects perform their larval development at the expense of other arthropods, generally other insects, and have free-living adult stages (Quicke, 1997). The insect immune reaction against parasitoid eggs and, more generally, against large foreign bodies consists in the formation of a multicellular, melanized capsule around the intruder (Carton & Nappi, 1997; Lavine & Strand, 2002). Following non-self recognition, haemocyte proliferation occurs and part of the haemocytes become adhesive and aggregate around the parasitoid egg. Within the same period, a proteolytic cascade is triggered, which leads to conversion of an inactive pro-phenoloxydase zymogen into an active phenoloxydase enzyme (Cerenius & Söderhäll, 2004). Phenoloxydase is involved in melanin synthesis and production of cytotoxic radicals, which are supposedly responsible for parasitoid death (Nappi & Christensen, 2005). In *Drosophila* larvae, plasmatocytes and lamellocytes are the haemocyte cells that collaborate to form the cellular sheath around the intruder, whereas crystal cells contain pro-phenoloxydase precursors (Meister, 2004).

Parasitoids show various virulence strategies to escape encapsulation of their eggs by immunocompetent hosts (Strand & Pech, 1995b; Moreau, 2003; Pennacchio & Strand, 2006). They can be divided into two categories in regard to the remaining ability of parasitized hosts to encapsulate other foreign bodies, as supernumerary parasitoids or implanted chromatography beads: if foreign bodies other than the parasitoid egg are encapsulated, 'local immunoevasion' has occurred. On the contrary, parasitized hosts that are unable to mount successful encapsulation reactions have suffered a 'systemic immunosuppression'. The braconid parasitoids *Asobara citri* and *Microplitis demolitor*, for example, are known to suppress the whole encapsulation ability of their respective hosts, in contrast to the ichneumonid *Venturia canescens* and the two braconids *Macrocentrus cingulum* and *Asobara tabida* (Feddersen *et al.*, 1986; Strand & Noda, 1991; Hu *et al.*, 2003; Moreau *et al.*, 2003). The capacity to encapsulate supernumerary foreign objects can also change in the course of parasitization. Encapsulation ability is sometimes restored following systemic immunosuppression (Stoltz & Guzo, 1986; Lavine & Beckage, 1996; Stettler *et al.*, 1998; Yin *et al.*, 2003) or can be suppressed belatedly following an early local immunoevasion strategy (Hayakawa & Yazaki, 1997; Asgari, 2006).

The alteration of host immune defenses is due to parasitoid maternal factors that are produced in the female reproductive apparatus and introduced into the host at the time of oviposition. These factors, including polydnviruses (PDVs), virus-like particles (VLPs), ovarian fluids and venoms, can interfere with specific host immune components. Depending on the parasitoid species, they can coat the egg surface, providing local protection, or they can be dispersed in the host haemolymph, inducing an overall immunosuppression (Webb & Luckhart, 1994; Drezen *et al.*, 2003; Labrosse *et al.*, 2003; Moreau & Guillot, 2005; Reineke *et al.*, 2006). The main effects observed on the host immune system are haemocyte apoptosis (Strand & Pech, 1995a; Lapointe *et al.*, 2005), disruption of the actin cytoskeleton of specific haemocytes (Rizki & Rizki, 1994; Turnbull *et al.*, 2004) and inhibition of phenoloxydase activity (Beckage *et al.*, 1990; Moreau *et al.*, 2000; Shelby *et al.*, 2000). Finally, few studies have also hypothesized that the larval surface would be involved in local immunoevasion processes (Lavine & Beckage, 1996; Kinuthia *et al.*, 1999).

Most analyses of parasitoid virulence strategies have been performed on species of the Ichneumonoidea superfamily and particularly on PDVs-carriers. As a consequence, they might not account for the diversity of the mechanisms used by parasitoids to escape host immune defenses. Data on other parasitoid families will provide the potential for characterizing new immune suppressive molecules or pointing out conserved virulence factors and which may enable to identify evolutionary convergences in virulence strategies.

Leptopilina boulardi is a non-PDVs carrier cynipid wasp found in Europe, Asia, Africa, the American continent and the Caribbean islands, that infests second instar *Drosophila* larvae of the *melanogaster* subgroup (Carton *et al.*, 1986; Allemand *et al.*, 2002). This parasitoid species has generally a high success on *D. melanogaster* with the exception of a Congolese line that is unable to escape encapsulation in reference resistant strains of *D. melanogaster* (Dupas & Boscaro, 1999; Dupas & Carton, 1999). The Congolese line is also original in being able to escape encapsulation in some *D. yakuba* strains (Dubuffet *et al.*, submitted) in contrast to other *L. boulardi* lines whose eggs are always encapsulated in this host species.

Variation of virulence on *D. melanogaster* has already been investigated (Russo *et al.*, 2001; Labrosse *et al.*, 2003; Labrosse *et al.*, 2005a; Labrosse *et al.*, 2005b).

Parasitism of this species by a *L. bouleari* line of the “common type” (IS_m line, always virulent on *D. melanogaster*) or injection of venom from IS_m female venom glands protects eggs of the Congolese line (IS_y) from encapsulation (Labrosse *et al.*, 2003). Venom gland components, injected together with IS_m eggs, thus induce a systemic immunosuppression. Parasitism by IS_m or IS_y females induces haemocyte proliferation in *D. melanogaster* larvae. However, the number of lamellocytes is further reduced by 50% in larvae parasitized by the IS_m line in comparison to larvae parasitized by the IS_y line. Moreover, parasitism by IS_m but not by IS_y females induces a modification of the morphology of the host lamellocytes (Russo *et al.*, 2001; Labrosse *et al.*, 2005a). These changes in lamellocyte shape were considered as characteristic of the virulence strategy used by the *Leptopilina* genus since also described in *D. melanogaster* parasitized by *L. heterotoma* or *L. victoriae* (Rizki & Rizki, 1984; Morales *et al.*, 2005).

In this study, we investigate the virulence strategy used by the IS_y line of *L. bouleari* on *D. yakuba*. We first report parasitism effects on the encapsulation ability of *D. yakuba* larvae during the two first days of parasitization, as well as the effect of injection of venom gland contents. The efficiency of the observed virulence strategy, in relation with the developmental stage of the parasitoid, is then questioned by determining the hatching time of parasitoid embryos. In a second part, we report differential effects of parasitism by IS_m and IS_y females on cellular components of *D. yakuba* larvae, notably on the lamellocyte morphology. Finally, we compare virulence strategies used by the IS_m line on *D. melanogaster* and the IS_y line on *D. yakuba*, and discuss whether specificity of virulence factors and of their physiological effects explain intra-specific variation of virulence efficiency against the two host species.

Previous studies on parasitoid-host interactions have rarely questioned whether intra-specific variation of virulence strategies could be found in the field and whether different virulence strategies and different virulence factors might be used by a given parasitoid species against different host species. The *L. bouleari* – *Drosophila melanogaster* / *Drosophila yakuba* model is ideal to address these questions and obtained data will provide insights on the bases of host specificity in parasitoid wasps.

2 Materials and methods

2.1 Insects

The *L. boulandi* IS_m line (Gif stock, no. 431) derives from a single female collected in the Nasrallah oasis (Tunisia) and the IS_y line (Gif stock, no. 486) derives from a single female originating from a mass culture of a Brazzaville (Congo) population. Both IS_m and IS_y lines were reared on a susceptible *D. melanogaster* strain (Gif stock no. 1333), at 25°C. After emergence, adults of both lines were kept at 18°C on agar medium with honey. The *D. yakuba* reference strain used during the experiments is the isofemale line 1880-D, which was raised at 25°C using a standard *Drosophila* cornmeal-yeast-agar medium.

IS_y and IS_m lines ability to evade encapsulation by the 1880-D line of *D. yakuba* and the 1088 reference line of *D. melanogaster* are the exact opposite (Table 1). 22 ± 5 % of IS_y eggs are encapsulated by the *D. yakuba* line (N = 81), but half of the capsules are inefficient since the parasitoid finally manages to escape (Figure 42). As a result, 92 ± 3 % of IS_y parasitoids develop until emergence (21-25 days later) in *D. yakuba* hosts (N = 92) (Dubuffet, unpublished data). In contrast, 85 ± 3 % (N = 146) of IS_y eggs are efficiently encapsulated by the reference resistant line of *D. melanogaster* (Labrosse *et al.*, 2003). All the IS_m eggs are efficiently encapsulated by the reference *D. yakuba* line (N = 87) whereas none are encapsulated by the reference *D. melanogaster* line (N = 240) (Labrosse *et al.*, 2003, Dubuffet, unpublished data).

2.2 Effects of parasitism on the encapsulation response

48 ± 1h second instar *D. yakuba* larvae were placed on agar plates covered with *Drosophila* cornmeal-yeast-agar medium and exposed to mated and fed 4-8 days *L. boulandi* females. The females' oviposition behaviour was then observed under a stereomicroscope. Following each single oviposition event, the parasitized larva was immediately injected with a small volume of paraffin oil (*Gifrer*) using an Eppendorf transjector (*FemtoJet*®, needles *Femtotips II*®, 0.7 µm outer diameter). Using the Eppendorf transjector, injection of second instar *Drosophila* larvae is possible but the injected volume has to be evaluated visually by observing the drop through the larvae cuticle. Only larvae exhibiting a drop of 150-200 µm in diameter (which correspond to

2-5 nl drops) were conserved. Injected larvae were transferred to a fresh medium and pooled by groups of 14–37 larvae. Groups of control unparasitized larvae were also injected using the same procedure. Patches of larvae were then placed at 25°C during various periods (24, 30, 40 and 48 hours). Finally, larvae were dissected in Ringer's saline solution (182 mM KCl; 46mM NaCl; 3mM CaCl₂; 10mM Tris-HCl) to evaluate the degrees of encapsulation of the oil drops, categorized as follows: 'absence of haemocytes' (total absence of haemocytes at the surface of the drop), 'presence of some haemocytes' (some haemocytes observed at the surface of the drop), 'partial cellular encapsulation and spots of melanization' (presence of a multilayered capsule covering a large part of the foreign body, also partially melanized), 'completed capsule' (cellular capsule totally covering the surface of the drop and strongly melanized). Comparisons between parasitized larvae and controls were performed by Chi-squared contingent comparisons.

2.3 *Effects of the venom gland content on the encapsulation response*

For each experiment, 20-25 IS_y female venom glands were dissected in 10 µl Ringer's saline solution at 4°C. The samples were homogenized manually and the extract was briefly centrifuged at 10 000 g to precipitate the cellular debris. Protein concentration in the samples was determined spectrophotometrically using the standard method of Bradford (1976), and adjusted with Ringer to obtain 1µg/µl solutions. The quantity of proteins by gland was 0.61 ± 0.11 µg (N = 8). It should be noted that the term 'venom gland' (also called 'accessory gland' or 'long gland') used throughout this paper corresponds to both the venom gland and the reservoir tissues.

Injections of 10 nl paraffin oil together with either 10 nl of venom gland solution (which corresponds to 0.015 wasp gland-equivalent) or Ringer's saline solution were performed in 3 days-old *D. yakuba* larvae according to the method of Doury & Eslin (in prep.). This method allows co-injection of definite volumes of oil and aqueous solution but necessitates a 25 µm diameter glass micro-needle so that hosts to be injected were older than usual (third stage). Patches of 17-34 injected larvae were placed at 25°C during 24 or 44 hours. Larvae were then dissected to evaluate the degrees of encapsulation of the oil drops, categorized as reported above. Comparisons between

venom gland extracts injected larvae and Ringer injected controls were performed using Chi-squared contingent comparisons.

2.4 *Hatching time evaluation*

Patches of 30 *D. yakuba* 48h old larvae were submitted to parasitism by 3 *L. boulandi* females during 1 hour. Larvae were dissected at different moments thereafter to determine the developmental stage of *L. boulandi* embryos (eggs or L1 larvae).

2.5 *Haemograms*

D. yakuba females were allowed to oviposit during 1 hour on a standard *Drosophila* medium. Eggs were then placed at 25°C. 48 hours later, groups of 20 resulting second instar larvae were collected, transferred to a fresh medium and submitted to parasitism by IS_y or IS_m females for 2 hours. Only one female parasitoid was allowed to oviposit per patch to avoid superparasitism. Groups of unparasitized larvae were used as a control. Parasitized and control larvae were maintained on artificial diet at 25°C and haemocyte counts were performed 27 hours after parasitism (76 hours old larvae). Larvae were carefully washed three times in Ringer's saline solution. Haemolymph was collected directly from each larva in a Thoma hemocytometer (0.02 mm depth), without dilution, by cutting the anterior part of the larvae with ophthalmic scissors.

The total number of haemocytes per mm³ (THC) and the numbers of each type of haemocyte per mm³ (i.e. plasmatocytes, crystal cells and lamellocytes) were counted in 21-26 larvae per treatment under a phase contrast microscope (Eslin & Prévost, 1996). The haemocyte types were defined according to Brehélin (1982). Modified lamellocytes with a bipolar shape and blunt or flared ends (instead of the normal disc shape) were also identified and counted (see Rizki & Rizki, 1984 for the identification of modified lamellocytes). The percentage of bipolar lamellocytes was calculated as the number of modified lamellocytes per mm³ divided by the total number of lamellocytes. This percentage was transformed for statistical analyses using an arcsine transformation (Anscombe, 1948). ANOVA analyses were performed followed by pairwise comparison

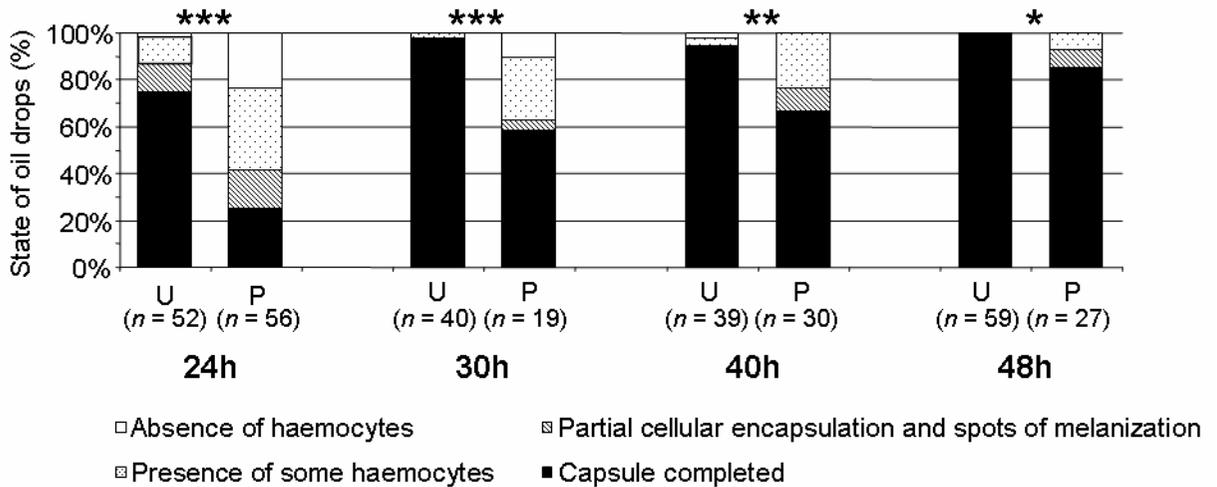


Figure 1 (Article 2) : Encapsulation degrees of paraffin oil drops injected in *D. yakuba* larvae unparasitized (U) or parasitized by *L. boulardi* (P). Two-days old *D. yakuba* larvae were injected with 2-5 nl of paraffin oil just after parasitization (< 10 minutes). Injections were also performed in unparasitized larvae of the same age reared under the same experimental conditions. Injected larvae were dissected at different times (24, 30, 40 and 48 hours), and the degree of encapsulation of oil drops was categorized as follows : 'absence of haemocytes' (total absence of haemocytes on the drop surface), 'presence of some haemocytes' (some haemocytes observed on the surface of the drop), 'partial cellular encapsulation and spots of melanization' (partially melanized capsule covering a large part of the foreign body), 'capsule completed' (strongly melanized capsule totally surrounding the drop). Results are expressed in percentages of injected oil drops. Values within brackets indicate numbers of examined oil drops for each category (** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; χ^2 test).

using Fisher's Least Difference (LSD) test, to determine if there were treatment-dependent differences in haemocyte counts and bipolar lamellocytes percentages (Software: Systast 10, SPSS Inc, Chicago, IL).

3 Results

3.1 Transient inhibition of D. yakuba encapsulation ability following parasitism by L. boulardi

Analysis of the virulence strategy used by *L. boulardi* IS_y females against *D. yakuba* was performed by injecting paraffin oil drops in second instar host larvae immediately (< 10 minutes) after their infestation. The encapsulation degree of the oil drops injected in unparasitized *D. yakuba* larvae (as a control) and in larvae parasitized by IS_y wasps was subsequently recorded at different times (24, 30, 40 and 48 hours) following injection (Figure 1). The degree of encapsulation of oil drops was categorized as indicated in material and methods. The percentage of hatched parasitoids was also determined for the same period of time (Table 2).

In unparasitized larvae, only 2 ± 2 % of the injected droplets remained intact 24 hours post infestation (PI). 75 ± 6 % were surrounded by a melanized capsule and nearly all droplets were at least covered by some haemocytes (Figure 1). When the larvae were dissected 48 hours PI, 100 ± 0 % of the droplets were completely encapsulated and melanized. Foreign objects are thus readily encapsulated by *D. yakuba* larvae.

Frequency distributions of the different encapsulation categories for the oil drops were then compared between unparasitized and parasitized larvae. They significantly differed whatever the dissection time, the oil drops being consistently less encapsulated in parasitized larvae (24 h PI : $\chi^2 = 30.11$; d.f = 3; $P < 0.001$; 30 h PI : $\chi^2 = 15.88$; d.f = 3; $P = 0.001$; 40 h PI : $\chi^2 = 12.61$; d.f = 3; $P = 0.006$; 48 h PI : $\chi^2 = 9.17$; d.f = 3; $P = 0.027$). However, the difference between parasitized and unparasitized samples decreased in the course of parasitization. 24 hours PI, the percentage of completely encapsulated drops was divided by 3 in comparison with unparasitized larvae, but it was only reduced by 40%, 30% and 15% at 30 h PI, 40 h PI and 48 h PI respectively. Despite the important reduction of encapsulation ability at 24 h PI, most of the drops were at least covered by some haemocytes and only 23 ± 6 % of the droplets remained

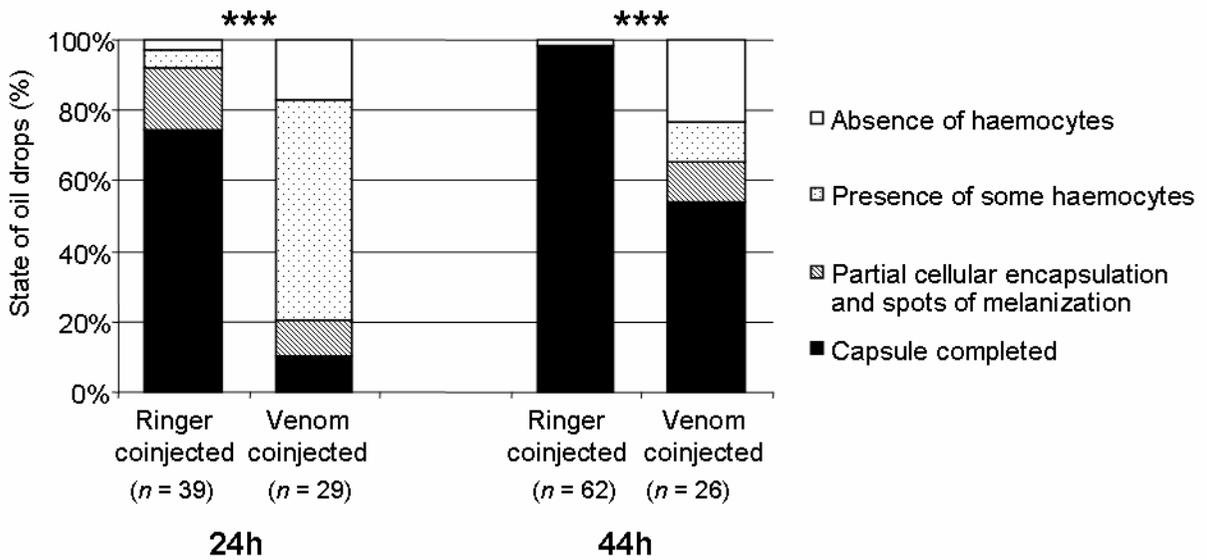


Figure 2 (Article 2) : Encapsulation degrees of paraffin oil drops co-injected in *D. yakuba* larvae together with a saline solution or *L. boulardi* venom gland extracts. Two-days old *D. yakuba* larvae were injected with 10 nl of paraffin oil together with 10 nl of Ringer saline solution or 10 nl of *L. boulardi* venom gland extracts (1mg/ml). Injected larvae were dissected at different moments thereafter (24 and 44 hours) in order to examine the encapsulation degrees of the oil drops categorized as follows : 'absence of haemocytes' (total absence of haemocytes at the surface of the drop), 'presence of some haemocytes' (some haemocytes observed at the surface of the drop), 'partial cellular encapsulation and spots of melanization' (presence of a multilayered capsule covering a large part of the foreign body, partially melanized), 'capsule completed' (cellular capsule totally covering the surface of the drop and strongly melanized). Results are expressed in percentages of oil drops. Values within brackets indicate numbers of examined oil drops for each category (***) $P < 0.001$; χ^2 test).

totally intact. 48 h PI, none of the droplets was intact and more than 80% were totally encapsulated. Encapsulation ability was thus almost completely restored at this time. Interestingly, parasitoid hatching occurs at 32 ± 1 h PI (Table 2), at a time when half of the injected drops are encapsulated.

Our results clearly demonstrate that parasitization by IS_y females of *L. bouhardi* inhibits the encapsulation ability of *D. yakuba* larvae, but that this “systemic immunosuppression” is only transient.

3.2 Transient inhibition of encapsulation ability is due to venom gland contents

To determine if female venom gland products are involved in the transient inhibition of encapsulation ability, paraffin oil drops were co-injected with venom gland extracts or Ringer's saline (as a control) in *D. yakuba* larvae. Their encapsulation degree was observed 24 and 44 hours PI (Figure 2). Frequency distributions of the different encapsulation categories significantly differed for oil drops co-injected with venom gland extracts and co-injected with Ringer's saline, with a strong decrease in the encapsulation level of oil drops co-injected with venom gland extracts (24 h PI: $\chi^2 = 37.53$; d.f = 3; $P < 0.001$; 44 h PI: $\chi^2 = 29.18$; d.f = 3; $P < 0.001$). However, the difference between the samples depended on the time elapsed before dissection of the injected larvae. 24 hours PI, the percentage of completely encapsulated drops was divided by 7 in comparison to the control but it was only divided by 2 at 44 h PI. These results indicate that injection of IS_y venom gland extracts prevents oil drops from being encapsulated, but in a transient way, since the encapsulation ability is almost completely recovered 44 h PI. Injection of venom gland extracts thus reproduces parasitism effects.

*3.3 Comparison of parasitism effects of IS_y and IS_m females on *D. yakuba* haemocytes*

Effects of parasitism by IS_y on *D. yakuba* cellular immunity were analyzed by comparing haemocyte profiles of unparasitized larvae and larvae parasitized by IS_y or IS_m females. Results and statistical analysis are shown in Table 3. The Total Haemocyte Count (THC) was significantly higher 27 hours PI in the two parasitized samples than in

Table 1 (Article 2): Outcome of immune interactions between the two different lines of *Leptopilina boulardi* (IS_y and IS_m) and the reference resistant lines of *Drosophila melanogaster* and *Drosophila yakuba* .

	<i>Drosophila melanogaster</i> resistant reference line 1088	<i>Drosophila yakuba</i> resistant reference line 1880D
IS _m line	No capsule	Encapsulation
IS _y line	Encapsulation	No capsule

Table 2 (Article 2) : Percentage of hatched parasitoid eggs as a function of their age at the time of observation. Parasitized *D. yakuba* larvae were dissected at different times after oviposition. Parasitoid larvae that were hatching at the time of observation were counted as 'hatched' (number indicated within brackets).

Age of parasitoid eggs	% of hatched eggs	Number of observations
24 ± 1 h	0.0 %	30
30 ± 1 h	0.0 %	14
31 ± 1 h	0.0 %	5
32 ± 1 h	40.0 %	20 (4)
33 ± 1 h	95.8 %	24 (2)
40 ± 1 h	100.0 %	30
44 ± 1 h	100.0 %	5

unparasitized controls, indicating that cell proliferation occurs in response to infection. This change corresponds to an increase in both the number of plasmatocytes and lamellocytes but not of crystal cells. However, the number of lamellocytes ($P = 0.021$), plasmatocytes ($P < 0.001$) and the resulting THC ($P < 0.001$) were significantly lower in *D. yakuba* larvae parasitized by IS_y females than in larvae parasitized by IS_m females. The most important effect is obtain for plasmatocytes, those number is half-reduced in IS_y parasitized larvae in comparison with IS_m parasitized ones. No difference in the percentage of bipolar lamellocytes was found under the different conditions. Few bipolar lamellocytes were observed in all larvae, due to a natural percentage of non-discoidal lamellocytes or to a misclassification error.

4 Discussion

Intra-specific variation in parasitism success has rarely been reported. One of the more striking examples is the outcome of *Leptopilina boulardi* parasitism in two different host species, *D. melanogaster* and *D. yakuba*, which clearly depends on the parasitoid line (Dupas & Boscaro, 1999). IS_m parasitoids always succeed in preventing encapsulation in *D. melanogaster* but their eggs are consistently encapsulated in *D. yakuba*. IS_y parasitoids are encapsulated in resistant strains of *D. melanogaster* but can develop in *D. yakuba* reference strains. Virulence components used by IS_m parasitoids on *D. melanogaster* have already been investigated (Russo *et al.*, 2001; Labrosse *et al.*, 2003; Labrosse *et al.*, 2005a; Labrosse *et al.*, 2005b), but nothing was known on the virulence strategies developed by IS_y parasitoids against *D. yakuba*.

4.1 Virulence strategy used by IS_y against *D. yakuba*

Foreign bodies injected in *D. yakuba* larvae just after their parasitization by IS_y females remain capsule-free 24 hours post-infestation (PI) and are thus clearly protected from encapsulation. *D. yakuba* larvae then recover their encapsulation ability since more than 80% of injected oil drops are completely encapsulated 48 hours PI. Parasitoid eggs hatch within the recovery period and parasitoid larvae then remain non-encapsulated. When oil drops are co-injected with female venom gland extracts in *D. yakuba* larvae, their encapsulation level is again strongly decreased 24 hours PI and only half-reduced 48 hours PI post-infestation. Venom gland extracts thus mimic parasitization effects on

Table 3 (Article 2) : Total haemocyte count (THC), differential count of plasmatocytes, lamellocytes and crystal cells, and percentage of bipolar cells in unparasitized *Drosophila yakuba* larvae and in larvae parasitized by IS_y or IS_m females of *Leptopilina boulardi*, 27 hours after parasitization. Values are expressed in mean numbers of cells per mm³ of hemolymph (\pm SE). Numbers within brackets indicate numbers of replicates for each category of hosts. For each cellular category, the means were compared between unparasitized larvae, larvae parasitized by IS_y females and larvae parasitized by IS_m females. Values within a same line followed by different letters indicate a significant difference (ANOVA, P<0.05).

	Unparasitized larvae	Larvae parasitized		ANOVA
	(N=26)	by IS _y females (N=21)	by IS _m females (N=21)	
THC	3964 \pm 328 a	12942 \pm 890 b	23064 \pm 1898 c	df=2; F=71.94; P<0.001
Plasmatocytes	3372 \pm 309 a	6702 \pm 833 b	15236 \pm 1786 c	df=2; F=32.46; P<0.001
Lamellocytes	268 \pm 64 a	5719 \pm 458 b	7423 \pm 705 c	df=2; F=72.46; P<0.001
Crystal cells	64 \pm 14 a	190 \pm 60 a	144 \pm 55 a	df=2; F=2.14; P=0.126
% Bipolar lamellocytes	2.7 \pm 2.7 a	4.0 \pm 0.8 a	4.5 \pm 0.7 a	df=2; F=0.30; P=0.740

D. yakuba encapsulation ability. Our results clearly show that parasitization by IS_y females induces a transient systemic suppression of encapsulation ability in *D. yakuba* larvae, a phenomenon that involves female venom gland products.

L. boulardi development in a host larva lasts several days while complete systemic immunosuppression was only observed during the first 24 hours PI. Successive virulence strategies are then probably used to overcome *D. yakuba* immune defences. At first, venom gland products protect the parasitoid until its emergence within the host, since hatching occurs during the period of recovery of the immune defences. Parasitoid larvae must then escape encapsulation by immunocompetent hosts, for example by eating or brushing off haemocytes that attach their surface, or using a protective layer that coat the cuticle. The last protection strategy has already been proposed for parasitoid species whose larvae, implanted in a host, are not encapsulated in contrast to foreign objects (Salt, 1966; Lavine & Beckage, 1996; Stettler *et al.*, 1998). In *Venturia canescens*, Kinuthia *et al.* (1999) described an hemomucin coating the larval surface during late embryogenesis and reported that host haemolymph components, including a lipophorin, enter the parasitoid egg to form a hemomucin-lipophorin complex at the surface of the developing larva. By the time the larva hatches, it would be covered with “host” proteins and therefore be protected.

In *D. yakuba* parasitized by IS_y parasitoids, systemic immunosuppression conferred by venom gland products in the first hours following infestation might thus be progressively replaced by local immunoevasion, since encapsulation ability is recovered 2 days following parasitization.

Several parasitoid immunosuppressive factors are known to target cellular components, mainly haemocytes, or humoral components such as the PO cascade. The effects of IS_y parasitization on *D. yakuba* cellular components were analyzed by comparing haemocytic profiles of unparasitized hosts and hosts parasitized by IS_y females or IS_m females, during the systemic immunosuppression period. The THC was higher in parasitized hosts, whatever the parasitoid line than in unparasitized hosts, due an increase in both the number of lamellocytes and plasmatocytes. Parasitoid eggs and/or the material injected with the eggs are thus recognised by the immune system of *D. yakuba* larvae, leading to haemocyte proliferation as well as differentiation of lamellocytes. The number of crystal cells remains constant in parasitized larvae, as

reported for *D. melanogaster* (Carton & Kitano, 1979; Moreau *et al.*, 2003), supporting the idea that these cells are not involved in the encapsulation process (Irving *et al.*, 2005).

The THC, the lamellocyte count and the plasmatocyte count were reduced in hosts parasitized by IS_y parasitoids in comparison with hosts parasitized by the IS_m line. In *Drosophila* larvae, cell proliferation and lamellocyte differentiation occur in the haematopoietic organ (Lanot *et al.*, 2001; Meister, 2004). To escape encapsulation in *D. melanogaster*, the parasitoid species *Asobara citri* induces a severe disruption of the haematopoietic organ anterior lobes, thus preventing the production of new haemocytes (Moreau *et al.*, 2003). However, alteration of this organ is not always correlated with the absence of haemocytic proliferation. In *D. melanogaster* larvae parasitized by *L. heterotoma*, an increase of THC is observed although apoptosis is detected in this organ (Nappi & Streams, 1969; Chiu *et al.*, 2000; Chiu & Govind, 2002). This proliferation is nevertheless reduced in comparison with what is usually observed after infestation by a avirulent parasitoid, like *Ganaspis mellipes* (Nappi & Streams, 1969). A similar effect on haematopoietic organ would be involved in *D. yakuba* larvae after parasitization by IS_y parasitoids, delaying or reducing cell proliferation. Alternatively, destruction of part of the haemocytes might occur after the proliferation step, a virulence mechanism also described in the *Leptopilina* genus (Chiu & Govind, 2002; Labrosse *et al.*, 2005a; Morales *et al.*, 2005). *L. heterotoma* venom gland extracts induce apoptosis of *D. melanogaster* plasmatocytes as well as lysis of the lamellocytes following actin cytoskeleton modifications (Chiu & Govind, 2002). Apoptosis of plasmatocytes could also occur following IS_y parasitization. However, no modification of the lamellocyte morphology was observed in parasitized *D. yakuba* larvae so that lysis of the lamellocytes in the same way is rather unlikely (Table 3). Finally, it is also possible that IS_m products injected during oviposition (egg and/or venom) are more immunogenic than those of IS_y parasitoids, thus inducing a higher cell proliferation in *D. yakuba* larvae.

Most of the injected oil drops are at least covered by some haemocytes 24 hours post-infestation or injection of venom gland extracts. These haemocytes probably correspond to plasmatocytes, the first *Drosophila* haemocytes that adhere to a foreign object (Russo *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2005). A mechanism that would prevent

recruitment or adhesion of additional haemocytes (an particularly lamellocytes) to the surface of foreign bodies might also be responsible for the systemic inhibition of encapsulation.

4.2 Virulence strategies within the *L. bouleari* species and within the *Leptopilina* genus

Intra-specific variation of parasitism success against two different host species has been described in *L. bouleari*, using the IS_m and IS_y lines (Dupas & Boscaro, 1999)(Dubuffet *et al.*, unpublished). Our results show that virulence strategies used by the IS_m line to succeed in *D. melanogaster* and the IS_y line to succeed in *D. yakuba* differ by some remarkable features.

Both parasitoids induce at first a systemic suppression of the encapsulation ability of their respective hosts. However, the immune suppressive effects induced by IS_m parasitoids are durable whereas those induced by IS_y females are clearly transient. This raises the question of the evolutionary benefits of each strategy. The IS_m strategy, although efficient in a situation of monoparasitism (one parasitoid egg per host; 0% encapsulation (Labrosse *et al.*, 2003), might not be as profitable in a situation of multiparasitism in which supernumerary parasitoids or kleptoparasitoids (that oviposit in already parasitized hosts), could benefit from the protection conferred by IS_m parasitization. *Asobara tabida* for example uses a kleptoparasitic strategy and its survival is increased in *D. simulans* (Kraaijeveld, 1999) and *D. melanogaster* (personal observation, unpublished) when hosts are previously parasitized by virulent *L. bouleari* parasitoids. In a multiparasitism situation, the IS_y strategy would confer a better survival probability to its eggs by not providing long-term protection to other foreign bodies such as supernumerary parasitoids.

Haemocyte proliferation occurs in all *Drosophila* larvae parasitized by *L. bouleari*, whatever the *Drosophila* species or the parasitoid line. However, successful parasitism of IS_m in *D. melanogaster* is associated with modifications of lamellocytes only, both in their morphology - 30-40 % of the lamellocytes become bipolar – and number (Russo *et al.*, 2001), suggesting specific targeting and destruction of these cells. In contrast, IS_y success in *D. yakuba* only affects the haemocyte – plasmatocyte and lamellocyte – number, possibly by regulating their proliferation and/or recruitment.

The virulence strategies of IS_y against *D. yakuba* and IS_m against *D. melanogaster* thus differ at the physiological level, suggesting that different molecular factors might be involved. Interestingly, the two lines of the same parasitoid species have more different virulence strategies against different host species than are the strategies used by different *Leptopilina* species against *D. melanogaster*. Indeed, *L. heterotoma* and *L. victoriae*, as well as other *Drosophila* parasitoids such as *A. citri*, durably inhibits encapsulation ability. *L. heterotoma* and *L. victoriae* also induce changes in haemocyte morphology since most lamellocytes become bipolar after parasitization (Rizki *et al.*, 1990; Russo *et al.*, 2001; Labrosse *et al.*, 2003). IS_y differences in virulence are not only explained by infestation of a different host species. Indeed, this line succeeds in developing in 'susceptible' (but immunocompetent) *D. melanogaster* strains without inducing any lamellocyte shape modification (Russo *et al.*, 2001). Hence, although it is likely that many aspects of the two strategies are 'host species-specific', others would rather be 'parasitoid-line-specific'.

4.3 Insights on specificity in *L. boulardi* - *Drosophila* interactions

Studies on intra-specific variability of virulence strategies against different hosts address the question of the bases of specificity in *L. boulardi* - *Drosophila* interactions. They will also help analyzing the factors responsible for specificity. It was previously shown that lamellocyte shape modifications in *D. melanogaster* are specifically induced by the IS_m line. (Russo *et al.*, 2001). In addition, we demonstrate here that IS_y success on *D. yakuba* is not associated with lamellocyte modifications. IS_m does not induce changes on *D. yakuba* lamellocytes which would explain its failure to develop successfully in this host species. This physiological effect is thus both 'parasitoid-line-specific' and 'host-species specific'.

Recent studies have shown that a 35 kDa virulence factor, named P4, contained in the venom gland of IS_m females, is associated with the modification of *D. melanogaster* lamellocyte shape (Labrosse *et al.*, 2005a; Labrosse *et al.*, 2005b). This protein was not detected on electrophoresis of IS_y venom gland extracts using an antibody raised against this factor, a RhoGAP protein. This indicates that it is either absent or produced in a small amount compared to IS_m venom glands. As a consequence, no modification of lamellocyte shape are observed in *D. melanogaster* or *D. yakuba* larvae parasitized by IS_y females. Studies are now aimed to understand how the P4 virulence factor enter

Drosophila melanogaster haemocytes and induce actin changes, which would also allow understanding its inefficiency on *D. yakuba* haemocytes. The nature and the mode of action of IS_y venom gland factors, responsible for transient alteration of encapsulation ability of *D. yakuba* larvae, are currently under investigation.

Characterisation of virulence factors that may be useful against a large host range, as well as those that determine species-specificity in parasitoid-host interactions or more generally in parasite or pathogen-host interactions is an important challenge to understand the diversification of these pathogens/parasites as well as the evolution of host resistance mechanisms. By and large, comparative researches will also help us to define virulence factor targets in insect species.

5 Acknowledgments

We are grateful to Patrice Eslin and Geneviève Prévost for fruitful discussions, to Malivone Seui for technical assistance, and to Carole Labrousse and Françoise Frey for help in rearing hosts and parasitoids. This work was supported by the French GDR 2153. Aurore Dubuffet received financial support from the François Rabelais University.

Principaux résultats de l'article 2

1. La stratégie de virulence utilisée par la lignée IS_y de *L. bouhardi* contre l'hôte *D. yakuba* est une immunosuppression systémique transitoire, progressivement remplacée par une immunoévasion locale.

Les expériences d'injection de paraffine réalisées ont permis de mettre en évidence que la capacité des larves de *D. yakuba* à encapsuler un corps étranger est d'abord inhibée pendant les premières 24 heures, puis progressivement restaurée pour sembler quasiment intacte 48 heures après parasitisme.

La larve de parasitoïde émerge dans l'hôte durant la période de récupération de la capacité à encapsuler. La poursuite du développement du parasitoïde s'effectue donc dans un hôte capable d'encapsuler un corps étranger. Ces résultats suggèrent que la larve est protégée localement de l'encapsulement, par un mécanisme différent de celui qui protège l'œuf.

La suppression de la capacité de *D. yakuba* à encapsuler un corps étranger induite par la lignée IS_y est ainsi transitoire alors que celle induite chez *D. melanogaster* par la lignée IS_m est durable (Labrosse *et al.*, 2003).

→ Les stratégies de virulence employées par les 2 lignées de parasitoïde diffèrent donc en ce premier point.

2. Les facteurs localisés dans la glande à venin de la lignée IS_y sont responsables de l'immunosuppression systémique transitoire.

Les extraits de glande à venin de femelles IS_y protègent une goutte d'huile de l'encapsulement, mais les effets de ces facteurs sont beaucoup moins importants 48 heures après injection que dans les premières 24 heures. L'effet du parasitisme sur la suppression transitoire de la capacité à encapsuler est donc reproduit par les facteurs contenus dans la glande à venin des femelles IS_y, ce qui confirme leur rôle dans la protection de l'œuf du parasitoïde.

→ Les facteurs de virulence employés par les 2 lignées de parasitoïde sont localisés dans les glandes à venin des femelles.

3. Les larves de *D. yakuba* parasitées par la lignée IS_y ont un nombre total d'hémocytes moins important que les larves parasitées par la lignée IS_m. Le nombre de lamellocytes et de plasmacytes est affecté.

Une prolifération hémocytaire importante est toujours obtenue dans les larves de *D. yakuba* parasitées par l'une ou l'autre des lignées de parasitoïde, ce qui indique que la réponse immunitaire est déclenchée. Le nombre total d'hémocytes est cependant plus important dans les larves parasitées par la lignée "avirulente" IS_m que dans les larves parasitées par la lignée "virulente" IS_y, ce qui suggère soit que la lignée IS_y affecte le nombre d'hémocytes en réduisant la prolifération cellulaire ou en détruisant une partie des lamellocytes et des plasmacytes, soit que la lignée IS_m produit des œufs et/ou des venins plus immunogènes que la lignée IS_y, ce qui induirait une prolifération cellulaire plus intense.

→ L'une des causes de la variation de succès de *L. boulardi* sur *D. yakuba* pourrait donc être la différence d'effets des deux lignées sur l'immunité cellulaire de cet hôte.

Une différence de THC est donc observée dans les larves de *D. yakuba* parasitées par l'une ou l'autre des 2 lignées de parasitoïde alors qu'aucune différence n'a été détectée chez les larves de *D. melanogaster* parasitées par ces mêmes lignées (Russo *et al.*, 2001). Ainsi, le nombre de lamellocytes et de plasmacytes semble affecté chez *D. yakuba* suite au parasitisme par IS_y alors que seul le nombre de lamellocytes est réduit chez *D. melanogaster* suite au parasitisme par IS_m.

→ Les stratégies de virulence employées par les 2 lignées de parasitoïde diffèrent donc en ce deuxième point.

4. L'aspect des lamellocytes de l'hôte *D. yakuba* n'est jamais affecté.

Le pourcentage de lamellocytes "anormaux" des larves parasitées par la lignée IS_y n'est pas différent de celui observé dans les larves non parasitées. Le succès de la lignée IS_y dans l'espèce *D. yakuba* ne peut donc pas être lié à cette pathologie hémocytaire, contrairement à ce qui est observé lors du parasitisme de *D. melanogaster* par la lignée IS_m.

→ Les stratégies de virulence employées par les 2 lignées de parasitoïde diffèrent donc en ce troisième point.

Le pourcentage de lamellocytes anormaux n'est pas non plus différent entre les larves de *D. yakuba* parasitées par la lignée IS_m et les larves non parasitées. Ceci indique que la pathologie cellulaire habituellement induite par la lignée IS_m chez les larves de *D. melanogaster* est spécifique à cette espèce hôte. Autrement dit, le facteur P4, responsable de ces effets chez *D. melanogaster*, semble inefficace sur *D. yakuba*.

→ Le facteur P4 semble donc être un facteur “spécifique” de l’hôte *D. melanogaster*. Cette spécificité pourrait expliquer en partie la différence de succès de la lignée IS_m sur les espèces *D. melanogaster* et *D. yakuba*.

Les facteurs contenus dans la glande à venin des femelles IS_y étant responsables de l’inhibition de la capacité des larves de D. yakuba à encapsuler, la recherche des effets de ces facteurs sur l’activité PO et la mélanisation a ensuite été effectuée par des tests in vitro.

II EFFETS DES COMPOSÉS CONTENUS DANS LA GLANDE IMPAIRE DE *L. BOULARDI* SUR L'ACTIVITÉ PHENOLOXYDASE DE *D. YAKUBA*

II.1 Objectif/Principe

L'effet des facteurs contenus dans la glande impaire des femelles de la lignée IS_y sur l'activité PO de l'hôte *D. yakuba* a été recherché par dosage *in vitro* de l'activité de cette enzyme en présence ou absence de ces facteurs. De même, l'effet des facteurs contenus dans la glande impaire des femelles de la lignée IS_m sur cette activité a été mesuré afin de déterminer si ces effets peuvent être liés à la réussite parasitaire.

L'enzyme PO permet la conversion de L-DOPA en dopachrome, un produit coloré en rose, coloration mesurable à 490 nm. L'activité PO peut ainsi être estimée en mesurant par densité optique la quantité de dopachrome formée à partir d'une quantité fixe de L-DOPA durant un laps de temps donné (Moreau *et al.*, 2000).

II.2 Matériel et méthodes

*II.2.1 Obtention d'hémolymphe de larves de *D. yakuba**

Des larves de la lignée R₁ de *D. yakuba* âgées de 96 ± 2h (élevées à 25°C), sont rincées successivement 3 fois dans du Ringer, 2 fois dans un mélange Ringer 50% / Ethanol 50%, puis 3 fois dans du Ringer. Elles sont ensuite placées sur du papier filtre humecté avec du Ringer pendant 30 minutes afin de laisser vider au maximum le contenu de leur tube digestif.

II.2.2 Préparation des extraits de glande impaire

Une soixantaine de glandes impaire de femelles *L. bouleardi* (lignée IS_y ou lignée IS_m) sont disséquées dans 20 µl de tampon cacodylate (acide cacodylique 10 mM; CaCl₂, 2 H₂O 5 mM; pH7), broyées manuellement à l'aide d'une pince à dissection puis vortexées. Après une brève centrifugation à 12 000 g afin de se débarrasser des débris cellulaires, le surnageant est récupéré. La concentration protéique de l'extrait de glande impaire obtenu est ensuite dosée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Dans ces conditions, la concentration de l'extrait de glande impaire obtenu est d'environ 1 µg / µl.

II.2.3 Dosage de l'activité de l'enzyme phénoloxydase

L'hémolymphe de lots de 5 larves est collecté en présence de tampon cacodylate, directement dans le puits de la microplaque dans lequel l'activité PO sera mesurée, dans 5 types de solutions, soit:

1. en présence de **tampon cacodylate** uniquement (témoin 'hémolymphe seul')
2. en présence d'un inhibiteur de PO, une solution de 1-phenyl-2-thiourée (**PTU**) à 0.01% ('traitement PTU', témoin négatif)
3. en présence de 4 µg d'extraits de glande impaire de femelles **IS_y** collectés dans du tampon cacodylate ('traitement IS_y', test inhibition)
4. en présence de 4 µg d'une protéine quelconque, ici de la **BSA** mise en solution dans du tampon cacodylate ('traitement BSA', contrôle protéique)
5. en présence de 4 µg d'extraits de glande impaire de femelles **IS_m** collectés dans du tampon cacodylate ('traitement IS_m', test spécificité)

Chez de nombreux insectes, l'activité PO "basale" (en absence d'infection bactérienne ou de parasitisme) mesurée juste après la collecte de l'hémolymphe est généralement assez faible, puisque l'enzyme est encore sous la forme non-active pro-PO. Ainsi, la mesure de l'activité en cas d'infection ou la mesure des effets d'une substance sur l'activation ou l'inhibition de cette enzyme (ou sur l'enzyme elle même) nécessite généralement au préalable l'activation du zymogène pro-PO en PO active par divers types d'éliciteurs microbiens, enzymatiques ou chimiques (LPS, laminarine, protéases à sérine, CaCl₂...) (Richards et Edwards, 2000 ; Shelby *et al.*, 2000 ; Tong et Kanost, 2005). Cette activation n'est pas nécessaire dans les conditions utilisées puisque la PO est activée dès que l'hémolymphe des larves de drosophile est collectée. Par contre, il est par conséquent nécessaire de collecter directement l'hémolymphe des larves dans la substance dont on veut tester l'effet inhibiteur et il devient impossible de tester le même échantillon en absence ou en présence de cette substance.

Les échantillons sont mis à incuber 45 minutes à 37°C afin de laisser le temps à l'enzyme d'atteindre son activité maximale. 50 µl d'une solution de L-DOPA 5 mM (L-dihydroxyphenylalanine, préparée extemporanément dans du tampon cacodylate) sont alors ajoutés dans chaque puits. L'activité de l'enzyme PO est mesurée par spectrophotométrie à 490 nm après une heure d'incubation à 21°C.

Au moins 3 répétitions de chaque type de traitement ont été effectuées. Les résultats sont comparés à l'aide d'un test de Kruskal Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples pour données non paramétriques au vu du nombre réduit de répétitions dans certains traitements (Siegel et Castellan, 1988).

Les résultats obtenus pour chaque traitement sont représentés dans la Figure 43 en termes de pourcentage relatif d'activité PO par rapport au témoin "hémolymphé seul". Ce pourcentage se calcule de la façon suivante:

$$\% \text{ relatif d'activité PO} = \frac{\text{densité optique mesurée dans le traitement considéré}}{\text{densité optique mesurée dans le témoin hémolymphé seul}}$$

II.3 Résultats

Des différences significatives du % relatif d'activité PO ont pu être mises en évidence dans les différents traitements (Kruskal Wallis, $H = 35.278$; $df = 4$; $P < 0.001$) (voir Figure 43). L'ajout de PTU induit une réduction de 95% de l'activité PO ($Q = 3.18$; $d.f = 5$; significatif au seuil 5%) par rapport au témoin 'hémolymphé seul' ce qui signifie que la production de dopachrome est bien attribuable à la PO (et pas à une autre enzyme) qui est ainsi sous sa forme active dans l'échantillon 'hémolymphé seul'.

L'ajout de 4 μg d'extraits de glande impaire de la lignée IS_y induit une forte inhibition de l'activité PO ($Q = 4.59$; $d.f = 5$; significatif au seuil 5%), équivalente à celle obtenue avec l'inhibiteur PTU ($Q = 0.70$; $d.f = 5$; NS). Une inhibition importante de l'activité PO est donc induite par des facteurs contenus dans la glande impaire de cette lignée. La quantité d'extraits nécessaire à une telle inhibition étant très éloignée de la réalité biologique (4 μg d'extraits pour 5 larves de drosophiles correspondent environ à 1.3 équivalents de glande par hôte), des tests complémentaires utilisant 1 μg d'extraits de glande IS_y (0.32 équivalents de glande par hôte) ont été réalisés. Une différence globale de % relatif d'activité PO est de nouveau obtenue en comparant les résultats obtenus dans cette condition avec les conditions 1, 2 et 3 décrites précédemment (Kruskal Wallis, $H = 35,61$; $d.f = 3$; $P < 0.001$). L'activité PO obtenue dans ce traitement est fortement réduite ($Q = 3,07$; $d.f = 3$; significatif au seuil 5% ; 50% de l'activité du traitement 'hémolymphé seul') et statistiquement équivalente à celle obtenue avec ajout de PTU ($Q = 1,67$; $d.f = 3$; NS) ou de 4 μg d'extrait de glande ($Q = 1,14$; $d.f = 3$; NS).

L'ajout de BSA ne change en revanche pas l'activité PO basale dans l'hémolymphé ($Q = 0.64$; $d.f. = 5$; NS), ce qui indique que l'ajout d'une protéine quelconque n'induit d'inhibition de l'activité PO. Enfin, l'activité PO mesurée dans le traitement ' IS_m ' n'est pas statistiquement différente de celle mesurée dans le traitement 'BSA' ($Q = 0.07$; $d.f = 5$; NS). Ce sont donc les facteurs spécifiquement contenus dans la glande impaire des femelles IS_y de *Leptopilina bouvardi* qui induisent l'inhibition PO de l'hémolymphé des larves de *D. yakuba*.

Inhibition of PO activity and melanization by long gland products of IS_y females

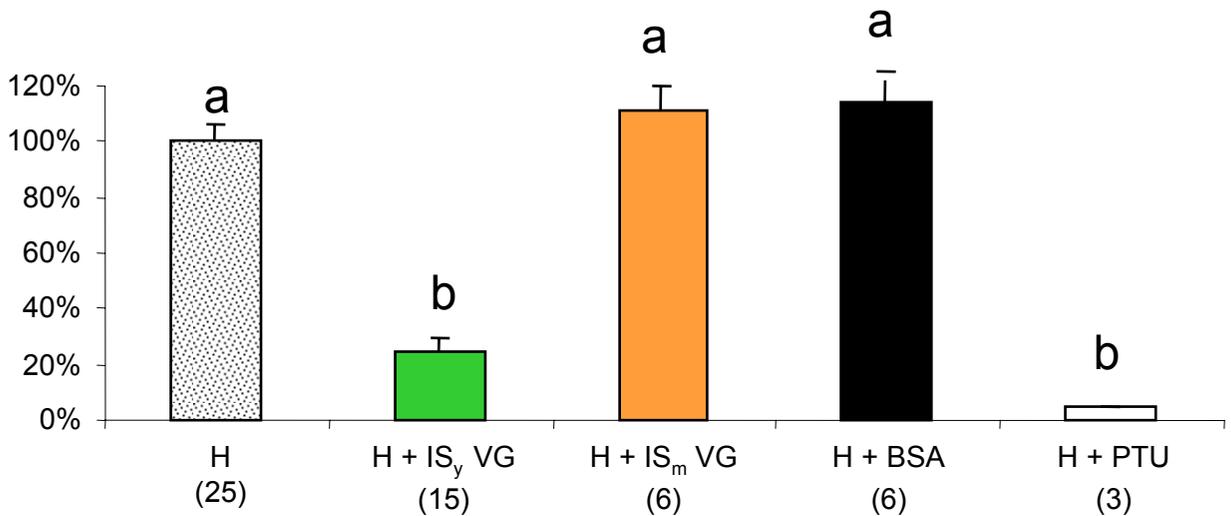


Figure 43 : Specific inhibition of Phenoloxydase (PO) activity in *Drosophila yakuba* (R₁ line) haemolymph by *Leptopilina boularidi* IS_y venom gland extracts.

PO activity was measured at 490 nm by the quantity of dopachrome formed after 1 hour of incubation at 21°C, under 5 different conditions. **H**: haemolymph of 5 *D. yakuba* larvae (96 ± 2 h); **H + IS_y VG**: haemolymph + 4 µg of IS_y venom gland extracts; **H + IS_m VG**: haemolymph + 4 µg of IS_m venom gland extracts; **H + BSA**: haemolymph + 4 µg of bovine serum albumin; **H + PTU**: haemolymph + 0.01% 1-phenyl-2-thiourea.

Results are expressed as the mean percentage of haemolymph PO activity measured in each treatment relative to the H control (*D. yakuba* haemolymph alone) (± SE). The number of repeated measures for each treatment is indicated between brackets.

PO activities significantly differed between treatments (Kruskal Wallis test: P < 0.001), Significant differences (P < 0.05) are indicated by different letters (multiple comparisons test for non-parametric data, Siegel & Castellan, 1988)

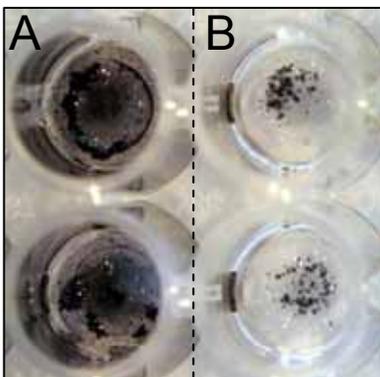


Figure 44 : Inhibition of melanisation in *Drosophila yakuba* haemolymph (R1 line) by venom gland extracts of the IS_y line of *Leptopilina boularidi*.

Haemolymph of *D. yakuba* larvae (96 ± 2 h) was collected in cacodylate buffer alone (**A**) or in presence of 4 µg of IS_y venom gland extracts (**B**)

Quelques heures après la collecte d'hémolymphe de larves de *D. yakuba* dans le tampon cacodylate, une mélanisation importante est habituellement observée dans les puits dans lesquels les mesures spectrophotométriques ont été effectuées (Figure 44a). Cette mélanisation est en revanche fortement réduite dans les puits dans lesquels des extraits de glande impaire de la lignée IS_y ont été ajoutés (Figure 44b).

II.4 Discussion / Perspectives

Ces tests *in vitro* permettent une démonstration claire de l'inhibition de l'activité PO de l'hémolymphe de larves de *D. yakuba* par les facteurs contenus spécifiquement dans les glandes impaires des femelles IS_y.

II.4.1 Rôle des facteurs contenus dans la glande impaire dans l'inhibition transitoire de l'encapsulation

Les extraits de glande impaire induisent une inhibition transitoire de la capacité des larves *D. yakuba* à encapsuler un corps étranger introduit dans leur cavité générale (Article 2). L'inhibition de la PO par ces extraits pourrait donc jouer un rôle dans cette inhibition de l'encapsulation.

Le système immunitaire des insectes est souvent présenté de manière dichotomique, avec "l'immunité cellulaire" d'une part (qui recouvre tout ce qui concerne la prolifération hémocytaire, l'activation puis l'agrégation des différents types hémocytaires autour du corps étranger) et "l'immunité humorale" d'autre part (qui recouvre la synthèse de peptides antimicrobiens, l'activation du système PO et la synthèse de mélanine). Cette dichotomie ne reflète pas cependant le déroulement de la réaction d'encapsulation qui nécessite la coopération de ces 2 systèmes. Ainsi, comme il a été souligné dans la revue bibliographique, l'inhibition de l'un entraîne l'inhibition de l'autre, et vice versa. Les tests *in vitro* de Ling et Yu (2005) par exemple, démontrent que la mélanisation d'un corps étranger est possible en présence d'hémocytes et de plasma chez *Manduca sexta* alors qu'elle est absente si l'un des deux composants manque. Les hémocytes, éléments de la réponse cellulaire sont ainsi nécessaires au processus de mélanisation (réponse humorale). Leur rôle dans ce processus viendrait simplement du fait qu'ils renferment les précurseurs de la PO (Rizki et Rizki, 1985 ; Jiang *et al.*, 1997 ; Ling et Yu, 2005). Chez la drosophile, ces précurseurs étaient considérés comme contenus dans les cellules à cristaux, mais un gène codant pour un précurseur de PO semble exprimé dans les lamellocytes (Irving *et al.*, 2005). L'inhibition de l'activation de la proPO en PO active induit une inhibition de l'encapsulation. L'injection de la serpine 27A (inhibiteur de l'enzyme activatrice de la proPO) chez des larves résistantes de *D. melanogaster*, par exemple, inhibe de manière significative leur capacité à former une capsule autour des œufs du parasitoïde IS_y, habituellement encapsulé (Nappi *et al.*, 2005). De même, l'ajout d'un inhibiteur de protéase à sérine (et donc de la cascade protéolytique qui conduit à l'activation de la proPO), le p-APMSF, inhibe *in vitro* la capacité des hémocytes de la chenille *Ephesia kuehniella*

à adhérer à une surface étrangère (Beck *et al.*, 2000). Enfin, le processus de mélanisation lui-même pourrait participer à la formation de la capsule, puisque l'encapsulation d'œufs de parasitoïdes avirulents n'est pas observé chez les mutants *D. melanogaster* déficients en dopa-décarboxylase (DDC), une enzyme clef de la mélanisation (Nappi *et al.*, 1992).

Ainsi, l'inhibition de l'activité PO d'un hôte par des facteurs injectés par le parasitoïde pourrait conduire à l'inhibition non seulement de la mélanisation, mais aussi de l'encapsulation dans son ensemble. Une telle stratégie a été proposée chez le parasitoïde *Venturia canescens* (Beck *et al.*, 2000). En effet, des tests *in vitro* ont pu démontrer que le fluide du calice de cette espèce (débarrassé de VLPs) inhibe l'activité PO de l'hémolymphe de l'hôte *E. kuehniella* ainsi que l'étalement des hémocytes sur une surface étrangère. Des effets similaires ayant été obtenus à l'aide de p-APMSF, les auteurs ont suggéré l'emploi d'un inhibiteur de protéase à sérine (serpine) par le parasitoïde afin d'inhiber transitoirement et/ou localement l'encapsulation (Beck *et al.*, 2000).

Ce type de stratégie pourrait être employé par la lignée IS_y pour éviter l'encapsulation de ses œufs par l'hôte *D. yakuba*, puisque les facteurs contenus dans la glande impaire et injectés lors de la ponte inhibent l'activité PO, soit par une inhibition directe de l'enzyme, soit par une inhibition de son activation. L'étalement cellulaire pourrait ainsi être inhibé par les facteurs injectés. En effet, lorsqu'un corps étranger est injecté en même temps que des extraits de glande impaire dans les larves de *D. yakuba*, celui-ci n'est recouvert que de quelques hémocytes (sans doute des plasmocytes) 24 heures après parasitisme alors qu'une prolifération hémocytaire non négligeable a eu lieu (Article 2). Des tests *in vitro* mesurant l'étalement cellulaire (et en particulier des lamellocytes) en présence d'extraits de glande impaire de la lignée IS_y seraient donc appropriés afin de déterminer si l'inhibition de l'activité PO induit dans ce modèle une inhibition de l'étalement cellulaire.

II.4.2 Spécificité d'inhibition

Les tests réalisés dans cette étude démontrent également que les facteurs contenus dans la glande impaire des femelles de la souche IS_m n'induisent pas d'inhibition de l'activité PO chez *D. yakuba*. Cette lignée induit pourtant une inhibition significative de la mélanisation des tumeurs dans une souche tumorale de *D. melanogaster* (Labrosse *et al.*, 2003). L'inhibition de la mélanisation chez *D. melanogaster* pourrait ainsi être due soit à une inhibition spécifique de l'activité PO ou de son activation chez *D. melanogaster* (qui serait inefficace chez *D. yakuba*) soit à l'inhibition d'une autre enzyme intervenant dans le processus de mélanisation, telle que la dopa-décarboxylase par exemple. Des tests *in vitro* similaires à celui employé dans la présente étude permettraient de trancher entre ces 2 hypothèses.

II.4.3 Nature des facteurs de virulence et variation intraspécifique

Une variation intraspécifique importante au sein de l'espèce *L. boulardi* a pu être mise en évidence au cours de cette étude, puisque les facteurs contenus dans les glandes impaires des femelles IS_y ont un effet majeur sur l'activité PO de l'hôte *D. yakuba* alors que les facteurs des femelles IS_m n'ont aucun effet. Ces facteurs pourraient intervenir par ailleurs sur la différence d'effet des lignées IS_m et IS_y sur le nombre d'hémocytes des larves de *D. yakuba*, comme cela a été mis en évidence dans le système *L. boulardi* / *D. melanogaster* (Labrosse *et al.*, 2005a).

Les différences observées entre les 2 lignées soulèvent la question de la nature des facteurs de virulence localisés dans la glande impaire. Le profil protéique de la glande impaire de la lignée IS_y observé en condition native est très différent de ceux observés dans les autres lignées de *L. boulardi*, qui sont par contre très similaires entre eux (Figure 45) (Labrosse *et al.*, 2005b). Des facteurs présents spécifiquement chez la lignée IS_y (et absents ou peu abondants chez la lignée IS_m) pourraient ainsi être responsables des effets massifs observés notamment sur l'activité PO et la mélanisation chez l'hôte *D. yakuba*.

L'étude des facteurs de virulence contenus dans la glande impaire de la lignée IS_y a donc été initiée afin de déterminer la nature des facteurs de virulence responsables des différents effets de cette lignée sur l'immunité de l'hôte *D. yakuba*.

Action des venins sur la PO :

Principaux résultats

1. Les composés contenus dans la glande à venin des femelles IS_y de *L. boulandi* inhibent l'activité PO de l'hémolymphe des larves R₁ de *D. yakuba*.

Les expériences *in vitro* ont permis de mettre en évidence une forte inhibition de l'activité PO de l'hémolymphe de larves R₁ de *D. yakuba* par les facteurs contenus dans la glande à venin des femelles IS_y. Cette inhibition est soit due à l'inhibition de l'enzyme PO elle-même, soit due à l'inhibition de l'activation de cette enzyme. Les données bibliographiques indiquant par ailleurs que l'activation de la PO est nécessaire à l'encapsulement, un scénario d'inhibition de l'encapsulement via l'inhibition de l'activité PO est proposé.

2. Les composés contenus dans la glande à venin des femelles IS_m de *L. boulandi* n'inhibent pas en revanche l'activité PO de l'hémolymphe des larves de *D. yakuba*.

Les facteurs contenus dans la glande à venin des femelles IS_m de *L. boulandi* n'induisent pas d'inhibition de l'activité PO.

→ La nature ou la spécificité des facteurs contenus dans le venin des femelles IS_y et IS_m pourrait être à l'origine de la différence de virulence observée entre ces 2 lignées vis à vis de l'hôte *D. yakuba*.

*Les facteurs contenus dans la glande à venin des femelles IS_y provoquant l'inhibition de l'activité PO des larves de *D. yakuba* alors que ceux contenus dans la glande à venin des femelles IS_m sont inefficaces, la comparaison des profils protéiques des glandes à venin des 2 lignées ainsi que l'étude de la nature des facteurs contenus dans les glandes des femelles IS_y ont été entreprises.*

III NATURE DES FACTEURS DE VIRULENCE CONTENUS DANS LES GLANDES IMPAIRES DES FEMELLES DE LA LIGNÉE IS_y

III.1 Objectif/Principe

La suppression des facultés d'encapsulation chez l'hôte *D. melanogaster* par la lignée IS_m, ainsi que leur inhibition transitoire chez l'hôte *D. yakuba* par la lignée IS_y sont dues aux facteurs contenus respectivement dans les glandes impaires des femelles IS_m et IS_y et co-injectés lors de l'oviposition. Des **facteurs de virulence** contenus dans ces glandes sont donc à l'origine des perturbations du système immunitaire chez ces 2 hôtes. Les 2 lignées IS_m et IS_y ayant des propriétés de virulence différentes vis à vis des hôtes *D. melanogaster* et *D. yakuba*, il est raisonnable de penser que les facteurs de virulence possédés par ces 2 lignées diffèrent soit par leur nature, soit par leur spécificité d'action. Si les facteurs de virulence possédés par ces 2 lignées **diffèrent par leur nature**, les facteurs qui permettent à la lignée IS_m de supprimer le système immunitaire de *D. melanogaster* sont absents (ou en quantité fortement réduite) chez IS_y, d'où "l'avirulence" de cette lignée sur cet hôte. De même, les facteurs qui permettent à la lignée IS_y d'échapper à l'encapsulation chez *D. yakuba* sont absents (ou en quantité réduite) chez IS_m. Si les facteurs de virulence possédés par ces 2 lignées **diffèrent par leur spécificité**, des facteurs homologues devraient être trouvés dans ces 2 lignées. Les différentes capacités de virulence observées chez ces deux types de parasitoïdes seraient alors dues à des différences dans des régions particulières des facteurs de virulence qui détermineraient leur spécificité d'action. L'étude des facteurs de virulence des lignées IS_m et IS_y est donc une étape déterminante dans l'étude des variations de virulence de l'espèce *L. bouvardi* sur chacune des 2 espèces hôte.

Une première comparaison des profils protéiques des glandes impaires des lignées provenant de diverses origines géographiques avait été effectuée par Labrosse *et al.* (2005b) (Figure 45). Quatre bandes protéiques majeures, notées P1 à P4 sont observées chez toutes les lignées qui sont virulentes sur *D. melanogaster* alors que ces bandes ne sont pas observées chez la lignée IS_y, avirulente sur cette espèce. La bande protéique P4, étudiée dans la lignée IS_m et contenant une protéine à domaine RhoGAP, est responsable de la modification de la forme des lamellocytes et fortement impliquée dans l'inhibition de l'encapsulation chez *D. melanogaster* (Labrosse *et al.*, 2003 ; Labrosse *et al.*, 2005a ; Labrosse *et al.*, 2005b)(voir synthèse bibliographique p49-50 pour détails). Les anticorps dirigés spécifiquement contre cette protéine permettent de la détecter en Western-blot chez les lignées de *L. bouvardi* virulentes sur *D. melanogaster* mais pas chez la lignée IS_y (Labrosse *et al.*, 2005b)(Figure 46). De plus, aucune modification de la forme des lamellocytes n'est induite par le parasitisme de IS_y ni chez *D. melanogaster* (Russo *et al.*, 2001), ni chez *D. yakuba* (Article

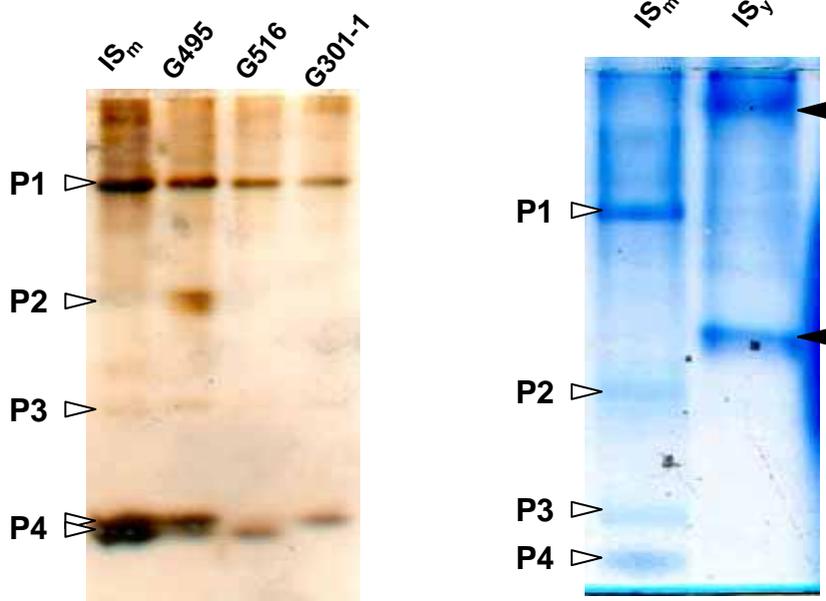


Figure 45 : Native PAGE of venom gland protein extracts of *Leptopilina boulardi* females from different areas.

(A) Left to right: IS_m line (Nasrallah, Tunisia), G495 line (Lamto, Ivory Coast), G516 (Toulouse, France), G301-1 (Guadeloupe, Caribbean Island), IS_y line (Brazzaville, Congo). Empty arrowheads indicate major bands in the lines virulent on *D. melanogaster* with their corresponding number (P1-P4). The P4 band appears as a double band in IS_m and G495 and as a single one in G516 and G301-1.

(B) Native-PAGE profiles of the IS_m line, virulent on *D. melanogaster* and the IS_y line, unable to escape encapsulation in resistant *D. melanogaster* strains. Black arrowheads indicate the two main bands in the IS_y line.

From Labrosse & al 2005b

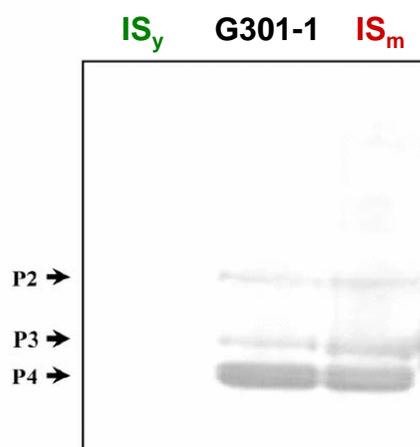


Figure 46 : Western blot analysis of venom gland proteins from the IS_y line (avirulent on *D. melanogaster*) and from the G301-1 and IS_m lines (virulent on *D. melanogaster*) using an antibody directed against the P4 recombinant protein.

The P4 double band as well as two faint bands corresponding to P2 and P3 is detected in virulent lines only.

From Labrosse et al. 2005b

2). Enfin, les expériences réalisées récemment suggèrent que le gène de la protéine P4 est présent dans le génome des lignées IS_y et IS_m de *L. bouvardi*, mais qu'il est faiblement exprimé dans les glandes des femelles IS_y, contrairement à ce qui est observé dans les glandes des femelles IS_m. Il semblerait ainsi que l'avirulence de la lignée IS_y sur l'hôte *D. melanogaster* puisse être expliquée par la trop faible quantité du facteur de virulence P4 chez cette lignée (Poirié, com. personnelle).

Aucune donnée concernant le(s) facteurs de virulence propres à la lignée IS_y n'était disponible au début de ma thèse et j'ai donc entrepris la caractérisation des profils protéiques ainsi que l'identification de facteurs de virulence dans cette lignée.

- Mon 1^{er} objectif était de confirmer la présence de bandes protéiques majeures "typiques" de cette lignée, aussi bien en condition native que dénaturante et de déterminer leur poids moléculaire.

- Mon 2nd objectif était d'identifier les protéines présentes dans ces bandes protéiques majeures. Le séquençage interne de ces bandes protéiques a été réalisé par spectrométrie de masse, en collaboration avec Maya Belghazi (INRA de Nouzilly).

III.2 Matériel et méthode

III.2.1 Comparaison des profils protéiques en condition native

80 glandes impaires de la lignée IS_m (environ 80 µg de protéines) et 100 glandes impaires de la lignée IS_y (environ 60 µg) ont été disséquées dans un petit volume de Ringer (<10 µl), broyées manuellement avec les pinces à dissection puis congelées. Aucune centrifugation n'a été réalisée afin de conserver le maximum de protéines dans l'échantillon. Les protéines de ces échantillons ont ensuite été séparées sur un gel d'électrophorèse PAGE-natif (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) à 8%. Après migration à 45mA pendant 4 heures à 4°C, les protéines ont été révélées par une coloration au bleu de Coomassie G-250 selon la méthode de Matsui (1999).

III.2.2 Comparaison des profils protéiques en condition dénaturante

3 glandes impaires de la lignée IS_m (environ 3 µg) et 3 glandes impaires de la lignée IS_y (environ 2 µg) ont été disséquées dans un petit volume de Ringer (<5 µl) et broyées manuellement avec les pinces à dissection. Aucune centrifugation n'a été réalisée. Les protéines de ces échantillons ont ensuite été séparées par gel d'électrophorèse SDS-PAGE (en présence de SDS et β-mercaptoéthanol) à 8%. Le poids moléculaire des bandes protéiques majeures a été déterminé à l'aide d'un marqueur de poids moléculaire (6.5-175 kDa, BioLabs®_{Inc.}). Après une migration de 2 h 30 à température ambiante et 45mA, les protéines ont été révélées par une coloration au nitrate argent standard (Bloom *et al.*, 1987).

Proteic bands sequenced by mass spectrometry

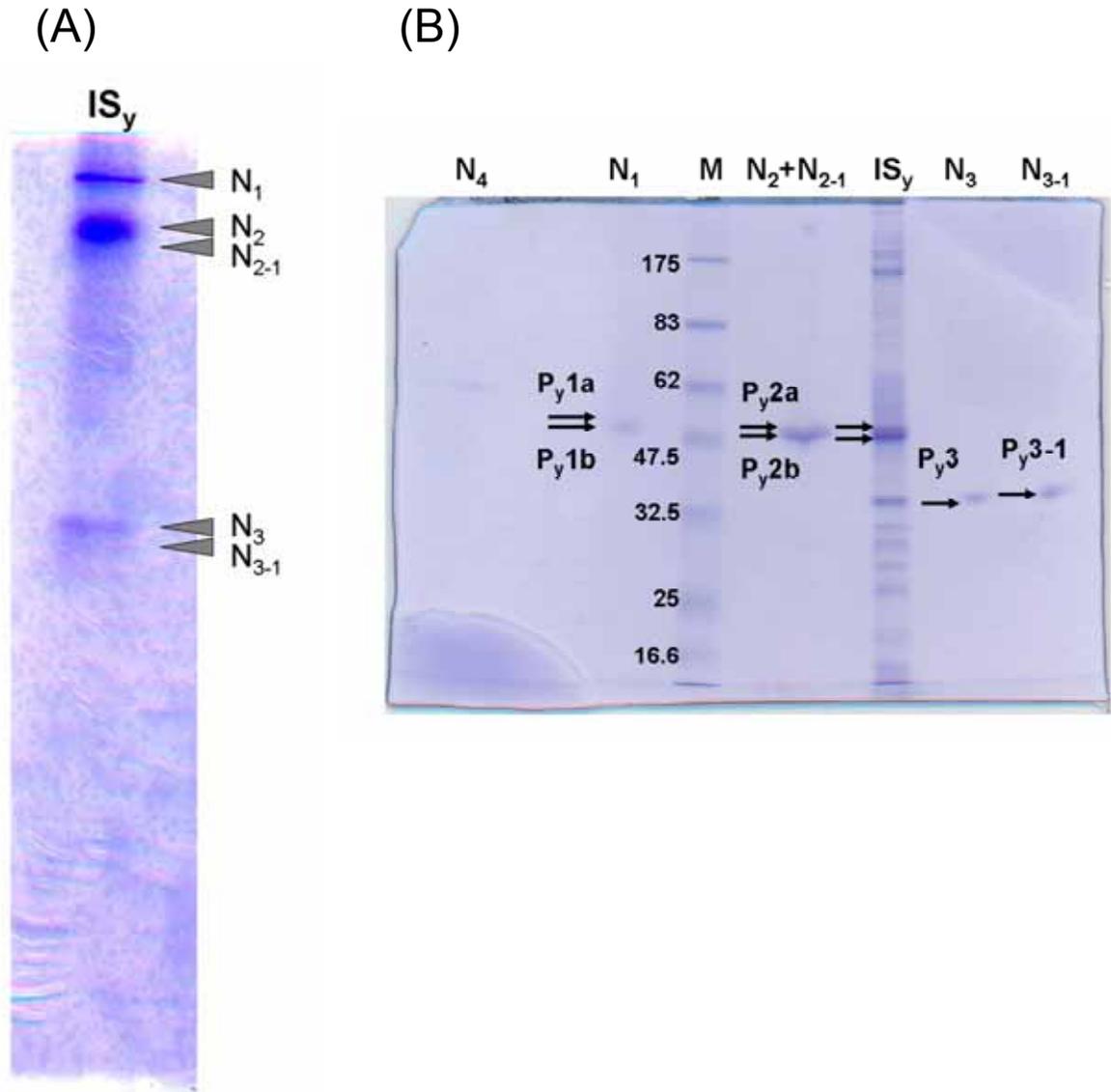


Figure 47 : Bands excised for internal sequencing from **(A)** a 8% native-PAGE gel performed with 60 IS_y glands ($\approx 37 \mu\text{g}$) (migration 8 h, 25mA, 4°C) and **(B)** an SDS-PAGE electrophoresis of the bands cut and eluted from a native gel.

The native-PAGE gel used for the SDS-PAGE gel **(B)** was performed with 130 IS_y venom gland ($\approx 80 \text{ mg}$) (8%, migration 4 h, 40mA, 4°C). Under these conditions, the N_2 and N_{2-1} native bands merged into a single major band. Proteins of the 5 major 'native' bands (N_1 , N_2+N_{2-1} , N_3 , N_{3-1} and N_4) and 40 IS_y long gland ($\approx 24 \text{ mg}$; lane ' IS_y ') were separated on a 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue R-250. P_{yi} indicate the proteins contained in the N_i band of native proteins. Double bands are noted 'a' and 'b'

III.2.3 Analyse en condition dénaturante des bandes majeures observées en condition native

Les bandes majeures spécifiquement observées dans la lignée IS_y en conditions natives ont été analysées en condition dénaturante selon le protocole employé par Moreau (2004). Pour cela, 2 gels PAGE-natif ont été réalisés selon le protocole décrit dans le paragraphe III.2.1, respectivement à partir de 100 (≈ 60 µg de protéines ; gel n°1) et 130 (≈ 80 µg ; gel n°2) glandes impaires de femelles IS_y. Les bandes majeures observées dans ces gels ont ensuite été excisées du gel, rincées à l'eau afin d'éliminer le bleu de Coomassie puis incubées à 55°C pendant 10 minutes dans un tampon contenant du SDS et du β-mercaptoéthanol. Les protéines contenues dans chaque bande protéique "native" ont été ensuite séparées par électrophorèse SDS-PAGE 10% en déposant le morceau de gel excisé ainsi que le tampon de dénaturation dans lequel les protéines ont été incubées. Un échantillon de glandes impaires de la lignée IS_y (20 glandes pour le gel n°1, 40 pour le gel n°2) a de même été déposé afin de constituer un repère. Après 4 heures de migration à 40mA à température ambiante, les protéines ont été révélées par coloration au nitrate d'argent pour le gel n°1 et par coloration standard au bleu de Coomassie R-250 pour le gel n°2. Les poids moléculaires des protéines ont été déterminés à l'aide du marqueur de poids moléculaire BioLabs®_{Inc.}

III.2.4 Identification des protéines des bandes protéiques majeures

Une première série d'identification des protéines contenues dans les glandes impaires des femelles IS_y a été réalisée à partir des bandes majeures observées sur un profil 'natif'. Pour cela, les protéines de 60 glandes impaires (≈ 36 µg) ont été séparées par électrophorèse PAGE-natif 8% (migration 25mA pendant 8 heures à 4°C). Les morceaux de gel contenant 5 bandes majeures (notées N₁, N₂, N₂₋₁, N₃ et N₃₋₁, Figure 47a) ont été découpés et les protéines contenues dans ces bandes éluées puis fragmentées par digestion trypsique. Les peptides ainsi obtenus ont été séquencés *de novo* par ESI-Q-TOF (electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight) MS/MS (spectrométrie de masse en tandem).

Une deuxième série d'identification a été réalisée à partir des bandes excisées du gel n°2 décrit ci-dessus (profil 'SDS' de bandes majeures découpées d'un gel PAGE-natif), dans le but de confirmer les résultats obtenus lors du 1^{er} séquençage tout en ayant connaissance du poids moléculaire des protéines séquencées. Un séquençage interne des protéines contenues dans les bandes indiquées en Figure 47b a été réalisé comme décrit ci-dessus.

Des homologies de séquences ont finalement été recherchées à l'aide du logiciel BLAST pour toutes les séquences peptidiques obtenues.

Comparison of proteic profiles of IS_m and IS_y venom gland extracts

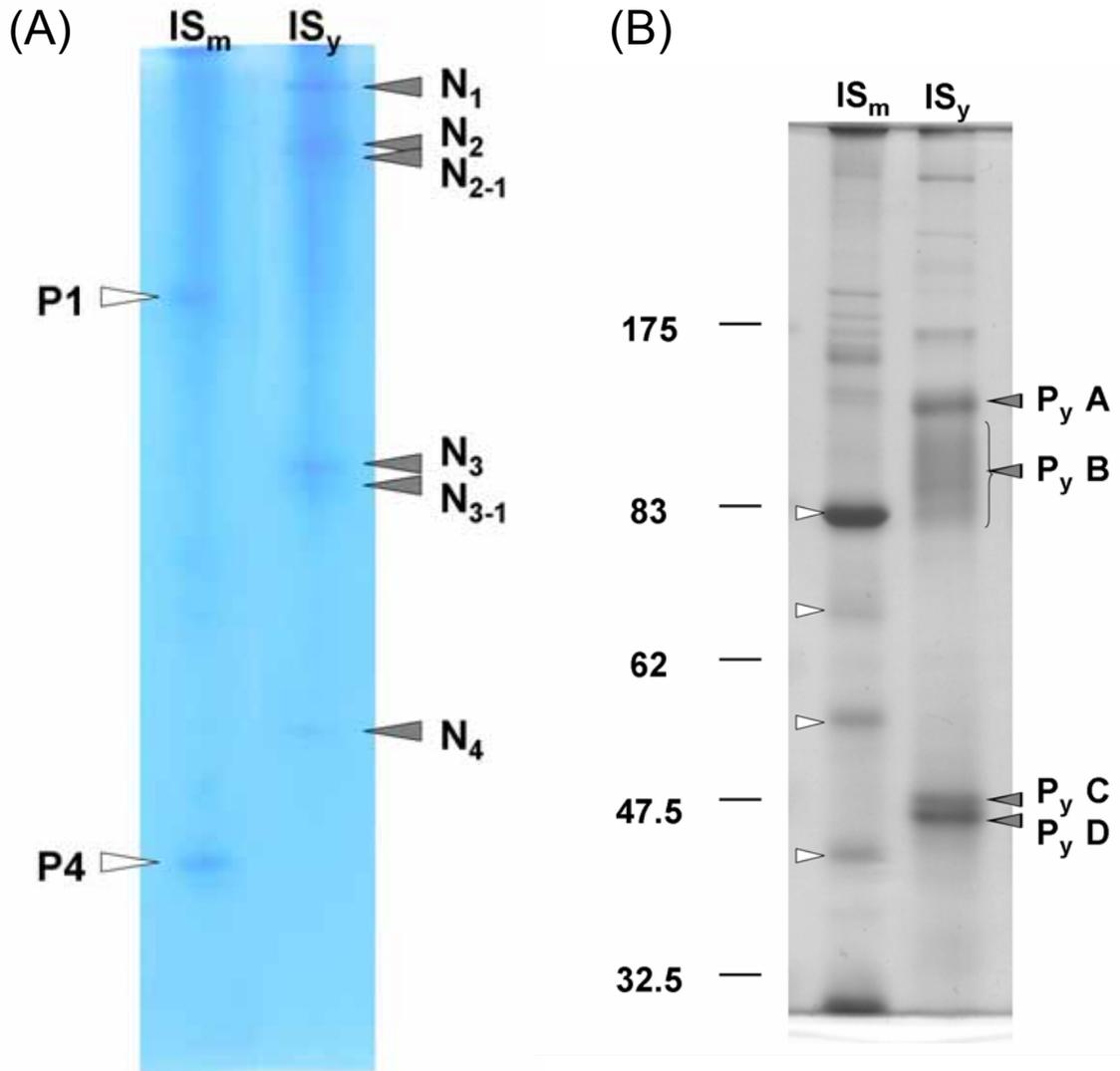


Figure 48 : Comparison of protein profiles between *IS_m* and *IS_y* *Leptopilina bouvardi* females.

A. Native PAGE profiles of venom gland extracts from *IS_m* and *IS_y* *Leptopilina bouvardi* females. Empty arrowheads indicate the 2 major bands described by Labrosse *et al.* (2005b) in the *IS_m* line. Grey arrowheads indicate the main bands in the *IS_y* line with their corresponding number. Protein extracts (*IS_m* lane: 80 venom glands, i.e. about 80 µg ; *IS_y* lane: 100 venom glands, i.e. about 60 µg) were separated on a 8% Native PAGE and stained with Coomassie Blue R-250.

B. SDS-PAGE profiles of venom gland extracts from *IS_m* and *IS_y* *Leptopilina bouvardi* females. Empty arrowheads indicate the 3 major bands described by Labrosse *et al.* (2005b) in the *IS_m* line. Grey arrowheads indicate the main bands in the *IS_y* strain with their corresponding number. Protein extracts (*IS_m* lane: 3 long glands, i.e. about 3 µg ; *IS_y* lane: 3 long glands, i.e. about 2 µg) were separated on a 8% SDS-PAGE and silver stained for comparison.

III.2.5 Recherche de la présence d'une serpine dans les glandes de femelles IS_y et IS_m

L'une des protéines identifiée par BLAST à partir des peptides obtenus par séquençage interne des bandes correspondrait à un inhibiteur de protéase à serine (serpine) dont nous avons cherché à confirmer la présence par RT-PCR.

L'ARN_m de glandes impaires de 55 femelles *L. boulandi* de la lignée IS_y ainsi que de 55 femelles de la lignée IS_m a été extrait par le kit Easy RNA/DNA (Qiagen) et amplifié avec des amorces dégénérées (direct 5'TACTTYAARGGNGARTGGAA3' et 5'GCAGCAGCNGCYTCNGC3' reverse) choisies à partir des fragments peptidiques et de l'alignement de différentes serpines. Des fragments PCR de la taille attendue (selon les alignements réalisés) ont été obtenus pour chaque lignée de parasitoïde et le séquençage des produits de RT-PCR a été directement effectué en utilisant les amorces dégénérées.

III.3 Résultats

III.3.1 Comparaison des profils protéiques en condition native

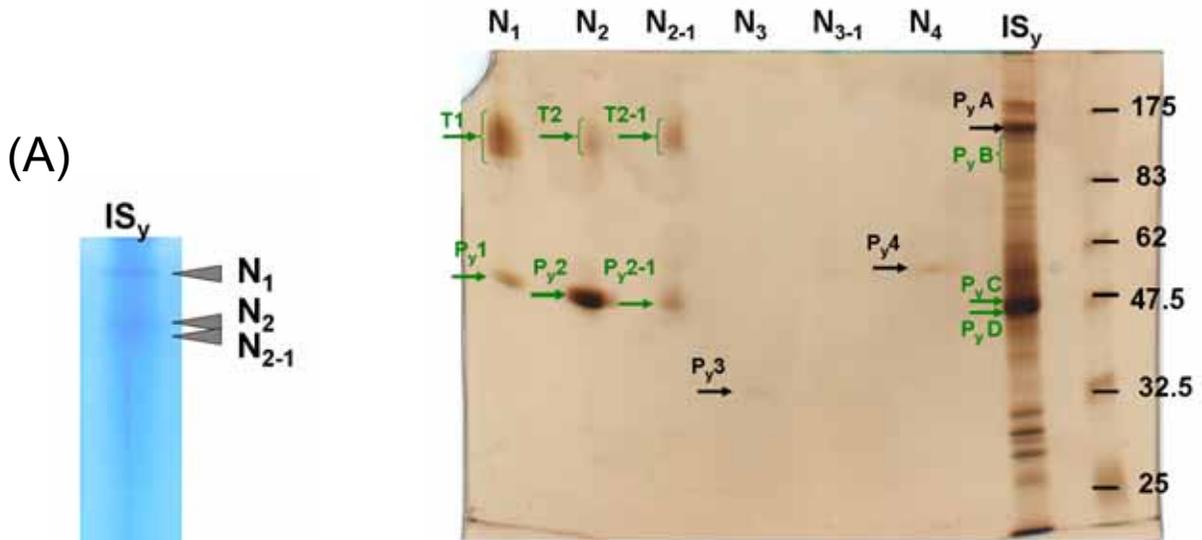
Les profils protéiques des glandes des femelles IS_y et IS_m obtenus en condition native sont présentés en Figure 48a. De nombreuses bandes protéiques majeures, annotées sur la figure, diffèrent entre les 2 profils. Chez la lignée IS_m, 2 bandes majeures, correspondant aux bandes annotées 'P1' et 'P4' apparaissent dans les conditions employées au cours de cette étude. D'autres bandes protéiques mineures apparaissent, mais sont difficilement discernables du fait d'un contraste insuffisant avec la trame de fond du gel. Six bandes protéiques majeures apparaissent dans le profil protéique de la lignée IS_y. Ces bandes ont été nommées N₁, N₂, N₂₋₁, N₃, N₃₋₁ et N₄ en fonction de leur migration. Les protéines de la bande N₂₋₁ ayant une migration très similaire à celles des protéines de la bande N₂, les bandes N₂₋₁ et N₂ sont souvent confondues en une bande alors appelée N_{2+N₂₋₁} lorsque les conditions de migration employées sont légèrement différentes. De même, les bandes N₃ et N₃₋₁ sont parfois confondues.

III.3.2 Comparaison des profils protéiques en condition dénaturante

Les profils protéiques des glandes des femelles IS_y et IS_m obtenus en condition dénaturante sont présentés en Figure 48b. Chez la lignée IS_m, 4 bandes majeures, de tailles apparentes estimées à 82, 67, 54 et 42 kDa sont observées dans les conditions de l'étude. Une autre bande majeure, de taille estimée à 35 kDa dans d'autres conditions, est visible dans le front de migration du gel de la Figure 48b. Cette bande de 35kDa correspond à la protéine P4 décrite par (Labrosse *et al.*, 2005b). Chez la lignée IS_y, 4 bandes majeures de taille apparente de 103 kDa (P_yA), de 80-100 kDa (P_yB), de 47 kDa (P_yC) et 45 kDa (P_yD) sont observées.

Molecular weights of the major proteic bands observed under native conditions.

(B) gel n°1



(C) gel n°2

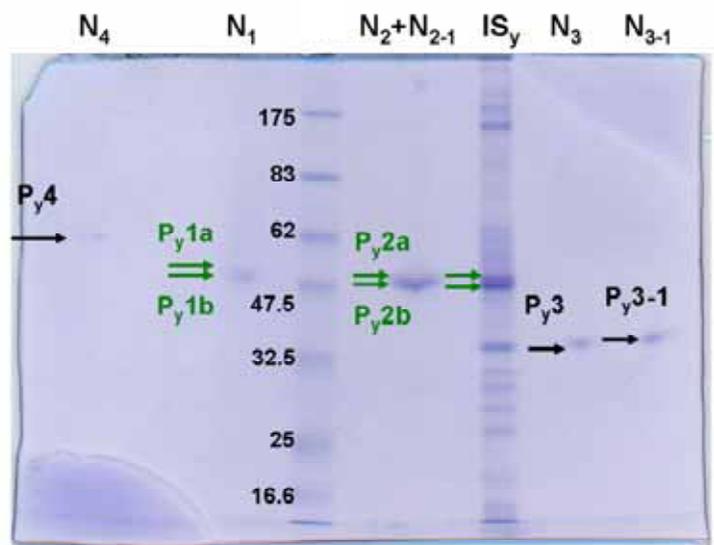


Figure 49 : Molecular weights of the major bands observed in the native protein profile of IS_y venom glands.

A. Native PAGE profile of venom gland extracts from the IS_y line of *Leptopilina bouvardi*. Venom gland proteins (60 μg) were separated on a 8% native-PAGE and stained with Coomassie Blue R-250 (migration 4 h, 45 mA, 4°C)

B. SDS-PAGE profile of N₁-N₄ bands cut and eluted from the native gel shown in A (lanes 'N₁' to 'N₄') and of 20 IS_y long gland (≈ 12 μg; lane 'IS_y'). Proteins were separated on a 10% SDS-PAGE and silver stained. T_i and P_y*i* indicate the proteins contained in the N_i band of native proteins. No band appeared in the N₃₋₁ lane. **C.** SDS-PAGE profile of bands cut and eluted from a 7% native gel. The native-PAGE gel was performed with 130 IS_y long gland (≈ 80 μg) (migration 4 h, 40mA, 4°C). Under these conditions, the N₂ and N₂₋₁ bands merged into a single major band. Proteins of the 5 major 'native' bands (N₁, N₂+N₂₋₁, N₃, N₃₋₁ and N₄) and 40 IS_y long gland (≈ 24 μg ; lane 'IS_y') were separated on 10% a SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue R-250. P_y*i* indicate the proteins contained in the N_i band of native proteins. Double bands are noted 'a' and 'b'.

III.3.3 Analyse en condition dénaturante des bandes majeures observées en condition native

Les profils de migration en condition dénaturante des protéines contenues dans les bandes majeures des gels PAGE-natif sont présentés en Figure 49. Les poids moléculaire de toutes ces bandes protéiques, ainsi que ceux des bandes P_yA, P_yB, P_yC et P_yD sont indiqués dans le Tableau 10.

Les profils obtenus dans les 2 gels, l'un coloré au nitrate d'argent (coloration dépendante des groupement chimiques présents sur les protéines présentes dans les bandes) et l'autre au bleu de Coomassie (colorant qui se fixe de manière non spécifique aux protéines et qui permet de visualiser d'autant mieux les protéines qu'elles sont abondantes dans une bande protéique) sont globalement similaires. Seules les bandes T1, T2, T3 et P_yB, observées sous forme de traînées dans le gel n°1, sont absentes du profil obtenu dans le gel n°2. L'absence de ces traînées dans ce gel est sans doute due au seuil de détection des protéines qui est globalement moins élevé par coloration au bleu de Coomassie (0.3-1µg) que par coloration argent (2-5 ng). Par ailleurs, la bande protéique P_y3 est faiblement colorée en nitrate d'argent alors qu'elle est très marquée dans le gel n°2. Il est probable que les protéines contenues dans cette bande protéique fixent mal le nitrate d'argent, d'où sa faible coloration en dépit de la quantité de protéines présentes.

Les **bandes natives N₁, N₂ et N₂₋₁** se résolvent chacune en 2 bandes visibles dans le gel n°1 (respectivement T1 et P_y1, T2 et P_y2 et T2-1 et P_y2-1), tandis que les bandes N₁ et N₂+N₂₋₁ ne se résolvent chacune qu'en une double bande dans le gel n°2 (respectivement P_y1a et P_y1b pour N1 et P_y2a et P_y2b pour N₂+N₂₋₁). Les traînées T1, T2 et T3 ont un poids moléculaire d'environ 80-90 kDa et pourraient correspondre à la traînée P_yB définie dans le profil SDS de la glande impaire totale (poids moléculaire estimé à 80-100 kDa). Les bandes P_y1, P_y2 P_y2-1, P_y1a, P_y1b, P_y2a, P_y2b, toutes de poids moléculaire estimé entre 45 et 53 kDa pourraient correspondre aux bandes P_yC et P_yD définies dans le profil SDS de la glande impaire totale. L'attribution exacte de toutes ces bandes (P_y1 à P_y2b) à l'une ou l'autre de ces 2 bandes n'est cependant pas réalisable du fait des variations de poids moléculaire estimés d'un gel à l'autre (Tableau 10).

La **bande native N₃** se résout en une bande notée P_y3 de poids moléculaire estimé à 36-37 kDa dans les 2 gels. Aucune bande n'a été révélée pour la bande native N₃₋₁ dans le gel n°1 alors que cette bande se résout en une bande appelée P_y3-1 dans le gel n°2, de poids moléculaire similaire à celui de la bande P_y3 (37 kDa).

Enfin, la **bande native N₄** se résout en une bande notée P_y4 dont la taille varie de 55 à 61 kDa selon les estimations.

Tableau 10 : Molecular weights of 'SDS' proteinic bands corresponding to each analysed native band and molecular weights of the bands P_yA, P_yB, P_yC et P_yD defined from the SDS proteinic profile of venom gland extracts of IS_y females. - : band not seen

Gel 1 (Silver nitrate coloration)			Gel 2 (Coomassie blue coloration)		
Native band	Corresponding SDS band(s)	Estimated weight	Native band	Corresponding SDS band(s)	Estimated weight
N ₁	T1	80-92 kDa	N ₁	-	-
	P _y 1	47 kDa		P _y 1a	53 kDa
				P _y 1b	52 kDa
N ₂	T2	81-90 kDa	N ₂ +N ₂₋₁	-	-
	P _y 2	45 kDa		P _y 2a	51 kDa
N ₂₋₁	T2-1	84-90 kDa		P _y 2b	50 kDa
	P _y 2-1	45 kDa			
N ₃	P _y 3	36 kDa	N ₃	P _y 3	37 kDa
N ₃₋₁	-	-	N ₃₋₁	P _y 3-1	37 kDa
N ₄	P _y 4	55 kDa	N ₄	P _y 4	61 kDa
	P _y A	89 kDa		P _y A	107 kDa
	P _y B	75-88 kDa		-	-
	P _y C	48 kDa		P _y C	51 kDa
	P _y D	46 kDa		P _y D	49 kDa

III.3.4 Identification des protéines des bandes protéiques majeures

L'ensemble des séquences peptidiques obtenues dans les 2 séries d'analyses est reporté dans l'annexe 2. De nombreuses séquences sont retrouvées dans plusieurs bandes protéiques. Les bandes natives N_1 , N_2 et N_{2-1} par exemple partagent 16 séquences protéiques identiques ou similaires. De même, 9 séquences protéiques sont partagées par les bandes natives N_3 et N_{3-1} . La recherche d'homologie de séquence en utilisant les peptides séquencés a permis d'identifier clairement la présence d'une **serpine** dans les bandes N_1 et $N_{2+N_{2-1}}$.

III.3.5 Recherche de la présence d'une serpine dans les glandes de femelles IS_y et IS_m

La présence d'une serpine dans les glandes impaires des femelles IS_y mais aussi des femelles IS_m a été confirmée par RT-PCR, en utilisant des amorces définies à partir des séquences peptidiques qui ont permis l'identification de cette protéine (Figure 50). Les séquences protéiques déduites à partir des séquences nucléotidiques du produit de RT-PCR sont données en Figure 51. Les séquences identifiées chez les deux lignées de parasitoïdes correspondent clairement à des protéines de la famille des serpines, mais elles diffèrent significativement (75 % de similitude). Cinq peptides séquencés par spectrométrie sont retrouvés dans la séquence protéique obtenue pour IS_y , ce qui indique que la serpine amplifiée par RT-PCR dans cette lignée correspond bien à la protéine excisée du gel et séquencée par spectrométrie de masse. Ces 5 peptides, indiqués en rouge dans l'annexe 2, sont retrouvés dans les bandes natives N_2 , N_{2-1} , P_y2a , P_y2b , P_yC , P_yD , et P_y1a .

III.4 Discussion / Perspectives

Les profils protéiques obtenus en condition native ou dénaturante à partir d'extraits de glande impaire de femelles sont très différents entre les 2 lignées de *L. bouvardi* étudiées, ce qui confirme l'observation de Labrosse *et al.* (2005b). Cependant, l'analyse plus approfondie menée ici sur la lignée IS_y montre que l'on peut considérer 6 bandes majeures visibles dans cette lignée en conditions natives et non 2. La nature d'une de ces protéines majeures ayant été clairement définie par la suite, seuls les résultats concernant les banques protéiques N_1 , N_2 et N_{2-1} , qui contiennent cette protéine, sont discutés ici. Les autres bandes protéiques sont actuellement en cours d'analyse.

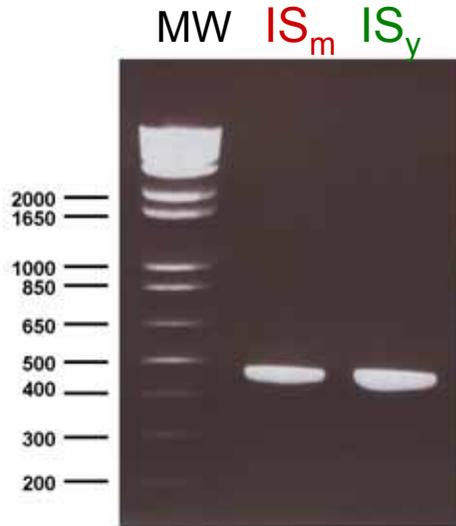


Figure 50 : RT-PCR detection of putative serpins in venom glands of IS_m and IS_y *Leptopilina boulardi* females.

RT-PCR products were obtained using primers designed from sequences of the peptides identified as part of proteins of the serpin family. MW: molecular weight markers.

>3.13-3.14_consensus Serpin protein from IS_y female venom glands

*V**L**T**N**A**I**F**K**G**E**W**K* xxxxxxxx *D**Y**H**G**Q**T**K**I**V**P**T**M**T**K**T**G**P**Y**R*
*V**S**F**G**D**T**A**I**K**A**R* *M**I**E**L**P**Y**K* *G**D**E**L**S**M**L**I**V**P**Y**E**M**N* *G**L**D**D**V**E**S*
*L**E**R**V**N**L**R**N**H**I**K**S**L* *M**P**F**E**V**K**L**N**L**P**K**F* *R**V**E* *A**T**T**D**L**Y**D**A**L**N**K*
*M**G**I**N**E**A**F**T**D**I**A**N**F* xxxxxxxxxxxx *A**E**A**A**A**A*

>3.15-3.16_consensus Serpine protein from IS_m female venom glands

*V**L**T**N**A**I**F**K**G**E**W**K* xxxxxxxx *D**Y**H**G**Q**T**K**I**V**P**T**M**T**Q**T**A**Q**Y**R*
*V**A**H**V**P**E**I**K**A**N* *I**E**L**P**Y**K* *G**D**E**L**S**M**L**I**V**L**P**D**E**M**Y* *G**L**D**D**V**E**S*
*L**E**G**V**N**L**R**N**L**R**N**S**L* *S**L**I**T**V**K**L**N**L**P**K**F* *R**V**E* *A**T**T**N**L**N**D**A**L**Y**K*
*M**G**I**N**D**L**F**T**D**F**A**N**F* xxxxxxxxxxxx *A**E**A**A**A**A*

Figure 51 : Proteinic sequence deduced from nucleotide sequences of RT-PCR products. These products were obtained from the two parasitoid lines IS_m and IS_y using primers designed from the peptidic sequences identified as serpins in IS_y venom glands.

Peptidic sequences identified as serpins are noted in italic and underlined. Underlined amino acid within the sequence correspond to peptides that were also sequenced by spectrometry.

Amino acids that differ between the two sequences are shown in grey

- Poids moléculaire des bandes protéiques N_1 , N_2 et N_{2-1}

L'étude des bandes protéiques natives N_1 , N_2 et N_{2-1} en conditions dénaturantes semble indiquer qu'elles sont constituées de protéines de taille similaire, réparties dans 2 bandes SDS. La 1^{ère}, d'environ **80-90 kDa**, apparaît sous la forme d'une "traînée" tandis que la 2^{nde} apparaît sous la forme d'une double bande d'environ **45-50 kDa**. Ces 2 bandes semblent ainsi correspondre à la traînée **P_yB** et à la double bande **P_yC-P_yD** observées dans le profil SDS des glandes de la lignée IS_y. Les protéines contenues dans ces 3 bandes natives n'ont pas seulement des poids moléculaires semblables, mais semblent également présenter des similitudes en terme de séquence protéique puisque de nombreux peptides séquencés sont retrouvés dans les bandes N_1 , N_2 et N_{2-1} .

- Identification d'une serpine

Le séquençage des peptides obtenus par digestion trypsique de ces bandes a permis l'identification d'une **serpine** sur la base d'homologie de séquence. Les serpines sont des protéines globulaires ayant un large domaine conservé de 370 à 390 acides aminés et une extrémité C-terminale variable, de 30 à 40 acides aminés (Irving *et al.*, 2000 ; Silverman *et al.*, 2001). Leur poids moléculaire varie de 40 à 55 kDa selon les espèces ce qui correspond au poids estimé de la double bande protéique P_yC-P_yD (45-50 kDa) (Jiang et Kanost, 1997 ; De Gregorio *et al.*, 2002a ; Danielli *et al.*, 2003 ; Wang et Jiang, 2004 ; Abraham *et al.*, 2005 ; Tong *et al.*, 2005). La nature de la protéine de 80-90 kDa (contenue dans la traînée P_yB et invisible avec la coloration de Coomassie) est en revanche toujours inconnue.

La présence d'une serpine dans les glandes des femelles IS_y a été ensuite confirmée par RT-PCR sur ARN extrait de glandes impaires. L'amplification, réalisée dans des conditions standard (50°C, 30 cycles), produit une seule bande de forte intensité (Figure 50). De plus, cinq peptides séquencés par spectrométrie de masse à partir des bandes natives N_1 , N_2 et/ou N_{2-1} sont retrouvés dans la séquence traduite du produit de PCR (Annexe 2). Ceci confirme non seulement que la serpine amplifiée par RT-PCR correspond à la serpine identifiée comme une protéine abondante dans les glandes impaires, mais aussi que les bandes natives N_1 , N_2 et N_{2-1} renferment des protéines très similaires, du moins en ce qui concerne la séquence qui a été amplifiée (Figure 52).

Plus de 16 serpines ont été mises en évidence chez le lépidoptère *Manduca sexta*. Certaines sont codées par des gènes différents (Molnar *et al.*, 2001) tandis que d'autres sont codées par un seul gène qui code pour différents variants (Jiang *et al.*, 1994 ; Jiang et Kanost, 1997). Le gène serpine-1, par exemple code pour 12 serpines qui ne diffèrent que par leur extrémité C-terminale, grâce à l'épissage alternatif des exons qui codent pour cette région de la protéine (Jiang *et al.*, 1994). De même, 4 isoformes sont codés par épissage alternatif du gène *SRPN10* chez *Anopheles gambiae* (Danielli *et al.*, 2003).

Manebra -----NKLPIICILALAAATAMAREN-VLLKSNVEPTANHPFVVKARPGENVVLSAFVLSPLACLGLSLASVGEHDEILK-----ATGLPNDNVKKEVPTTVGKQLRSVKGVELRLANKVTVRQGAVINDEFAAVSKDVF 131
 Plutella -----MKLLICVLGVVVVATMADEIDPKQQLNNGNDLPTANHPSEVLEKQNGKVVLSAFVITPVACLGLSLASSGETHDLILK-----TLGLPDEAIKSVPPVNAKLRDIXGVTLEQASRIIPLTAEIADDFAAASRDVF 133
 Lonocmia -----RPLRPGLKILICIPALAAALITATE-D-LQRIILRDGNDQPTAKMLPEIVKSNPKNIIVSFAFVSNVSPLAQLAISAGEPDEIIPS-----AIGPPNENVTKAVPTDLNREIKSVKGVTLKIANKIYIANGPELNDQFAVVSQDVF 137
 sexta serpin -----MKIIMCIPGLAALAMAGETD-LQRIILRSDNDQPTAQNPSVEVYKAPGQNVVLSAFVLSPLACLGLSLASVGEHDEILK-----ALALPNDNVKDVPAALNRRGVRVAVKGVDLKMAKIIYVAKGLLNDQFAVVSQDVF 132
 Bombyx -----MKYIICLPTIATAAMAATN-LNSVLEKNGNDNPTARMPTIVVKNRPGKSVLSAFVLSPLACLGLSLASVGETHREILK-----AIGPPDDAIKRTPEASKSRDLRSIKGVELKMAKVVVHDGKGLDENFAVVSQDVF 132
 Apia spn4 -----MLK-----KINY-----YF 9
 An.gambiae -----MADNSSLDAQFVYQSNSFATKLYQPIAKHAGEVNVVLPFPIISACLIAAAMAGGITAEKSYSVLIPGAP-DRKQTVACNTRRIMEPLATDSTVN--VANKIIVVQNIYAVKSAFNAIATGSF 120
 Apia spn1 -----
 Limulus MLSRPTLLCCLVNLIVSTPQQLELFFKFKADRSHENLKVAVNCPGIIHCRRLINE--SKNIIPFPFLSTALSNAPVSGRNTAIEHRSGLGPRRAGLACEDVDPSPYQAPQLLESQCSGDKFYVAATALVQNNYINILNSIKRILHREF 148
 hcmologSp2 -----LCLLLLATVSCRPTDDFYQLAKENANKNLISPLVFIALSNATMARGETAQENRQ--VLELP-EDKKQVAAKTKDILTELESREKVAAILSLANRIYVNNDLILVPGYNQIVKDSF 116
 Dm Serpin-2 -----MKHLCLLLLATVSCRPFDDFYQLAKENAAANLISPLVFIALSNATMARGETAQENRQ--VLELP-DDKKEVAAKTKDILSKLEGREKVAAILSLANRIYVNNKPKLVPYVQVNDKDSF 119
 Dm serpin-3 -----MKYLCLLLLATVSCRPTDDFYQLAKENADKNLISPLVFIALSNATMARGETAQENRD--VLELP-DDKKEVAAKTKDILSKLEGREKVAAILSLANRIYVNNKPKLVPYVQVNDKDSF 119
 Dm serpin-1 -----MYLCLPIWVTVACCTKBYQLCKSHQNLVVPVSIITILNVPMASAGSIAKELQS--ALGLPSEDFKAVAAATGAILNLDLQIEGPIIKLANRIYVNDQYSLNQNINLAVPEPF 120
 ruler 1.....10.....20.....30.....40.....50.....60.....70.....80.....90.....100.....110.....120.....130.....140.....150

Manebra NLDVKNVLPTEKNVEAAKIIIFWVEENTHKIKDLVSSRSLDASAAVLVNAIYFKGKWKPFVDESAIRLDLPPVYKDPPIKPTNHEKSDPKYASRKEIDAKLLEIPIYSGQSSLLIIVLPIEIDGIGSIVKLEKDPALSKAVENMYFNE 281
 Plutella GSAENKLPTEKNVESAKIINDVBERTNNRICDLVCPDSIKEDASLLVNAIYFKGKWKPFVDESAITRDPFVSKDKTVKVPNTYQKASFPYGSALDAXLLENPIYEGIKAFPIIILPDIIEGLPAITKELKPEQLHNKALSEMFKGE 283
 Lonocmia NSEVYKLDPAQNKVAAKTIIFWVEEDTNNRIKDLVCPDSDDYRAVLVNAIYFKGKWKPFVDESAIDRPPHVDNXTKIQVPTNERSQYISYGSRELNAKIEMPIYSGDETLLVIVLPIYVYDGIHNLLEKLEDPKVLRSVEKDMHEID 287
 sexta serpin GSEVQNVDPVKSVEAAGAINKWEVDECTNNRIKDLVCPDSDDETRSVLVNAIYFKGKWKPFVDESAIMDRDPFVSKDKTKVPTMIGKKDVRVADVPELDAXHIEYSGQSSMIIILPQVQVGTALBQKLEKDPKALSRAEERLYNTE 282
 Bombyx NLDVQNIIPSEKNIVAAKSINDVBEENTNRIKDLVCPDSSSAAVLVNAIYFKGKWKPFVDESAIDRDPFVSKDKTKVPMYKPSDYKYSBSAVLNAQLIEIPIYSGQSSLLIIVLPIKDKIGITQLGALKDPKLETAQSSMYSTE 282
 Apia spn4 RSEATQVINPAKSNAAAIINWVEQNTNLIKDLITAGCLNEMTLLVNVAVYFKGKWKPFVDESAIKMPPHVNKNTIKNPTNYKQSKYKYGELSNLNAKPIVPIYKGIENMIIILPPIYGLTEVEKELQNLKLSLILNQVYEQE 158
 An.gambiae RSEASVNPFAESAAAAKKINGWVEENTNRIKDLISPDALDELRMVLVNAVHFKGIINWYIFDPSLIRFPFVWLSETEIRDVPMNIIKHPAIFNPPPELGFSALEITVGGSDMIMNLLPBERNGLAALBEELPT-INLAEIAGKMHKQE 269
 Apia spn1 -----MIIILPQITGLLNIQTNPSPIMLANIT--RFYND 33
 Limulus YLDIIPVEPVRNGLWVKEMVKNVSNITNHEKITSIDKPLSPLRPLVNAIYFKGKWKPFVDRKKTLSLFPNNKVARVIMHSLINKFPPTTDSLEKQVLEIPIYSGQSSMIIILPQVQVGTALBQKLEKDPKALSRAEERLYNTE 297
 hcmologSp2 KAEAAISVADPNKAASIVKWDNTEGGKIRDIYAKTMS-DMILIIINAIYFKGQWAFINPEKPTQKIDPRIDQKSVVIMHSHIGSEKAAH----- 210
 Dm Serpin-2 MAAEAAIIVDPNKAASIVNWDNTEGGKIRDLVSSNMS-KNELIIVNAIYFKGQWYKFNPKLIEKNRPRVSDQKSVVIMHSLFQSPRAAHDSELGAKIIEIPIYRNSSLMIIPIPDQVGLSEIIEKIVG-FKPKLSK---MD 262
 Dm serpin-3 KAEAAISANNPKIITASIVKWDVTEGGKIRDLVNPSCVA-NIIVLIIINAIYFKGQWQKENTBQI-KSDPHISDQKSVVIMHSLVPPGVSVDRELGANVIEIPIYRNSNLMMVIPIPDQVGLPEIIEKIVG-FTPKLIN---IN 261
 Dm serpin-1 KSEASISLTVNSPVAARINQVLDCTSGKIKGMIKPSMSTSDVKALLVNAIYFKGQWSEKIDPAKTRASTPQVYANKSVVIMHSHIGSEKAAH----- 264
 ruler160.....170.....180.....190.....200.....210.....220.....230.....240.....250.....260.....270.....280.....290.....300

RSL: reactive site loop

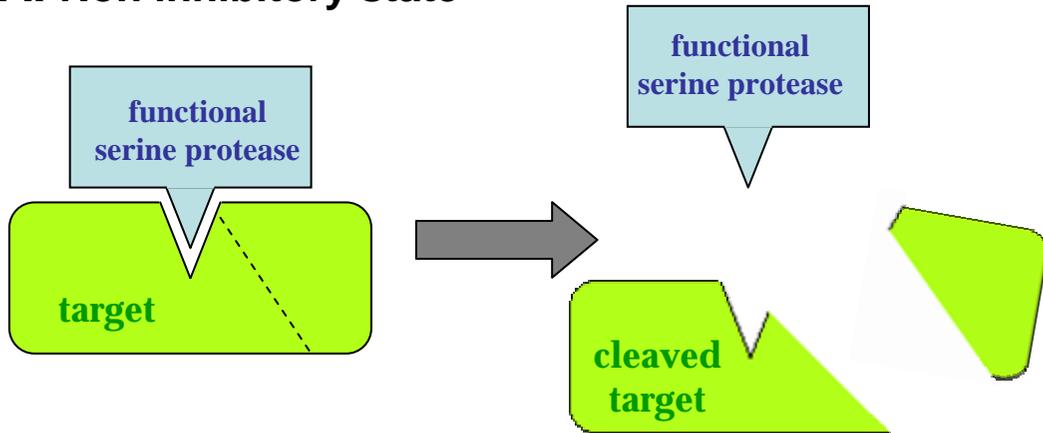
Manebra VNVVDLPEFKIETITDLKAVLKKNNIVKLPTEGGSEARINNIKGEIDLPTIDAIAKAPIDVREGAEAAAANEIETIALE-AII EKLVFNANSPVPTIMEGD--KILFNQVYQS--- 392
 Plutella IQVYIPEFKIETITDLKAVLKKNNIVKLPTEGGSEARINNIKGEIDLPTIDAIAKAPIDVREGAEAAAANVPETIALE-AVI EPLIFNVNPPVPAIMQER--TNLFPNVPQSL--- 395
 Lonocmia VDVYVPEFKIETITDLKAVLKKNNIVKLPTEGGSEARIDYLLKSCDALYVSEAVKAPIEVREGAEAAAANEPAAAN--FSSPTDRNMLIVKQT---VRNVP--- 383
 sexta serpin VEIYIPEFKIETITDLKAVLKKNNIVKLPTEGGSEARINNIKGEIDLPTIDAIAKAPIDVREGAEAAAANVVRGIRPFPVSRPIKFTADRPPLPFNKTNQ--QLFNGICHCP--- 395
 Bombyx VDLYIPEFKIETITDLKAVLKKNNIVKLPTEGGSEARINNIKGEIDLPTIDAIAKAPIDVREGAEAAAANAPVTRGSKVTVPIVFNANKPYYALQVCG--VIMFNQIPIN--- 392
 Apia spn4 IQLYIPEFKIETIHLNIVLCKNGLIDAPT-SHANFSGIS--DINIQINKVIEKAPIEVREGAEAAATGK----- 227
 An.gambiae VEVPIPEFKIETIRDLNEDLCAIGHMERPE-DSAEFDLQNEPLKVKSVVHEKAPIEVREGAEAAAATGMHMR-CMPEHETFTVDHPPLYVIRHQ--QWVYVGVGVAKIDA- 380
 Apia spn1 IEKLYIPEFKIETIDLNALNKKISLITHEK-PNANFNRI-S-NPLMVKVILKAIIDVREGAEAAATAVSLPLRRKCTPEIEKFIYDRPMPFIIETK-NNILPIGNVQDIEKL 147
 Limulus IVVTIPEFKLENGPIQIKIYLCVNGHNEAPE-PSADFSGNH-GRNLPVVDVILKAMIDVREGAEAAAVSGVVMLEKASNN--IPTFVANPPMPLINKESGHILPLSGVREL--- 408
 hcmologSp2 ----- 210
 Dm Serpin-2 VTLRIPEFKIETPFAQLNKILVANGICDAPE-KSADFCDIVEN-SNVYVKKVIEKAPIEVREGAEAAAATALLFVRLVPMPEQCMVFNADHPATYVIRDR--TIYQGHVFPNE- 375
 Dm serpin-3 VHLRIPEFKIETPFAQLNKILVANGICDAPE-KSADFNDIVAN-SGAVGGVVHEKAPIDVREGAEAAAATAVVFPVYKIRSP--MDFNVNPPATYVIRDAE--NIYQGHVFNPEL- 372
 Dm serpin-1 VTLRIPEFKIETPFAQLNKILVANGICDAPE-KSADFCDIVEN-SNVYVKKVIEKAPIEVREGAEAAATAVAVTNR---APETIIMADHPAPYVIRDAE--TIYQGHVYVSP--- 372
 ruler310.....320.....330.....340.....350.....360.....370.....380.....390.....400.....410.....



Figure 52 (previous page): Proteinic sequence alignment of some arthropod serpins.

The putative reactive site loop (RSL) is bordered and the cleavage site (between P1 and P1' residues) is indicated. Peptides obtained from sequencing of IS_y long gland proteinic bands that aligned with sequences of proteins from the serpin family are indicated with a pink trait. The IS_y serpin sequence obtained from RT-PCR experiments is indicated with a black line.

A. Non inhibitory state



B. Inhibition

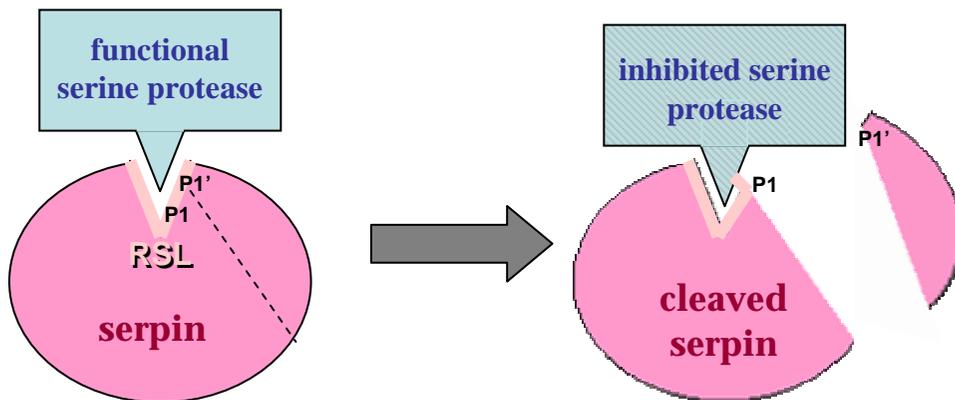


Figure 53 : Inhibitory mechanism of serpins.

A. Under non-inhibitory conditions, serine proteases remain active after they have cleaved their usual target

B. Inhibitory serpins expose a C-terminal reactive-site loop (**RSL**) and act as baits for the target serine proteases. The protease cleaves the serpin between residues P1 and P1' within the loop. It is then "trapped" to the P1 residue via a covalent bond, which leads to its activation.

Bien qu'une contamination ne soit pas à exclure, il semble donc plausible que les 3 bandes natives observées correspondent à 3 isoformes de la même protéine ayant une extrémité N-terminale commune (en partie séquencée ici) et des extrémités C-terminale différentes. L'analyse de ces régions devrait permettre de confirmer ou infirmer cette hypothèse.

- *Rôle potentiel des serpins en tant que facteurs de virulence*

Les serpins sont des inhibiteurs de protéases à sérine. Elles sont connues chez les insectes pour réguler notamment l'activation de la phénoloxydase en inhibant les protéases à sérine de la cascade d'activation de cette enzyme (Kanost, 1999 ; De Gregorio *et al.*, 2002a ; Ligoxygakis *et al.*, 2002)(Figure 53). J'ai pu montrer que l'activité PO est inhibée dans l'hémolymph de larves de *D. yakuba* en présence d'extraits de glande impaire de femelles IS_y (chapitre II, partie II). La (ou les) serpine(s) contenues dans les glandes impaires des femelles IS_y pourraient à l'évidence être les facteurs de virulence responsables de cet effet. Les études en cours et à venir devraient fournir des éléments permettant de confirmer ou infirmer cette hypothèse. Notre objectif est actuellement d'obtenir la séquence complète de cette serpine et de la produire en cellules d'insectes Sf9 en employant un système baculovirus afin de tester ses effets *in vitro* sur l'activité PO de l'hémolymph de *D. yakuba* (Zhu *et al.*, 2003 ; Tong et Kanost, 2005). Si l'effet du facteur serpine permet de reproduire l'effet des extraits de glandes impaires, cela confirmera le rôle de ces facteurs dans l'inhibition de la réponse immunitaire de *D. yakuba*. Il restera alors à déterminer si l'injection de cette serpine purifiée peut reproduire l'effet de l'injection d'extraits de glande impaire sur les capacités des larves *D. yakuba* à encapsuler une goutte d'huile.

- *Spécificité d'hôte*

Les serpins inhibent les sérines protéases en se fixant à leur site actif via une région située dans leur partie C-terminale, appelée **RSL** (pour *Reactive Site Loop*) (Figure 53). La protéase clive la serpine au niveau du site de clivage P1-P1' (P1' désignant le 1^{er} acide aminé après le site de clivage, du côté C-terminal, et P1 l'acide aminé situé avant le site de clivage, du côté N-terminal). Chaque serpine forme alors un complexe covalent avec la protéase, via une liaison entre le résidu P1 et le site actif de la protéase, inhibant ainsi l'activité de la protéase. L'interaction serpine-protéase s'effectuant au niveau du RSL, la spécificité d'action des serpins est largement déterminée par leur région C-terminale (Jiang et Kanost, 1997 ; Kanost, 1999 ; Abraham *et al.*, 2005). Les 12 serpins codées par le gène serpin-1 de *M. sexta* par exemple n'inhibent pas la même gamme de sérines protéases (Jiang et Kanost, 1997). Il serait alors envisageable que la ou les serpins contenues dans les glandes impaires des femelles IS_y puissent inhiber une sérine protéase de *D. yakuba* mais soient inefficaces dans l'inhibition d'une sérine protéase homologue chez *D. melanogaster*, pour

peu que celle-ci présente des différences au niveau du site actif. Cette hypothèse devrait pouvoir être testée en observant *in vitro* l'effet de serpins produites en cellules d'insectes sur l'activité PO de larves de *D. melanogaster*. Si elle se vérifie, il sera extrêmement intéressant d'identifier la protéase ciblée par l'inhibiteur et d'étudier les variations de son site actif chez les différentes espèces du sous-groupe *melanogaster* en relation avec le succès de la lignée IS_y sur ces espèces.

- *Variation de virulence et serpins*

La présence de serpine(s) a également été mise en évidence par RT-PCR dans les glandes impaires des femelles IS_m. L'incapacité des femelles IS_m à échapper à la réponse immunitaire de *D. yakuba* ne peut donc pas être attribuée à l'absence de serpins dans les glandes impaires. Ces analyses n'étant cependant pas quantitatives, il n'est pas à exclure que ces serpins ne soient pas exprimées de la même façon dans les 2 lignées. Par ailleurs, la séquence obtenue chez la lignée IS_m est assez différente de celle obtenue chez la lignée IS_y, ce qui suggère que les serpins contenues dans les glandes impaires de ces 2 lignées pourraient avoir des spécificités d'action différentes, potentiellement à l'origine des variations de succès observées sur *D. yakuba*. La présence de serpins pourrait également être un facteur expliquant la réussite parasitaire de la lignée IS_y sur les souches sensibles de *D. melanogaster*, rejoignant l'hypothèse d'une spécificité d'interaction "serpine-sérine" protéase impliquée dans la spécificité d'hôte.

- *Perspectives*

Les serpins étant des inhibiteurs de sérine protéase spécifiques d'une gamme restreinte de protéases à sérine, ces facteurs, produits en grande quantité dans les glandes impaires des femelles IS_y, sont d'excellents candidats en tant que facteurs de virulence (qui inhiberaient la cascade protéolytique conduisant à l'activation de la PO) et en tant que facteurs à l'origine de la spécificité d'hôte. L'étude conjointe de ces facteurs et de leurs cibles pourrait à long terme établir un lien entre les variations de succès du parasitoïde *L. boulardi* sur les différentes espèces hôtes et les interactions moléculaires potentiellement à l'origine de ces variations.

Nature des venins :

Principaux résultats

1. Les profils protéiques des glandes à venin des lignées IS_y et IS_m diffèrent en condition native et dénaturante.

L'analyse en électrophorèse des protéines contenues dans les glandes à venin des 2 lignées a révélé une forte différence de profil entre les 2 lignées du parasitoïde, aussi bien en conditions natives que dénaturantes, ce qui confirme l'observation faite par Labrosse *et al.* (2005b). Les poids moléculaires des bandes protéiques majeures dans la lignée IS_m ont été estimés à 82, 67, 54 et 42 et 35 kDa tandis que ceux des bandes protéiques majeures de la lignée IS_y sont de 103 kDa (P_yA), de 80-100 kDa (P_yB), de 47 kDa (P_yC) et 45 kDa (P_yD). Il semblerait donc que les 2 lignées de *L. boulardi* aient à disposition un "arsenal protéique" différent, ce qui suggère des facteurs de virulence de nature ou de séquence différentes.

→ la différence de virulence des 2 lignées vis à vis des espèces hôte *D. melanogaster* et *D. yakuba* pourrait provenir de la différence de facteurs contenus dans ces glandes.

2. Les bandes natives N₁, N₂ et N₂₋₁ contiennent les bandes P_yB, P_yC et P_yD.

Les 3 bandes natives de plus faible migration obtenues dans le profil de IS_y ont été éluées et analysées en conditions dénaturantes. Chacune de ces bandes native se résout en conditions dénaturantes en une double-bande de 45-50 kDa, qui correspondrait aux bandes P_yC et P_yD et en une traînée protéique de 80-100 kDa qui correspondrait à la bande P_yB.

3. Les bandes natives N₁, N₂ et N₂₋₁ contiennent une (ou des) serpines(s).

Une serpine a été identifiée dans les bandes natives N₁, N₂ et N₂₋₁ par spectrométrie de masse, sur la base d'homologie de séquence de peptides obtenus dans ces bandes avec les bases de données. Ce résultat a été confirmé par RT-PCR.

Les serpines sont des inhibiteurs de protéases à sérine qui sont connus chez les insectes pour participer, notamment, à la régulation de l'activation

de la PO. L'hypothèse actuellement retenue est que une ou plusieurs serpins injectées par les femelles *L. boulardi* réguleraient l'activation de la proPO en PO active. Cette hypothèse reste à démontrer par des tests d'inhibition de PO employant une serpine recombinante.

La présence d'une serpine, de séquence protéique légèrement différente à celle mise en évidence dans la lignée IS_y, a également été mise en évidence chez la lignée IS_m.

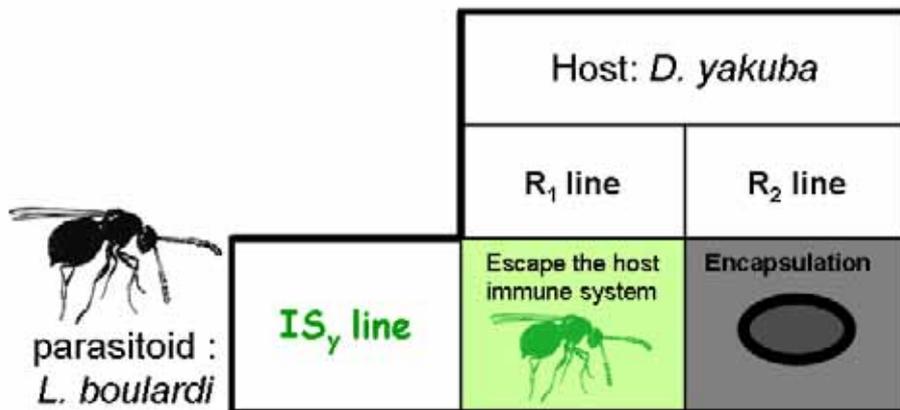
→ La variation de succès des 2 lignées de *L. boulardi* sur *D. yakuba*, déjà potentiellement associée à une différence dans les effets des facteurs contenus dans leurs glandes à venin sur l'activité PO, pourrait provenir d'une différence de spécificité des serpins contenues dans ces glandes.

*La spécificité d'action observée généralement chez les serpins fait de ces protéines des facteurs de virulence privilégiés pour expliquer les variations de succès de *L. boulardi* sur ses hôtes par le biais d'interactions spécifiques.*

CHAPITRE 3

Variation de résistance au parasitoïde *Leptopilina boulardi* chez l'hôte *Drosophila yakuba*:

Bases génétiques et physiologiques



PRÉSENTATION DE L'ÉTUDE

Comment expliquer les variations de résistance dans une espèce hôte ?

Les variations de résistance aux parasites sont connues dans divers modèles biologiques impliquant des invertébrés et leurs parasites, même si curieusement, la base génétique de ces résistances a été rarement démontrée et les gènes responsables quasiment jamais identifiés (Richards, 1976 ; Carius *et al.*, 2001 ; Kraaijeveld *et al.*, 2002 ; Carton *et al.*, 2005 ; Lambrechts *et al.*, 2005). D'un point de vue physiologique, les variations de résistance sont généralement expliquées soit par des **variations d'immunocompétence** des hôtes, soit par la **spécificité des interactions parasitaires** régissant la "compatibilité" (ou l'incompatibilité) de chaque interaction parasitaire (Schmid-Hempel et Ebert, 2003 pour revue).

Selon le concept d'immunocompétence, la variation de résistance dans une espèce hôte serait liée à une variation dans le niveau d'investissement des hôtes dans leur potentiel immunitaire. On considère par ailleurs que les ressources dont dispose un individu sont limitées et que l'augmentation de l'investissement dans un trait d'histoire de vie induit une diminution de l'allocation des ressources dans un autre trait d'histoire de vie. Si on considère l'immunité comme un trait d'histoire de vie à part entière, alors l'investissement d'un individu dans un fort potentiel immunitaire devrait se répercuter sur d'autres traits d'histoire de vie, comme le nombre de descendants produits ou la longévité. Ces diminutions d'investissement dans d'autres traits d'histoire de vie sont appelés "coûts de résistance" (Sheldon et Verhulst, 1996 ; Zuk *et al.*, 1996 ; Owens et Wilson, 1999). Ils seraient à l'origine de la contre sélection des allèles de résistance en absence du parasite et participeraient ainsi au maintien du polymorphisme de résistance dans les populations naturelles.

Selon ce concept, une forte résistance chez un individu hôte est liée à un fort investissement des ressources dans son potentiel immunitaire. La résistance chez un individu hôte est considérée comme un caractère général (non-spécifique) et donc mesurable en l'absence du parasite ou du pathogène. Ainsi, le pourcentage de corps étrangers injectés qui sont encapsulés ou leur degré d'encapsulation, l'activité phénoloxydase, le nombre d'hémocytes ou encore la production de peptides antimicrobiens sont des mesures de l'immunocompétence couramment employées chez les invertébrés (Mallon *et al.*, 2003 ; Cotter *et al.*, 2004 ; Lambrechts *et al.*, 2004 ; Rantala et Roff, 2005 ; Simmons et Roberts, 2005).

A l'inverse, une réponse spécifique n'est dirigée que contre un ensemble restreint d'espèces parasites ou même de souches d'une même espèce parasite. Dans ce cas, l'issue de l'interaction parasitaire ne dépend pas (ou dans une faible proportion) de la "condition immunologique" de l'hôte, mais résulterait de l'interaction entre le génotype de l'hôte et le génotype du parasite (Carius *et al.*, 2001 ; Carton *et al.*, 2005 ; Lambrechts *et al.*, 2006).

La résistance dans les modèles hôte/parasitoïdes

Très peu de données concernant les variations de résistance des insectes hôtes aux parasitoïdes sont aujourd'hui disponibles. Seule la résistance de l'espèce *D. melanogaster* vis à vis du parasitoïde *Asobara tabida* et vis à vis de *Leptopilina boulardi* a été étudiée.

1. Bases génétiques

Les bases génétiques de la résistance de *D. melanogaster* à ces deux parasitoïdes ont été recherchées par des croisements entre lignées homogènes, respectivement sensibles et résistantes. Une base génétique simple, avec un locus spécifiquement responsable de la résistance à chaque espèce de parasitoïde a été mise en évidence (Carton et Nappi, 2001 pour revue). La capacité des larves de *D. melanogaster* à encapsuler le parasitoïde *L. boulardi* est contrôlée par un locus majeur diallélique, appelé ***Rlb*** (pour **R**ésistance à **L**eptopilina **b**oulardi) tandis que leur capacité à encapsuler le parasitoïde *A. tabida* est contrôlée par le locus majeur ***Rat*** (pour **R**ésistance à **A**sobara **t**abida) différent de *Rlb* (Poirié *et al.*, 2000). Au locus *Rlb*, situé dans la région 55E2-55F3 du chromosome 2 (Hita *et al.*, 1999), l'allèle responsable de la résistance (*Rlb*⁺) est dominant sur l'allèle responsable de la sensibilité (*Rlb*⁻) (Carton *et al.*, 1992). Au locus *Rat*, l'allèle responsable de la résistance (*Rat*⁺) est dominant sur l'allèle responsable de la sensibilité (*Rat*⁻) (Benassi *et al.*, 1998). Ce locus est situé sur le chromosome 2 mais distant de 35 centimorgans du locus *Rlb* (Poirié *et al.*, 2000). De façon intéressante, une étude parallèle de la résistance à *Asobara tabida* basée sur la sélection partielle de lignées résistantes a également conduit à la mise en évidence d'un gène majeur dont la localisation correspond à celle prédite pour *Rat* (Orr et Irving, 1997).

L'analyse des bases physiologiques sous-jacentes aux variations de résistance à chaque espèce de parasitoïde a mis en évidence des mécanismes de résistance différents, en accord avec l'existence de 2 systèmes génétiques distincts.

II. Bases physiologiques

La variation de résistance de *D. melanogaster* à *A. tabida* semble assez bien expliquée chez par une **variation d'immunocompétence** des larves. En effet, l'étude réalisée par Kraaijeveld *et al.* (2001b) indique que le nombre d'hémocytes est 2 fois plus important chez les larves de lignées sélectionnées pour leur résistance que chez les larves des lignées témoin¹. Il a été aussi montré dans ce modèle que la résistance de ces lignées sélectionnées est associée à un coût, puisque les larves résistantes sont moins bonnes compétitrices que les larves sensibles, dans des conditions où la nourriture est fortement limitée (Kraaijeveld et Godfray, 1997) (Figure 27 p77). L'investissement des larves de *D. melanogaster* dans la résistance vis à vis d'*A. tabida* semble donc se traduire par la production d'un nombre plus important d'hémocytes, qui aurait pour contrepartie une diminution de leurs capacités compétitrices. Ce résultat pourrait expliquer le maintien du polymorphisme de résistance dans les populations naturelles, voire même expliquer la disparition de la résistance dans les régions d'Europe où *A. tabida* est absent ou potentiellement inféodé à une autre espèce hôte, *D. subobscura* (Kraaijeveld et Godfray, 1999) (voir exposé bibliographique p70).

Plusieurs études indiquent que la variation de résistance à *L. bouvardi* n'est au contraire pas corrélée à une variation d'immunocompétence des larves de *D. melanogaster*. En effet, les larves sélectionnées pour leur résistance à *A. tabida* (donc sélectionnées pour un nombre d'hémocytes plus important) ne sont pas résistantes à *L. bouvardi* et une étude sur différentes populations de *D. melanogaster* a montré qu'il n'existe pas de corrélation entre la capacité à encapsuler *A. tabida* et la capacité à encapsuler *L. bouvardi* (Kraaijeveld et Van Alphen, 1995 ; Fellowes *et al.*, 1999). Par ailleurs, le nombre total d'hémocytes et de lamellocytes d'une souche encapsulant près de 100 % des œufs de *L. bouvardi* est équivalent à celui d'une souche totalement sensible à ce parasitoïde (0% d'encapsulation) (Russo *et al.*, 2001). Enfin, la plupart des souches de *D. melanogaster* qui sont incapables d'encapsuler les œufs de *L. bouvardi* sont capables d'encapsuler ceux d'*A. tabida*, ce qui semble exclure une potentielle "immuno-incompétence" (Vass *et al.*, 1993).

Au niveau hémocytaire, une seule différence entre les lignées R et S (respectivement résistante et sensible à la lignée IS_y de *L. bouvardi*) a été mise en évidence, et uniquement suite à l'infestation des larves. L'observation des profils hémocytaires des larves parasitées depuis 6, 15, 24 et 48 heures indique en effet que le nombre maximal d'hémocytes produits suite à la reconnaissance de *L. bouvardi* est atteint plus tôt chez les larves résistantes (15 heures post-infestation) que chez les larves sensibles (24 heures post-infestation) (Russo *et al.*, 2001) (Figure 29 p79). On observerait

¹ Cependant, l'étude n'indique ni l'âge des larves analysées, ni les catégories cellulaires qui ont été prises en compte, ni l'unité de mesure (nombre d'hémocytes par mm³ ou nombre d'hémocytes par larves) ce qui empêche toute vérification ou comparaison.

ainsi une différence de vitesse de réponse en terme de prolifération hémocytaire. Une différence majeure existe donc entre les phénomènes de résistance aux deux espèces de parasitoïdes : la résistance à *A. tabida* semble due à une différence hémocytaire constitutive entre larves hôtes (immunocompétence) alors que la résistance à *L. bouvardi* pourrait être liée à une différence au niveau de l'induction (ou de la sensibilité à la répression) de la prolifération hémocytaire, en réponse au parasitisme. Il faut également noter que les stratégies parasitaires employées par ces deux parasitoïdes sont très différentes, ce qui pourrait avoir conduit à la sélection de mécanismes de résistance différents.

La différence entre larves sensibles et résistantes n'étant mise en évidence qu'en présence de *L. bouvardi* (type IS_y) et la résistance à *L. bouvardi* étant par ailleurs complètement indépendante de la résistance à *A. tabida*, il semble que la variation de résistance à *L. bouvardi* soit expliquée par l'existence d'**interactions spécifiques**, sur lesquelles je reviendrais largement dans le chapitre de discussion et non par des variations d'immunocompétence (Carton et Nappi, 2001 ; Dupas *et al.*, 2002).

Bien que la résistance à *L. bouvardi* ne repose pas sur une différence d'immunocompétence, un coût à la résistance a été mis en évidence dans des lignées de *D. melanogaster* sélectionnées pour leur résistance à *L. bouvardi*, dans des conditions de sévère compétition larvaire (Fellowes *et al.*, 1998). Si la résistance à *L. bouvardi* est effectivement associée à un coût, sa répartition devrait alors se limiter aux régions où elle est efficace (au Congo principalement) et elle devrait être absente des régions où elle est inefficace (en Méditerranée, où *L. bouvardi* est fortement virulent et échappe toujours l'encapsulation, quel que soit le génotype de l'hôte). Or, étrangement, les taux de résistance au type IS_y de *L. bouvardi* dans les populations de *D. melanogaster* ne semblent pas particulièrement corrélés à la présence de ce parasitoïde (Dupas *et al.*, 2002). La résistance est élevée dans les populations de *D. melanogaster* qu'elles soient originaires d'Europe, d'Asie, d'Afrique ou d'Amérique alors que le type IS_y de *L. bouvardi* n'a été mis en évidence qu'au Congo (Figure 23 p71). Ces résultats suggèrent donc soit que la résistance dans ces régions est sélectionnée par d'autres facteurs (comme d'autres parasitoïdes/pathogènes), soit que la résistance à *L. bouvardi* est un caractère "neutre" dans la plupart des populations (Dupas *et al.*, 2002), le coût détecté par Fellowes *et al.* étant alors dû aux conditions particulières de l'expérience en laboratoire.

Qu'en est-il dans le modèle *L. bouleari* / *D. yakuba* ?

La résistance de *D. melanogaster* à *L. bouleari* et *A. tabida* semble avoir des bases physiologiques très différentes. Par contre, les bases génétiques des résistances observées sont similaires, avec un gène de résistance majeur et un allèle de résistance dominant (Poirié *et al.*, 2000). Par ailleurs, la résistance aux deux espèces semble présente à des fréquences élevées dans les populations naturelles (Kraaijeveld et Godfray, 1999 ; Dupas *et al.*, 2002). Pour déterminer si ces observations sont généralisables à d'autres modèles hôtes-parasitoïdes et notamment à d'autres espèces hôtes, je me suis penchée sur le modèle *L. bouleari/D. yakuba*.

Lorsque j'ai commencé ma thèse, un polymorphisme de résistance vis à vis de la lignée IS_y de *L. bouleari* était connu chez *D. yakuba* (Yves Carton et Françoise Frey, com. personnelle). De plus, des lignées isofemelles présentant des niveaux de résistance contrastés vis à vis de la lignée IS_y (15-20% d'encapsulation pour R₁, 85-90% pour R₂) étaient à ma disposition. A l'aide de ces informations et de ces lignées de laboratoire, j'ai cherché à caractériser la résistance à *L. bouleari* chez *D. yakuba* afin de la comparer à celle connue chez *D. melanogaster*.

Le but de cette étude était notamment de déterminer :

- 1) La répartition du polymorphisme de résistance dans les **populations naturelles**.
- 2) Les **bases génétiques** des différences de résistance observées entre les lignées R₁ et R₂.
- 3) Les **bases physiologiques** des différences de résistance entre les lignées R₁ et R₂.

La distribution de la résistance à *L. bouleari* dans les populations naturelles de *D. yakuba* et le déterminisme génétique de la résistance sont présentés dans l'article 3 (partie I). Ce travail a été effectué en collaboration avec Yves Carton et Françoise Frey (CNRS Gif sur Yvette).

Les résultats concernant la recherche des bases physiologiques de la différence de résistance entre les 2 lignées sont présentés dans la partie II.

I ARTICLE 3: GENETIC INTERACTIONS BETWEEN A PARASITOID WASP AND ITS *DROSOPHILA* HOSTS

Article 3

Genetic interactions between a parasitoid wasp and its *Drosophila* hosts

Aurore Dubuffet, Stéphane Dupas, Françoise Frey, Jean-Michel
Drezen, Marylène Poirié and Yves Carton

Accepté avec corrections mineures dans Heredity

Summary

Coevolutionary arms races between hosts and parasites would not occur without genetic variation for traits involved in parasitism outcome. However, although well-characterised in plant-pathogen models, genetic variations in resistance and virulence have rarely been described in host-parasitoid interactions. The main data were obtained for specific interactions between *Leptopilina boulardi* and its *Drosophila* hosts, leading to the hypothesis of a ‘gene-for-gene’ pattern explaining the interaction between *L. boulardi* and *D. melanogaster*. The present study focuses on genetic interactions between *L. boulardi* and another host species, *D. yakuba*. We report variability in resistance, due to a single diallelic locus, thus confirming that resistance and virulence in *Drosophila* / parasitoids systems are determined by major genes. Interestingly, the genetic pattern describing variation in *L. boulardi* success on *D. yakuba* is totally different from the pattern explaining the *L. boulardi* - *D. melanogaster* interaction. Finally, the geographic distribution of resistance in natural populations of *D. yakuba* is described and discussed under an evolutionary point of view.

1 Introduction

In host-parasite or host-pathogen interactions, antagonistic selective pressures can lead to a coevolutionary arms race, based on adaptations and counter-adaptations in each partner. However, this process requires occurrence of genetic variation for traits involved in the final outcome of the interaction (Thompson, 1994; Sorci *et al*, 1997). Such a variation has often been described in plant-pathogen interactions (Frank, 1994) but little is known regarding interactions between insect parasitoids and their hosts. In this kind of interaction, where larval stages of the parasitoid are dependant on their arthropod host (Godfray, 1993), reciprocal selective pressures are particularly strong as only one partner can survive infestation.

To defend themselves against parasitoid attacks, host species have set up diverse behavioural and/or immune defences (Gross, 1993; Strand and Pech, 1995). In insects, the most well known immune defence against parasitoids is the formation of a multicellular, melanized capsule around the parasitoid egg. This encapsulation reaction, when successful, leads to parasitoid death and host survival (Carton and Nappi, 1997). To counteract host immune defences, parasitoids have developed various strategies, mainly based on the use of virulence factors (Strand and Pech, 1995; Pennacchio and Strand, 2006). However, despite their relevance for the study of coevolution, few data are currently available on host-parasitoid interactions regarding the genetic bases of resistance and virulence traits (Kraaijeveld *et al*, 1998; Dupas *et al*, 2002).

Variability for both resistance (ability to neutralize the parasitoid egg using immune defences) and virulence (ability to overcome the host immune defences) have been documented in only three host-parasitoid interactions, two of them involving the host species *Drosophila melanogaster* (Kraaijeveld and van Alphen, 1994; Dupas *et al*, 2002) and the other, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Henter, 1995; Henter and Via, 1995). In these models, genetic variation for both resistance and virulence has been observed and resistance and virulence components are thus predicted to co-evolve under antagonistic selective pressures.

Whatever its theoretical interest, this interpretation would be unlikely to explain all resistance and virulence patterns in natural populations (Dupas *et al*, 2002). Indeed, as stressed by Thompson (Thompson, 1999), selective pressures related to other parasitoid

and host species will also influence the geographic patterns of resistance-virulence in a given pairwise interaction. As a consequence, it is probably necessary to analyse several pairwise systems, involving the different host and parasitoid species in interaction, and to estimate potential trade-offs or genetic constraints between resistance and virulence traits.

At the present time, *Drosophila* species and their parasitoids are probably the best model to analyze multiple-species-host-parasitoid interactions and understand resistance and virulence patterns in the field. Variability of resistance has been observed against different parasitoids in *D. melanogaster* (Kraaijeveld and Van Alphen, 1995; Dupas *et al.*, 2002), and variability in virulence has been reported in the parasitoid species *L. bouleardi* against different *Drosophila* host species (Dupas and Boscaro, 1999). The genetic determinism of these traits has been mainly studied in the *D. melanogaster* – *L. bouleardi* system, using crosses between laboratory isofemale lines. A simple genetic system was found, with one diallelic locus explaining resistance and one diallelic locus responsible for virulence (Carton *et al.*, 1992; Dupas *et al.*, 1998). Interestingly, in tropical Africa, *L. bouleardi* can infest several other species of the *melanogaster* subgroup of Drosophilidae, including *D. yakuba* (Carton and Nappi, 1991). This species is widespread on the African mainland (Lachaise *et al.*, 1988) and was also described recently on some islands (Lachaise *et al.*, 2000). Variability for virulence against *D. yakuba* has been observed in natural populations of *L. bouleardi*, and is also determined by a single diallelic locus (Dupas and Boscaro, 1999; Dupas and Carton, 1999). However, the question whether genetic variation in resistance to *L. bouleardi* occurs in *D. yakuba* and whether this resistance is also determined by a major gene remained unanswered.

In this paper, we show that variability in resistance to *L. bouleardi* occurs in *D. yakuba* populations. We demonstrate that resistance is controlled by a major locus with two alleles, thus confirming that resistance and virulence traits in *Drosophila*-parasitoid wasps interactions are determined by major loci as in plant-pathogen interactions (Frank, 1994). Interestingly, combined data suggest that the *L. bouleardi* / *D. melanogaster* interaction is well explained by a ‘gene-for-gene’ (‘incompatibility’) pattern whereas interaction of *L. bouleardi* with *D. yakuba* would be better described by

Table 1 : Collection sites of the *D. yakuba* reference lines used for genetic analyses and percentage of encapsulation of *L. boulandi* eggs from the IS_y and IS_m lines.

Strain number (Gif stock)	Collection site	Collection year	Status	Encapsulation rate of IS _y eggs (number of larvae tested)	Encapsulation rate of IS _m eggs (number of larvae tested)
1880D (R ₁)	Tanzania, Udzungwa (south)	1995	Isofemale line	12.5 % (240)	100% (89)
1907 (R ₂)	Tanzania, Meru (north)	1995	Isofemale line	86.0 % (299)	99.4% (157)

Table 2 : *D. yakuba* strains collection sites, collection dates, status and percentage of encapsulation of *L. boulandi* eggs from the IS_y and IS_m lines.

Strain number (Gif stock)	Collection site	Date	Status	Encapsulation rate of IS _y eggs (number of larvae tested)	Encapsulation rate of IS _m eggs (number of larvae tested)
1915	Ivory Coast, Taï	1983	multifemale strain	77.6 % (60)	100% (57)
1919	Sao Tome isle (hybrid zone)	2001	7 isofemale lines	7.5 % (53)	100% (77)
1917	Sao Tome isle (south)	2000	24 isofemale lines	6.0 % (84)	100% (74)
1921	Principe Isle	2001	6 isofemale lines	88.9 % (54)	100% (46)
1916	Gabon, Lope	1998	14 isofemale lines	92.0 % (50)	100% (31)
1920	Kenya, Mt Elgon	1984	multifemale strain	85.5 % (55)	100% (29)
1918	Kenya, Mt Kenya	1984	multifemale strain	97.9 % (47)	100% (32)

a ‘compatibility’ pattern. Occurrence of genetically based variations of virulence and resistance in *L. bouleardi* interactions with two different *Drosophila* host species makes this model highly suitable for understanding the evolution of complex host-parasitoid relationships and addressing the question of the specificity of resistance and virulence traits.

2 Materials and methods

2.1 Insects

1a. Reference lines of L. bouleardi

The *L. bouleardi* isofemale lines IS_y and IS_m have been described in Dupas *et al.* (1998). IS_m (Gif stock, no. 431) derives from a single female collected in the Nasrallah oasis (Tunisia). IS_y (Gif stock, no. 486) derives from a single female originating from a mass culture of a Brazzaville (Congo) population. The IS_y line has been used by Carton *et al.* (1992) to study the genetics of resistance to *L. bouleardi* in *D. melanogaster*. Both IS_m and IS_y lines were reared on a susceptible *D. melanogaster* strain (Gif stock no. 1333), at 25°C. After emergence, adults of both lines were kept at 18°C on agar medium with honey.

1b. Reference lines of D. yakuba

The isofemale lines 1880-D (R₁ line) and 1907 (R₂ line) were selected from two populations in Tanzania and further used to analyse the genetic basis of resistance. R₁ and R₂ show opposite immune capacities against the IS_y line of *L. bouleardi* (see Table 1). These isofemale lines were obtained from a single inseminated founder female collected in the field (David *et al.*, 2005) that was used to initiate a full sib line. The sib lines had been maintained in the laboratory for 8 years at the time of the experiments, and were thus likely homozygous for all the loci potentially involved in resistance to the parasitoid wasp. The R₁ line was used by Dupas *et al.* (1998) to study the genetics of virulence of *L. bouleardi* on *D. yakuba*.

1c. Natural populations of D. yakuba

Seven *D. yakuba* populations were collected throughout the species distribution area, in the Afrotropical region (Lachaise *et al*, 1988), and several isofemale lines or multi-female strains were obtained from these populations. Occurrence of geographic variation in resistance against *L. bouvardi* was tested using either multi-female strains or pools of 6 to 24 isofemale lines (Table 2). This method was previously shown to preserve the genetic variability of a population (David *et al*, 2005). All *D. yakuba* strains were raised at 25°C using a standard *Drosophila* cornmeal-yeast-agar medium.

2.2 Bioassay procedure

For bioassays, batches of 30 second instar *D. yakuba* larvae (48 hours old) were submitted to parasitism by 3 *L. bouvardi* females during 4 hours. Encapsulation ability was estimated 48 hours later by dissecting late third instar larvae. All the bioassays were performed at 25°C. The encapsulation rate was calculated as the ratio of encapsulated parasitoid eggs to the number of parasitized hosts, using only data from monoparasitized larvae.

2.3 Genetic analysis

5a. Crossing procedure

Two generations of reciprocal crosses (Table 3) between the R₁ and R₂ lines, respectively susceptible and resistant to the parasitoid IS_y line, were performed. The two parental lines, the two F₁ hybrids and the two F₂ hybrids were tested and compared for their encapsulation ability.

5b. Statistical analysis

The mode of inheritance of *D. yakuba* resistance to the *L. boulardi* IS_y line was assessed using analyses of variance (ANOVA) with the generalized linear model procedure, assuming binomial error term distribution. Analyses were performed according to the method described by De Belle & Sokolowski (1987), which was previously used to analyse the genetic determinism of *D. melanogaster* resistance against the parasitoid species *L. boulardi* and *A. tabida* (Carton *et al.*, 1992; Benassi *et al.*, 1998). The following comparisons were made (cross numbers refer to those described in Table 3): difference between parental strains (1 vs 2), dominance or additive effects (1+2 vs 3+4), deviation from an autosomal mode of inheritance (3 vs 4).

The single-gene model with complete dominance of the resistance allele was tested using a Mendelian analysis with susceptible : resistant larvae ratios, as described in Carton *et al.* (1992). Susceptible : resistant observed and expected ratios were analysed using a Chi-squared analysis. All statistical analyses were performed using Systat 10 software (SPSS Inc.).

3 Results

3.1 Occurrence of variability in *D. yakuba* resistance to *L. boulardi*

Two well-characterised reference lines of the parasitoid *L. boulardi*, differing by their contrasted success on the host species *D. melanogaster*, were used to test the occurrence of variation in resistance in *D. yakuba*. Two isofemale lines, R₁ and R₂, originating from Tanzanian populations, were selected from a range of candidate lines for their respective high and low encapsulation levels of the wasp IS_y line. The parental isofemale lines R₁ and R₂ encapsulated respectively 12.5% and 86% of IS_y parasitoid eggs. Both lines encapsulated almost 100% of the eggs of the reference IS_m line (99.4% and 100% respectively) (Table 1). Based on these results, R₁ and R₂ were considered respectively as susceptible and resistant to the IS_y line of *L. boulardi*.

Table 3 : Percentage of encapsulation of *L. bouleari* IS_y eggs by *D. yakuba* larvae originating from different crosses involving the R₁ and R₂ lines.

Crosses	Mother × Father	Number of replicates	Number of larvae tested	Encapsulation rate (mean ± SE) (%)
Parental lines				
1	R ₁ × R ₁	13	240	12.5 ± 2.1
2	R ₂ × R ₂	14	299	86.0 ± 2.0
Reciprocal F ₁ hybrids				
3	R ₁ × R ₂	13	383	83.6 ± 1.9
4	R ₂ × R ₁	13	457	86.4 ± 1.6
Reciprocal F ₂ hybrids				
5	(R ₁ × R ₂) × (R ₁ × R ₂)	11	419	62.5 ± 2.4
6	(R ₂ × R ₁) × (R ₂ × R ₁)	12	370	60.0 ± 2.6

Table 4 : Contrast ANOVA for encapsulation of *L. bouleari* IS_y eggs by *D. yakuba* larvae originating from crosses involving the R₁ and R₂ lines (Generalized linear model with binomial error term)

Source	d.f.	MS	F	P
Model (between crosses)	5	22.38	136.10	< 0.001
Contrasts				
1. R ₁ vs. R ₂ parental lines (1 vs. 2)	1	71.83	436.79	< 0.001
2. Dominance (1+2 vs. 3+4)	1	41.56	252.74	< 0.001
3. Deviation from an autosomal mode of inheritance (3 vs. 4)	1	0.17	1.05	0.305
Error (within crosses)	2162	0.164		

3.2 Genetic determinism of resistance

A set of crosses was performed between the R₁ and R₂ isofemale lines to analyze the genetic determinism of *D. yakuba* resistance to IS_y parasitoids (see Materials and Methods). Encapsulation rates of IS_y eggs by larvae originating from the different crosses and results of the contrast analysis of variance are presented in Table 3 and 4 respectively. As expected, the R₁ and R₂ lines differed significantly in their resistance to infestation by IS_y parasitoids ($F = 436.79$, $P < 0.001$). F₁ hybrids exhibited significantly higher resistance than the mean parents, showing that resistance was dominant ($F = 252.74$, $P < 0.001$). Reciprocal F₁ hybrids were not significantly different from each other, excluding involvement of non-autosomal inheritance ($F = 1.05$, $P = 0.305$). Larvae from the different crosses were then classified into two classes (resistant and susceptible) according to their ability to encapsulate IS_y eggs. The fit to a single gene model was tested by comparing susceptible : resistant ratios with expected Mendelian ratios using a chi-squared analysis. The results (Table 5) were consistent with the hypothesis of a single major segregating locus with two alleles, the resistant one being completely dominant. We proposed that the locus encoding *D. yakuba* resistance to IS_y parasitoids be termed *Rlb*_{IS_y} (for Resistance to *L. boulardi* of the IS_y type) and the resistant and susceptible alleles, *Rlb*_{IS_y}⁺ and *Rlb*_{IS_y}⁻ respectively.

3.3 Genetic variability in natural populations

Encapsulation rates of the two reference *L. boulardi* lines, IS_y and IS_m, were recorded in seven *D. yakuba* populations collected across its geographical range, where *D. melanogaster* is also present (Lachaise *et al*, 1988) (Table 2). Figure 1 presents the geographic pattern of resistance to IS_y parasitoids.

A high level of variation in resistance to the IS_y line was observed in the field, which confirmed the results obtained with the Tanzanian R₁ and R₂ isofemale lines: resistance to IS_y in *D. yakuba* shows significant variability. Encapsulation rates varied from 6% to 98% but most populations encapsulated IS_y eggs at a high frequency (from 77.6% to 97.9%). Only populations from the São Tome island were susceptible to IS_y infestation

Table 5 : Chi-squared homogeneity tests of susceptible : resistant ratios of *D. yakuba* larvae submitted to parasitism by *L. boulardi* IS_y females. Expected ratios are calculated under a one-locus model with dominance of the resistant allele.

Expected ratios⁽¹⁾ are derived by assuming a 13.25 % probability of misclassification (ratios of misclassification observed in the parental crosses⁽²⁾)

NS: non significant

	n	Susceptible : Resistant	Expected	Observed	χ^2	P
Parental lines						
R ₁ x R ₁	240	1 : 0	240 : 0	210 : 30 (2)		
R ₂ x R ₂	299	0 : 1	0 : 299	42 : 257 (2)		
Reciprocal crosses						
F ₁						
R ₁ x R ₂	383	0 : 1	51 : 332 (1)	63 : 320	3.26	0.07 NS
R ₂ x R ₁	457	0 : 1	61 : 396 (1)	62 : 395	0.02	0.89 NS
F ₂						
F ₁ x F ₁	789	1 : 3	302 : 487 (1)	305 : 484	0.05	0.83 NS

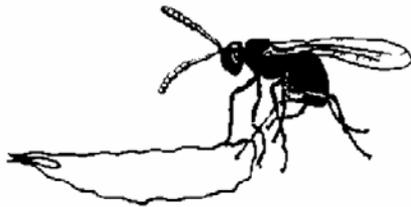
(6.5% and 7.0% of IS_y eggs encapsulated). Resistance was thus found either at a very high or a very low frequency in *D. yakuba* Afrotropical populations. By contrast, there was no variability between *D. yakuba* strains for resistance to the IS_m parasitoid line, 100% of the eggs being encapsulated in every strain (Table 2). Despite intense investigations, we have not found yet any *D. yakuba* population susceptible to the IS_m line of *L. bouleardi*.

4 Discussion

4.1 Genetic determinism of parasitoid resistance in *Drosophila*

The present study reports occurrence of variation in *D. yakuba* ability to encapsulate eggs of the IS_y line of *L. bouleardi*. Using crosses between lines having contrasted resistance levels, we demonstrate that resistance is determined by a single major locus, that we termed *Rlb*_{IS_y}.

Considering the high number of genes involved in insect immune pathways (Irving *et al*, 2001; Zettervall *et al*, 2004), variation in resistance to parasitoid wasps was rather expected to be determined by multigenic systems (Sorci *et al*, 1997). However, in all cases in which genetic determinism of resistance to parasitoids has been studied, *D. melanogaster*/*L. bouleardi*, *D. melanogaster*/*A. tabida*, and now *D. yakuba* / *L. bouleardi*, differences between lines resistant and susceptible to a given parasitoid have always been explained by a single diallelic locus: in *D. melanogaster*, two loci, named *Rat* and *Rlb* (labelled as *Rst(2)Lb* in Flybase; ID number: FBgn0016729), localised 35 centimorgans apart, are responsible for resistance to the parasitoids *A. tabida* and *L. bouleardi* respectively (Carton *et al*, 1992; Benassi *et al*, 1998; Poirié *et al*, 2000). The use of isofemale lines, which are not representative of the extent of genetic variation in the field might favour the recovery of simple genetic systems (Kraaijeveld *et al*, 1998). However, studies by Orr and Irving (Orr and Irving, 1997), dealing with genetic variation of resistance to *A. tabida* in *D. melanogaster* populations from different parts of Europe, also concluded on a simple genetic basis for resistance. The advantage of performing analyses with well-characterized strains is that it allows precise localization and identification of resistance loci (Hita *et al*, 1999; Poirié,



2 independent loci for virulence,
 IS_y locus, 2 alleles IS_y^+ and IS_y^-
 IS_m locus, 2 alleles IS_m^+ and IS_m^-

		<i>D. melanogaster</i>		<i>D. yakuba</i>	
		One gene for resistance, 2 alleles Rib^+ and Rib^-		One gene for resistance, 2 alleles $Rib_{IS_y^+}$ and $Rib_{IS_y^-}$	
		Susceptible line Rib^-/Rib^-	Resistant line Rib^+/Rib^+	R_1 line $Rib_{IS_y^-}/Rib_{IS_y^-}$	R_2 line $Rib_{IS_y^+}/Rib_{IS_y^+}$
<i>L. boulandi</i> 	IS_m line $IS_m^+/IS_m^+; IS_y^-/IS_y^-$	1a Parasitism success	1b Parasitism success	2a  Parasitism failure: encapsulation	2b  Parasitism failure: encapsulation
	IS_y line $IS_m^-/IS_m^-; IS_y^+/IS_y^+$	1c Parasitism success	1d  Parasitism failure: encapsulation	2c Parasitism success	2d  Parasitism failure: encapsulation

(Article 3) Box 1 : Genetic interactions matrix in the *Drosophila* - *L. boulandi* reference system.

The interactions between the reference lines IS_y and IS_m of the parasitoid *L. boulandi* and the reference lines of the host species *D. melanogaster* and *D. yakuba* are illustrated. Resistance in each host species is determined by one locus, and two independent loci are responsible for virulence of the parasitoid against the two host species.

In the *L. boulandi*- *D. melanogaster* system (cells 1a to 1d), the host alleles Rib^+ and Rib^- are responsible for resistance and susceptibility to IS_y infection, respectively. The parasitoid alleles IS_m^+ and IS_m^- are responsible for virulence and avirulence of the parasitoid on the host resistant line. Parasitism success is the rule in *D. melanogaster* (cells 1a, 1b and 1c), except when a resistance allele Rib^+ is present without any virulence allele IS_m^+ (cell 1d).

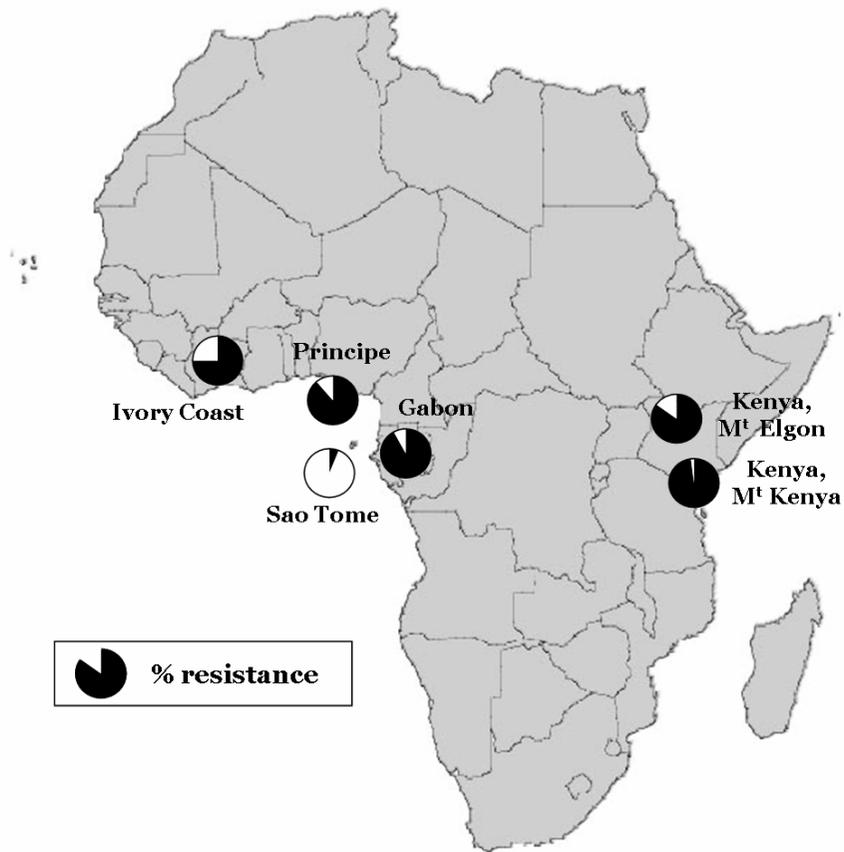
In the *L. boulandi* - *D. yakuba* system (cells 2a to 2d), the host alleles $Rib_{IS_y^+}$ and $Rib_{IS_y^-}$ are responsible for resistance and susceptibility to the IS_y infection, and the parasitoid alleles IS_y^+ and IS_y^- are responsible for virulence and avirulence of the parasitoid on the host R_1 line. In this system, parasitism failure is the rule (cells 2a, 2b and 2d), except when two virulence alleles IS_y^+ are present with two susceptibility alleles $Rib_{IS_y^-}$ (cell 2c).

unpublished data). These loci are expected to contain genes involved in the response to parasitoid attacks, showing enough polymorphism to respond to selection pressures, and thus potentially evolving under coevolutionary processes.

The genetic bases of interactions between two different lines of *L. boulandi* and the two host species *D. melanogaster* and *D. yakuba* are summarized in Box 1. In the *L. boulandi*-*D. melanogaster* system, parasitism success is the rule and failure only occurs when the parasitoid has no virulence alleles (IS_y line) and the host is resistant (at least one Rlb^+ allele, Resistant strain) (Dupas *et al*, 2002). In this system, somehow resembling the ‘gene-for-gene’ (or ‘incompatibility’) model of plant-pathogens interactions (Briggs and Johal, 1994), one parasitoid genotype (IS_m line) has a ‘universal virulence’ (Frank, 1994), which means that it can infest all *D. melanogaster* flies whatever their genotypes.

In contrast, the general outcome in the *L. boulandi*-*D. yakuba* interaction is the encapsulation of the parasite egg, and parasitism is only successful if the parasitoid is homozygous for virulence alleles ($IS_y^+IS_y^+$, IS_y line) (Dupas *et al*, 1998) and the host is homozygous for susceptible alleles (Rlb_{Isy}^- , R_1 line). This genetic pattern of interactions, quite different from the one described above, resembles the ‘compatibility model’ of Briggs and Johal (1994). Under this model, parasitoid success would require a specific match between host and parasite ‘compatible factors’ and each modification of the host target would prevent development of the parasite.

IS_m eggs are rarely encapsulated in *D. melanogaster* and always encapsulated in *D. yakuba* lines. Besides, despite intense investigations, we have been unable to recover *D. melanogaster* flies resistant or *D. yakuba* flies susceptible to this parasitoid line. On the contrary, encapsulation of IS_y eggs can take place in both host species depending on the genotype of the fly (i.e. the resistance status of the host strain). In this way, the success of the IS_m line is ‘species-dependant’ whereas the success of the IS_y line is ‘host-genotype-dependant’. As suggested in other host-parasite systems, success/failure of a parasitoid seems to be neither due to the single parasitoid virulence nor to the host resistance ability alone, but rather determined by complex interactions between host and parasitoid (Kraaijeveld and Godfray, 2001; Dupas *et al*, 2002; Little *et al*, 2005).



(Article 3) Figure 1 : Geographic distribution of *D. yakuba* resistance to *IS_y* parasitoids in tropical Africa. The resistance level (in black) was estimated from the percentage of *IS_y* eggs encapsulated by *D. yakuba* larvae.

4.2 Geographic patterns of *D. yakuba* resistance to *L. boulardi*

L. boulardi eggs of the IS_m line were encapsulated in all tested *D. yakuba* strains, whatever their geographic origin, as in the R₁ and R₂ isofemale lines, thus confirming the absence of variation in resistance to this parasitoid. Occurrence of variability in resistance to IS_y females, discovered in Tanzanian populations (origin of the R₁ and R₂ lines), was further confirmed using other natural populations. A high resistance level was found in Kenya, Gabon, Ivory Coast and in the Principe Island whereas populations from São Tome were susceptible. Interestingly, resistance to IS_y parasitoids is also high in *D. melanogaster* populations, even in areas where this type of parasitoid is absent (Dupas *et al*, 2002).

It is generally postulated that resistance to a pathogen or a parasite is a life history trait whose polymorphism is maintained by a balance between positive selection forces (the presence of the pathogen) and counter-selecting forces (the cost of maintaining resistance in the absence of the pathogen) (Kurtz *et al*, 2002; Rolff and Siva-Jothy, 2003). Under this model, positive selective forces should have acted in every locality where resistance to IS_y parasitoids is observed at high frequencies. At the moment, *L. boulardi* populations corresponding to the 'IS_y type' (able to develop on *D. yakuba*) have only been found in Congo and to a lesser extent in Ivory Coast (Dupas and Boscaro, 1999). If the 'IS_y type' repartition area was the same in the past, other biotic or abiotic pressures might have selected resistance in the majority of *D. yakuba* populations. Whether individuals resistant to 'IS_y parasites' can also resist to other parasitoids/pathogens remains to be determined, but preliminary results suggest they are at least able to resist another parasitoid species found in these localities, *Leptopilina freyae* (Allemand *et al*, 2002; Carton, unpublished data). Resistance in *D. yakuba* populations would be considered in this way as a 'generalist resistance' rather than a 'specific resistance'.

Under the same hypothesis, the absence of resistance in São Tome island could result from the absence of the agents selecting resistance in mainland populations, combined with counter-selection of resistance alleles, leading to the loss of resistance. Unfortunately, the questions whether *L. boulardi* parasitoids can be found in São Tome and whether *D. yakuba* resistance is costly, remain to be answered. A second hypothesis would be that under a high diversity of attack or a high prevalence of parasites,

tolerance or non investment in immune defence mechanisms are an optimal strategy (Sasaki and Godfray, 1999; Jokela *et al*, 2000). We lack information on the abundance of *D. yakuba* pathogens or parasitoids in this island but under classical theories in biogeography, this hypothesis seems rather unlikely (MacArthur and Wilson, 1967). Finally, susceptibility of São Tome populations to *L. bouleari* might be explained by a founder effect having occurred during more or less recent colonization events. In the São Tome island, distant of 320 km from the mainland, *Drosophila yakuba* is found together with its newly discovered, endemic sister species *D. santomea* that probably arose after the colonization of the island by a *D. yakuba*-like ancestor (Lachaise *et al*, 2000). The extant insular *D. yakuba* population on São Tome was shown to result from a recent secondary colonization (Cariou *et al*, 2001) that might have involved a small number of flies.

Observation of variability for resistance and virulence in host-parasitoid communities and determination of their genetic bases are major steps in the process of understanding diffuse coevolutionary processes. Deciphering the physiological and molecular bases of these traits will help addressing the question of specificity in host-parasitoid interactions and will provide precious information on the course of coevolutionary arms races.

5 Acknowledgments

This work was supported by the French GDR 2153. Aurore Dubuffet received financial support from the François Rabelais University. We are grateful to Daniel Lachaise for providing *Drosophila* lines, Carole Labrousse for technical assistance and to Georges Periquet for fruitful discussions.

Principaux résultats de l'article 3

1. Un polymorphisme de résistance existe chez *D. yakuba* vis à vis de la lignée IS_y de *L. bouleari* mais pas vis de la lignée IS_m.

Les taux d'encapsulation des œufs des lignées IS_y et IS_m ont été établis dans 5 populations de *D. yakuba*, provenant de localités réparties dans l'aire de répartition de l'espèce.

Les œufs de la lignée IS_m sont toujours encapsulés par *D. yakuba*, quelle que soit la souche hôte testée.

La lignée IS_y permet par contre de révéler un polymorphisme de résistance entre les populations, puisque le taux de résistance varie de 6% à 98% selon les populations considérées.

2. Le polymorphisme de résistance vis à vis de la lignée IS_y a une base génétique simple.

Des croisements réalisés à partir des lignées R₁ et R₂, respectivement sensible et résistante à la lignée IS_y, ont permis d'établir que la différence de résistance des 2 lignées est sous la dépendance d'un locus autosomal diallélique appelé *Rlb*_{IS_y} (pour Résistance au type IS_y de *L. bouleari*). L'allèle responsable de la résistance *Rlb*_{IS_y}⁺, est dominant sur l'allèle *Rlb*_{IS_y}⁻.

3. Les modèles génétiques des interactions *L. bouleari* / *D. yakuba* et *L. bouleari* / *D. melanogaster* sont différents.

L'ensemble des résultats obtenus à ce jour montre que l'issue des interactions entre *L. bouleari* et *D. melanogaster* et entre *L. bouleari* et *D. yakuba* dépend à la fois de la lignée de parasitoïde et de la lignée hôte considérées.

Cependant, les interactions génétiques observées dans le système *L. bouleari* / *D. yakuba* semblent très différentes de celles décrites dans le système *L. bouleari* / *D. melanogaster* (voir Encadré 1). L'issue "par défaut" de l'interaction semble en effet être la réussite parasitaire dans le système *L. bouleari* / *D. melanogaster* et l'encapsulation dans le système *L. bouleari* / *D. yakuba*.

II RECHERCHE DES BASES PHYSIOLOGIQUES DE LA RÉSISTANCE À *L. BOULARDI* CHEZ *D. YAKUBA*

II.1 Objectif/Principe

Les bases physiologiques de la différence de résistance à la lignée IS_y de *L. bouleardi* entre les souches R₁ et R₂ de *D. yakuba* ont été recherchées. Il s'agissait notamment de déterminer si la différence de résistance entre les 2 souches hôtes était due à une **différence d'immunocompétence** (de "potentiel immunitaire", mesurable en absence du parasitoïde) ou bien **dépendante de l'interaction spécifique entre hôte et parasitoïde**, comme par exemple en cas d'une différence de sensibilité des composantes de l'immunité normalement ciblées par le parasitoïde IS_y (mesurable uniquement en présence du parasitoïde).

L'immunocompétence des lignées R₁ et R₂ a été comparée sur 3 critères :

- capacité à encapsuler un corps étranger "neutre" (qui n'interfère pas avec le système immunitaire de la larve hôte)
- quantité basale d'hémocytes
- activité PO potentielle (activité de la PO contenue dans l'hémolymphe mesurée après activation)

Les composantes de l'immunité de *D. yakuba* ciblées par *L. bouleardi* étant les hémocytes (effet sur le nombre) et l'activité PO (inhibition de l'activité de la PO ou de son activation)(voir Chapitre 2), la sensibilité de ces composantes au parasitoïde IS_y a été comparée entre les 2 lignées hôtes R₁ et R₂ en mesurant :

- le nombre d'hémocytes dans des larves parasitées
- l'activité PO en présence de venin de la lignée IS_y

II.2 Matériel et méthodes

II.2.1 Comparaison de la capacité à encapsuler un corps étranger "neutre"

Des larves des lignées R₁ et R₂ de *D. yakuba*, de 2nd stade larvaire (48 ± 1h) sont injectées avec un petit volume d'huile de paraffine (corps étranger neutre), selon le protocole décrit dans le chapitre 2 (article 2), puis transférées dans du milieu frais par groupes de 15 à 20 larves et placées à 25°C. Deux jours plus tard, ces larves sont disséquées pour évaluer le degré d'encapsulation des gouttes d'huile, catégorisé ainsi: 'absence d'hémocytes', 'présence de quelques hémocytes', 'encapsulation cellulaire partiel et taches de mélanisation', 'capsule complète'. La comparaison des degrés d'encapsulation des gouttes de paraffine dans les lignées R₁ et R₂ a été effectuée par un Khi deux de contingence.

II.2.2 Hémogrammes

Les hémogrammes de larves de *D. yakuba*, obtenus selon la méthode indiquée dans le chapitre 2 (article 2), ont été établis pour les catégories indiquées ci-dessous :

1. larves **R₁** âgées de 76 h **non parasitées**
2. larves **R₂** âgées de 76 h **non parasitées**
3. larves **R₁** âgées de 76 h parasitées depuis 27 h par la lignée **IS_y**
4. larves **R₁** âgées de 76 h parasitées depuis 27 h par la lignée **IS_m**
5. larves **R₂** âgées de 76 h parasitées depuis 27 h par la lignée **IS_y**
6. larves **R₂** âgées de 76 h parasitées depuis 27 h par la lignée **IS_m**

Le nombre total d'hémocytes (THC) et le nombre d'hémocytes de chaque catégorie cellulaire (plasmocytes, lamellocytes et cellules à cristaux) ont été évalués. Les résultats obtenus pour des lots de 21 à 28 larves par catégorie ont été comparés par ANOVA en analyse de contrastes. Les différentes sources pouvant être à l'origine des variations du nombre d'hémocytes dans les différentes catégories ont été testées :

Contraste 1 : Effet du parasitisme : **1+2 vs. 3+4+5+6**

Contraste 2 : Effet de la lignée parasitoïde sur le nombre d'hémocytes : **3+5 vs. 4+6**.

Contraste 3 : Effet de la lignée hôte sur la quantité basale d'hémocytes (larves non parasitées) : **1 vs. 2**

Contraste 4 : Effet de la lignée hôte sur le nombre d'hémocytes (larves parasitées) : **3+4 vs. 5+6**.

Ces analyses ont été suivies de tests de comparaisons multiples (LSD, pour Fisher's Least Difference). L'ensemble de l'analyse a été effectué grâce au logiciel Systat (Version 10, SPSS Inc, Chicago, IL)

II.2.3 Mesure de l'activité PO

Nous avons vu dans le chapitre précédent que l'enzyme PO obtenue en collectant l'hémolymphe de larves de drosophiles dans du tampon cacodylate se trouvait sous sa forme active, ce qui permet de mesurer l'activité PO potentiellement disponible chez les larves des lignées R₁ et R₂. La sensibilité à l'inhibition de la PO (ou à l'inhibition de son activation) par le venin des femelles IS_y a aussi été comparée entre les 2 lignées de *D. yakuba*. L'activité PO a été déterminée selon le protocole décrit dans le chapitre 2 (Partie III) dans des échantillons de 5 larves de drosophiles âgées de 96 h :

- de la lignée R₁ (hémolymphe seule)
- de la lignée R₂ (hémolymphe seule)

- de la lignée R₁ en présence de 4 µg de venin de femelles IS_y
- de la lignée R₂ en présence de 4 µg de venin de femelles IS_y

Au moins 3 répétitions de chaque type de traitement ont été effectuées. Les résultats sont comparés à l'aide d'un test de Kruskal Wallis suivi d'un test de comparaisons multiples pour données non paramétriques au vu du nombre réduit de répétitions dans certains traitements (Siegel et Castellan, 1988).

Les résultats obtenus pour chaque traitement sont représentés en termes de pourcentage relatif d'activité PO par rapport au témoin "hémolymphé seul de la lignée R₁" pour lequel on connaît les effets de l'ajout de venin. Ce pourcentage a été calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ relatif d'activité PO} = \frac{\text{densité optique mesurée dans le traitement considéré}}{\text{densité optique mesurée dans le témoin hémolymphé de R}_1}$$

II.3 Résultats

II.3.1 Comparaison de la capacité à encapsuler un corps étranger "neutre"

Le degré d'encapsulation des gouttes de paraffine injectées dans des larves des lignées R₁ et R₂ depuis deux jours est représenté dans la Figure 54. Plus de 85 % des larves des deux lignées forment une capsule complète autour de la goutte d'huile. Les degrés d'encapsulation du corps étranger ne sont pas statistiquement différents entre les deux lignées de *D. yakuba* ($\chi^2 = 6.40$; d.f = 3 ; $P = 0.094$), mais la proportion de larves ayant élaboré une capsule complète autour de la goutte d'huile est plus importante dans la lignée R₁ ($\chi^2 = 6.40$; d.f = 1 ; $P = 0.011$). Les capacités des larves des deux lignées à encapsuler un corps étranger sont donc globalement équivalentes mais il semblerait que seulement 87 ± 7 % de larves de la lignée R₂ soient capables d'élaborer une capsule complète en 48 heures. Cette différence n'est cependant pas celle à laquelle on pouvait s'attendre, puisque c'est la lignée R₁, incapable d'encapsuler les œufs de la lignée IS_y de *L. boulandi* qui aurait la meilleure "capacité intrinsèque" à encapsuler un corps étranger.

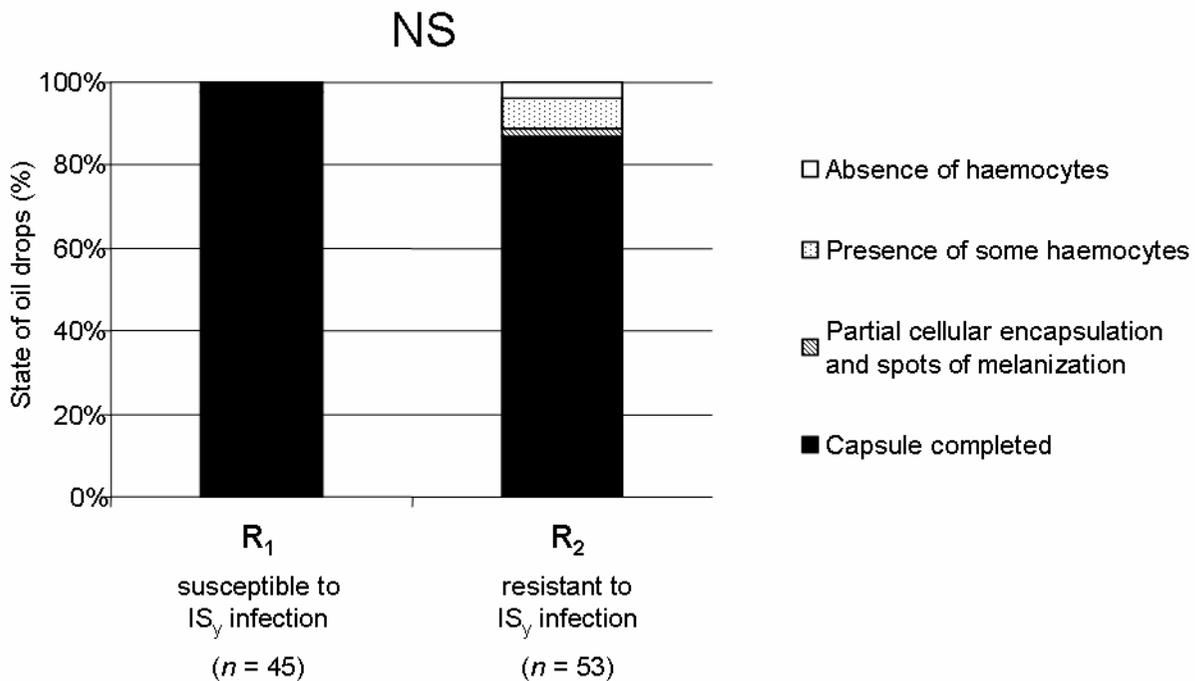


Figure 54 : Comparison of 'general encapsulation abilities' of the R₁ and R₂ *D. yakuba* lines of, susceptible and resistant to the IS_y line of *Leptopilina boulardi*, respectively.

Two-days old *D. yakuba* larvae were injected with 2-5 nl of paraffin oil. Injected larvae were dissected 48 hours post-parasitism and the degree of encapsulation of oil drops was categorized as follows : 'absence of haemocytes' (total absence of haemocytes on the drop surface), 'presence of some haemocytes' (some haemocytes observed on the surface of the drop), 'partial cellular encapsulation and melanization spots' (partially melanized capsule covering a large part of the foreign body), 'capsule completed' (strongly melanized capsule totally surrounding the drop). Results are expressed in percentages of injected oil drops. Values within brackets indicate numbers of examined oil drops for each category (NS: $P = 0.114$; χ^2 test).

II.3.2 Hémogrammes

Les résultats des comparaisons effectuées entre les différentes catégories testées sont présentés dans le Tableau 11 et le nombre moyen (\pm S.E) de THC, plasmatoctes, lamellocytes et cellules à cristaux est indiqué dans le Tableau 12.

Le nombre total d'hémocytes, le nombre de plasmatoctes et de cellules à cristaux est plus important chez les larves parasitées par les femelles IS_y ou IS_m que chez les larves non parasitées alors que le nombre de cellules à cristaux reste constant (contraste 1). Les profils hémocytaires obtenus pour l'ensemble des interactions indiquent donc qu'une prolifération hémocytaire est systématiquement déclenchée chez les larves parasitées, et ce quelle que soit la lignée parasitoïde ou la lignée hôte concernée, comme montré chez *D. melanogaster* (Tableau 12). Cette prolifération hémocytaire ne semble pas concerner les cellules à cristaux.

Le nombre de plasmatoctes et de lamellocytes diffère cependant selon la lignée de parasitoïde qui a infesté les larves hôtes (contraste 2). Il est moins important chez les larves infestées par la lignée IS_y que chez les larves infestées par la lignée IS_m. Le nombre de plasmatoctes est moins élevé chez les larves parasitées par la lignée IS_y, aussi bien chez la lignée R₁ que la lignée R₂ mais une différence concernant le nombre de lamellocytes n'est observée que chez les larves de la lignée hôte R₁ (Tableau 12).

Les larves non parasitées des lignées R₁ et R₂ présentent le même nombre de plasmatoctes, de lamellocytes et de cellules à cristaux (contraste 3). Elles présentent aussi le même nombre de lamellocytes et de cellules à cristaux lorsqu'elles sont parasitées par l'une ou l'autre des 2 lignées de parasitoïdes (contraste 4). Elles diffèrent par contre pour leur nombre de plasmatoctes, mais uniquement lorsqu'elles sont parasitées par la lignée IS_m de *L. bouvardi*. Dans ce cas, le nombre de plasmatoctes est particulièrement élevé chez les larves de la lignée R₁ (Tableau 12).

II.3.3 Mesure de l'activité PO

Des différences significatives du % relatif d'activité PO ont pu être mises en évidence entre les différents traitements (Kruskal Wallis, $H = 26.79$; $df = 3$; $P < 0.001$), mais ces différences ne sont dues qu'à la présence ou l'absence de venin de la lignée IS_y de *L. bouvardi* (voir Figure 55). Aucune différence significative d'activité PO n'a été mise en évidence entre les échantillons 'hémolymphe seul' des lignées hôtes R₁ et R₂ ($Q = 0.12$; $d.f = 3$; NS). De même, les échantillons dans lesquels 4 μ g de venin de la lignée IS_y de *L. bouvardi* était présents ne diffèrent pas entre les 2 lignées R₁ et R₂ ($Q = 0.66$; $d.f = 3$; NS). L'ajout de 4 μ g de venin induit donc une inhibition significative de l'activité PO de l'hémolymphe chez les 2 lignées (R₁ : $Q = 4.04$; $d.f = 3$; significatif au seuil 5% ; R₂ : $Q = 3.93$; $d.f = 3$; significatif au seuil 5%).

Tableau 11 : Comparison of the THC, plasmacyte counts, the lamellocyte count and the crystal cell count in *D. yakuba* larvae of the R₁ and R₂ lines, unparasitized or parasitized by *L. bouhardi* females of the IS_y or IS_m lines, using contrast ANOVA. The table gives the F values and the significance level. NS : $P > 0.05$; * $P < 0.05$; * $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Source	d.f	THC	Plasmacytes	Lamellocytes	Crystal cells
Model (between samples)	5	48.047 ***	23.520 ***	49.464 ***	2.013 NS
<i>Contrasts :</i>					
1. Between unparasitized and parasitized larvae (1+2 vs. 3+4+5+6)	1	188.96 ***	35.24 ***	7.03 **	-
2. Between IS _m and IS _y lines (3+4 vs. 5+6)	1	36.33 ***	35.25 ***	7.03 **	-
3. Between unparasitized R ₁ and R ₂ lines (1 vs 2)	1	0.06 NS	0.05 NS	0.01 NS	-
4. Between parasitized R ₁ and R ₂ lines (3+5 vs. 4+6)	1	3.38 NS	10.77 **	3.83 NS	-
Error	128	2.76 10 ⁷	1.86 10 ⁷	6.38 10 ⁶	2.86 10 ⁴

Tableau 12 : Total haemocyte count (THC), differential count of plasmacytes, lamellocytes and crystal cells, in unparasitized *Drosophila yakuba* larvae and in larvae parasitized by IS_y or IS_m females of *Leptopilina bouhardi*, 27 hours after parasitization. Values are expressed in mean numbers of cells per mm³ of hemolymph (\pm SE). Numbers within brackets indicate numbers of replicates for each category of hosts. For each cellular category, means were compared between unparasitized larvae and larvae parasitized by IS_y females. Values within a same column followed by different letters indicate a significant difference (LSD test, $P < 0.05$).

		THC	Plasmacytes	Lamellocytes	Crystal cells
Unparasitized larvae	1 R ₁ (n=26)	3964 \pm 328 a	3372 \pm 309 a	268 \pm 64 a	64 \pm 14 a
	2 R ₂ (n=27)	4303 \pm 461 a	3623 \pm 458 a	286 \pm 77 a	96 \pm 14 a
Larvae parasitized by IS _y females	3 R ₁ (n=21)	12942 \pm 890 b	6702 \pm 834 bc	5719 \pm 458 b	190 \pm 60 a
	4 R ₂ (n=18)	13825 \pm 1353 b	6380 \pm 690 b	7 046 \pm 859 bc	103 \pm 32 a
Larvae parasitized by IS _m females	5 R ₁ (n=21)	23064 \pm 1898 d	15236 \pm 1786 d	7423 \pm 852 c	144 \pm 54 a
	6 R ₂ (n=21)	17816 \pm 1473 c	9253 \pm 969 c	8325 \pm 827 c	53 \pm 26 a

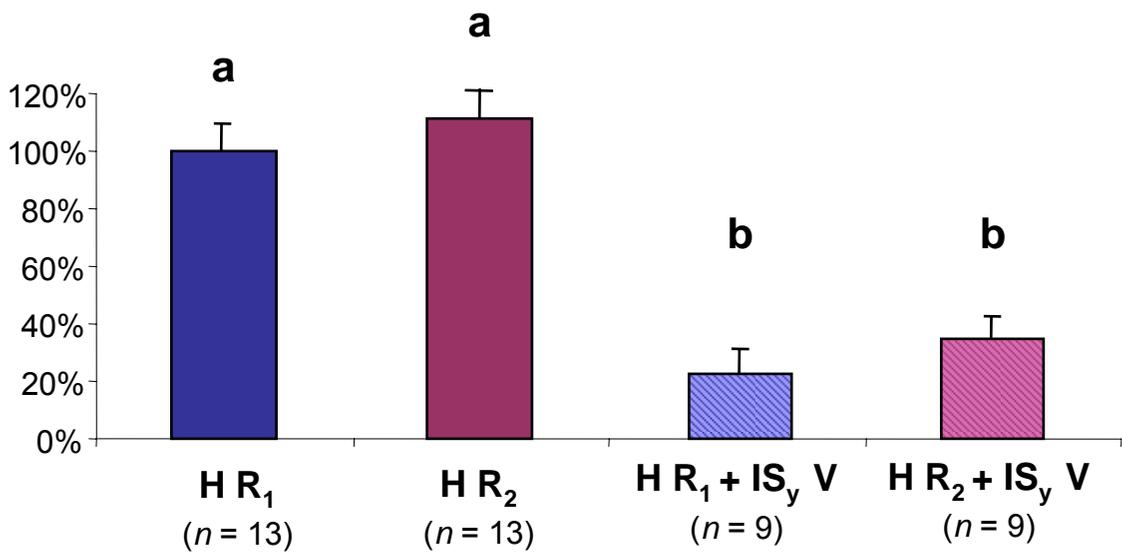


Figure 55 : Inhibition of Phenoloxydase (PO) activity in *Drosophila yakuba* (R₁ and R₂ lines) haemolymph by *Leptopilina boulardi* IS_y long gland extracts.

PO activity was measured at 490 nm by the quantity of dopachrome formed after 1 hour of incubation at 21°C, under 4 different conditions. **H R₁**: haemolymph of 5 *D. yakuba* larvae of the R₁ line (96 ± 2 h); **H R₁ + IS_y V**: haemolymph of the R₁ line + 4 µg of IS_y venom gland extracts; **H R₂**: haemolymph of 5 *D. yakuba* larvae of the R₂ line (96 ± 2 h); **H R₂ + IS_y V**: haemolymph of the R₂ line + 4 µg of IS_y venom gland extracts.

Results are expressed as the mean percentage of haemolymph PO activity measured in each treatment relative to the H R₁ treatment (R₁ haemolymph alone) (± SE). The number of repeated measures is indicated between brackets for each treatment.

PO activities significantly differed between treatments (Kruskal Wallis test: P < 0.001), Significant differences (P < 0.05) are indicated by different letters (multiple comparisons test for non-parametric data, Siegel & Castellan, 1988)

II.4 Discussion / Perspectives

Aucune des mesures effectuées n'a permis de mettre en évidence une différence physiologique permettant d'expliquer la différence de résistance entre les lignées R_1 et R_2 .

II.4.1 Comparaison de l'immunocompétence des lignées R_1 et R_2

Le nombre basal d'hémocytes ainsi que l'activité PO des 2 lignées est statistiquement similaire, ce qui indique que les larves des 2 lignées possèdent *a priori* un "arsenal" de défense équivalent pour neutraliser un corps étranger. Les larves de ces 2 lignées ont par ailleurs globalement la même capacité à encapsuler un corps étranger neutre et encapsulent toutes les deux les œufs de la lignée IS_m . L'ensemble de ces résultats tend ainsi à exclure l'hypothèse que la différence de résistance des 2 lignées hôtes à la lignée IS_y de *L. boulardi* puisse être due à une différence d'immunocompétence. Contrairement au parasitoïde *A. tabida*, les variations de succès de *L. boulardi* dans ses hôtes *D. melanogaster* et *D. yakuba* ne sont donc pas attribuables à des différences d'immunocompétence, mais plutôt à des interactions spécifiques avec les lignées du parasitoïde.

II.4.2 Comparaison de la sensibilité des cibles des facteurs parasitaires dans les lignées R_1 et R_2

Dans le chapitre précédent, il a été montré que le THC, le nombre de plasmacytes et le nombre de lamellocytes sont moins importants chez les larves de la lignée R_1 parasitées par la lignée IS_y de *L. boulardi* que chez les larves R_1 parasitées par la lignée IS_m . L'étude réalisée ici indique que cette différence est aussi observée chez les larves de la lignée R_2 en ce qui concerne le THC et les plasmacytes. Le nombre de lamellocytes n'est par contre pas statistiquement différent, ce qui pourrait indiquer que le parasitisme par la lignée IS_y n'induit pas les mêmes effets sur les lamellocytes chez la lignée R_2 que chez la lignée R_1 . Cette différence apparente de sensibilité des deux souches hôtes à l'effet de la lignée IS_y sur le nombre de ne peut cependant pas expliquer leur différence de résistance puisque le nombre de lamellocytes n'est pas différent entre les larves des lignées R_1 et R_2 parasitées par la lignée IS_y de *L. boulardi*.

Le THC, le nombre de plasmacytes et le nombre de lamellocytes sont équivalents entre les larves des lignées R_1 et R_2 parasitées par les femelles IS_y . Ainsi, soit la différence d'encapsulation des œufs de la lignée IS_y n'est pas due à une différence dans le nombre d'hémocytes, soit cette différence n'est pas décelée à 27 heures après parasitisme mais pourrait être détectée à un autre moment. L'exemple de la résistance de *D. melanogaster* indique que de telles différences temporaires dans le nombre d'hémocytes peuvent être observées (Russo *et al.*, 2001).

L'activité PO des 2 lignées de drosophiles est inhibée en présence de venin de la lignée IS_y de *L. bouvardi* ce qui suggère que la différence de résistance de ces 2 lignées n'est pas liée à une différence de sensibilité à l'inhibition. Cependant, les tests ont été effectués avec une quantité importante de venin (4 µg d'extraits de venin pour l'hémolymphe de 5 larves de drosophiles), ce qui est éloigné de la réalité biologique. Dans ces conditions, même si les facteurs de virulence contenus dans le venin sont moins efficaces sur les cibles de la lignée R₂ que sur les cibles de la lignée R₁, leur forte concentration pourrait masquer une plus faible efficacité et ainsi induire une inhibition totale de l'activité PO. La mise au point de tests *in vitro* avec des quantités plus réduites de venin permettra de confirmer ou d'exclure cette possibilité.

Les résultats obtenus permettent de rejeter l'hypothèse d'une différence d'immunocompétence comme responsable de la résistance des lignées R₁ et R₂ de *D. yakuba* à la lignée IS_y de *L. bouvardi*.

Il semble donc que la résistance chez cette espèce hôte soit, comme celle observée chez *D. melanogaster* (face à la même lignée de *L. bouvardi*), dépendante des interactions spécifiques lignée hôte - lignée parasite. Aucune des mesures qui ont été effectuées dans le modèle *D. yakuba* n'a cependant permis de déceler une différence qui permettrait d'expliquer la variation de résistance observée. Ceci peut provenir du fait que d'autres composantes de la réponse immunitaire sont touchées (production de radicaux cytotoxiques par exemple) ou tout simplement de la « finesse » des différences mises en jeu (différences quantitativement peu importantes ou observables seulement à un temps précis). Par ailleurs, les effets de la lignée IS_y sur l'immunité des larves R₁ de *D. yakuba*, décrits dans le chapitre 2 et supposés être responsables de la réussite parasitaire, ont été caractérisés comme « transitoires ». Ainsi, on ne peut négliger l'hypothèse que la capacité de récupération des capacités à encapsuler puisse différer entre larves hôtes R₁ et R₂. Si les larves de la lignée R₂ récupèrent leurs capacités à encapsuler plus rapidement que les larves de la lignée R₁, alors les effets du parasitoïde IS_y sur l'immunité des larves de *D. yakuba* R₂, nécessaires à la réussite parasitaire, pourraient ne pas être suffisants, conduisant à l'encapsulation des œufs du parasite.

Il est probable que seule une analyse « continue » et « exhaustive » des composants immunitaires au cours du parasitisme, lourde à mettre en place, permettrait de caractériser à coup sûr les différences impliquées dans les processus de résistance.

DISCUSSION

Stratégies de virulence chez le parasitoïde *L. boulandi* :

Comment expliquer les variations de succès de *L. boulandi* sur ses hôtes ?

Stratégies de virulence des parasitoïdes de drosophiles

		Host: <i>D. melanogaster</i>		Host: <i>D. yakuba</i>	
		S line	R line	R ₁ line	R ₂ line
parasitoid: <i>L. boulandi</i> 	IS_m line "common type" (ref G431)	No encapsulation 	No encapsulation 	Encapsulation 	Encapsulation 
	IS_y line "atypical type" (ref G486)	No encapsulation 	Encapsulation 	No encapsulation 	Encapsulation 

Avant propos

L'issue de l'interaction entre une espèce parasite et une espèce hôte n'est pas immuable. Elle dépend de facteurs environnementaux (température, nutrition, présence d'organismes pathogènes, compétiteurs) qui influencent la condition physiologique des partenaires de l'interaction ainsi que de facteurs génétiques. Ces facteurs génétiques sont connus et étudiés dans de nombreux modèles parasite / hôte, mais étrangement, ils sont fortement négligés dans les modèles parasitoïde / hôte (*voir exposé bibliographique*). Combinant données bibliographiques et données expérimentales, cette thèse est probablement à ce jour l'étude la plus complète portant sur les bases génétiques, physiologiques et moléculaires des interactions spécifiques entre un parasitoïde et ses hôtes.

Dans la *1^{ère} partie* de la discussion, deux “types” sont définis chez le parasitoïde *L. boulandi* et les résultats principaux concernant le comportement de sélection d'hôte et les stratégies de virulence de ces deux types, IS_m et IS_y , par rapport aux espèces hôtes *D. melanogaster* et *D. yakuba* sont résumés. Les hypothèses concernant les mécanismes comportementaux ou physiologiques mis en jeu dans ces stratégies sont évoquées, puis les bases physiologiques, génétiques et moléculaires à l'origine de la variation de succès de *L. boulandi* sur ses hôtes résumées. Les stratégies de virulence des parasitoïdes de drosophiles sont comparées dans une *2^{nde} partie* afin de mettre en évidence certaines similitudes et d'éventuelles convergences évolutives.

I INTERACTIONS *L. BOULARDI* - *DROSOPHILES* : RÉINTERPRÉTATION DE LA MATRICE D'INTERACTIONS

I.1 Les “types” IS_m et IS_y

Le succès de *L. bouleardi* semble en majeure partie attribuable à son niveau de virulence vis à vis de l'espèce hôte concernée (Dupas *et al.*, 2002). Vis à vis de *D. melanogaster*, cette virulence est élevée dans la majorité des populations naturelles. Seules 2 populations, originaires d'Afrique tropicale, ont une virulence faible vis à vis de cet hôte (Dupas et Boscaro, 1999 ; Dupas *et al.*, 2002). Vis à vis de *D. yakuba*, la répartition de la virulence suit quasiment un patron inverse. En effet, toutes les populations fortement virulentes sur *D. melanogaster* sont complètement “avirulentes” vis à vis de *D. yakuba*. L'une des 2 populations africaines avirulentes sur *D. melanogaster*, originaire du Congo, est majoritairement virulente sur *D. yakuba*, mais l'autre, originaire de Côte d'Ivoire, est essentiellement avirulente sur *D. yakuba*.

Suivant ces patrons de virulence, 2 types de parasitoïdes peuvent être définis :

- “**Type IS_m**” : Type “commun”, trouvé dans la majorité des populations. Les souches de ce type sont hautement virulentes sur *D. melanogaster* et complètement avirulentes sur *D. yakuba*. Les profils protéiques des glandes à venin (contenant les facteurs responsables de la virulence) de plusieurs souches de ce type, issues de populations d'origine géographique variée, ayant été décrits comme comparables à ceux de la lignée IS_m, cette lignée peut être considérée comme “représentative” du “type IS_m” de *L. bouleardi* (Labrosse *et al.*, 2005b).

- “**Type IS_y**” : Type “atypique”, trouvé à ce jour uniquement dans la région de Brazzaville, au Congo. La lignée IS_y est actuellement la seule lignée représentative de ce type caractérisée. Le succès des parasitoïdes de ce type sur les hôtes *D. melanogaster* et *D. yakuba* est sous la dépendance du caractère résistant ou sensible de ces hôtes, défini par leur génotype. J'ai cherché au cours de ma thèse à obtenir d'autres lignées de parasitoïdes en provenance de Brazzaville. Malheureusement, aucun des parasitoïdes ayant émergé des drosophiles récoltées ne correspondait après identification à l'espèce *L. bouleardi*.

(NB: La majorité des individus de la population ivoirienne n'appartient apparemment à aucune de ces catégories)

La distinction du type IS_y par rapport au type commun ne se limite pas à ses capacités de virulence. La lignée IS_y se distingue des autres lignées par des différences morphologiques et est génétiquement différenciée par rapport aux autres lignées de l'espèce *L. bouleardi* (Nordlander, 1980 ;

Allemand *et al.*, 2002) (Figure 56). Enfin, les croisements de mâles de cette lignée avec des femelles d'une lignée Guadeloupéenne ont fourni une descendance constituée de 80% de mâles en 2^e génération¹, ce qui pourrait suggérer la mise en place d'un isolement reproducteur partiel entre ces 2 lignées (Carton et Claret, 1982 ; Allemand *et al.*, 2002). Le statut de race ou de sous-espèce de cette lignée ne sera pas discuté ici, mais les différences de stratégies mises en évidence entre les types IS_m et IS_y (listées ci-dessous) pourraient avoir contribué à la différenciation du type IS_y, ou au contraire avoir été facilitées par cette différenciation.

1.2 Type IS_m : Succès “espèce-hôte dépendant”

Les populations du type IS_m proviennent de régions où *D. melanogaster* et/ou *D. simulans* sont les seules espèces hôtes disponibles (Tableau 7 p73). Dans l'oasis de Nasrallah (Tunisie) par exemple, d'où la lignée IS_m est issue, *D. melanogaster* est l'hôte principal de *L. bouhardi*, à l'exception de quelques mois par an où *D. simulans* est plus abondante que *D. melanogaster* (Carton et Nappi, 1991). Dans ces conditions de relative stabilité, les modèles théoriques prédisent que le parasitoïde devrait avoir tendance à se spécialiser sur l'hôte le plus fréquent, ici *D. melanogaster* (Lapchin, 2002). L'ensemble des données obtenues à ce jour suggère que cette lignée est effectivement spécialisée sur *D. melanogaster*.

1.2.1 Sélection d'hôte chez IS_m : préférence pour *D. melanogaster* ?

- *D. melanogaster* est l'hôte “préféré”

D'un point de vue comportemental, il a été mis en évidence qu'en situation de choix entre *D. melanogaster* et *D. simulans*, les femelles *L. bouhardi* de la lignée IS_m infestent préférentiellement les larves de *D. melanogaster*, dans lesquelles leurs œufs sont moins fréquemment encapsulés (Rouault, 1979). En situation de choix entre des larves de *D. melanogaster* et de *D. yakuba*, espèce hôte qui ne vit pas en Tunisie et qui encapsule fortement les œufs de cette lignée, une nette préférence pour *D. melanogaster* s'observe également, ce qui tend à indiquer une spécialisation comportementale pour *D. melanogaster* (*Chapitre 1*). Les données obtenues sur le comportement de sélection des femelles *L. bouhardi* indiquent cependant que cette préférence n'existe pas au début de l'exploitation du patch d'hôte mais qu'au fur et à mesure des rencontres, leur comportement change vis à vis de l'espèce hôte la moins préférée qui est alors de plus en plus rejetée. Cette stratégie comportementale de l'espèce *L. bouhardi* pourrait ainsi être considérée comme “opportuniste”.

¹ Le déterminisme du sexe est particulier chez les hyménoptères: les femelles sont obtenues lorsque les œufs sont fécondés (femelles 2n) alors que les mâles sont produits par des œufs non fécondés (males n). Un sex-ratio biaisé en faveur des mâles indique une forte proportion d'œufs non fécondés chez ces espèces et donc la présence potentielle d'un isolement reproducteur.

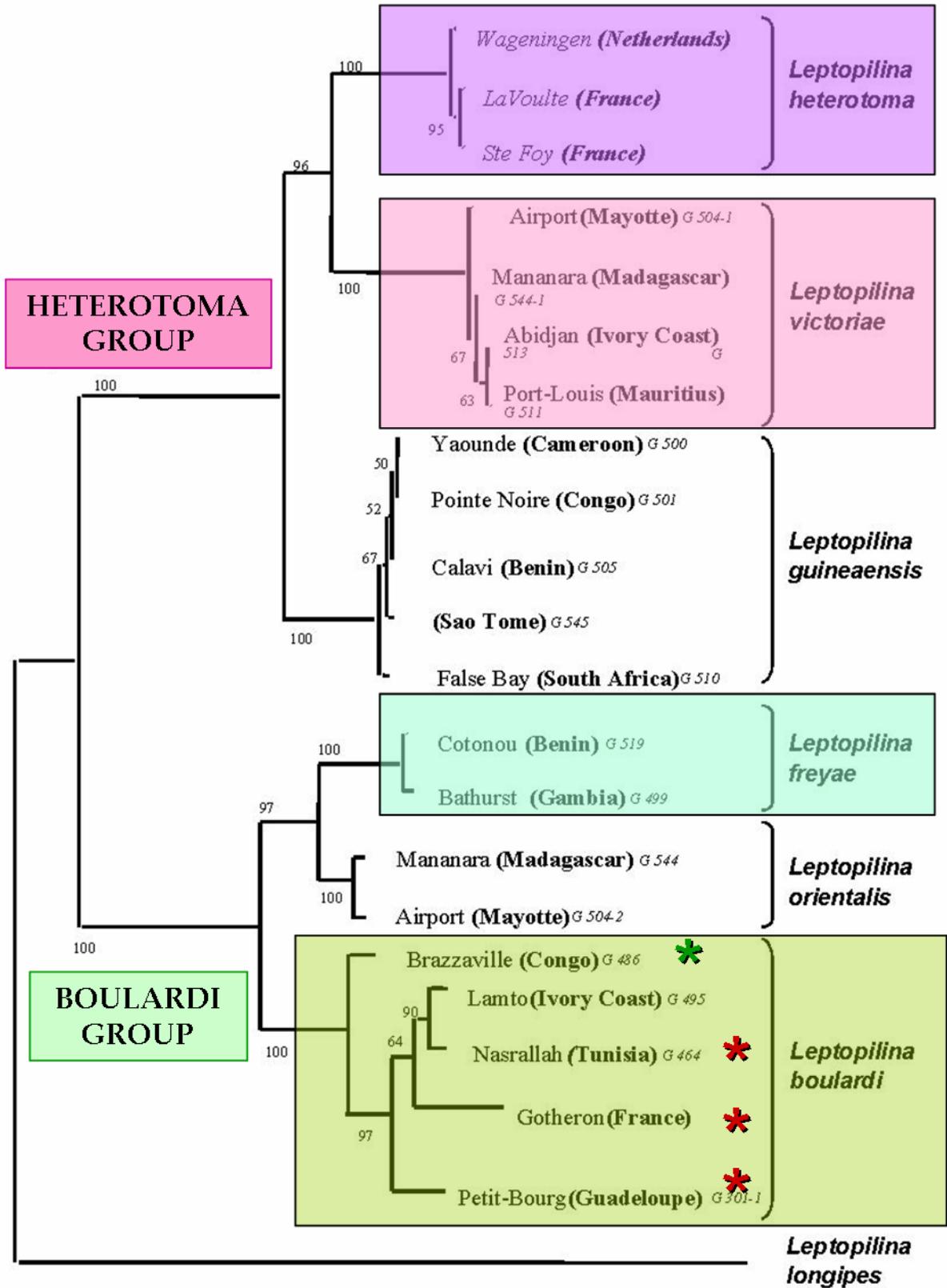


Figure 56 : Phylogenetic tree inferred from the nucleotide sequences of the ITS2 region of the representatives strains of the six species of *Leptopilina* belonging to the *heterotoma* and *boulardi* groups. Bootstrap values are given above the branches that support clades.

Species that are studied for their virulence strategies are shown in boxes.

Green stars refer to parasitoids of the *IS_y* type and red stars refer to parasitoids of the *IS_m* type.

From Allemand et al. 2002

- *Une stratégie opportuniste ?*

Trois types de comportements de sélection d'hôtes sont définis par Vinson : les comportement **innés**, les comportements dus à **l'expérience** des femelles parasitoïdes (ou conditionnement α) et les comportements dus à un **apprentissage associatif** (ou conditionnement β) (Vinson, 1998). Les comportements innés correspondent aux comportements "spontanés" qu'on observe chez des femelles "naïves" (i.e. qui n'ont pas encore eu de contact suffisant avec le patch d'hôtes). L'expérience des femelles a pour conséquence d'améliorer leurs capacités de détection de certains signaux ou d'augmenter leurs préférences innées. L'apprentissage associatif est défini comme la réponse à un nouveau composé. Cet apprentissage est obtenu suite à l'association d'un composé reconnu de manière innée avec ce nouveau composé lors d'une expérience faisant intervenir les 2 composés simultanément. Ce deuxième type de conditionnement permet par exemple à des femelles parasitoïdes qui parasitent des hôtes en présence de certains fruits d'associer l'odeur des fruits avec une rencontre potentielle d'hôte (De Jong et Kaiser, 1991).

D'après les définitions énoncées ci-dessus, les préférences des femelles *L. bouvardi* ne semblent pas s'exprimer de façon innée, mais semblent nécessiter une certaine "expérience" (au sens de Vinson) sur le patch d'hôtes pour se manifester. Ainsi, à leur arrivée sur le patch d'hôte, les femelles *L. bouvardi* soit ne distinguent pas les 2 espèces hôtes, soit sont génétiquement programmées pour accepter tous les hôtes potentiels qu'elles rencontrent. Dans les 2 cas, les femelles *L. bouvardi* pourraient être qualifiées "d'opportunistes" (soit par ignorance, soit par "choix") puisqu'elles déposent leurs œufs dans des espèces hôtes qui ne seront pas forcément permissives au développement de cette descendance. Ce comportement donne le potentiel à l'espèce *L. bouvardi* de coloniser de nouvelles espèces hôtes, à condition que ces espèces hôtes soient au moins partiellement permissives au développement de la descendance considérée.

Le rejet de l'espèce hôte la moins préférée s'observe chez les femelles *L. bouvardi* après quelques rencontres avec les espèces hôtes présentes sur le patch. Ce changement de comportement pourrait être dû soit à l'augmentation de la sensibilité des femelles aux signaux émis par les larves hôtes les "moins préférées" soit à un changement d'intérêt des femelles vis à vis de l'espèce la moins préférée qui s'opère à mesure qu'elles gagnent de l'information sur la qualité de l'environnement (ici, présence de l'espèce hôte préférée). Dans le 1^{er} cas, le rejet des larves de l'espèce *D. yakuba* devrait être observé chez les femelles *L. bouvardi* de la lignée IS_m au bout d'un certain nombre de rencontres même en absence de larves de *D. melanogaster*, hypothèse qui pourra être testée.

1.2.2 Stratégie de virulence d'IS_m : spécifique de *D. melanogaster* ?

- Le succès de la lignée IS_m est “espèce spécifique”

Le succès de la lignée IS_m est élevé sur l'espèce hôte *D. melanogaster* quelle que soit la population considérée. En fait, aucune population de *D. melanogaster* “résistante” c'est-à-dire capable d'encapsuler les œufs de cette lignée de parasitoïde n'a été trouvée à ce jour (Carton, com. personnelle). La stratégie de virulence de IS_m vis à vis de *D. melanogaster* peut ainsi être qualifiée “d'universelle”, c'est à dire efficace quel que soit le génotype de la larve hôte considérée. L'absence de résistance chez l'hôte peut être due au fait que les cibles des facteurs de virulence impliqués sont monomorphes (absence de variabilité génétique permettant la sélection de la résistance), ou bien au fait que les variations d'une ou plusieurs cibles de ces facteurs ne sont pas suffisantes pour permettre la résistance (injection par le parasitoïde de facteurs de virulence multiples à cibles multiples, par exemple).

Le succès de la lignée IS_m est nul sur *D. yakuba* et ce quelle que soit la lignée hôte considérée. En effet, 99 ± 1 % des larves de toutes les souches hôtes testées jusqu'à présent encapsulent les œufs de cette lignée (*Chapitre 3*). La stratégie de virulence dont l'efficacité est “universelle” sur *D. melanogaster* est ainsi complètement inefficace sur *D. yakuba*. Les facteurs de virulence injectés par les femelles IS_m semblent donc spécifiques vis-à-vis de *D. melanogaster*, en étant, par exemple, incapables d'interagir avec leur cible chez *D. yakuba*, si elle diffère suffisamment de celle présente chez *D. melanogaster*.

- Les effets sur les lamellocytes sont spécifiques de *D. melanogaster*

L'un des effets majeurs de la lignée IS_m sur l'immunité de l'hôte *D. melanogaster* est la modification de la forme des lamellocytes, qui semble corrélée à leur incapacité à former une capsule (*voir p47-48 pour de plus amples informations*). Cette modification est observée dans les lignées sensibles et résistantes de *D. melanogaster* parasitées par la lignée IS_m (Russo *et al.*, 2001), mais n'est en revanche pas observée dans les lignées R₁ ou R₂ de *D. yakuba* suite au parasitisme (pour R₁ : voir *Chapitre 2*, pour R₂ : non présenté). La modification des lamellocytes semble donc à première vue assez bien corrélée à la réussite parasitaire de la lignée IS_m de *L. bouvardi* dans les espèces hôtes *D. melanogaster* et *D. yakuba*.

→ Et les autres espèces du sous-groupe *melanogaster* ?

D'autres espèces du sous-groupe *melanogaster* sont plus ou moins permissives au développement de la lignée IS_m ou de lignées du type IS_m (Carton et Kitano, 1981). Seules 10 à 30% des larves de *D. simulans*, par exemple, encapsulent les œufs de cette lignée (Rouault, 1979 ; Carton et Kitano, 1981 ; Carton et Nappi, 1991). Le test de l'existence d'un lien direct

entre le succès du type IS_m sur ces différentes espèces et la modification de la forme de leurs lamellocytes par les facteurs de virulence de cette lignée est en projet.

- *Rôle du facteur P4 dans le succès de la lignée IS_m*

Les facteurs contenus dans les glandes à venin, associées à l'appareil génital des femelles *L. bouvardi*, sont responsables de la modification de la forme des lamellocytes (Labrosse *et al.*, 2005a) (*voir p 47-49 pour détails*). L'un des facteurs majeurs contenus dans cette glande, la protéine **P4**, semble responsable de cette modification. Ce facteur a été identifié comme étant une protéine Rho-GAP (Labrosse *et al.*, 2005b).

Les Rho-GTPases, inactivées par les protéines Rho-GAP, sont connues pour réguler la dynamique du cytosquelette d'actine (Ridley, 2001). Des recherches ont été initiées afin de déterminer si la protéine P4 cible (directement ou indirectement) une Rho-GTPase impliquée dans la régulation du cytosquelette d'actine des lamellocytes de *D. melanogaster*, provoquant ainsi la modification de leur forme (Poirié, com. pers.). La cible du facteur P4 est notamment recherchée par la méthode du criblage de banque en double-hybride. De manière intéressante, le réarrangement du cytosquelette d'actine est perturbé dans les hémocytes des drosophiles mutantes pour la GTPase Rac2 de *D. melanogaster*. Ces mutants sont incapables d'encapsuler un œuf de parasitoïde dû à l'apparente inhibition des capacités des plasmatocytes et des lamellocytes à s'étaler à la surface de corps étrangers (Williams *et al.*, 2005). Ainsi, l'injection par le parasitoïde d'une protéine RhoGAP ciblant directement ou indirectement une GTPase telle que Rac2 ou Rac1 constitue une hypothèse de travail intéressante.

De même, un effet potentiel de la protéine P4 sur le bon fonctionnement de la protéine Rac2 pourrait aussi expliquer d'autres effets décrits lors du parasitisme. En effet, chez les mutants Rac2 de *D. melanogaster*, la mélanisation du corps étranger est inhibée (Williams *et al.*, 2005). Il est donc ainsi possible que l'inhibition de mélanisation des tumeurs observée chez les larves *D. melanogaster* de souches tumorales parasitées par la lignée IS_m puisse être due au moins partiellement à un effet de la protéine P4 sur le fonctionnement de la protéine Rac2.

➔ *La spécificité de la lignée IS_m: définie par l'interaction P4-cible ?*

Si le facteur P4 est bel et bien responsable de l'altération de la forme des lamellocytes, il pourrait être le facteur (ou l'un des facteurs majeurs) dont l'efficacité serait "universelle" sur *D. melanogaster* et nulle sur *D. yakuba*. L'étendue du spectre d'hôte de la lignée IS_m pourrait ainsi être conditionnée par "l'efficacité" du facteur P4 sur sa cible. Cette cible pourrait par exemple être monomorphe au sein de l'espèce *D. melanogaster* mais différer entre les espèces *D. melanogaster* et *D. yakuba*.

Par ailleurs, le succès relatif de la lignée IS_m sur certaines espèces du sous-groupe *melanogaster* pourrait être expliqué par la similitude de la cible du facteur P4 chez ces espèces phylogénétiquement proches de *D. melanogaster* (figure 57). Cette théorie pourrait être testée en rapprochant l'effet *in vitro* des extraits de glande à venin de la lignée IS_m sur la forme des lamellocytes de différentes espèces du sous-groupe *melanogaster* (projet décrit précédemment) de l'existence et de la variation de la cible de la protéine P4 dans ces différentes espèces.

I.3 Type IS_y : Succès “résistance de l'hôte dépendant”

La lignée IS_y est issue d'une population récoltée à Brazzaville, au Congo, où le nombre d'espèces de drosophiles est élevé (Vouidibio, 1985). L'espèce *D. melanogaster* est présente quasiment toute l'année, mais ses effectifs présentent de fortes fluctuations dans le temps et dans l'espace (Vouidibio, 1985). Ces conditions ne favorisent pas l'emploi d'une stratégie de spécialisation. En effet, si l'espèce hôte “préférée” est plus rare que les espèces hôtes alternatives, la fitness d'un parasitoïde est alors faible. Dans ce type d'environnement fluctuant, une stratégie plus généraliste, incluant une fitness élevée sur une espèce hôte “privilégiée” et une fitness non nulle sur une (ou des) espèce(s) “alternative(s)” est plutôt attendue (Lapchin, 2002).

Du point de vue de ses capacités de virulence, la lignée IS_y est effectivement moins spécifique que la lignée IS_m puisqu'elle peut en sus de l'espèce *D. melanogaster* infester avec succès l'espèce hôte *D. yakuba*, contrairement à la lignée IS_m. Les données dont nous disposons aujourd'hui ne nous permettent pas cependant de considérer une de ces 2 espèces hôtes comme espèce hôte “privilégiée”. En effet, le succès de la lignée IS_y sur *D. melanogaster* et *D. yakuba* est fortement conditionné par les capacités de résistance de ces espèces (Dupas *et al.*, 2002) (*Chapitre 3*). Comme nous ne connaissons pas le niveau de résistance des populations de *D. melanogaster* et *D. yakuba* de Brazzaville, ni les fluctuations temporelles potentielles de ces niveaux de résistance, il nous est impossible de prédire quelle est l'espèce hôte qui offre la meilleure fitness aux femelles de type IS_y.

I.3.1 Sélection d'hôte : des préférences moins marquées que chez IS_m

Les données obtenues au cours de ma thèse ont permis de mettre en évidence une différence de comportement de sélection d'hôte entre les lignées IS_m et IS_y qui pourrait être corrélée avec leurs capacités de virulence (*Chapitre 1*). En effet, alors que la lignée IS_m montre une préférence claire pour *D. melanogaster* en situation de choix, la lignée IS_y a des préférences moins marquées, ce qui suggèrerait une stratégie comportementale plus généraliste. En effet, après examen “externe” des larves, elle ne semble pas avoir de préférence d'hôte. C'est seulement après examen interne des larves (après introduction de son ovipositeur) que ses préférences s'expriment : sur ce critère, elle accepte plus volontiers de pondre un œuf dans les larves de

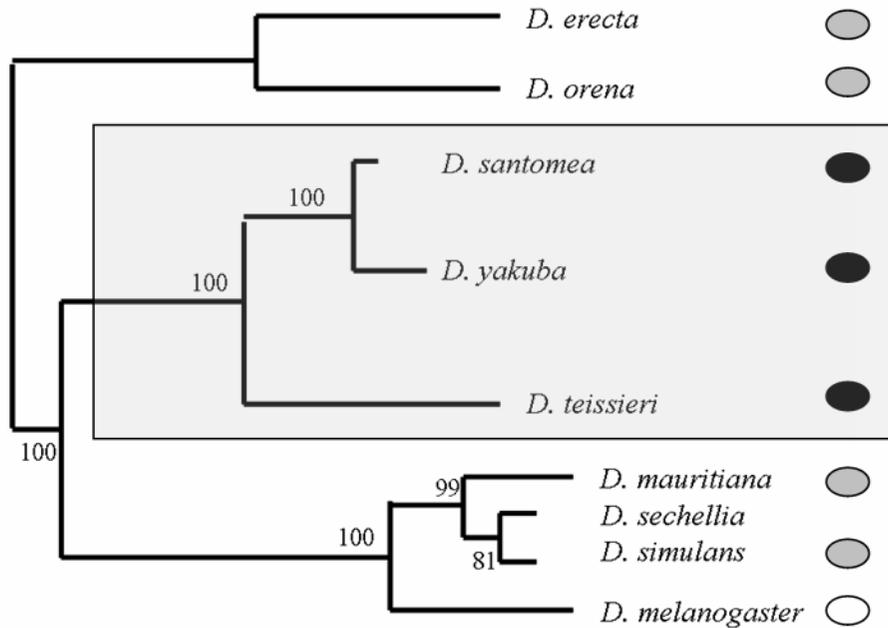


Figure 57 : Encapsulation rates of *Leptopilina boulardi* eggs of the “IS_m type” in different species of the *melanogaster* subgroup.

L. boulardi is able to escape encapsulation, at least in 50% of larvae in all the species of the *melanogaster* subgroup, except in the clade constituted by *D. santomea*, *D. yakuba* and *D. teissieri*, shown in the grey box. One hypothesis to explain this result could be that virulence factors of *L. boulardi* were initially efficient on the ancestor shared by all the species of the *melanogaster* subgroup. If the target of these virulence factors was modified during the differentiation of the *D. yakuba* clade, the virulence factors used by *L. boulardi* have become inefficient on these species.

Legend: white ellipse: less than 10% of encapsulation, grey ellipse: between 20 and 50% of encapsulation, black ellipse: more than 80% of encapsulation.

The phylogenetic tree used is from Lachaise *et al.* 2000. Encapsulation rates in all *Drosophila* species, except *D. santomea*, are from Carton and Kitano, 1981. Encapsulation rate in *D. santomea*: Carton, pers. communication.

l'espèce *D. yakuba* que dans celles de *D. melanogaster*. *D. yakuba* semble donc être l'espèce hôte "privilegiée" d'un point de vue comportemental, mais cette préférence est moins marquée que celle de IS_m vis à vis de *D. melanogaster* puisqu'elle ne s'exprime qu'après examen interne de la larve. La connaissance des conditions écologiques ayant pu favoriser un tel comportement dans la population dont la lignée IS_y est issue serait nécessaire pour expliquer la sélection de ce comportement.

- Mécanisme de distinction des espèces hôtes

Outre la démonstration de l'existence de variations intra spécifiques de comportement, les résultats obtenus soulèvent la question du mécanisme de distinction des espèces hôtes par les femelles *L. bouvardi*.

En effet, les préférences des femelles *L. bouvardi* peuvent s'exprimer après inspection externe de la larve, à la suite de laquelle la femelle peut décider d'introduire ou non son ovipositeur (lignée IS_m), et/ou après inspection interne de la larve, à la suite de laquelle la femelle peut décider de déposer un œuf ou non (lignées IS_m et IS_y). Ces données semblent indiquer que les femelles *L. bouvardi* emploient 2 types de signaux pour distinguer les 2 espèces hôtes *D. melanogaster* et *D. yakuba* : des signaux "externes" à la larve hôte et des signaux "internes".

Les **signaux externes** pourraient être constitués par les kairomones de contact qui recouvrent la surface des larves de drosophiles, et qui sont détectées par les femelles *L. bouvardi* (Vet *et al.*, 1993). Il a été démontré que les femelles *L. bouvardi* répondent aux kairomones de *D. simulans* et *D. melanogaster*, 2 espèces du sous-groupe *melanogaster*, mais pas aux kairomones de drosophiles phylogénétiquement plus éloignées (Vet *et al.*, 1993). Ces kairomones de contact, dont la nature est inconnue, pourraient être les signaux externes qui permettent aux femelles *L. bouvardi* de distinguer les deux espèces *D. melanogaster* et *D. yakuba*.

La nature des **signaux internes** qui permettent aux femelles *L. bouvardi* de distinguer les 2 espèces hôtes après introduction de l'ovipositeur demande à être précisée. Étrangement, la littérature concernant les signaux chimiques employés par les parasitoïdes pour distinguer les différentes espèces hôtes est abondante en ce qui concerne les odeurs volatiles, plus restreinte en ce qui concerne les kairomones de contact, et, à ma connaissance, absente en ce qui concerne les composés "internes". Cela vient sans doute du fait qu'intuitivement, on suppose que la reconnaissance de l'hôte uniquement au moyen de la détection de ce type de composés est si coûteuse en temps qu'elle n'est probablement pas employée par les parasitoïdes. Vinson avait émis l'hypothèse cependant que certains types de composés solubles, contenus dans l'hémolymphe, pouvaient être détectés grâce aux récepteurs localisés sur l'ovipositeur des femelles parasitoïdes (Vinson, 1991 ; Vinson, 1998). Jusqu'à présent, seule l'existence de composés de marquage internes, déposés par les femelles parasitoïdes elles-mêmes lors de la ponte pour indiquer leur "passage" à leurs congénères (et éviter le superparasitisme) a été mise en évidence (van Baaren et Boivin,

1998). Les résultats obtenus lors de ma thèse suggèrent l'existence de composés permettant à une femelle parasitoïde de distinguer 2 espèces hôtes phylogénétiquement proches, ce qui ouvre un champ d'investigation jusqu'alors inexploré.

1.3.2 Stratégie de virulence d' IS_y

- *Le succès de la lignée IS_y est "résistance de l'hôte dépendant"*

Le succès de la lignée IS_y est fortement dépendant du niveau de résistance de la larve infectée, que cette larve soit de l'espèce *D. melanogaster* ou *D. yakuba*. Cela suggère l'emploi d'une stratégie de virulence qu'on pourrait qualifier "de **conditionnelle**" vis à vis de chacune des 2 espèces, c'est à dire efficace à condition que l'hôte infesté n'aie pas certaines caractéristiques qui lui permettent de résister à cette stratégie.

- *Stratégie de virulence de la lignée IS_y sur *D. yakuba*.*

La stratégie de virulence permettant à la lignée IS_y d'échapper à l'encapsulation par la lignée R_1 de *D. yakuba* a été mise en évidence au cours de cette thèse (*Chapitre 2*). Cette stratégie consiste à inhiber de manière transitoire la capacité des larves à encapsuler grâce à l'action des venins qui sont injectés lors de l'oviposition (*Article 2*). Un effet de la lignée IS_y sur le nombre de plasmatocytes et de lamellocytes a aussi été mis en évidence. En effet, les larves infestées par la lignée IS_y présentent moins de plasmatocytes et de lamellocytes que les larves infestées par la lignée IS_m , ce qui traduit soit une surproduction d'hémocytes provoquée par la présence de facteurs éliciteurs chez la lignée avirulente IS_m , soit une prolifération cellulaire suite à l'infestation réduite ou retardée par l'effet des facteurs de virulence de la lignée IS_y , ou encore une destruction de ces hémocytes par les facteurs de virulence de la lignée IS_y (*Article 2*). Enfin, l'inhibition de l'activité PO par les facteurs contenus dans les venins de la lignée IS_y a été mise en évidence (*Chapitre 2, partie II*).

→ *Effets nécessaires mais non suffisants*

Les effets de la lignée IS_y sur le nombre d'hémocytes et sur l'activité PO ne sont pas spécifiques de la lignée R_1 de *D. yakuba*, puisqu'ils sont aussi observés chez la lignée R_2 (*Chapitre 3, partie II*). La lignée R_2 étant capable d'encapsuler les œufs de la lignée IS_y en dépit de ces effets, on peut alors considérer que ces effets ne sont pas *suffisants* pour protéger les œufs du parasitoïde IS_y de l'encapsulation. Ils peuvent être toutefois *nécessaires* puisque les œufs de la lignée IS_m , qui ne provoque pas ces effets, sont encapsulés par les lignées R_1 et R_2 .

Les bases physiologiques de la différence de résistance entre les lignées R_1 et R_2 restent obscures, mais ne correspondent pas à une différence d'immunocompétence des larves. Au temps post-parasitisme

testé, il n'existe également aucune différence de sensibilité aux effets connus de la lignée IS_y (*Chapitre 3, partie II*). D'autres mesures, tenant compte de la dynamique d'encapsulation seront nécessaires à la compréhension du mécanisme de résistance.

- *Stratégie de virulence de la lignée IS_y sur D. melanogaster :*

Le succès de la lignée IS_y sur les souches sensibles (S) de *D. melanogaster* est encore mal connu. On sait que cette lignée n'induit pas de modification des lamellocytes contrairement à la lignée IS_m (en accord avec la quantité extrêmement réduite de facteur P4 injecté) ni de diminution du nombre de lamellocytes ou de plasmatocytes par rapport au larves non parasitées (Russo *et al.*, 2001 ; Labrosse *et al.*, 2005a). Cependant, la lignée IS_y induisant un certain nombre d'effets sur l'immunité de *D. yakuba* (*Chapitre 2*), comme l'inhibition de l'activité PO, on peut supposer qu'elle induise aussi certains effets, encore à caractériser, chez les larves de la lignée S de *D. melanogaster*.

→ *la lignée IS_y (G486) n'est sans doute pas un corps neutre dans D. melanogaster*

Sous l'hypothèse précédente, la lignée IS_y pourrait induire des effets sur certains composants de l'immunité des larves de *D. melanogaster*. De la même façon que chez *D. yakuba*, ces effets pourraient être *suffisants* pour empêcher l'encapsulation des œufs dans les larves sensibles, mais pas chez les larves résistantes.

Si cette hypothèse se vérifie, de nombreuses études réalisées jusqu'à présent sur l'immunité de *D. melanogaster* devront être reconsidérées. En effet, le suivi des différentes étapes de l'encapsulation ou la caractérisation de certains mutants vis à vis de leur capacité à encapsuler ont souvent été effectués à l'aide d'œufs de la lignée IS_y de *L. bouvardi* (appelée souche "avirulente" G486) "injectés" directement par les femelles (De Gregorio *et al.*, 2002a ; Sorrentino *et al.*, 2002 ; Sorrentino *et al.*, 2004 ; Williams *et al.*, 2005). Si le parasitoïde IS_y induit différents effets sur l'immunité de son hôte, la dynamique d'encapsulation pourrait être faussée (puisque retardée par exemple) ou l'importance de certains gènes au cours de l'encapsulation mal interprétée. On pourrait imaginer par exemple que l'absence d'encapsulation d'un œuf de la lignée IS_y chez un mutant soit due, non pas à la mutation seule, mais à l'action conjointe des effets de la mutation qui "complète" les effets immunosuppresseurs du parasitoïde.

→ *Étude de la stratégie de virulence de IS_y sur D. melanogaster*

L'étude de cette stratégie de virulence était jusqu'à présent difficilement réalisable. En effet, les drosophiles étant de petits hôtes, l'injection de billes de chromatographie, couramment employée chez les lépidoptères, est compliquée, voire impossible. Les approches comparatives

(comparaison des effets d'un parasitoïde virulent avec ceux d'un parasitoïde avirulent), parfois employées pour caractériser la stratégie de virulence des parasitoïdes de drosophile était de même impossible puisque les deux lignées de parasitoïdes parviennent à échapper à l'encapsulement dans des larves sensibles S de *D. melanogaster*. Cette étude est maintenant possible grâce à la mise au point de 2 techniques:

- injection de gouttes d'huiles, qui font alors office de "parasitoïdes avirulents" dans le corps des larves de drosophiles (technique mise au point par G. Doury, Université d'Amiens). L'effet de la lignée IS_y sur les capacités d'encapsulement des larves de la lignée S pourra par exemple être observé afin de savoir si une immunoévasion locale ou une immunosuppression systémique sont induites.

- mesure des effets des venins sur l'activité PO des larves de drosophile (technique employée chez de nombreux invertébrés qui a été adaptée au modèle biologique durant ma thèse). Elle permettra de déterminer si les facteurs contenus dans les glandes à venin de la lignée IS_y peuvent inhiber l'activité PO de *D. melanogaster*.

- *Rôle potentiel des serpinés dans le succès de la lignée IS_y*

Les facteurs contenus dans les glandes à venin des femelles IS_y induisent l'inhibition de l'activité PO des larves de *D. yakuba* (*Chapitre 2, Partie II et Chapitre 3, partie II*). Cette inhibition pourrait être à l'origine de l'inhibition transitoire des capacités des larves R₁ à encapsuler, puisque comme décrit tout au long de ce manuscrit, l'encapsulement est fortement dépendant du bon fonctionnement de la cascade PO (*Exposé bibliographique p18 & Chapitre 2 partie II*).

Une (ou des) serpine(s) a été mise en évidence dans les glandes à venin des femelles IS_y (*Chapitre 2, Partie III*). Les serpinés sont des inhibiteurs de protéases à sérine, connus notamment pour être impliqués dans la régulation de l'activation de la cascade PO (Kanost, 1999 ; De Gregorio *et al.*, 2002a). Les serpinés des glandes à venin des femelles IS_y pourraient donc être impliqués dans l'inhibition de l'activité PO des larves de *D. yakuba* et constituer des facteurs de virulence majeurs. Des travaux sont actuellement en cours afin de produire ces facteurs et tester leur rôle dans l'inhibition de l'activité PO et de l'encapsulement.

→ *Une certaine spécificité définie par l'interaction serpine-cible ?*

L'action des serpinés est connue pour être spécifique d'un spectre restreint de protéases (*Exposé bibliographique p22*). Cette spécificité est due aux différences observées dans la région C-terminale des serpinés (la région RSL en particulier) qui interagit avec le site actif des protéases à sérine qu'elles inhibent (Figure 52). Une différence dans le site actif de la protéase à sérine pourrait ainsi empêcher l'action inhibitrice de la serpine correspondante. La spécificité d'action d'une serpine serait ainsi

conditionnée par le polymorphisme existant dans la région du site actif de la protéase-cible.

Un des projets à venir est de tester l'effet du venin des femelles IS_y sur d'autres espèces de drosophiles, à commencer par *D. melanogaster*, afin de savoir si l'inhibition de PO est spécifique ou non de *D. yakuba*, et déterminer si le taux d'inhibition a un lien avec une variation de séquence du site actif de la protéase cible.

→ Serpines chez la lignée IS_m ?

Une serpine a également été mise en évidence par RT-PCR dans les glandes à venin des femelles IS_m. Sa séquence est différente de celle mise en évidence dans les glandes des femelles IS_y, ce qui pourrait suggérer une protéase-cible différente. Si cette serpine est la seule qui soit contenue dans ces venins, cette différence de séquence pourrait expliquer l'inefficacité des venins de la lignée IS_m à inhiber l'activité PO des larves de *D. yakuba* (*Chapitre 2, Partie II*).

Ces résultats ne sont cependant pas exhaustifs et nous ne savons pas pour l'instant dans quelle mesure la (ou les) serpines contenues dans les glandes à venin des femelles *L. bouhardi* sont similaires ou différentes et dans quelle mesure elle pourraient conditionner leur réussite parasitaire.

I.4 **Bilan 1 : Variation intra-spécifique de stratégie parasitaire**

L'ensemble de ces résultats démontre que les adaptations employées par les lignées IS_m et IS_y pour réussir le parasitisme sont globalement assez différentes. Ce résultat est en lui-même exceptionnel puisqu'il s'agit d'une première description de variation intra-spécifique de stratégie parasitaire.

La quasi totalité des études menées jusqu'à présent sur les interactions hôte/parasitoïdes ont considéré les espèces de l'interaction comme des entités immuables, les populations d'une même espèce provenant de régions différentes (lesquelles sont d'ailleurs rarement précisées dans les publications) étant considérées comme équivalentes. Pourtant, plusieurs populations d'une espèce de parasitoïde peuvent présenter un comportement ou une virulence vis à vis d'une espèce hôte très différent. Parmi les rares exemples trouvés dans la littérature, on trouve bien entendu les parasitoïdes de drosophiles *Asobara tabida* et *Leptopilina bouhardi*, largement cités dans cette thèse, mais aussi des parasitoïdes employés en lutte biologique, comme les braconidés *Microctonus aethiopoides* (Sundaralingam *et al.*, 2001), *Agathis* n. sp. (Althoff et Thompson, 2001) ou *Cotesia sesamiae*, dont le polymorphisme de virulence est actuellement en cours l'étude (Gitau et Dupas, com. personnelle) (Ngi-Song *et al.*, 1998 ; Mochiah *et al.*, 2001 ; Chinwada *et al.*, 2003).

Ces variations géographiques peuvent être de la plus grande importance dans l'évolution des parasitoïdes puisqu'elles peuvent refléter les différences de nature et/ou d'intensité de la sélection exercées par leurs hôtes

(Thompson, 1994, 1999). En effet, les pressions de sélection qui peuvent façonner l'évolution d'un parasitoïde de large distribution géographique comme *L. boulandi* peuvent être de nature et/ou d'intensité extrêmement variables d'une région à l'autre. En Tunisie par exemple, d'où la lignée IS_m est issue, nous avons vu que l'accès à *D. melanogaster* était relativement stable au cours de l'année tandis qu'au Congo, d'où la lignée IS_y est issue, le nombre d'hôtes potentiel est plus élevé et les fluctuations saisonnières des effectifs de *D. melanogaster* importantes, ce qui pourrait favoriser des stratégies d'exploitation des hôtes très différentes (Lapchin, 2002).

I.5 Bilan 2 : Comment expliquer les variations de succès de *L. boulandi* sur *D. melanogaster* et *D. yakuba* ?

Nous avons maintenant une bonne connaissance des facteurs physiologiques, génétiques et parfois moléculaires qui participent à la variation de succès de *L. boulandi* sur les espèces hôtes *D. melanogaster* et *D. yakuba*. Plusieurs facteurs interviennent: les capacités de virulence de la lignée de parasitoïde considérée, l'espèce hôte infestée et le génotype de la larve hôte. L'ensemble des connaissances acquises sur ce modèle biologique est résumé dans la figure 58.

I.5.1 Variation de virulence

Les capacités des femelles *L. boulandi* à empêcher l'encapsulation de leurs œufs par le système immunitaire de la larve qu'elles infestent est avant tout dépendant de leur génotype, qui définit à la fois leur potentiel à infester différentes espèces hôtes et l'efficacité avec laquelle elles vont altérer la réponse immunitaire de leurs hôtes. La virulence de *L. boulandi* vis à vis des 2 espèces *D. melanogaster* et *D. yakuba* est ainsi contrôlée par un système génétique simple, faisant intervenir un locus diallélique par espèce hôte (Dupas *et al.*, 1998 ; Dupas et Carton, 1999). Le locus IS_m (pour Immunosuppression de *D. melanogaster*) détermine la virulence vis à vis de *D. melanogaster* tandis que le locus IS_y (pour Immunosuppression de *D. yakuba*) détermine la virulence vis à vis de *D. yakuba*.

Le génotype des parasitoïdes *L. boulandi* est lui-même la résultante des diverses adaptations de la population de parasitoïde à son environnement, dans lequel les hôtes prennent une place prépondérante. Les contraintes évolutives exercées par les différentes espèces hôtes sur l'évolution de la virulence de *L. boulandi* (et des parasitoïdes en général) sont mal connues, mais il apparaît que la virulence vis à vis d'une espèce hôte n'existe que là où elle peut effectivement être utile. La virulence vis à vis de *D. yakuba* par exemple n'est pas observée dans les populations méditerranéennes qui ne rencontrent jamais *D. yakuba* (Dupas et Boscaro, 1999). En revanche, la présence d'une espèce hôte n'assure pas l'existence

		Host: <i>D. melanogaster</i>		Host: <i>D. yakuba</i>	
		S line	R line	R ₁ line	R ₂ line
parasitoid: <i>L. bouhardi</i> 	IS_m line "common type" (ref G431)	No encapsulation 	No encapsulation 	Encapsulation 	Encapsulation 
	IS_y line "atypical type" (ref G486)	No encapsulation 	Encapsulation 	No encapsulation 	Encapsulation 

Figure 58 : Short review of physiological differences that may contribute to the variation of success of *Leptopilina bouhardi* in the host species *D. melanogaster* and *D. yakuba*. The different loci that are involved in this variation are also given. There is no demonstrated link between genetic and physiological variations at present.

Variation of virulence

A. in *D. melanogaster* : Effect on lamellocytes (morphology and number). ^α

The P4 factor is involved in the modification of the lamellocyte morphology. The amount of this factor is high in IS_m venom glands but low in the IS_y line. ^β

No data available on the molecular factor(s) responsible of the effects on the lamellocytes number.

Genetics: biallelic locus, named *IS_m*. The *IS_m⁺* allele, responsible of virulence, is semi-dominant. ^γ

B. in *D. yakuba* : Effect on the number of haemocytes (lamellocytes and plasmatocytes) ^(2, 1) and on the PO activity ^(2, II)

No data available on the molecular factor(s) responsible of the effects on the number of haemocytes (lamellocytes and plasmatocytes).

A serpin, found in IS_y venom glands may be involved in the effects on PO activity. A serpin is also found in IS_m venom glands but there is a significant sequence variation between the serpins of the two lines. Differences in serpins might explain the difference in *D. yakuba* PO inhibition by IS_m and IS_y venom gland contents. ^(2, III)

Genetics: biallelic locus, named *IS_y*. The *IS_y⁺* allele, responsible of virulence, is recessive. ^δ

Host species specificity (for the IS_m line)

C. Effect on the lamellocyte morphology ^(2, 1)

Effects on the lamellocyte morphology are observed in *D. melanogaster* but never in *D. yakuba*. ^(2, 1)

Variation of resistance (against the IS_y line only)

Susceptible lines in both species are equally immunocompetent than resistant lines, that are able encapsulate the IS_y eggs ^(3, II)

D. In *D. melanogaster* : Haemocytic proliferation occurring earlier in the resistant line ? ^α

Genetics: biallelic locus, named *Rlb*. The *Rlb⁺* allele, responsible of resistance, is dominant. ^ε

E. In *D. yakuba* : unknown mechanism ^(3, II)

Genetics: biallelic locus, named *Rlb_{IS_y}*. The *Rlb_{IS_y}⁺* allele, responsible of resistance, is dominant. ^(3, 1)

References

^α (Russo *et al.*, 2001) ; ^β (Labrosse *et al.*, 2005b) ; ^γ (Dupas *et al.*, 1998) ; ^δ (Dupas et Carton, 1999) ; ^ε (Carton *et al.*, 1992) ; ^(2, 1) Chapter 2, Article 2 ; ^(2, 11) Chapter 2, Part II ; ^(2, III) Chapter 2, Part III ; ^(3, 1) Chapter 3, Article 3 ; ^(3, II) Chapter 3, Part II

d'adaptations pour cette espèce chez la population de parasitoïde, comme c'est le cas pour la population ivoirienne de *L. boulandi* qui n'est pas virulente sur *D. yakuba* malgré la présence de cet hôte dans ce pays.

Différents effets sur la physiologie de l'hôte semblent être responsables des variations de virulence. Chez l'hôte *D. melanogaster*, une différence d'effets sur les lamellocytes (nombre et morphologie) semble être à l'origine des différences de virulence entre les différentes lignées de *L. boulandi* (Russo *et al.*, 2001). Chez l'hôte *D. yakuba*, il s'agirait d'un effet sur le nombre de plasmocytes et de lamellocytes et d'un effet sur l'activité PO (*Chapitre 2, Partie II*). Il est possible que d'autres effets, pour l'instant non caractérisés, puissent aussi intervenir dans cette variation.

Les venins injectés lors de l'oviposition joueraient dans les 2 cas un rôle prépondérant dans la mise en échec de la réponse immunitaire des hôtes (Labrosse *et al.*, 2003) (*Chapitre 2, Article 2*). Les différences relevées dans les profils protéiques de ces venins pourraient expliquer ainsi en grande partie les différences de succès des lignées de parasitoïdes (Labrosse *et al.*, 2005b) (*Chapitre 2, Partie III*).

Le facteur P4 semble être l'un des acteurs principaux de la variation de virulence de *L. boulandi* dans l'hôte *D. melanogaster*. Ce facteur, à l'origine des modifications de la forme des lamellocytes, est présent en grande quantité dans les glandes à venin des femelles IS_m mais très faiblement présent dans celles des femelles IS_y (Labrosse *et al.*, 2005a, Poirié, com. pers.). D'autres facteurs, impliqués par exemple dans l'effet sur le nombre de lamellocytes, pourraient également intervenir.

La variation de virulence vis à vis de l'hôte *D. yakuba* pourrait s'expliquer en partie par la présence de formes différentes de serpine dans les glandes à venin des 2 lignées de parasitoïdes (*Chapitre 2, Partie II*). La serpine présente chez la lignée IS_y serait à l'origine de l'inhibition *in vitro* de PO observée en présence de venins, tandis que la forme de serpine présente dans le venin de la lignée IS_m serait inefficace contre la cascade PO de *D. yakuba* (mais pourrait être efficace par exemple chez *D. melanogaster*). D'autres facteurs, impliqués dans l'effet sur le nombre d'hémocytes, pourraient également intervenir.

L'ensemble des données obtenues à ce jour semble donc suggérer que l'essentiel de la variation de virulence de *L. boulandi* sur les espèces *D. melanogaster* et *D. yakuba* pourrait s'expliquer par les différents facteurs de virulence contenus dans les venins des femelles. Il reste maintenant à déterminer si un lien direct entre le déterminisme génétique de la virulence vis à vis de ces 2 hôtes (loci IS_m et IS_y) et les facteurs caractérisés (ainsi que leurs effets) peut être établi.

1.5.2 Spécificité d'hôte (lignée IS_m)

Le succès de la lignée IS_m de *L. boulardi* est défini par l'espèce hôte qui est infestée. De manière intéressante, la modification de la forme des lamellocytes est observée chez les lignées sensibles et résistantes de *D. melanogaster* suite au parasitisme, mais jamais chez *D. yakuba* (**Chapitre 2, Article 2**). Des travaux sont en cours afin de déterminer si cette différence d'effets est directement liée à la spécificité d'action du facteur P4 (qui serait spécifique de *D. melanogaster*). Le succès de *L. boulardi* sur les différentes espèces hôtes pourrait ainsi être conditionné par la spécificité des facteurs de virulence injectés, qui définissent alors pour le parasitoïde le “champ des possibles”.

D'autres facteurs, tels que la serpine trouvée dans le venin de la lignée IS_m, pourraient aussi intervenir dans la variation de succès de *L. boulardi* dans les différentes espèces hôtes.

1.5.3 Variation de résistance

De manière intéressante, les variations de résistance ne concernent pas la lignée IS_m. En effet, il n'a jamais été trouvé jusqu'à présent de population de *D. melanogaster* qui soit résistante à la lignée IS_m, ni de population de *D. yakuba* sensible à l'attaque de ce type de lignée (Carton, com. pers., **Chapitre 3, Article 3**). Le type IS_m emploie donc des facteurs de virulence extrêmement efficaces sur l'hôte *D. melanogaster*, qu'on pourrait qualifier “d'universels” (qui inhibent efficacement l'encapsulation quelque soit le génotype de l'hôte). Ces facteurs sont par contre inefficaces contre *D. yakuba*, espèce hôte que la majorité des populations de *L. boulardi* n'ont jamais rencontrées et pour laquelle il n'y a pas eu d'adaptation possible.

Une variation de résistance est par contre observée vis à vis de la lignée IS_y, aussi bien chez *D. melanogaster* que chez *D. yakuba*. Elle ne semble dans aucune des 2 espèces imputable à une différence d'immunocompétence, contrairement à ce qui peut être observé vis à vis du parasitoïde *A. tabida* (Kraaijeveld *et al.*, 2001b ; Russo *et al.*, 2001) (**Chapitre 3, Partie II**).

Chez les 2 espèces hôtes, la résistance vis à vis de la lignée IS_y est due en premier lieu à l'absence de facteurs de virulence “universels” chez le parasitoïde. D'autres facteurs de virulence, aux effets plus modérés, sont toutefois présents chez cette lignée de parasitoïde, ce qui lui permet d'infester avec succès les larves “R₁” de *D. yakuba* et probablement les larves sensibles de *D. melanogaster*, mais ils ne sont pas “suffisants” vis à vis des larves résistantes. L'efficacité de cette stratégie de virulence peut donc être qualifiée de “conditionnelle”, puisque le succès de cette lignée est conditionné par le génotype des hôtes infestés.

Chez *D. melanogaster*, la variation de résistance pourrait être due à une prolifération cellulaire plus rapide chez les larves résistantes (Russo *et al.*, 2001). Un locus diallélique (appelé *Rlb*) détermine la capacité des larves à résister, mais aucun lien entre ce locus et cette prolifération n'a à ce jour été établi. Un locus diallélique, appelé *Rlb_{ISy}* détermine également la capacité des larves de *D. yakuba* à résister à la lignée IS_y, mais aucune des mesures effectuées à ce jour n'a permis de déterminer quelle pourrait être la cause de cette résistance (*Chapitre 3, Article 3 et Partie II*). Le lien possible entre le déterminisme génétique mis en évidence et une base physiologique est ainsi loin d'être établi chez cette espèce.



Le succès de *L. bouvardi* dans ses différentes espèces hôtes est donc régi par un ensemble d'interactions complexes entre des facteurs de virulence, dont l'efficacité peut être plus ou moins universelle, et des phénomènes de résistance qui sont encore relativement mal connus. L'ensemble est contrôlé par des interactions génétiques faisant appel à un déterminisme génétique simple, qui devra être relié à l'avenir aux variations physiologiques et moléculaires décrites.

II STRATÉGIES DE VIRULENCE DES PARASITOÏDES DE DROSOPHILES

Les drosophiles sont parasitées par plus de 40 espèces d'hyménoptères parasitoïdes, réparties dans 4 familles : les Braconidae, les Pteromalidae, les Figitidae et les Diapriidae (Carton *et al.*, 1986) (Figure 59). Tous les parasitoïdes de la famille des Braconidae et des Figitidae sont connus pour parasiter les stades larvaires de la drosophile. Ce sont également tous des endoparasitoïdes. Les œufs de ces parasitoïdes étant confrontés à un environnement similaire, il est intéressant de comparer les stratégies de virulence que ces espèces emploient pour éviter la réponse immunitaire de la drosophile. Ces stratégies sont elles très différentes, chaque espèce de parasitoïde employant une stratégie particulière, ou au contraire, assez similaires ? Dans ce deuxième cas de figure, les similitudes peuvent avoir 2 origines: soit ces stratégies sont des “caractères ancestraux”, hérités d'un ancêtre commun, soit elles reflètent des convergences évolutives résultantes de pressions de sélection similaires (nécessité de contourner le système immunitaire de la drosophile).

Les stratégies de virulence de quelques espèces appartenant aux genres *Asobara* (famille des Braconidae), *Leptopilina* et *Ganaspis* (famille des Figitidae) ont été étudiées. Les différents aspects de ces stratégies ont été décrits précisément dans la synthèse bibliographique de cette thèse. La présente partie de la discussion dresse un bilan concernant les connaissances acquises ou à acquérir chez ces espèces (Tableau 13).

II.1 Mécanisme général

La plupart des parasitoïdes de drosophile étudiés à ce jour altèrent la réponse immunitaire de leurs hôtes de manière systémique. Les figitidés *Ganaspis xanthopoda*, *Leptopilina heterotoma* et *Leptopilina victoriana* inhibent la formation de tumeurs chez des souches tumorales de *D. melanogaster*. De même, la lignée IS_m de *Leptopilina bouvardi* inhibe l'encapsulation des œufs de la lignée IS_y habituellement encapsulés par *D. melanogaster* et le braconidé *Asobara citri* inhibe l'encapsulation de gouttes de paraffine injectées dans ce même hôte (Nappi, 1975 ; Rizki *et al.*, 1990 ; Chiu *et al.*, 2000 ; Labrosse *et al.*, 2003 ; Moreau *et al.*, 2003 ; Morales *et al.*, 2005). Seul le braconidé *Asobara tabida* semble totalement échapper à cette généralité, puisque les œufs de ce parasitoïde sont protégés de manière locale par leur chorion adhésif, ce qui n'altère pas les capacités des larves de *D. melanogaster* à encapsuler une goutte de paraffine injectée (Moreau *et al.*, 2003). Le mécanisme employé par la lignée IS_y vis à vis de *D. yakuba* diffère également légèrement de celui des autres parasitoïdes, puisque l'altération des capacités à encapsuler n'est que transitoire (*Chapitre 2, Article 2*).

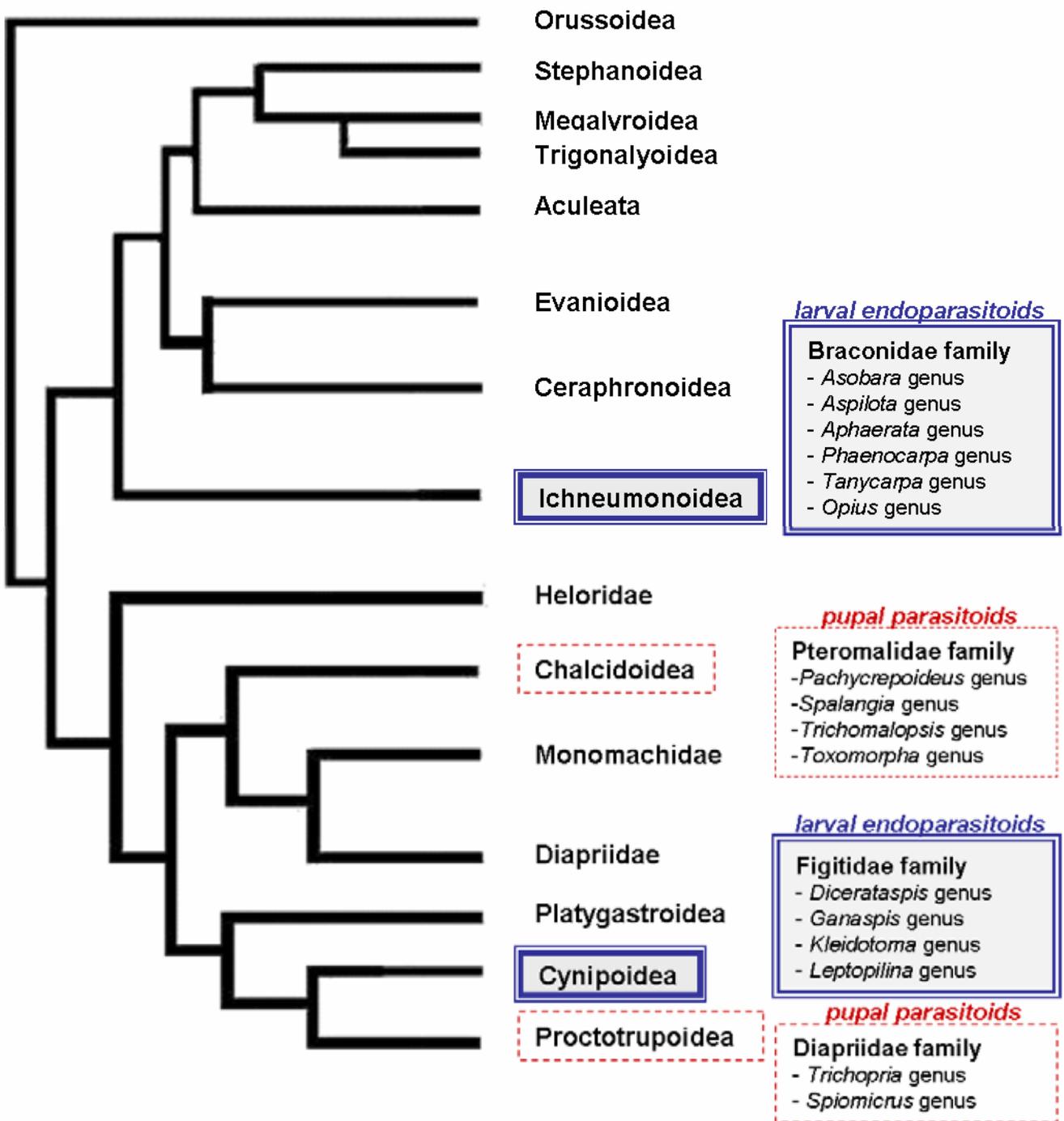


Figure 59 : Phylogenetic tree of different parasitoid superfamilies belonging to the Apocrita sub-order. Super-families where *Drosophila* parasitoids are found are framed and family and genus names of the different known species are listed.

All the listed species belonging to the Pteromalidae and Diapriidae families are pupal parasitoids (endo or ectoparasitoids), whereas all the listed species belonging to the Braconidae and Figitidae families are larval endoparasitoids.

Tree : Pennachio and Strand, 2006
List of Drosophila parasitoids : Carton et al. 1986

Family	Braconidae family		Figitidae family					
	Asobara genus		Ganaspis genus	heterotoma group		Leptopilina genus		
Genus								
Group								
Species	<i>A. tabida</i>	<i>A. citri</i>	<i>G. xanthopoda</i>	<i>L. heterotoma</i>	<i>L. victorinae</i>	<i>L. boulardi</i>		
Type						IS _m type	IS _y type (on the S line of <i>D. melanogaster</i>)	IS _y type (on the R ₁ line of <i>D. yakuba</i>)
General mechanism								
Systemic immunosuppression	no ^G	yes ^G	yes ^E	yes ^{A,B,C,F}	yes ^D	yes ^{H,I}		transient ^(I)
Local immunoevasion	yes ^G							yes ^(I)
Effects on the Total Haemocyte Count (THC) and on the haematopoietic organ								
Total Haemocyte Count (THC)	P ^R	↘ ^G		P↘ ^K		P=,N,O	P ^{N,O}	P↘ ^(I)
Disappearance of lymph glands	no ^G	yes ^G (necrosis)	yes ^E	yes ^{E,J} (tunnel+)	yes ^J (tunnel+)			
Effects on the lamellocytes								
Lamellocytes number	P ^R	↘ ^G		↘ ^{P,K,L}		P↘ ^{N,O}	P ^{N,O}	P↘ ^(I)
Lamellocytes morphology	normal ^S	normal ^G		altered ^{L,C,M}	altered ^D	altered ^{C,N, O}	Normal ^(N,O)	Normal ^(I)
Effects on phenoloxydase activity and melanisation								
PO activity	Inh ^Q	Inh ^G						Inh ^(II)
Melanisation						Inh ^H		Inh ^(II)

Table 13 : Comparison of virulence strategies used by different species to escape the *Drosophila* immune system. In the reported data, the host species is always *D. melanogaster*, except when specially mentioned.

Legends : P: haemocytic proliferation ; P↘: haemocytic proliferation but the number of haemocytes is less important than in larvae parasitized by a non virulent parasitoid ; P= : haemocytic proliferation, the number of haemocytes is similar than in larvae parasitized by a non virulent parasitoid ; ↘ : the number of haemocytes is reduced in comparison with unparasitized larvae ; Inh : inhibition

References : ^A(Nappi, 1975); ^B(Nappi, 1977); ^C(Rizki *et al.*, 1990); ^D(Morales *et al.*, 2005); ^E(Chiu *et al.*, 2000); ^F(Streams et Greenberg, 1969); ^G(Moreau *et al.*, 2003); ^H(Labrosse *et al.*, 2003); ^I(Nappi *et al.*, 2004); ^J(Chiu et Govind, 2002); ^K(Nappi et Streams, 1969); ^L(Rizki et Rizki, 1984); ^M(Rizki et Rizki, 1994); ^N(Russo *et al.*, 2001); ^O(Labrosse *et al.*, 2005); ^P(Walker, 1959); ^Q(Moreau *et al.*, 2000); ^R(Eslin et Prévost, 1998); ^S(Prévost *et al.*, 2005)

Ainsi, bien qu'une tendance générale à l'immunosuppression systémique soit observée, différentes stratégies peuvent être employées par des parasitoïdes appartenant au même genre (*A. citri*: systémique ; *A. tabida*: local), voire à la même espèce (*L. bouvardi* type IS_y: systémique transitoire, *L. bouvardi* type IS_m : systémique durable).

II.2 Effets sur le nombre total d'hémocytes et sur l'organe hématopoïétique

La prolifération hémocytaire est généralement observée suite au parasitisme. En effet, le nombre total d'hémocytes est plus élevé chez les larves de *D. melanogaster* parasitées par *A. tabida*, *L. heterotoma* ou *L. bouvardi* (type IS_m ou IS_y) et chez les larves de *D. yakuba* parasitées par la lignée IS_y de *L. bouvardi* (Eslin et Prévost, 1998 ; Russo *et al.*, 2001) (*Chapitre 2, Article 2*). Seul *A. citri* semble échapper à cette règle puisque les larves infestées par ce parasitoïde présentent un nombre d'hémocytes réduit par rapport aux larves non parasitées, ce qui a été interprété comme une absence de prolifération hémocytaire (Moreau *et al.*, 2003).

L'apparente absence de prolifération hémocytaire suite au parasitisme par *A. citri* pourrait être expliquée par l'altération de l'organe hématopoïétique, également observée après parasitisme par *G. xanthopoda*, *L. heterotoma* et *L. victoriae* (Chiu *et al.*, 2000 ; Chiu et Govind, 2002 ; Moreau *et al.*, 2003). Cependant, l'altération de l'organe hématopoïétique n'est pas forcément corrélée à l'inhibition totale de la prolifération cellulaire, puisque une atrophie complète de l'organe hématopoïétique a été observée chez les larves de *D. melanogaster* parasitées par *Leptopilina heterotoma* alors qu'une augmentation du nombre total d'hémocytes est tout de même observée (Nappi et Streams, 1969 ; Chiu et Govind, 2002). L'atrophie de cet organe pourrait toutefois limiter une partie de la prolifération cellulaire puisque le nombre d'hémocytes chez ces larves est tout de même réduit en comparaison avec les larves parasitées par le parasitoïde avirulent *Pseudocoila mellipes* (Nappi et Streams, 1969). Le moment auquel l'atrophie de l'organe hématopoïétique est induite pourrait par exemple expliquer la différence entre les effets d' *A. citri* et ceux de *L. heterotoma*. L'organe hématopoïétique étant aussi la cible de *G. xanthopoda* et *L. victoriae*, il serait intéressant de voir chez les larves de *D. melanogaster* parasitées par ces parasitoïdes si la prolifération hémocytaire est altérée de manière plus ou moins importante (Chiu *et al.*, 2000 ; Chiu et Govind, 2002). De même, le nombre d'hémocytes observé chez les larves de *D. yakuba* parasitées par la lignée IS_y de *L. bouvardi* étant moins important que chez les larves parasitées par la lignée avirulente IS_m (et réciproquement en ce qui concerne les lamellocytes chez les larves de *D. melanogaster*), il serait intéressant d'observer les effets éventuels du parasitisme par *L. bouvardi* sur l'organe hématopoïétique (*Chapitre 2, Article 2*).

Enfin, de manière intéressante, il semblerait que les mécanismes à l'origine de l'altération de l'organe hématopoïétique des larves de *D. melanogaster* par *A. citri* soient différents de ceux employés par

L. heterotoma et *L. victoriae*. En effet, les observations en microscopie suggèrent une nécrose dans le cas d'*A. citri* (Prévost *et al.*, 2005) tandis qu'un marquage Tunel positif est observé suite au parasitisme par *L. heterotoma* et *L. victoriae*, ce qui suggère un mécanisme d'apoptose (Chiu et Govind, 2002). Deux phénomènes *à priori* très différents pourraient donc être à l'origine de l'altération de l'organe hématopoïétique.

Des parasitoïdes appartenant à 2 familles distinctes (Braconidae et Figitidae) ciblent ainsi les même tissus chez l'hôte (organe hématopoïétique). Des mécanismes différents sont employés, mais ils semblent produire des effets similaires, à savoir la réduction de la prolifération cellulaire, voire sa suppression totale. Cette caractéristique suggère une convergence évolutive entre les stratégies employées par ces espèces.

II.3 Effets sur les lamellocytes

Les lamellocytes, qui sont les constituants majeurs de la capsule, sont de manière constante la cible des parasitoïdes de drosophiles qui emploient une stratégie d'immunosuppression systémique (tous ceux du tableau 13, à l'exception d'*A. tabida*). Leur nombre et/ou leur morphologie peut être altéré suite au parasitisme.

Chez les larves de drosophiles saines, le nombre de lamellocytes est très faible alors que normalement, il augmente considérablement chez les larves parasitées (Lanot *et al.*, 2001 ; Russo *et al.*, 2001 ; Sorrentino *et al.*, 2002 ; Márkus *et al.*, 2005). Chez les larves parasitées par *A. citri* ou *L. heterotoma*, le nombre de lamellocytes est toutefois inférieur au nombre de lamellocytes observé chez les larves saines. Cette diminution est interprétée pour *A. citri* par une absence de prolifération cellulaire (due à l'altération de l'organe hématopoïétique) et pour *L. heterotoma* comme une destruction massive de ces hémocytes, ce qui suggère ici aussi deux mécanismes différents pour un seul et même effet (Walker, 1959 ; Nappi et Streams, 1969 ; Rizki et Rizki, 1984 ; Moreau *et al.*, 2003). Enfin, le nombre de lamellocytes des larves de *D. melanogaster* et *D. yakuba* parasitées respectivement par la lignée IS_m et par la lignée IS_y de *L. bouvardi* est plus élevé que dans les larves saines (indiquant une prolifération cellulaire) mais est réduit en comparaison des larves parasitées par des parasitoïdes avirulents (Russo *et al.*, 2001 ; Labrosse *et al.*, 2005a) (*Chapitre 2, Article 2*). Le mécanisme à l'origine de ces effets reste à préciser, mais le venin est impliqué dans le cas des effets de la lignée IS_m.

Enfin, 3 espèces de parasitoïdes, toutes appartenant au genre *Leptopilina* induisent une modification de la forme des lamellocytes. Ces hémocytes, habituellement discoïdaux adoptent une forme bipolaire suite au parasitisme par (ou en présence du venin de) *L. heterotoma*, *L. victoriae* ou la lignée IS_m de *L. bouvardi* (Rizki et Rizki, 1984 ; Russo *et al.*, 2001 ; Labrosse *et al.*, 2005a ; Morales *et al.*, 2005 ; Chiu *et al.*, 2006). De manière intéressante, la lignée IS_y fait exception dans le genre *Leptopilina* puisqu'elle n'induit pas de modification de lamellocytes ni chez

D. melanogaster, ni chez *D. yakuba* (Russo *et al.*, 2001 ; Labrosse *et al.*, 2005a) (*Chapitre 2, Article 2*).

II.4 Effets sur la cascade PO et la mélanisation

Peu de données sont disponibles sur les effets des parasitoïdes de drosophiles sur l'activité PO de leurs hôtes. Cependant, des inhibitions ayant été mises en évidence dans tous les systèmes parasitoïdes/drosophiles étudiés, il semblerait que ce type d'effet soit très souvent employé par les parasitoïdes de drosophiles (Moreau *et al.*, 2000 ; Moreau *et al.*, 2003) (*Chapitre 2, Article 2*).

II.5 Bilan : diversité et similitudes de stratégies

Les stratégies de virulence de quelques parasitoïdes de drosophiles sont de mieux en mieux connues, en particulier chez les parasitoïdes du genre *Leptopilina*. Des zones d'ombre restent à éclaircir afin de pouvoir établir des comparaisons entre les différentes espèces du genre *Leptopilina*, mais il semble que certains aspects de la stratégie parasitaire soient relativement conservés dans ce genre (immunosuppression systémique, effet sur le nombre de lamellocytes, effet sur l'aspect des lamellocytes). Des recherches futures nous permettront de déterminer si l'atrophie de l'organe hématopoïétique et l'inhibition de la PO sont aussi conservées chez les différentes espèces du genre *Leptopilina*.

Les stratégies de virulence employées par les 2 lignées de *L. bouleardi* sont différentes (durée de l'immunosuppression systémique, effet sur le nombre total d'hémocytes, modification des lamellocytes suite au parasitisme) et de façon surprenante, plus éloignées que les stratégies employées par 2 espèces du même genre (*L. bouleardi* -type commun IS_m- et *L. heterotoma* par exemple). Cette différence tient peut être au fait que lorsqu'on compare les systèmes IS_m/*D. melanogaster* et IS_y/*D. yakuba*, ce sont à la fois les lignées de parasitoïdes et les espèces hôtes qui sont comparées. Ceci a sans doute pour conséquences d'ajouter, aux différences directement liées aux lignées de parasitoïde, des différences liées à l'hôte infesté. L'étude de la stratégie de virulence employée par la lignée IS_y pour éviter l'encapsulation de ses œufs par les souches sensibles de *D. melanogaster* pourrait permettre d'éliminer cet "effet hôte", en comparant les effets des lignées IS_m et IS_y sur le même hôte. Cet effet hôte, et donc la spécificité d'hôte des facteurs de virulence, pourra par ailleurs être caractérisé en comparant les stratégies de virulence employées par la lignée IS_y sur chacune des 2 espèces hôtes.

De grandes différences inter-spécifiques sont également observées dans le genre *Asobara*, puisqu' *A. citri* altère considérablement la réponse immunitaire de *D. melanogaster* tandis qu'*A. tabida* laisse la réponse immunitaire de son hôte globalement intacte (Prévost *et al.*, 2005). La stratégie d'*A. citri* est à ce titre plus proche de celle des figitidés (genres *Ganaspis* et *Leptopilina*) que de celle d'*A. tabida* qui appartient pourtant au

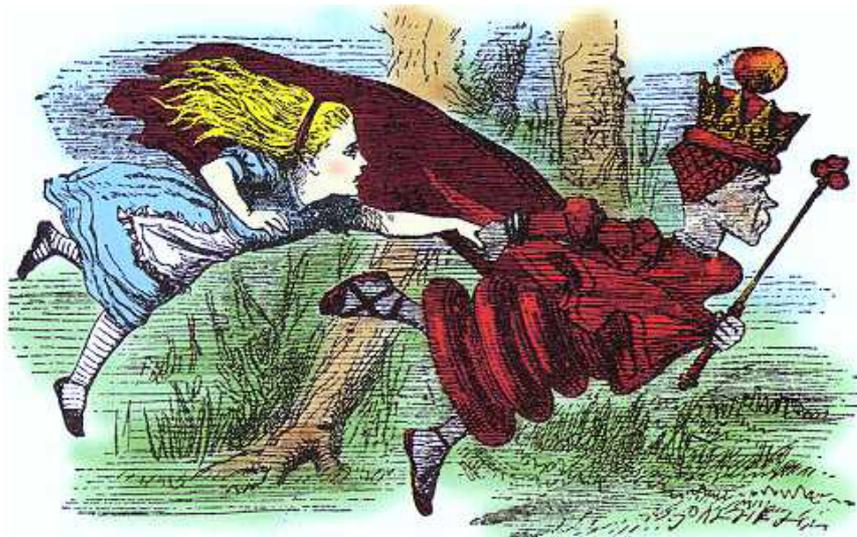
même genre. L'étude à venir des stratégies employées par d'autres espèces du genre *Asobara* devrait permettre de définir si la tendance générale des espèces de ce genre est plus proche de celle d'*A. citri* que d'*A. tabida*.

Les similitudes de stratégies de virulence observées entre différentes espèces appartenant à des genres, voire familles différentes suggèrent de fortes convergences évolutives chez les parasitoïdes de drosophiles. Tous les parasitoïdes étudiés parasitent la même espèce, *D. melanogaster*, à laquelle ils ont tous dû s'adapter d'une manière ou d'une autre. L'altération de certaines cibles (organe hématopoïétique, lamellocytes...) semble un moyen particulièrement efficace pour échapper à la réponse immunitaire des larves de drosophiles puisqu'elle est partagée par la plupart des espèces de parasitoïdes étudiées. Cependant, certaines espèces ou types, comme *A. tabida* ou la lignée IS_y de *L. boulandi*, emploient des stratégies différentes des autres, ce qui suggère une histoire évolutive particulière ayant conduit à l'émergence d'adaptations physiologiques "originales". Les causes évolutives ayant permis l'émergence de telles stratégies divergentes sont particulièrement intéressantes à rechercher. Leur étude nécessitera sans doute de coupler des données écologiques/biogéographiques (quelles espèces hôtes étaient présentes au cours de l'histoire évolutive des parasitoïdes ?) et physiologiques (sur quelles espèces hôtes ces stratégies sont-elles efficaces ?).

Enfin, bien que quelques éléments clairs concernant les stratégies de virulence des parasitoïdes de drosophiles aient été acquis ces dernières années, nos connaissances sont faibles en comparaison avec celles disponibles sur les parasitoïdes de lépidoptères. Seules 6 espèces des 47 espèces de parasitoïdes de drosophiles connues ont été étudiées à ce jour, ce qui ne reflète qu'une partie de la diversité des stratégies employées par les parasitoïdes de drosophiles afin d'échapper à la réponse immunitaire des drosophiles. L'étude des stratégies de virulence employées par d'autres espèces, appartenant notamment aux autres genres qui parasitent les larves de drosophiles devrait permettre de révéler la diversité de ces stratégies ou au contraire de mettre en évidence les caractéristiques communes à ces parasitoïdes.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A la recherche des facteurs de
virulence “universels”...



Tout comme Alice dans *l'Autre côté du miroir* de Lewis Carroll, qui doit courir afin de rester au même endroit, les parasites doivent s'adapter à tout changement chez leurs hôtes. La survie des hôtes étant par ailleurs dépendante de leur capacité à mettre en place des systèmes de défense efficaces, les parasites subissent de fortes pressions évolutives qui sélectionnent les innovations qui vont leur permettre de contourner les lignes de défenses mises en place par les hôtes au cours de leur évolution. Hôtes et parasites sont donc en perpétuelle “course à l'innovation” (ou “course à l'armement”), principe même de la théorie de la Reine Rouge définie par van Valen (1973). Les variations de résistance et de virulence observées dans les systèmes hôtes-parasites sont probablement pour la plupart le reflet de cette course, mais elles sont peu étudiées dans certains systèmes hôtes/parasites et notamment dans les interactions hôtes/parasitoïdes.

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'apporter de plus amples connaissances sur les variations existant dans les interactions hôtes/parasitoïdes. Dans le modèle biologique qui a été étudié, ces variations sont déterminées par une base génétique simple et par la présence (ou l'absence) de facteurs de virulence chez les parasitoïdes, dont la spécificité pourrait définir le spectre d'hôte. Des variations de succès parasitaire ont été rapportées dans d'autres modèles hôte/parasitoïde, mais peu de données concernant les bases physiologiques de ces variations sont disponibles. Ces variations reposent-elles aussi sur une base génétique simple et sur l'efficacité de quelques facteurs de virulence ?

Différents types de facteurs semblent exister, qualifiés dans la discussion de ce manuscrit “d'universels” ou de “conditionnels”. Les facteurs universels permettent à un parasitoïde de mettre en échec la réponse immunitaire des hôtes quel que soit leur génotype. Cela sous-entend qu'ils sont non seulement très efficaces, mais aussi qu'ils sont soit insensibles au polymorphisme des facteurs ciblés chez les hôtes, soit qu'ils ciblent des facteurs monomorphes. Avoir de tels facteurs de virulence garantit au parasitoïde un succès à long terme sur une espèce hôte donnée. On peut ainsi s'attendre à ce que ces facteurs soient particulièrement bien conservés au cours de l'évolution des espèces chez lesquelles cette innovation est apparue, ou encore que différents facteurs ayant des effets “convergeants” sur ces cibles puissent être sélectionnés chez différents clades. Très schématiquement, la course à l'armement tendrait ainsi à favoriser des facteurs de virulence “universels”. De tels facteurs sont-ils fréquents ? Probablement oui. En effet, bien que peu de facteurs de virulence communs aient été mis en évidence jusqu'à présent dans les différentes familles de parasitoïdes, certaines cibles hôtes, comme le cytosquelette d'actine des hémocytes, l'organe hématopoïétique ou la cascade PO semblent par contre “privilegiées”, ce qui conforterait l'hypothèse d'effets convergeants. L'analyse du mécanisme d'action de ces facteurs de virulence et l'étude du polymorphisme éventuel de leurs cibles aux échelles intra et inter spécifiques sera sans doute un facteur déterminant dans la compréhension des variations de succès des parasitoïdes.

Bibliographie

* Article de revue

** Livre

Abraham E.G., Pinto, S.B., Ghosh, A., Vanlandingham, D.L., Budd, A., Higgs, S., Kafatos, F.C., Jacobs-Lorena, M. et Michel, K. (2005) An immune-responsive serpin, SRPN6, mediates mosquito defense against malaria parasites. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **102**(45), 16327-16332.

* Agaisse H. et Perrimon, N. (2004) The roles of JAK/STAT signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Reviews*, **198**(1), 72-82.

Allemand R., Lemaître, C., Frey, F., Boulétreau, M., Vavre, F., Nordlander, G., van Alphen, J.J.M. et Carton, Y. (2002) Phylogeny of six african *Leptopilina* species (Hymenoptera: Cynipoidea, Figitidae), parasitoids of *Drosophila*, with description of three new species. *Annales de la Société Entomologique de France*, **38**(4), 319-332.

Althoff D.M. et Thompson, J.N. (2001) Geographic structure in the searching behaviour of a specialist parasitoid: combining molecular and behavioural approaches. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 406-417.

Amaya K.E., Asgari, S., Jung, R., Hongskula, M. et Beckage, N.E. (2005) Parasitization of *Manduca sexta* larvae by the parasitoid wasp *Cotesia congregata* induces an impaired host immune response. *Journal of Insect Physiology*, **51**(5), 505-512.

Anscombe F.J. (1948) The transformation of Poisson, binomial, and negative binomial data. *Biometrika*, **35**, 246-254.

* Arthur A.P. (1981). Host acceptance by parasitoids. *Semiochemicals: their role in pest control* (ed. by D. A. Nordlund, R. L. Jones et W. J. Lewis), pp. 97-120. John Wiley & Sons, New York.

Asgari S. et Schmidt, O. (1994) Passive protection of eggs from the parasitoid, *Cotesia rubecula*, in the host, *Pieris rapae*. *Journal of Insect Physiology*, **40**, 789-795.

Asgari S., Hellers, M. et Schmidt, O. (1996) Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. *Journal of General Virology*, **77**(10), 2653-2662.

Asgari S., Schmidt, O. et Theopold, U. (1997) A polydnavirus-encoded protein of an endoparasitoid wasp is an immune suppressor. *Journal of General Virology*, **78**(11), 3061-3070.

Asgari S., Theopold, U., Wellby, C. et Schmidt, O. (1998) A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, **95**, 3690-3695.

Asgari S. et Schmidt, O. (2002) A coiled-coil region of an insect immune suppressor protein is involved in binding and uptake by hemocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**(5), 497-504.

Asgari S. et Schmidt, O. (2003) Is cell surface calreticulin involved in phagocytosis by insect hemocytes? *Journal of Insect Physiology*, **49**(6), 545-550.

Asgari S., Zhang, G., Zareie, R. et Schmidt, O. (2003) A serine proteinase homolog venom protein from an endoparasitoid wasp inhibits melanization of the host hemolymph. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33**(10), 1017-1024.

Asgari S. (2006) Venom proteins from polydnavirus-producing endoparasitoids: their role in host-parasite interactions. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **61**, 146-156.

* Ashida M. et Brey, P.T. (1998). Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects* (ed. by P. T. Brey et D. Hultmark), pp. 135-172. Chapman & Hall, London.

Askew R.R. et Shaw, M.R. (1986). Parasitoid communities: their size, structure and development. *Insect Parasitoids* (ed. by J. K. Waage et D. Greathead). Academic Press, London.

** Barbault R. (1992) *Ecologie des peuplements. Structure, dynamique et évolution*. Masson. Paris.

Barratt B.I.P., Evans, A.A., Stoltz, D.B., Vinson, S.B. et Easingwood, R. (1999) Virus-like particles in the ovaries of *Microctonus aethiopoidea* Loan (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of adult weevils (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **73**(2), 182-188.

Beck M., Theopold, U. et Schmidt, O. (2000) Evidence for serine protease inhibitor activity in the ovarian calyx fluid of the endoparasitoid *Venturia canescens*. *Journal of Insect Physiology*, **46**(9), 1275-1283.

Beck M. et Strand, M.R. (2003) RNA interference silences *Microplitis demolitor* bracovirus genes and implicates glc1.8 in disruption of adhesion in infected host cells. *Virology*, **314**(2), 521-535.

Beck M. et Strand, M.R. (2005) Glc1.8 from *Microplitis demolitor* Bracovirus Induces a Loss of Adhesion and Phagocytosis in Insect High Five and S2 Cells. *Journal of Virology*, **79**(3), 1861-1870.

Beckage N.E., Metcalf, J.S., Nesbit, D.J., Schleifer, K.W., Zetlan, S.R. et De Buron, I. (1990) Host hemolymph monophenoloxidase activity in parasited *Manduca sexta* larvae and evidence for inhibition by wasp polydnavirus. *Insect Biochemistry*, **20**(3), 285-294.

Beckage N.E., Tan, F.F., Schleifer, K.W., Lane, R.D. et Cherubin, L.L. (1994) Characterisation and biological effects of *Cotesia congregata* polydnavirus on host larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **26**(2-3), 165-195.

* Beckage N.E. (1998) Modulation of immune responses to parasitoids by polydnaviruses. *Parasitology*, **116**(Suppl), 57-64.

* Beckage N.E. et Gelman, D.B. (2004) Wasp parasitoid disruption of host development : implications for new biologically based strategies for insect control. *Annual Review of Entomology*, **49**, 299-330.

Bedwin O. (1979) An insect glycoprotein: a study of the particles responsible for the resistance of the parasitoid's egg to the defence reaction of its insect host. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **205**, 267-270.

Benassi V., Frey, F. et Carton, Y. (1998) A new specific gene for wasp cellular immune resistance in *Drosophila*. *Heredity*, **80**(Pt 3), 347-352.

- Bensadia F., Boudreault, S., Guay, J.-F., Michaud, D. et Cloutier, C. (2006) Aphid clonal resistance to a parasitoid fails under heat stress. *Journal of Insect Physiology*, **52**, 146–157.
- Bloom H., Beier, H. et Gross, H.S. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- Blumberg D. (1991) Seasonal variations in the encapsulation of eggs of the encyrtid parasitoid, *Metaphycus stanleyi*, by the pyriform scale, *Protopulvinaria pyriformis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **58**, 231–237.
- * Boulétreau M. (1986). The genetic and coevolutionary interactions between parasitoids and their hosts. *Insect Parasitoids: 13th symposium of the Royal Entomological Society of London* (ed. by J. Waage et D. Greathead), pp. 169-200. Academic Press, London.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brehélin M., Zachary, D. et Hoffmann, J.A. (1978) A comparative ultrastructural study of blood cells from nine insect orders. *Cell Tissue Research*, **195**, 45-57.
- Brehélin M. (1982) Comparative study of structure and function of blood cells from two *Drosophila* species. *Cell Tissue Research*, **221**, 607-615.
- * Brehélin M. et Zachary, D. (1986). Insect haemocytes: a new classification to rule out the controversy. *Immunity in invertebrates* (ed by M. Brehélin), pp. 36-48. Springer-Verlag, New York Tokyo.
- * Briggs S.P. et Johal, G.S. (1994) Genetic patterns of plant-parasite interactions. *Trends in Genetics*, **10**(1), 12-16.
- Brodeur J. et Vet, L.E.M. (1995) Relationships between parasitoid host range and host defence: a comparative study of egg encapsulation in two related parasitoid species. *Physiological Entomology*, **20**, 7-12.
- * Brooks W.M. (1993). Host-parasitoid-pathogen interactions. *Parasites and Pathogens of Insects* (ed. by N. E. Beckage, S. N. Thompson et B. A. Federici), Vol. 2, pp. 231-272. Academic Press, San Diego.
- Cariou M.L., Silvain, J.F., Daubin, V., Da Lage, J.L. et Lachaise, D. (2001) Divergence between *Drosophila santomea* and allopatric or sympatric populations of *D. yakuba* using paralogous amylase genes and migration scenarios along the Cameroon volcanic line. *Molecular Ecology*, **10**(3), 649-660.
- Carius H.J., Little, T.J. et Ebert, D. (2001) Genetic variation in a host-parasite association: potential for coevolution and frequency-dependant selection. *Evolution*, **55**(6), 1136-1145.
- Carton Y. (1976) Isogenic, allogenic, and xenogenic transplants in an insect species. *Transplantation*, **21**(1), 17-22.
- Carton Y. et Kitano, H. (1981) Evolutionary relationships to parasitism by seven species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Biological Journal of the Linnean Society*, **16**, 227-241.
- Carton Y. et Claret, J. (1982) Adaptative significance of a temperature induced diapause in a cosmopolitan parasitoid of *Drosophila*. *Ecological Entomology*, **7**, 239.
- Carton Y. et David, J.R. (1983) Reduction of fitness in *Drosophila* adults surviving parasitization by a cynipid wasp. *Experientia*, **39**, 231-233.

- Carton Y. et Boulétreau, M. (1985) Encapsulation ability of *Drosophila melanogaster*: a genetic analysis. *Developmental and Comparative Immunology*, **9**(2), 211-219.
- * Carton Y., Boulétreau, M., van Alphen, J.J.M. et van Lenteren, J.C. (1986). The *Drosophila* parasitic wasps. *The Genetics and Biology of Drosophila* (ed. by M. Ashburner, H. L. Carson et J. N. Thompson), Vol. 3C, pp. 347-394. Academic Press, New York/London.
- Carton Y. (1987). Ecological and genetic significance of the encapsulation process in *Drosophila* against a parasitic wasp. *Parasitoid Insects, Les colloques de l'INRA n°48* (ed. by M. Boulétreau et G. Bonnot), Vol. 48, pp. 123-125, Paris.
- Carton Y., Capy, P. et Nappi, A.J. (1989) Genetic variability of host-parasite relationship traits: utilisation of isofemale lines on a *Drosophila* parasitic wasp. *Genetics, Selection, Evolution*, **21**, 437-446.
- * Carton Y. et Nappi, A.J. (1991) The *Drosophila* immune reaction and the parasite capacity to evade it: genetic and coevolutionary aspects. *Acta Oecologia*, **12**, 89-104.
- Carton Y., Frey, F. et Nappi, A.J. (1992) Genetic determinism of the cellular immune reaction in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, **69**, 393-399.
- * Carton Y. et Nappi, A.J. (1997) *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today*, **13**(6), 218-227.
- * Carton Y. et Nappi, A.J. (2001) Immunogenetic aspects of the cellular response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics*, **52**, 157-164.
- * Carton Y., Nappi, A. et Poirié, M. (2005) Genetics of anti-parasite resistance in invertebrates. *Developmental and Comparative Immunology*, **29**, 9-32.
- * Cerenius L. et Söderhäll, K. (2004) The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, **198**(1), 116-126.
- Chain B.M., Leyshon-Soland, K. et Siva-Jothy, M.T. (1992) Haemocyte heterogeneity in the cockroach *Periplaneta americana* analyzed using monoclonal antibodies. *Journal of Cell Science*, **103**, 1261-1267.
- Charnov E.L. et Stephens, D.W. (1988) On the evolution of host selection in solitary parasitoids. *The American Naturalist*, **132**(5), 707-722.
- Chinwada P., Overholt, W.A., Omwega, C.O. et Muekec, J.M. (2003) Geographic differences in host acceptance and suitability of two *Cotesia sesamiae* populations in Zimbabwe. *Biological Control*, **28**, 354-359.
- Chiu H., Sorrentino, R.P. et Govind, S. (2000) Suppression of the *Drosophila* cellular immune response by *Gnaspis xanthopoda*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **484**, 161-167.
- Chiu H. et Govind, S. (2002) Natural infection of *D. melanogaster* by virulent parasitic wasps induces apoptotic depletion of hematopoietic precursors. *Cell Death and Differentiation*, **9**, 1379-1381.
- Chiu H., Morales, J. et Govind, S. (2006) Identification and immuno-electron microscopy localization of p40, a protein component of immunosuppressive virus-like particles from *Leptopilina heterotoma*, a virulent parasitoid wasp of *Drosophila*. *Journal of General Virology*, **87**, 461-470.
- Cho M.Y., Lee, H.S., Lee, K.M., Homma, K.-i., Natori, S. et Lee, B.L. (1999) Molecular cloning and functional properties of two early-stage encapsulation-relating proteins from the

- coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. *European Journal of Biochemistry*, **262**(3), 737-744.
- Choi J.Y., Whitten, M.M.A., Cho, M.Y., Lee, K.Y., Kim, M.S., Ratcliffe, N.A. et Lee, B.L. (2002) Calreticulin enriched as an early-stage encapsulation protein in wax moth *Galleria mellonella* larvae. *Developmental and Comparative Immunology*, **26**(4), 335-343.
- Clark D., Pech, L.L. et Strand, M.R. (1997) Isolation and identification of a plasmatocyte-spreading peptide from the hemolymph of the lepidopteran insect *Pseudoplusia includens*. *Journal of Biological Chemistry*, **272**(37), 23440-23447.
- Coodin S. et Caveney, S. (1992) Lipophorin inhibits adhesion of cockroach (*Periplaneta americana*) haemocytes *in vitro*. *Journal of Insect Physiology*, **38**, 853-862.
- Corley L.S. et Strand, M.R. (2003) Evasion of encapsulation by the polyembryonic parasitoid *Copidosoma floridanum* is mediated by a polar body-derived extraembryonic membrane. *Journal of Invertebrate Pathology*, **83**(1), 86-89.
- Coster-Longman C., Landi, M. et Turillazzi, S. (2002) The Role of Passive Defense (Selfish Herd and Dilution Effect) in the Gregarious Nesting of *Liostenogaster* Wasps (Vespidae, Hymenoptera, Stenogastrinae). *Journal of Insect Behavior*, **15**(2), 331-350.
- Cotter S.C., Kruuk, L.E. et Wilson, K. (2004) Costs of resistance: genetic correlations and potential trade-offs in an insect immune system. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**(2), 421-429.
- Couty A., Kaiser, L., Huet, D. et Pham-Delegue, M.H. (1999) The attractiveness of different odour sources from the fruit-host complex on *Leptopilina boulardi*, a larval parasitoid of frugivorous *Drosophila* spp. *Physiological Entomology*, **24**, 76-82.
- Crozatier M., Ubeda, J.-M., Vincent, A. et Meister, M. (2004) Cellular Immune Response to Parasitization in *Drosophila* Requires the EBF Orthologue Collier. *Plos Biology*, **2**(8), 1107-1113.
- Cui L., Soldevila, A.I. et Webb, B.A. (1997) Expression and hemocyte-targeting of a *Campoletis sonorensis* polydnavirus cysteine-rich gene in *Heliothis virescens* larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **36**(4), 251-271.
- Cui L., Soldevila, A.I. et Webb, B.A. (2000) Relationships between polydnavirus gene expression and host range of the parasitoid wasp, *Campoletis sonorensis*. *Journal of Insect Physiology*, **46**(10), 1397-1407.
- * D'Souza S.E., Ginsberg, M.H. et Plow, E.F. (1991) Arginyl-glycyl-aspartic acid (RGD): a cell adhesion motif. *Trends in Biochemical Sciences*, **16**, 246-250.
- * Dahlman D.L. (1991) Teratocytes and host/parasitoid interactions. *Biological Control*, **1**(2), 118-126.
- Danielli A., Kafatos, F.C. et Loukeris, T.G. (2003) Cloning and Characterization of Four *Anopheles gambiae* Serpin Isoforms, Differentially Induced in the Midgut by *Plasmodium berghei* Invasion. *The Journal of Biological Chemistry*, **278**(6), 4184-4193.
- Daquinag A.C., Nakamura, S., Takao, T., Shimonishi, Y. et Tsukamoto, T. (1995) Primary structure of a potent endogenous dopa-containing inhibitor of phenol oxidase from *Musca domestica*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **92**, 2964-2968.

- David J.R., Gibert, P., Legout, H., Petavy, G., Capy, P. et Moreteau, B. (2005) Isofemale lines in *Drosophila*: an empirical approach to quantitative trait analysis in natural populations. *Heredity*, **94**, 3-12.
- Davies D.H. et Vinson, S.B. (1986) Passive evasion by eggs of the braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* of encapsulation *in vitro* by haemocytes of host *Heliothis virescens*. Possible role for fibrous layer in immunity. *Journal of Insect Physiology*, **32**(12), 1003-1010.
- Davies D.H., Strand, M.R. et Vinson, S.B. (1987) Changes in differential haemocyte count in *in vitro* behaviour of plasmatocytes from host *Heliothis virescens* caused by *Campoletis sonorensis* polydnavirus. *Journal of Insect Physiology*, **33**, 143-153.
- Davies D.H., Hayes, T.K. et Vinson, S.B. (1988) Preliminary characterisation and purification of *in vitro* encapsulation promoting factor: a peptide that mediates insect haemocyte adhesion. *Developmental and Comparative Immunology*, **12**, 241-253.
- Davies D.H. et Vinson, S.B. (1988) Interference with function of plasmatocytes of *Heliothis virescens* *in vivo* by calyx fluid of the parasitoid *Campoletis sonorensis*. *Cell Tissue Research*, **251**, 467-475.
- De Belle S. et Sokolowski, M.B. (1987) Heredity of rover/sitter: alternative foraging strategies of *Drosophila melanogaster* larvae. *Heredity*, **59**, 73-83.
- De Gregorio E., Han, S.-J., Lee, W.-J., Baek, M.-J., Osaki, T., Kawabata, S.-I., Lee, B.-L., Iwanaga, S., Lemaitre, B. et Brey, P.T. (2002a) An immune-responsive serpin regulates the melanization cascade in *Drosophila*. *Developmental Cell*, **3**, 581-592.
- De Gregorio E., Spellman, P.T., Tzou, P., Rubin, G.M. et Lemaître, B. (2002b) The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*. *Embo Journal*, **21**, 2568-2579.
- De Jong R. et Kaiser, L. (1991) Odor learning by *Leptopilina boulardi*, a specialist parasitoid (Hymenoptera: Eucoilidae). *Journal of Insect Behavior*, **4**(6), 743-750.
- De Moraes C.M. et Mescher, M.C. (2004) Biochemical crypsis in the avoidance of natural enemies by an insect herbivore. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **101**(24), 8993-8997.
- Delpuech J.-M., Carton, Y. et Roush, R.T. (1993) Conserving genetic variability of a wild insect population under laboratory conditions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **67**, 233-239.
- Djemai I., Meyhöfer, R. et Casas, J. (2000) Geometrical games between a host and a parasitoid. *The American Naturalist*, **156**(3), 257-265.
- Djemai I., Casas, J. et Magal, C. (2001) Matching host reactions to parasitoid wasp vibrations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **268**, 2403-2408.
- * Douthett R.L. (1964). Biological characteristics of entomophagous adults. *Biological Control of Insect Pests and Weeds* (ed by P. DeBach), pp. 145-167. Chapman & Hall, London.
- * Drezen J.-M., Provost, B., Espagne, E., Cattolico, L., Dupuy, C., Poirié, M., Périquet, G. et Huguet, E. (2003) Polydnavirus genome: integrated vs. free virus. *Journal of Insect Physiology*, **49**(5), 407-417.
- Driessen G., Hemerik, L. et Boonstra, B. (1991) Host selection behaviour of the parasitoid *Leptopilina clavipes*, in relation to survival in hosts. *Netherlands Journal of Zoology*, **41**(2-3), 99-111.

- Dupas S., Brehélin, M., Frey, F. et Carton, Y. (1996) Immune suppressive virus-like particles in a *Drosophila* parasitoid: significance of their intraspecific morphological variations. *Parasitology*, **113**, 207-212.
- Dupas S., Frey, F. et Carton, Y. (1998) A single parasitoid segregating factor controls immune suppression in *Drosophila*. *The Journal of Heredity*, **89**(4), 306-311.
- Dupas S. et Boscaro, M. (1999) Geographic variation and evolution of immune suppressive genes in a *Drosophila* parasitoid. *Ecography*, **22**, 284-291.
- Dupas S. et Carton, Y. (1999) Two non-linked genes for specific virulence of *Leptopilina boulardi* against *Drosophila melanogaster* and *D. yakuba*. *Evolutionary Ecology*, **13**, 211-220.
- Dupas S., Carton, Y. et Poirié, M. (2002) The genetic dimension of the coevolution of virulence resistance in *Drosophila* - parasitoid wasp relationships. *Heredity*, **90**(1), 84-89.
- Dushay M.S. et Beckage, N.E. (1993) Dose-dependent separation of *Cotesia congregata* associated polydnavirus effects on *Manduca sexta* larval development and immunity. *Journal of Insect Physiology*, **39**, 1029-1040.
- Edson K.M., Vinson, S.B., Stoltz, D.B. et Summers, M.D. (1981) Virus in a parasitoid wasp: suppression of the cellular immune response in the parasitoid's host. *Science*, **211**, 582-583.
- Eslin P., Giordanengo, P., Fourdrain, Y. et Prévost, G. (1996) Avoidance of encapsulation in the absence of VLP by a braconid parasitoid of *Drosophila* larvae: an ultrastructural study. *Canadian Journal of Zoology*, **74**, 2193-2198.
- Eslin P. et Prévost, G. (1996) Variation in *Drosophila* concentration of haemocytes associated with different ability to encapsulate *Asobara tabida* larval parasitoid. *Journal of Insect Physiology*, **42**, 549-555.
- Eslin P. et Prévost, G. (1998) Hemocyte load and immune resistance to *Asobara tabida* are correlated in species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Journal of Insect Physiology*, **44**, 807-816.
- Eslin P. et Prévost, G. (2000) Racing against host's immunity defenses: a likely strategy for passive evasion of encapsulation in *Asobara tabida* parasitoids. *Journal of Insect Physiology*, **46**(8), 1161-1167.
- Espagne E., Dupuy, C., Huguet, E., Cattolico, L., Provost, B., Martins, N., Poirié, M., Périquet, G. et Drezen, J.-M. (2004) Genome Sequence of a Polydnavirus: Insights into Symbiotic Virus Evolution. *Science*, **306**(5694), 286-289.
- * Evans C.J. et Banerjee, U. (2003) Transcriptional regulation of hematopoiesis in *Drosophila*. *Blood Cells Molecules and diseases*, **30**(2), 223-228.
- Fatouros N.E., Huigens, M.E., van Loon, J.J.A., Dicke, M. et Hilker, M. (2005) Butterfly anti-aphrodisiac lures parasitic wasps. *Nature*, **433**, 704.
- Feddersen I., Sanders, K. et Schmidt, O. (1986) Virus-like particles with host protein-like antigenic determinants protect an insect parasitoid from encapsulation. *Experientia*, **42**, 1278-1281.
- Fellowes M.D., Kraaijeveld, A.R. et Godfray, H.C. (1998) Trade-off associated with selection for increased ability to resist parasitoid attack in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **265**(1405), 1553-1558.

- Fellowes M.D.E., Kraaijeveld, A.R. et Godfray, H.C.J. (1999a) The relative fitness of *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) that have successfully defended themselves against the parasitoid *Asobara tabida* (Hymenoptera, Braconidae). *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 123-128.
- Fellowes M.D.E., Kraaijeveld, A.R. et Godfray, H.C.J. (1999b) Cross-resistance following artificial selection for increased defense against parasitoids in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, **53**(3), 966-972.
- Ferrari J., Muller, C.B., Kraaijeveld, A.R. et Godfray, H.C. (2001) Clonal variation and covariation in aphid resistance to parasitoids and a pathogen. *Evolution*, **55**(9), 1805-1814.
- Ferrari J., Darby, A.C., Daniell, T.J., Godfray, H.C.J. et Douglas, A.E. (2004) Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. *Ecological Entomology*, **29**(1), 60-65.
- Fessler L.I., Nelson, R.E. et Fessler, J.H. (1994) *Drosophila* extracellular matrix. *Methods in Enzymology*, **245**, 271-294.
- Fleury F., Ris, N., Allemand, R., Fouillet, P., Carton, Y. et Boulétreau, M. (2004) Ecological and genetic interactions in *Drosophila*-parasitoids communities: a case study with *D. melanogaster*, *D. simulans* and their common *Leptopilina* parasitoids in south-eastern France. *Genetica*, **120**(1-3), 181-194.
- Forde S.E., Thompson, J.N. et Bohannan, B.J.M. (2004) Adaptation varies through space and time in a coevolving host-parasitoid interaction. *Nature*, **431**, 841-844.
- Frank S.A. (1994) Recognition polymorphism in host-parasite genetics. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (B)*, **346**, 283-293.
- Gardiner E.M.M. et Strand, M.R. (1999) Monoclonal antibodies bind distinct classes of hemocytes in the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology*, **45**, 113-126.
- Gardiner E.M.M. et Strand, M.R. (2000) Hematopoiesis in larval *Pseudoplusia includens* and *Spodoptera frugiperda*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **43**, 147-164.
- Geremia E., Corsano, C., Bonomo, R., Giardinelli, R., Pappalardo, P., Vanella, A. et Sichel, G. (1984) Eumelanins as free radical trap and superoxide dismutase activities in amphibia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **79B**, 67-69.
- * Gillespie J.P., Kanost, M.R. et Trenczek, T. (1997) Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, **42**, 611-643.
- ** Godfray H.C.J. (1994) *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. University Press. Princeton.
- Gomez-Gutiérrez J., Peterson, W.T., De Robertis, A. et Brodeur, R.D. (2003) Mass mortality of krill caused by parasitoid ciliates. *Science*, **301**, 339.
- Green D.M., Kraaijeveld, A.R. et Godfray, H.C. (2000) Evolutionary interactions between *Drosophila melanogaster* and its parasitoid *Asobara tabida*. *Heredity*, **85 Pt 5**, 450-458.
- Grimstone A.V., Rotheram, S. et Salt, G. (1967) An electronmicroscopic study of capsule formation by insect blood cells. *Journal of Cell Science*, **2**, 281-292.
- * Gross P. (1993) Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **38**, 251-273.
- Guzo D. et Stoltz, D.B. (1985) Obligatory multiparasitism in the tussock moth, *Orgyia leucostigma*. *Parasitology*, **90**, 1-10.

- Guzo D. et Stoltz, D.B. (1987) Observation on cellular immunity and parasitism of the tussock moth. *Journal of Insect Physiology*, **33**, 19-31.
- Hansen M.H.H. et Koella, J. (2003) Evolution of tolerance : the genetic basis of a host's resistance against parasite manipulation. *Oikos*, **102**, 309-317.
- Harwood S.H., McElfresh, J.S., Nguyen, A., Conlan, C.A. et Beckage, N.E. (1998) Production of early expressed parasitism-specific proteins in alternate sphingid hosts of the braconid wasp *Cotesia congregata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **71**(3), 271-279.
- Hayakawa Y., Yazaki, K., Yamanaka, A. et Tanaka, T. (1994) Expression of polydnavirus genes from the parasitoid wasp *Cotesia kariyai* in two noctuid hosts. *Insect Molecular Biology*, **3**(2), 97-103.
- Hayakawa Y. et Yazaki, K. (1997) Envelope protein of parasitic wasp symbiont virus, polydnavirus, protects wasp eggs from cellular immune reactions by the host insect. *European Journal of Biochemistry*, **246**(3), 820-826.
- Hellers M., Beck, M., Theopold, U., Kamei, M. et Schmidt, O. (1996) Multiple alleles encoding a virus-like particle protein in the ichneumonid endoparasitoid *Venturia canescens*. *Insect Molecular Biology*, **5**(4), 239-249.
- Henter H.J. (1995) The potential for coevolution in a host-parasitoid system. II. Genetic variation within a population of wasps in the ability to parasitize an aphid population. *Evolution*, **49**, 439-445.
- Henter H.J. et Via, S. (1995) The potential for coevolution in a host-parasitoid system. I. Genetic variation within an aphid population in susceptibility to a parasitic wasp. *Evolution*, **49**, 427-438.
- Hita M.T., Poirié, M., Leblanc, N., Lemeunier, F., Lutcher, F., Frey, F., Periquet, G. et Carton, Y. (1999) Genetic localization of a *Drosophila melanogaster* resistance gene to a parasitoid wasp and physical mapping of the region. *Genome Research*, **9**(5), 471-481.
- * Hoffmann J.A. (1995) Innate immunity of insects. *Current Opinion in Immunology*, **7**(1), 4-10.
- * Hoffmann J.A. (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature*, **426**, 33-38.
- Hollanen H. et Pimentel, D. (1984) New approach for selecting biological control agents. *Canadian Entomology*, **116**(1109-1121).
- Hu J., Zhu, X.-X. et Fu, W.-J. (2003) Passive evasion of encapsulation in *Macrocentrus cingulum* Brischke (Hymenoptera: Braconidae), a polyembryonic parasitoid of *Ostrinia furnacalis* Guenee (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Physiology*, **49**(4), 367-375.
- Hubbard S.F., Fytrou, A., Schofield, P.G. et Kraaijeveld, A.R. (données non publiées) *Wolbachia* infection suppresses both host defense and parasitoid counter-defense. IX European Workshop on Insect Parasitoids, 5-9 septembre 2005, Cardiff.
- Hufbauer R.A. et Via, S. (1999) Evolution of an aphid-parasitoid interaction: Variation in resistance to parasitism among aphid populations specialized on different plants. *Evolution*, **53**(5), 1435-1445.
- Irving J.A., Pike, R.N., Lesk, A.M. et Whisstock, J.C. (2000) Phylogeny of the Serpin Superfamily: Implications of Patterns of Amino Acid Conservation for Structure and Function. *Genome Research*, **10**, 1845-1864.

- Irving P., Troxler, L., Heuer, T.S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A. et Hetru, C. (2001) A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **98**(26), 15119-15124.
- Irving P., Ubeda, J.-M., Doucet, D., Troxler, L., Lagueux, M., Zachary, D., Hoffmann, J.A., Hetru, C. et Meister, M. (2005) New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome-wide analysis. *Cellular Microbiology*, **7**(3), 335-350.
- Iwama R. et Ashida, M. (1996) Biosynthesis of prophenoloxidase in hemocytes of larval hemolymph of the silk worm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry*, **16**, 547-555.
- Janeway C.A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, Vol. 54, pp. 1-13. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Janssen A. (1989) Optimal host selection by *Drosophila* parasitoids in the field. *Functional Ecology*, **3**, 469-479.
- Jiang H., Wang, Y. et Kanost, M.R. (1994) Mutually Exclusive Exon Use and Reactive Center Diversity in Insect Serpin. *The Journal of Biological Chemistry*, **269**(1), 66-68.
- Jiang H. et Kanost, M.R. (1997) Characterization and Functional Analysis of 12 Naturally Occurring Reactive Site Variants of Serpin-1 from *Manduca sexta*. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**(2), 1082-1087.
- Jiang H., Wang, Y., Ma, C. et Kanost, M.R. (1997) Subunit composition of pro-phenol oxidase from *Manduca sexta*: molecular cloning of subunit ProPO-P1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **27**, 835-850.
- Jiang H., Wang, Y., Yu, X.-Q., Zhu, Y. et Kanost, M.R. (2003) Prophenoloxidase-activating proteinase-3 (PAP-3) from *Manduca sexta* hemolymph: a clip-domain serine proteinase regulated by serpin-1J and serine proteinase homologs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **33**, 1049-1060.
- Jokela J., Schmid-Hempel, P. et Rigby, M.C. (2000) Dr. Pangloss restrained by the Red Queen - steps towards an unified defence theory. *Oikos*, **89**, 267-274.
- Kadash K., Harvey, J.A. et Strand, M.R. (2003) Cross-protection experiments with parasitoids in the genus *Microplitis* (Hymenoptera: Braconidae) suggest a high level of specificity in their associated bracoviruses. *Journal of Insect Physiology*, **49**(5), 473-482.
- * Kanost M.R. (1999) Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, **23**(4-5), 291-301.
- * Kanost M.R., Jiang, H. et Yu, X.-Q. (2004) Innate immune responses of a lepidopteran insect: *Manduca sexta*. *Immunological Reviews*, **198**(1), 97-105.
- Kinuthia W., Li, D., Schmidt, O. et Theopold, U. (1999) Is the surface of endoparasitic wasp eggs and larvae covered by a limited coagulation reaction? *Journal of Insect Physiology*, **45**(5), 501-506.
- Kitano H. et Nakatsujii, N. (1978) Resistance of *Apanteles* eggs to the haemocytic encapsulation by their habitual host *Pieris*. *Journal of Insect Physiology*, **24**, 261.
- Kitano H. (1986) The role of *Apanteles glomeratus* venom in the defensive response of its host, *Pieris rapae crucivora*. *Journal of Insect Physiology*, **32**(4), 369-375.

- Ko W.-Y., David, R.M. et Akashi, H. (2003) Molecular phylogeny of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Journal of Molecular Evolution*, **57**, 562–573.
- Kopelman A. et Chabora, P. (1984) Immature stages of *Leptopilina bouvardi* (Hymenoptera Eucolidae), a protelean parasite of *Drosophila* spp. *Annals of the Entomological Society of America*, **77**, 264-269.
- Kraaijeveld A.R. et van Alphen, J.J.M. (1994) Geographical variation in resistance of the parasitoid *A. tabida* against encapsulation by *D. melanogaster* larvae: the mechanism explored. *Physiological Entomology*, **19**, 9-14.
- Kraaijeveld A.R., Nowee, B. et Najem, R.W. (1995) Adaptive variation in host selection behaviour of *Asobara tabida*, a parasitoid of *Drosophila* larvae. *Functional Ecology*, **9**, 113-118.
- Kraaijeveld A.R. et Van Alphen, J.M. (1995) Geographical variation in encapsulation ability of *Drosophila melanogaster* larvae and evidence for parasitoid specific components. *Evolutionary Ecology*, **9**, 10-17.
- Kraaijeveld A.R. et Godfray, H.C. (1997) Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **389**(6648), 278-280.
- * Kraaijeveld A.R., Van Alphen, J.J. et Godfray, H.C. (1998) The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. *Parasitology*, **116**(Suppl), S29-45.
- Kraaijeveld A.R. (1999) Kleptoparasitism as an exploitation for paradoxical oviposition decisions of the parasitoid *Asobara tabida*. *Journal of Evolutionary Biology*, **12**, 123-133.
- * Kraaijeveld A.R. et Godfray, H.C.J. (1999) Geographic patterns in the evolution of resistance and virulence in *Drosophila* and its parasitoids. *The American Naturalist*, **153**, S61-S74.
- Kraaijeveld A.R. et Godfray, H.C.J. (2001) Is there local adaptation in *Drosophila*-parasitoid interactions? *Evolutionary Ecology Research*, **3**, 107-116.
- Kraaijeveld A.R., Hutcheson, K.A., Limentani, E.C. et Godfray, H.C.J. (2001a) Costs of counterdefenses to host resistance in a parasitoid of *Drosophila* larvae. *Evolution*, **55**(9), 1815-1821.
- Kraaijeveld A.R., Limentani, E.C. et Godfray, H.C. (2001b) Basis of the trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **268**(1464), 259-261.
- * Kraaijeveld A.R., Ferrari, J. et Godfray, H.C.J. (2002) Costs of resistance in insect-parasite and insect-parasitoid interactions. *Parasitology*, **125**(Suppl), S71-82.
- ** Krebs J.R. et Davies, N.B. (1981) *An Introduction to Behavioural Ecology*. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Kurtz J., van der Veen, I.T. et Ryder, J.J. (2002) Ecological immunity of arthropods-a thread of Ariadne? *Trends in Ecology and Evolution*, **17**(5), 204-205.
- Labrosse C. (2003) *Les facteurs immunosuppresseurs dans le système hôte-parasitoïde Leptopilina bouvardi - Drosophila melanogaster*. Thèse doctorale, Université de Tours, France.
- Labrosse C., Carton, Y., Dubuffet, A., Drezen, J.M. et Poirié, M. (2003) Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina bouvardi*. *Journal of Insect Physiology*, **49**(5), 513-522.

- Labrosse C., Eslin, P., Doury, G., Drezen, J.-M. et Poirié, M. (2005a) Haemocyte changes in *D. melanogaster* in response to long gland components of the parasitoid wasp *Leptopilina boulandi*: a Rho-GAP protein as an important factor. *Journal of Insect Physiology*, **51**(2), 161-170.
- Labrosse C., Stasiak, K., Lesobre, J., Grangeia, A., Huguet, E., Drezen, J.-M. et Poirié, M. (2005b) A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulandi* (Hymenoptera, Figitidae)–*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 93–103.
- Lachaise D., Cariou, M.-L., R., D.J., Lemeunier, F., L., T. et Ashburner, M. (1988). Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Evolutionary Biology* (ed. by M. Hecht, B. Wallace et G. T. Prance), Vol. 22, pp. 159-225. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Lachaise D., Harry, M., Solignac, M., Lemeunier, F., Bénassi, V. et Cariou, M.-L. (2000) Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new *melanogaster* sister species from São Tomé. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **267**, 1487-1495.
- Lackie A.M. (1983) Effect of substratum wettability and charge on adhesion *in vitro* and encapsulation *in vivo* by insect haemocytes. *Journal of Cell Science*, **63**, 181-190.
- Lackie A.M. (1986) The role of substratum surface-charge in adhesion and encapsulation by locust hemocytes *in vivo*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **47**, 377-378.
- * Lackie A.M. (1988) Immune mechanisms in insects. *Parasitology Today*, **4**(4), 98-105.
- Lambrechts L., Vulule, J.M. et Koella, J.C. (2004) Genetic correlation between melanization and antibacterial immune responses in a natural population of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Evolution*, **58**(10), 2377–2381.
- Lambrechts L., Halbert, J., Durand, P., Gouagna, L.C. et Koella, J.C. (2005) Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, **4**(3).
- * Lambrechts L., Fellous, S. et Koella, J.C. (2006) Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends in Parasitology*, **22**(1), 12-16.
- Lanot R., Zachary, D., Holder, F. et Meister, M. (2001) Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, **230**(2), 243-257.
- Lapchin L. (2002) Host-parasitoid association and diffuse coevolution: when to be a generalist ? *The American Naturalist*, **160**(2), 245-254.
- Lapointe R., Wilson, R., Vilaplana, L., O'Reilly, D.R., Falabella, P., Douris, V., Bernier-Cardou, M., Pennacchio, F., Iatrou, K., Malva, C. et Olszewski, J.A. (2005) Expression of a *Toxoneuron nigriceps* polydnavirus-encoded protein causes apoptosis-like programmed cell death in lepidopteran insect cells. *Journal of General Virology*, **86**(4), 963-971.
- * Lavine M.D. et Beckage, N.E. (1995) Polydnaviruses: potent mediators of host insect immune dysfunction. *Parasitology Today*, **11**(10), 368-378.
- Lavine M.D. et Beckage, N.E. (1996) Temporal pattern of parasitism-induced immunosuppression in *Manduca sexta* larvae parasitized by *Cotesia congregata*. *Journal of Insect Physiology*, **42**(1), 41-51.
- Lavine M.D. et Strand, M.R. (2001a) Surface characteristics of foreign targets that elicit an encapsulation response by the moth *Pseudoplusia includens*. *Journal of Insect Physiology*, **47**(9), 965-974.

Lavine M.D. et Strand, M.R. (2001b) α -Integrin subunits expressed in hemocytes of *Pseudophasia includens*. Keystone Symposium on the Genetic Manipulation of Insects, Vol. 63, pp. Keystone Symposia, Silverthorne, CO.

* Lavine M.D. et Strand, M.R. (2002) Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**(10), 1295-1309.

Lawrence P.O. et Akin, D. (1990) Virus-like particles from the poison glands of the parasitic wasp *Biosteres longicaudatus* (Hymenoptera: Braconidae). *Canadian Journal of Zoology*, **68**, 539-546.

Le Ralec A. (1991) *Les hyménoptères parasitoïdes: Adaptations de l'appareil reproducteur femelle. Morphologie et ultrastructure de l'ovaire, de l'oeuf et de l'ovipositeur*. Thèse doctorale, Université de Rennes I, France.

Le Ralec A., Rabasse, J.M. et Wajnberg, E. (1996) Comparative morphology of the ovipositor of some parasitic hymenoptera in relation to characteristics of their hosts. *Canadian Entomology*, **128**(3), 413-433.

Levin D.M., Breuer, L.N., Zhuang, S., Anderson, S.A., Nardi, J.B. et Kanost, M.R. (2005) A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**(5), 369-380.

Li S., Falabella, P., Giannantonio, S., Fanti, P., Battaglia, D., Digilio, M.C., Volkl, W., Sloggett, J.J., Weisser, W. et Pennacchio, F. (2002) Pea aphid clonal resistance to the endoparasitoid *Aphidius ervi*. *Journal of Insect Physiology*, **48**(10), 971-980.

Li X. et Webb, B.A. (1994) Apparent functional role for a cysteine-rich polydnavirus protein in suppression of the insect cellular immune response. *Journal of Virology*, **68**(11), 7482-7489.

Ligoxygakis P., Pelte, N., Ji, C., Leclerc, V., Duvic, B., Belvin, M., Jiang, H., Hoffmann, J.A. et Reichhart, J.-M. (2002) A serpin mutant links Toll activation to melanization in the host defence of *Drosophila*. *The EMBO Journal*, **21**(23), 6330-6337.

Ling E., Shirai, K., Kanehatsu, R., Kiguchi, K.L., E., Shirai, K., Kanehatsu, R. et Kiguchi, K. (2005) Reexamination of phenoloxidase in larval circulating hemocytes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Tissue and Cell*, **37**(2), 101-107.

Ling E. et Yu, X.-Q. (2005) Prophenoloxidase binds to the surface of hemocytes and is involved in hemocyte melanization in *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**(12), 1356-1366.

Ling E. et Yu, X.-Q. (2006) Cellular encapsulation and melanization are enhanced by immulectins, pattern recognition receptors from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Developmental and Comparative Immunology*, **30**(3), 289-299.

Little T.J., Hultmark, D. et Read, A.F. (2005) Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology. *Nature Immunology*, **6**(7), 651-654.

Luckhart S. et Webb, B.A. (1996) Interaction of a wasp ovarian protein and polydnavirus in host immune suppression. *Developmental and Comparative Immunology*, **20**(1), 1-21.

MacArthur R.H. et Pianka, E.R. (1966) On optimal use of a patchy environment. *The American Naturalist*, **916**, 603-609.

** MacArthur R.H. et Wilson, E.O. (1967) *The Theory of Island Biogeography*. Princeton University Press. Princeton, NJ.

- Mallon E.B., Loosli, R. et Schmid-Hempel, P. (2003) Specific versus nonspecific immune defense in the bumblebee, *Bombus terrestris* L. *Evolution*, **57**(6), 1444–1447.
- Márkus R., Kurucz, E., Rus, F. et Andó, I. (2005) Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Immunology Letters*, **101**(1), 108-111.
- * Marmaras V.J., Charalambidis, N.D. et Zervas, C.G. (1996) Immune response in insects: the role of phenoloxidase in defense reactions in relation to melanization and sclerotization. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **31**(2), 119-133.
- Matsui N.M., Smith-Beckerman, D.M. et Epstein, L.B. (1999) Staining of preparative 2-D gels. Coomassie blue and imidazole-zinc negative staining. *Methods Mol. Biol.*, **112**, 307–311.
- * Meister M. et Lagueux, M. (2003) *Drosophila* blood cells. *Cellular Microbiology*, **5**(9), 573-580.
- * Meister M. (2004) Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Current Opinion in Immunology*, **16**, 10–15.
- Michalakis Y. et Veuille, M. (1996) Length variation of GAG/GAA trinucleotide repeats in natural populations of *Drosophila melanogaster* and its relation to the recombination rate. *Genetics*, **143**, 1713–1725.
- Mochiah M.B., Ngi-Song, A.J., Overholt, W.A. et Botchey, M. (2001) Host Suitability of Four Cereal Stem Borers (Lepidoptera: Crambidae, Noctuidae) for Different Geographic Populations of *Cotesia sesamiae* (Cameron) (Hymenoptera: Braconidae) in Kenya. *Biological Control*, **21**(3), 285-292.
- Mohamed S.A., Overholt, W.A., Wharton, R.A., Lux, S.A. et Eltoum, E.M. (2003) Host specificity of *Psytalia cosyrae* (Hymenoptera: Braconidae) and the effect of different host species on parasitoid fitness. *Biological Control*, **28**(2), 155-163.
- Mollema C. (1991) Heritability estimates of host selection behaviour by the *Drosophila* parasitoid *Asobara tabida*. *Netherlands Journal of Zoology*, **41**(2-3), 174-183.
- Molnar K., Borhegyi, N.H., Csikos, G. et Sass, M. (2001) Distribution of serpins in the tissues of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*) larvae : Existence of new serpins possibly encoded by a gene distinct from the serpin-1 gene. *Journal of Insect Physiology*, **47**, 675–687.
- Monconduit H. et Prévost, G. (1994) Avoidance of encapsulation by *Asobara tabida*, a larval parasitoid of *Drosophila* species. *Norwegian Journal of Agricultural Sciences*, **16**, 301-309.
- Morales J., Chiu, H., Oo, T., Plaza, R., Hoskins, S. et Govind, S. (2005) Biogenesis, structure, and immune-suppressive effects of virus-like particles of a *Drosophila* parasitoid, *Leptopilina victoriae*. *Journal of Insect Physiology*, **51**(2), 181-195.
- Moran N.A., Degnan, P.H., Santos, S.R., Dunbar, H.E. et Ochman, H. (2005) The players in a mutualistic symbiosis: Insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **102**(47), 16919–16926.
- Moreau S.J., Doury, G. et Giordanengo, P. (2000) Intraspecific variation in the effects of parasitism by *Asobara tabida* on phenoloxidase activity of *Drosophila melanogaster* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, **76**(2), 151-153.
- * Moreau S.J.M. (2003) Relationships between parasitoid Hymenoptera and the immune system of their hosts: The « active » and « passive » mechanisms redefined. *Annales de la Société Entomologique de France*, **39**(4), 305-314.

- Moreau S.J.M., Eslin, P., Giordanengo, P. et Doury, G. (2003) Comparative study of the strategies evolved by two parasitoids of the genus *Asobara* to avoid the immune response of the host, *Drosophila melanogaster*. *Developmental and Comparative Immunology*, **27**(4), 273-282.
- Moreau S.J.M., Cherqui, A., Doury, G., Dubois, F., Fourdrain, Y., Sabatier, L., Bulet, P., Saarela, J., Prévost, G. et Giordanengo, P. (2004) Identification of an aspartylglucosaminidase-like protein in the venom of the parasitic wasp *Asobara tabida* (Hymenoptera: Braconidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**(5), 485-492.
- * Moreau S.J.M. et Guillot, S. (2005) Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 1209–1223.
- Moreau S.J.M., Guillot, S., Populaire, C., Doury, G., Prévost, G. et Eslin, P. (2005) Conversely to its sibling *Drosophila melanogaster*, *D. simulans* overcomes the immunosuppressive effects of the parasitoid *Asobara citri*. *Developmental and Comparative Immunology*, **29**(3), 205–209.
- Moret Y. et Schmid-Hempel, P. (2001) Immune defence in bumblebee offspring. *Nature*, **414**(6863), 506–506.
- Moret Y. et Siva-Jothy, M.T. (2003) Adaptive innate immunity? Responsive-mode prophylaxis in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **270**, 2475-2480.
- Nappi A.J. et Streams, F.A. (1969) Hemocytic reactions of *Drosophila melanogaster* to the parasites *Pseudocoila mellipes* and *P. bochei*. *Journal of Insect Physiology*, **15**, 1551-1566.
- Nappi A.J. (1975) Inhibition by parasites of melanotic tumour formation in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, **255**(5507), 402-404.
- Nappi A.J. (1977) Factors affecting the ability of the wasp parasite *Pseudocoila bochei* to inhibit tumorigenesis in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, **23**, 809-812.
- Nappi A.J., Carton, Y. et Vass, E. (1992) Reduced cellular immune competence of a temperature-sensitive dopa decarboxylase mutant strain of *Drosophila melanogaster* against the parasite *Leptopilina bouvardi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **101**(3), 453-460.
- * Nappi A.J. et Vass, E. (1993) Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Research*, **6**(3), 117-126.
- Nappi A.J., Vass, E., Frey, F. et Carton, Y. (1995) Superoxide anion generation in *Drosophila* during melanotic encapsulation of parasites. *European Journal of Cell Biology*, **68**(4), 450-456.
- Nappi A.J. et Vass, E. (1998) Hydrogen peroxide production in immune-reactive *Drosophila melanogaster*. *Journal of Parasitology*, **84**(6), 1150-1157.
- Nappi A.J., Vass, E., Frey, F. et Carton, Y. (2000) Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide*, **4**(4), 423-430.
- * Nappi A.J. et Vass, E. (2001) Cytotoxic reactions associated with insect immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **484**, 329-348.
- * Nappi A.J., Kohler, L. et Mastore, M. (2004a) Signaling pathways implicated in the cellular innate immune responses of *Drosophila*. *Invertebrate Survey Journal*, **1**, 5-33.

Nappi A.J., Vass, E., Malagoli, D. et Carton, Y. (2004b) The effects of parasite-derived immune-suppressive factors on the cellular innate immune and autoimmune responses of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Parasitology*, **90**(5), 1139-1149.

* Nappi A.J. et Christensen, B.M. (2005) Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 443-459.

Nappi A.J., Frey, F. et Carton, Y. (2005) *Drosophila* serpin 27A is a likely target for immune suppression of the blood cell-mediated melanotic encapsulation response. *Journal of Insect Physiology*, **51**(2), 197-205.

Nathan C. et Shiloh, M.U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **97**(16), 8841-8848.

Ngi-Song A.J., Overholt, W.A. et Stouthamer, R. (1998) Suitability of *Busseola fusca* and *Sesamia calamistis* (Lepidoptera: Noctuidae) for the Development of Two Populations of *Cotesia sesamiae* (Hymenoptera: Braconidae) in Kenya. *Biological Control*, **12**(3), 208-214.

Nordlander M. (1980) Revision of the genus *Leptopilina* (Forster 1869) with notes on status of some other genera (Hymenoptera Cynipoidea, Eucoilidae). *Entomologica Scandinavica*, **11**, 428-453.

Nutting W.L. et Spangler, H.G. (1969) The hastate setae of certain dermestid larvae: an entangling defense mechanism. *Annals of the Entomological Society of America*, **62**, 763-769.

Oliver K.M., Russell, J.A., Moran, N.A. et Hunter, M.S. (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, **100**(4), 1803-1807.

Oliver K.M., Moran, N.A. et Hunter, M.S. (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, **102**(36), 12795-12800.

Orr H.A. et Irving, S. (1997) The genetics of adaptation - the genetic basis of resistance to wasp parasitism in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, **51**, 1877-1885.

Ottoni E.B. (2000) EthoLog 2.2 - a tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, **32**(3), 446-449.

* Owens I.P.F. et Wilson, K. (1999) Immunocompetence: a neglected life history trait or conspicuous red herring? *Trends in Ecology and Evolution*, **14**(5), 170-172.

Parkinson N., Smith, I., Weaver, R. et Edwards, J.P. (2001) A new form of arthropod phenoloxidase is abundant in venom of the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **31**(1), 57-63.

Parkinson N.M., Richards, E.H., Conyers, C., Smith, I. et Edwards, J.P. (2002) Analysis of venom constituents from the parasitoid wasp *Pimpla hypochondriaca* and cloning of a cDNA encoding a venom protein. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **32**(7), 729-735.

Parsons P.A. (1980). Isofemale strains and evolutionary strategies in natural populations. *Evolutionary Biology* (ed. by M. Hecht, W. Steere et B. Wallace), pp. 175-217. Plenum, New York.

Patak J.P.N. (1990) Haemocyte mediated defense mechanism in *Bombyx mori*. *Indian Journal of Zoological Spectrum*, **1**(2), 10-14.

- Pech L.L., Trudeau, D. et Strand, M.R. (1994) Separation and behaviour *in vitro* of hemocytes of the moth *Pseudoplusia includens*. *Cell Tissue Research*, **277**, 159-167.
- Pech L.L. et Strand, M.R. (1995) Encapsulation of foreign targets by hemocytes of the moth *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera: Noctuidae) involves an RGD-Dependant cell adhesion mechanism. *Journal of Insect Physiology*, **41**(6), 481-488.
- Pech L.L., Trudeau, D. et Strand, M.R. (1995) Effects of basement membranes on the behavior of hemocytes from *Pseudoplusia includens* (Lepidoptera; Noctuidae): Development of an *in vitro* encapsulation assay. *Journal of Insect Physiology*, **41**(9), 801-807.
- Pech L.L. et Strand, M.R. (1996) Granular cells are required for encapsulation of foreign targets by insect haemocytes. *Journal of Cell Science*, **109**, 2053-2060.
- Pech L.L. et Strand, M.R. (2000) Plasmacytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *Journal of Insect Physiology*, **46**(12), 1565-1573.
- * Pennacchio F. et Strand, M.R. (2006) Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. *Annual Review of Entomology*, **51**, 233-258.
- Poirié M., Frey, F., Hita, M., Huguet, E., Lemeunier, F., Periquet, G. et Carton, Y. (2000) *Drosophila* resistance genes to parasitoids: chromosomal location and linkage analysis. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **267**(1451), 1417-1421.
- Poolman Simons M.T.T., Suverkropp, B.P., Vet, L.E.M. et de Moed, G. (1992) Comparison of learning in related generalist and specialist eucoilid parasitoids. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **64**, 117-124.
- Prévost G. et Vinson, S.B. (1987). Immunity relationships between the parasitoid *Campoletis sonorensis* and lepidopteran hosts: a hemocyte study. *Parasitoid Insects, Les colloques de l'INRA n°48* (ed. by M. Boulétreau et G. Bonnot), Paris.
- Prévost G., Davies, D.H. et Vinson, S.B. (1990) Evasion of encapsulation by parasitoid correlated with the extent of host hemocyte pathology. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **55**, 1-10.
- * Prévost G., Eslin, P., Doury, G., Moreau, S.J.M. et Guillot, S. (2005) *Asobara*, braconid parasitoids of *Drosophila* larvae: unusual strategies to avoid encapsulation without VLPs. *Journal of Insect Physiology*, **51**(2), 171-179.
- ** Price P.W. (1980) *Evolutionary biology of parasites*. Princeton University Press. Princeton.
- Qiu P., Pan, P. et Govind, S. (1998) A role for the *Drosophila* Toll/Cactus pathway in larval hematopoiesis. *Development*, **125**, 1909-19520.
- ** Quicke D.L.J. (1997) *Parasitic wasps*, Cambridge University Press edition. Chapman & Hall. London.
- Rantala M.J. et Kortet, R. (2003) Courtship song and immune function in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Biological Journal of the Linnean Society*, **79**, 503-510.
- Rantala M.J. et Roff, D.A. (2005) An analysis of trade-offs in immune function, body size and development time in the Mediterranean Field Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Functional Ecology*, **19**, 323-330.
- * Ratcliffe N.A. (1993). Cellular defense responses of insects: unresolved problems. *Parasites and Pathogens of Insects* (ed. by N. E. Beckage, S. N. Thompson et B. A. Federici), Vol. 1, pp. 267-304. Academic, San Diego.

- Ratner S. et Vinson, S.B. (1983) Encapsulation reactions *in vitro* by haemocytes of *Heliothis virescens*. *Journal of Insect Physiology*, **29**(11), 855-863.
- * Reichhart J.-M. (2005) Tip of another iceberg: *Drosophila* serpins. *Trends in Cell Biology*, **15**(12), 659-665.
- Reineke A., Asgari, S. et Schmidt, O. (2006) Evolutionary Origin of *Venturia canescens* Virus-Like Particles. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **61**, 123-133.
- ** Reuter O.M. (1913) *Lebensgewohnheiten und Instinkte der Insekten*. Friedlander. Berlin.
- Richards C.S. (1976) Variation in infectivity for *Biomphalaria glabrata* in strains of *Schistosoma mansoni* from the same geographical area. *Bulletin of the World Health Organisation*, **54**, 706-707.
- Richards E.H. et Edwards, J.P. (2000) Parasitism of *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) by the ectoparasitoid, *Eulophus pennicornis*, is associated with a reduction in host haemolymph phenoloxidase activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, **127**(3), 289-298.
- * Ridley A.J. (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in Cell Biology*, **11**, 471-477.
- Rizki R.M. et Rizki, T.M. (1980) Hemocyte responses to implanted tissues in *Drosophila melanogaster* larvae. *Wilhelm Roux's Archives*, **189**, 207-213.
- Rizki R.M. et Rizki, T.M. (1984) Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **81**, 6154-6158.
- Rizki R.M. et Rizki, T.M. (1990a) Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **87**, 8388-8392.
- Rizki R.M. et Rizki, T.M. (1990b) Microtubule inhibitors block the morphological changes induced in *Drosophila* blood cells by a parasitoid wasp factor. *Experientia*, **46**(3), 311-315.
- Rizki R.M. et Rizki, T.M. (1990c) Encapsulation of parasitoid eggs in phenoloxidase-deficient mutants of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*, **36**, 523-529.
- Rizki R.M. et Rizki, T.M. (1991) Effects of lamelloylase from a parasitoid wasp on *Drosophila* blood cells *in vitro*. *The Journal of Experimental Zoology*, **257**(2), 236-244.
- Rizki T.M. et Rizki, R.M. (1983) Blood cell surface changes in *Drosophila* mutants with melanotic tumors. *Science*, **220**(4592), 73-75.
- Rizki T.M. et Rizki, R.M. (1985) Paracrystalline inclusions of *Drosophila melanogaster* hemocytes have prophenoloxidases. *Genetics*, **110**, 98.
- * Rizki T.M. et Rizki, R.M. (1986). Surface changes on hemocytes during encapsulation in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Hemocytic and humoral immunity in arthropods* (ed by A. P. Gupta), pp. 157-190. John Wiley, New York.
- Rizki T.M., Rizki, R.M. et Carton, Y. (1990) *Leptopilina heterotoma* and *L. boulardi*: strategies to avoid cellular defense responses of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Parasitology*, **70**(4), 466-475.
- Rizki T.M. et Rizki, R.M. (1992) Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Developmental and Comparative Immunology*, **16**(2-3), 103-110.

- * Rizki T.M. et Rizki, R.M. (1994) Parasitoid-induced cellular immune deficiency in *Drosophila*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **712**, 178-194.
- Rolff J. et Kraaijeveld, A.R. (2001) Host preference and survival in selected lines of a *Drosophila* parasitoid, *Asobara tabida*. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 742-745.
- * Rolff J. et Siva-Jothy, M.T. (2003) Invertebrate ecological immunology. *Science*, **301**, 472-475.
- Rotherham S. (1967) Immune surface of eggs of a parasitic insect. *Nature*, **214**, 700.
- Rouault J. (1979) Rôle des parasites entomophages dans la compétition entre espèces jumelles de *Drosophiles* : approche expérimentale. *Compte Rendu Hebdomadaire Séances Académie Sciences*, **289** série D, 643-646.
- Russo J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y. et Brehelin, M. (1996) Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina boulardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology*, **112**(Pt 1), 135-142.
- Russo J., Brehélin, M. et Carton, Y. (2001) Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *Journal of Insect Physiology*, **47**(2), 167-172.
- Sagarra L.A., Peterkin, D.D., Vincent, C. et Stewart, R.K. (2000) Immune response of the hibiscus mealybug, *Maconellicoccus hirsutus* Green (Homoptera: Pseudococcidae), to oviposition of the parasitoid *Anagyrus kamali* Moursi (Hymenoptera: Encyrtidae). *Journal of Insect Physiology*, **46**(5), 647-653.
- Salt G. (1965) Experimental studies in insect parasitism XIII. The haemocytic reaction of a caterpillar to eggs of its habitual parasite. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, **162**, 303-318.
- Salt G. (1966) Experimental studies in insect parasitism XIV. The haemocytic reaction of a caterpillar to larvae of its habitual parasite. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, **165**, 155-178.
- ** Salt G. (1970) *The cellular defense reactions in insects*. University Press. Cambridge.
- Salt S. (1968) The resistance of insect parasitoids to the defense reactions of their hosts. *Biological Reviews*, **43**, 200-232.
- Sandström J.P., Russell, J.A., White, J.P. et Moran, N.A. (2001) Independent origins of horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Molecular Ecology*, **10**, 217-228.
- Sasaki A. et Godfray, H.C.J. (1999) A model for the coevolution of resistance and virulence in coupled host-parasitoid interactions. *Proc. R. Soc. London B*, **266**, 455-463.
- * Schmid-Hempel P. et Ebert, D. (2003) On the evolutionary ecology of specific immune defence. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**(1), 27-32.
- * Schmidt O. et Schuchmann-Feddersen, I. (1989). Role of virus-like particles in parasitoid-host interaction of insects. *Subcellular Biochemistry* (ed by J. R. Harris), Vol. 15, pp. 91-119. Plenum Publishing Corporation, New York.
- Schmidt O., Andersson, K., Will, A. et Schuchmann-Feddersen, I. (1990) Virus-like particle proteins from a hymenopteran endoparasitoid are related to a protein component of the immune system in the lepidopteran host. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **13**, 107-115.

- * Schmidt O., Theopold, U. et Strand, M. (2001) Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *BioEssays*, **23**(4), 344-351.
- Schmidt O., Glatz, R.V., Asgari, S. et Roberts, H.L.S. (2005) Are insect immune suppressors driving cellular uptake reactions? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **60**(4), 153-158.
- Schmit A.R. et Ratcliffe, N.A. (1977) The encapsulation of foreign tissue implants in *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*, **23**(2), 175-184.
- * Shelby K.S. et Webb, B.A. (1999) Polydnavirus-mediated suppression of insect immunity. *Journal of Insect Physiology*, **45**(5), 507-514.
- Shelby K.S., Adeyeye, O.A., Okot-Kotber, B.M. et Webb, B.A. (2000) Parasitism-linked block of host plasma melanization. *Journal of Invertebrate Pathology*, **75**(3), 218-225.
- * Sheldon B.C. et Verhulst, S. (1996) Ecological immunology: costly defenses and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, **11**(8), 317-321.
- ** Siegel S. et Castellan, N.J. (1988) *Non parametric statistics for the behavioral sciences*. New York.
- * Silverman G.A., Bird, P.I., Carrell, R.W., Church, F.C., Coughlin, P.B., Gettins, P.G.W., Irving, J.A., Lomas, D.A., Luke, C.J., Moyer, R.W., Pemberton, P.A., Remold-O'Donnell, E., Salvesen, G.S., Travis, J. et Whisstock, J.C. (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar by functionally diverse proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**(36), 33293-33296.
- Simmons L. et Roberts, B. (2005) Bacterial immunity traded for sperm viability in male crickets. *Science*, **309**, 2031.
- * Söderhäll K. et Cerenius, L. (1998) Role of prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, **10**, 23-28.
- Sorci G., Møller, A.P. et Boulinier, T. (1997) Genetics of host-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, **12**(5), 196-200.
- Sorrentino R.P., Carton, Y. et Govind, S. (2002) Cellular immune response to parasite infection in the *Drosophila* lymph gland is developmentally regulated. *Developmental Biology*, **243**, 65-80.
- Sorrentino R.P., Melk, J.P. et Govind, S. (2004) Genetic Analysis of Contributions of Dorsal Group and JAK-Stat92E Pathway Genes to Larval Hemocyte Concentration and the Egg Encapsulation Response in *Drosophila*. *Genetics*, **166**(3), 1343-1356.
- Stasiak K., Renault, S., Federici, B.A. et Bigot, Y. (2005) Characteristics of pathogenic and mutualistic relationships of ascoviruses in field populations of parasitoid wasps. *Journal of Insect Physiology*, **51**(2), 103-115.
- * Stettler P., Trenczek, T., Wyler, T., Pfister-Wilhelm, R. et Lanzrein, B. (1998) Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. *Journal of Insect Physiology*, **44**(9), 817-831.
- Stoltz D.B. et Cook, D.I. (1983) Inhibition of host phenoloxidase activity by parasitoid hymenoptera. *Experientia*, **39**, 1022-1024.

- Stoltz D.B., Krell, P.J., Summers, M.D. et Vinson, S.B. (1984) Polydnviridae- a proposed family of insect viruses with segmented, double-stranded, circular DNA genomes. *Intervirology*, **21**, 1-4.
- Stoltz D.B. et Guzo, D. (1986) Apparent haemocytic transformation associated with parasitoid induced inhibition of immunity in *Malacosoma disstria* larvae. *Journal of Insect Physiology*, **32**, 377-388.
- Strand M.R. et Noda, T. (1991) Alterations in the haemocytes of *Pseudoplusia includens* after parasitism by *Microplitis demolitor*. *Journal of Insect Physiology*, **37**(11), 839-850.
- Strand M.R. et Pech, L.L. (1995a) *Microplitis demolitor* polydnvirus induces apoptosis of a specific haemocyte morphotype in *Pseudoplusia includens*. *Journal of General Virology*, **76**(2), 283-291.
- * Strand M.R. et Pech, L.P. (1995b) Immunological basis for compatibility in parasitoid-host relationships. *Annual Review of Entomology*, **40**, 31-56.
- Strand M.R., Clark, K.C. et Gardiner, E.M.M. (1999) Plasmatocyte spreading peptide does not induce *Microplitis demolitor* polydnvirus-infected plasmatocytes to spread on foreign surfaces. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **40**, 41-52.
- Strand M.R. et Clark, K.D. (1999) Plasmatocyte spreading peptide induces spreading of plasmatocytes but represses spreading of granulocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **42**, 213-223.
- Strand M.R., Hayakawa, Y. et Clark, K.D. (2000) Plasmatocyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. *Journal of Insect Physiology*, **46**(5), 817-824.
- Streams F.A. (1968) Factors affecting the susceptibility of *Pseudocoila bochei* eggs to encapsulation by *Drosophila melanogaster*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **12**(3), 379-387.
- Streams F.A. et Greenberg, L. (1969) Inhibition of the defense reaction of *Drosophila melanogaster* parasitized simultaneously by the wasps *Pseudocoila bochei* and *Pseudocoila mellipes*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **13**, 371-377.
- * Sugumaran M. (2002) Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Research*, **15**(1), 2-9.
- Sundaralingam S., Hower, A.A. et Kim, K.C. (2001) Host selection and reproductive success of French and Moroccan populations of the parasitoid, *Microctonus aethiopoulos* (Hymenoptera: Braconidae). *BioControl*, **46**(1), 25-41.
- Takahashi S. et Enomoto, G. (1995) The initial phase of encapsulation of silicone oil injected in *Samia cynthia ricini* (Lepidoptera, saturniidae): the innermost structure of the developing capsule. *Zoological science*, **12**(3), 303-309.
- Tanaka K., Matsumoto, H. et Hayakawa, Y. (2002) Detailed characterization of polydnvirus immunoevasive proteins in an endoparasitoid wasp. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 2557-2566.
- Tanaka T. (1987a) Morphological changes in haemocytes of the host *Pseudaletia separata*, parasitized by *Microplitis mediator* or *Apanteles kariyai*. *Developmental and Comparative Immunology*, **11**(1), 57-67.

Tanaka T. (1987b) Effect of the venom of the endoparasitoid, *Apanteles kariyai* Watanabe, on the cellular defence reaction of the host, *Pseudaletia separata* Walker. *Journal of Insect Physiology*, **33**(6), 413-420.

* Tauber C.A. et Tauber, M. (1989). Sympatric speciation in insects: perception and perspectives. *Speciation and its Consequences* (ed. by D. Otte et J. A. Endler), pp. 307-344. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Teramoto T. et Tanaka, T. (2004) Mechanism of reduction in the number of the circulating hemocytes in the *Pseudaletia separata* host parasitized by *Cotesia kariyai*. *Journal of Insect Physiology*, **50**, 1103–1111.

* Thomas M.B. et Blanford, S. (2003) Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**(7), 344-350.

** Thompson J.N. (1994) *The coevolutionary process*. University of Chicago Press. Chicago.

* Thompson J.N. (1999) Specific hypotheses on the geographic mosaic theory of coevolution. *The American Naturalist*, **153**, S1-S14.

Tong Y., Jiang, H. et Kanost, M.R. (2005) Identification of Plasma Proteases Inhibited by *Manduca sexta* Serpin-4 and Serpin-5 and Their Association with Components of the Prophenol Oxidase Activation Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(15), 14932-14942.

Tong Y. et Kanost, M.R. (2005) *Manduca sexta* serpin-4 and serpin-5 inhibit the prophenoloxidase activation pathway: cDNA cloning, protein expression, and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(15), 14923-14931.

Traynor R.E. et Mayhew, P.J. (2005) Host range in solitary versus gregarious parasitoids: a laboratory experiment. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **117**(1), 41-49.

Trudeau D. et Strand, M.R. (1998) A limited role in parasitism for *Microplitis demolitor* polydnavirus. *Journal of Insect Physiology*, **44**(9).

Turlings T.C.J., Tumlinson, J.H. et Lewis, W.J. (1990) Exploitation of herbivore-plant odors by host-seeking parasitic wasps. *Science*, **250**, 1251-1253.

* Turnbull M. et Webb, B.A. (2002) Perspectives on polydnavirus origins and evolution. *Advances in Virus Research*, **58**, 203-254.

Turnbull M.W., Martin, S.B. et Webb, B.A. (2004) Quantitative analysis of hemocyte morphological abnormalities associated with *Campoplex sonorensis* parasitization. *Journal of Insect Science*, **4**(11), 1-15.

van Alphen J.J.M. et Janssen, A.R.M. (1982) Host selection by *Asobara tabida* Nees (Braconidae; Alysiinae) a larval parasitoid of fruit inhabiting *Drosophila* species. *Netherlands Journal of Zoology*, **32**(2), 194-214.

* van Alphen J.J.M. et Vet, L.E.M. (1986). An evolutionary approach to host finding and selection. *Insect Parasitoids, 13th Symposium of the Royal Entomological Society of London* (ed. by J. K. Waage et D. Greathead), pp. 23-61. Academic Press, London.

van Baaren J. et Boivin, G. (1998) Learning affects host discrimination behavior in a parasitic wasp. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, **42**, 9-16.

van Lenteren J.C. et Bakker, K. (1978) Behavioral aspects of the functional responses of a parasite (*Pseudeucoila bochei* Weld) to its host (*Drosophila melanogaster*). *Netherlands Journal of Zoology*, **28**, 213-233.

- * van Valen L. (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory*, **1**, 1-30.
- Varaldi J., Fouillet, P., Ravallec, M., Lopez-Ferber, M., Boulétreau, M. et Fleury, F. (2003) Infectious behavior in a parasitoid. *Science*, **302**(5652), 1930.
- Vårdal H., Sahlén, G. et Ronquist, F. (2003) Morphology and evolution of the cynipoid egg (Hymenoptera). *Zoological Journal of the Linnean Society*, **139**(2), 247–260.
- Vass E., Nappi, A.J. et Carton, Y. (1993) Comparative study of immune competence and host susceptibility in *Drosophila melanogaster* parasitized by *Leptopilina boulardi* and *Asobara tabida*. *Journal of Parasitology*, **79**(1), 106-112.
- Vass E. et Nappi, A.J. (1998a) Prolonged oviposition decreases the ability of the parasitoid *Leptopilina boulardi* to suppress the cellular immune response of its host *Drosophila melanogaster*. *Experimental Parasitology*, **89**(1), 86-91.
- Vass E. et Nappi, A.J. (1998b) The effects of dietary yeast on the cellular immune response of *Drosophila melanogaster* against the larval parasitoid, *Leptopilina boulardi*. *Journal of Parasitology*, **84**(4), 870-872.
- * Vass E. et Nappi, A.J. (2000) Developmental and immunological aspects of *Drosophila*-parasitoid relationships. *Journal of Parasitology*, **86**(6), 1259-1270.
- Vet L.E.M. et Bakker, K. (1985) A comparative functional approach to the host detection behaviour of parasitic wasps. II. A quantitative study on eight eucoilid species. *Oikos*, **44**, 487-489.
- Vet L.E.M. et van Alphen, J.J.M. (1985) A comparative functional approach to the host detection behavior of parasitic wasps. I. A qualitative study on Eucoilidae and Alysiinae. *Oikos*, **44**, 478-486.
- Vet L.E.M., Wäckers, F.L. et Dicke, M. (1991) How to hunt for hiding hosts: the reliability-detectability problem in foraging parasitoids. *Netherlands Journal of Zoology*, **41**, 202-213.
- * Vet L.E.M. et Dicke, M. (1992) Ecology of infochemical use by natural enemies in a tritrophic context. *Annual Review of Entomology*, **37**(1), 141-172.
- Vet L.E.M., Sokolowski, M.B., MacDonald, D.F. et Snellen, H. (1993) Responses of a generalist and a specialist parasitoid (Hymenoptera: Eucoilidae) to drosophilid larval kairomones. *Journal of Insect Behavior*, **6**(5), 615-624.
- * Vet L.E.M., Hemerik, L., Visser, M.E. et Wäckers, F. (2002). Flexibility in host search and patch use strategies of insects parasitoids. *The Behavioural Ecology of Parasites* (ed. by E. E. Lewis, J. F. Campbell et M. V. K. Sukhdeo), pp. 39-64. CABI Publishing, Wallingford.
- Via S. (2001) Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**(7), 381-390.
- * Viney M.E., Riley, E.M. et Buchanan, K.L. (2005) Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, **20**(12), 665-669.
- Vinson S.B. (1971) Defense reaction and hemocytic changes in *Heliothis virescens* in response to its habitual parasitoid *Cardiochiles nigriceps*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **18**, 94-100.
- * Vinson S.B. (1975). Biochemical coevolution between parasitoids and their hosts. *Evolutionary Strategies of Parasitic Insects and Mites* (ed by P. Price), pp. 14-48. Plenum, New York / London.

- * Vinson S.B. (1976) Host selection by insect parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **21**, 109-133.
- * Vinson S.B. et Iwantsch, G.F. (1980) Host Suitability for Insect Parasitoids. *Annual Review of Entomology*, **25**(1), 397-419.
- * Vinson S.B. (1990) How parasitoids deal with the immune system of their hosts: an overview. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **13**, 3-27.
- * Vinson S.B. (1991) Chemicals signals used by parasitoids. Insect Parasitoids: 4th European Workshop (ed by Redia), Vol. 74, pp. 15-42 Perugia.
- * Vinson S.B. (1998) The general host selection behavior of parasitoid hymenoptera and a comparison of initial strategies utilized by larvaphagous and oophagous species. *Biological Control*, **11**(2), 79-96.
- Vouidibio J. (1985) *Écologie des populations et biologie évolutive des drosophiles en Afrique équatoriale (Congo)*. Thèse doctorale, University of Paris XII & University Marien Ngouabi, Brazzaville (Congo).
- Wajnberg E., Prévost, G. et Boulétreau, M. (1985) Genetic and epigenetic variation in *Drosophila* larvae suitability to a hymenopterous endoparasitoid. *Entomophaga*, **30**, 187-190.
- Walker I. (1959) Die Abwehrreaktion des Wirtes *Drosophila melanogaster* gegen die zoophage Cynipidae *Pseudocoila bochei* Weld. *Revue Suisse de Zoologie*, **66**, 569-632.
- Walker I. (1962) *Drosophila* und *Pseudeucoila*. III. Selektions-versuche zur Steigerung der Resistenz des Parasiten gegen die Abwehrreaktion des Wirtes. *Revue Suisse de Zoologie*, **69**(7), 209-227.
- Wang Y. et Jiang, H. (2004) Purification and characterization of *Manduca sexta* serpin-6: a serine proteinase inhibitor that selectively inhibits prophenoloxidase-activating proteinase-3. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**, 387-395.
- Wang Y. et Jiang, H. (2006) Interaction of β -1,3-glucan with its recognition protein activates hemolymph proteinase 14, an initiation enzyme of the prophenoloxidase activation system in *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry*, **281**(14), 9271-9278.
- Webb B.A. et Luckhart, S. (1994) Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoletis sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **26**(2-3), 147-163.
- Webb B.A. et Luckhart, S. (1996) Factors mediating short- and long term immune suppression in a parasitized insect. *Journal of Insect Physiology*, **42**(1), 33-40.
- Webb B.A. (1998). Polydnavirus biology, genome structure, and evolution. *The insect viruses*, pp. 105-139. Plenum publishing corporation, New York.
- Wertheim B., Kraaijeveld, A.R., Schuster, E., Blanc, E., Hopkins, M., Pletcher, S.D., Strand, M.R., Partridge, L. et Godfray, H.C.J. (2005) Genome-wide gene expression in response to parasitoid attack in *Drosophila*. *Genome Biology*, **6**(11), R94.
- * Whitfield J.B. (1990) Parasitoids, polydnaviruses and endosymbiosis. *Parasitology Today*, **6**, 381-384.
- Whitfield J.B. (2002) Estimating the age of the polydnavirus/braconid wasp symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **99**, 7508-7513.

- Williams M.J., Andó, I. et Hultmark, D. (2005) *Drosophila melanogaster* Rac2 is necessary for a proper cellular immune response. *Genes to Cells*, **10**, 813–823.
- Yin L., Zhang, C., Qin, J. et Wang, C. (2003) Polydnavirus of *Campoletis chloridae*: Characterization and temporal effect on host *Helicoverpa armigera* cellular immune response. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, **52**, 104-113.
- Yu X.-Q. et Kanost, M.R. (2004) Immulectin-2, a pattern recognition receptor that stimulates hemocyte encapsulation and melanization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental and Comparative Immunology*, **28**, 891–900.
- Yu X.-Q., Tracy, M.E., Ling, E., Scholz, F.R. et Trenczek, T.E. (2005) A novel C-type immulectin-3 from *Manduca sexta* is translocated from the hemolymph into the cytoplasm of hemocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **35**, 285–295.
- Zettervall C.-J., Anderl, I., Williams, M.J., Palmer, R., Kurucz, E. et Andó, I. (2004) A directed screen for genes involved in *Drosophila* blood cell activation. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **101**(99), 14192-14197.
- Zhang G., Lu, Z.-Q., Jiang, H. et Asgari, S. (2004a) Negative regulation of prophenoloxidase (proPO) activation by a clip-domain serine proteinase homolog (SPH) from endoparasitoid venom. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**(5), 477-483.
- Zhang G., Schmidt, O. et Asgari, S. (2004b) A novel venom peptide from an endoparasitoid wasp is required for expression of polydnavirus genes in host hemocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**(40), 41580-41585.
- Zhu Y., Wang, Y., Gorman, M.J., Jiang, H. et Kanost, M.R. (2003) *Manduca sexta* serpin-3 regulates prophenoloxidase activation in response to infection by inhibiting prophenoloxidase activating proteinases. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(47), 46556-46564.
- Zou Z. et Jiang, H. (2005) *Manduca sexta* Serpin-6 Regulates Immune Serine Proteinases PAP-3 and HP8: cDNA cloning, protein expression, inhibition kinetics, and function elucidation. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(14), 14341-14348.
- Zuk M., Bryant, M.J., Kolluru, G.R. et Mirmovitch, V. (1996) Trade-offs in parasitology, evolution and behavior. *Parasitology Today*, **12**(46-47).

Annexe 1

Taux d'encapsulation des oeufs de *Leptopilina bouvardi* en fonction de la lignée de parasitoïde considérée, l'espèce hôte et la lignée hôte.

		Hôte: <i>D. melanogaster</i>		Hôte: <i>D. yakuba</i>	
		lignée S 1088	lignée R 1089	lignée R ₁ 1880-D	lignée R ₂ 1907
parasitoïde: <i>L. bouvardi</i> 	lignée IS_m "type commun" (ref G431)	%ER= 0±0 (n = 15)	%ER=0±0 (n = 73)	%ER=99±1 (n =236) % Eff = 100	%ER=100±0 (n =23) % Eff = 100
	lignée IS_y "atypique" (ref G486)	%ER=6±2* (n = 187) %Eff = ?	%ER=92±3 (n = 143) %Eff = 87±3	%ER=19±4 (n =101) %Eff = 58±11	%ER=93±3 (n = 113) %Eff = 97±2

%ER: taux d'encapsulation ; %Eff = pourcentage de capsules efficaces ; * :Carton et Frey, com. personnelle

Protocole standard:

Des femelles drosophiles adultes sont mises à pondre pendant 1-4 heures sur du milieu drosophile standard. Les œufs sont ensuite placés à 25°C. Deux jours plus tard, 20 à 30 larves de drosophiles de stade L2 ainsi obtenues sont transférées dans des pondoires contenant du milieu drosophile standard et soumises à infestation par 1 à 3 femelles *L. bouvardi* pendant 2 à 4 heures. Ces conditions permettent d'avoir un bon taux d'infestation tout en limitant le superparasitisme.

Les larves de drosophiles sont disséquées 48 heures plus tard dans du Ringer afin d'examiner l'état du parasitoïde, classé alors dans l'une de ces 3 catégories :

- **LL = Larve libre**: la larve L1 du parasitoïde est libre et vivante dans l'hémocoel de l'hôte.
- **CO = Capsule ouverte**: une capsule (probablement fragile ou incomplète) s'est formée autour de l'œuf du parasitoïde qui a poursuivi son développement jusqu'à l'émergence du 1^{er} stade larvaire au sein de cette capsule, d'où le parasitoïde vivant peut sortir. Dans ce cas de figure, une larve L1 de parasitoïde ainsi qu'une capsule vide sont retrouvés dans l'hémocoel de la larve hôte.
- **CC = Capsule complète**: une capsule s'est formée autour de l'œuf du parasitoïde, ce qui a conduit à la mort de ce dernier.

Seules les larves de drosophile contenant un seul parasitoïde sont considérées (monoparasitisme).

Le taux d'encapsulation (%ER pour *Encapsulation Rate*) et le pourcentage de capsules efficaces (%Eff) sont alors calculés de la façon suivante :

$$\%ER = \frac{CO + CC}{LL + CO + CC} \quad ; \quad \%Eff = \frac{CC}{CO + CC}$$

Annexe 2

Séquences des peptides obtenus après digestion trypsique des bandes protéiques majeures des glandes à venin de la lignée IS_y de *L. bouvardi*

Dans la marge :

Spn : séquences peptidiques ayant permis l'identification d'une serpine

* : séquences peptidiques qui ont été reconnues dans la séquence peptidique déduite du séquençage des produits de RT-PCR.

	N1		N2	N2-1		N2+N2-1		PyC	PyD	N3		N3-1	
	Py1a	Py1b		Py2a	Py2b	N3	Py3			N3-1	Py3-1		
Peptides spécifiquement trouvés dans N3													
HAEFSVNFK										X			
AHEFSVNFK										X			
YHYVWRSK										X			
DEXXXXXDVWRSK										X			
YHVWRSK										X			
GYSFTTTAER										X			
PTYXXXXLR										X			
TYP NLD LR										X			
SLTKQLDALR										X			
LPLAMAXXXXXK										X			
MPPPPQ										X			
LPGPLPXXXXLLNLP PPPPPP										X			

	N1		N2	N2-1		N2+N2-1		PyC	PyD	N3		N3-1	
	Py1a	Py1b		Py2a	Py2b	N3	Py3			N3-1	Py3-1		
Peptides spécifiquement trouvés dans N3-1													
LKGANL(YL)R													X
QDKLNNEIK												X	
LQGGFLKER												X	
DQVANSFVER												X	
PPPPPPPPXXXXLLNKVEK												X	

	N1		N2		N2+N2-1		PyC	PyD	N3		N3-1	
	Py1a	Py1b	N2	N2-1	Py2a	Py2b			N3	Py3	N3-1	N3-1 Py3-1
Peptides spécifiquement trouvés dans les bandes N3 et N3-1												
DAHDVGK									X			
(FL)STDAHDVGK (2)									X			X
LLFDQYK (2)									X			X
VLLLDLQR (2)									X		X	
VLLLDLAGR									X			
IKNFLR (2)									X			X
NVGQDLTNK									X			
ANDNVGQDLTNK									X			
NNANVGQDLTNK											X	
N NVVGQDLTNK											X	X
GQDLTNK											X	
NADNVGQDLTNK									X			
QGDLTNK											X	
GLTELEELAAFDAR (2)									X			X
LEEAPAAFADAR											X	
ELEAPAAFADAR											X	
HDLTLLNEFER									X			
DHLLTLLNEFER									X			
TLHDLLNEFER									X			
TLHDLLDQFER									X			X
HDLLNXXXR									X			
NLL(PA)DLAQK										X		
NILL PA DLAQK											X	X
GLNAPMZXXXSVG AP DLAQK									X			
LLKQDXXXXXLLK									X			
LKKDXXXXXLLK											X	
LSLLKKDK										X		
LSLLQDXXXQELK												X

	N1		N2		N2+N2-1		PyC	PyD	N3		N3-1		N3-1	
	N1	Py1a	Py1b	N2	N2-1	Py2a			Py2b	N3	Py3	N3	Py3	N3-1
Peptides spécifiquement trouvés dans N1														
FLVAFMTEK	X													
LVEVNEFGLFLTK	X													
ELFHFTK	X													
QPTVQGRSPK	X													
YLAXXXSYVK	X													
YLAYXXSYVK	X													
GGSPNLEXXXXFDYK	X													
YNEPTExXXAR	X													
NYEPTExXXAR	X													
LLNFLTER	X													
YTVFGRR	X													
YTVFRGR	X													

Peptides communs à N1 et N2												
N1	Py1a	N1 Py1b	N2	N2-1	Py2a	N2+N2-1 Py2b	PyC	PyD	N3	Py3	N3-1	N3-1 Py3-1
spn		X	X			X						
VVLTAIYFK (2)												
VVLTNALYFKGEWK			X									
TLNAXXXYFKGEWK			X									
LYDALNK (3)		X			X			X				
VVHLP TLLK	X			X								
VVHLPXXLLK												
* ATTDLYDALXK		X										
ATTDLYXXX K					X							
VLFAGVNK (3)			X	X		X						
ELFAGVNK			X									
VVLFAGVNK						X						
HVLFAGVNK		X										
SDLKLDHVVLF(EL) VK					X							
HVTWLF KVNK					X							
DKNNHVLFAGVGGK			X							X		
HVWLF										X		
VLFKVNK										X		
VTTVLFAGVNK											X	
(VT)DKPMHVLFAGVNK												X
MKNEFYNLTLR	X											
KMNEFYNLTLR	X											
YNLTLR									X			
MKYNLTLR			X									
DFSGXXXXXR									X			
CMADFSGPPPSVLR	X											
MCADFSGPPPSVLR	X											
DFSGPPXXXLR	X											
SGPPXXXLR	X											
DFSGPPP			X									
FDSGPPXXXLR				X								
DFSGPPXXXLR				X								
DFSGPP(PS)LVR												X
LYSPHLR (3)	X		X	X								
LYSPXXR				X								
NPLLLLR (4)						X					X	X
SDNPLLLLR (2)	X			X								

DSNPLLLR				X	
ASLLYQLSPYK	X				
SALLYQLSPYK	X				
ALLYQLSPYK			X		
ADEFNELFHGYR	X				
EFNELFHGYR			X		
ELFHGYR			X		
GAQLLNYYK					
LVTGLNQXXSQAQLLNYYK	X			X	
QLLNYYK					
QLDDLNNYK				X	
QDLDDLNNYK				X	
VTGLNKPLQSGAKLLNNYK					X
TAVNQPLQ					X
TAVNQPLQSGAQLLNYYK					X
SKAGLLNNYK					X
HADWVFR (2)		X			X

Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*

Corinne Labrosse, Yves Carton, Aurore Dubuffet, Jean-Michel Drezen
and Marylène Poirié

Journal of Insect Physiology **49**: 513-522



Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*

C. Labrosse^a, Y. Carton^b, A. Dubuffet^a, J.M. Drezen^a, M. Poirie^{a,*}

^a Institut de Recherche sur la Biologie de l'Insecte UPRESA CNRS 6035, IFR Biologie des Transposons et des Virus, Université F. Rabelais, Parc Grandmont, 37200 Tours, France

^b Laboratoire Populations, Génétique et Evolution, CNRS, 91198 Gif/Yvette, France

Received 8 August 2002; accepted 2 January 2003

Abstract

To develop inside their insect hosts, endoparasitoid wasps must either evade or overcome the host's immune system. Several ichneumonid and braconid wasps inject polydnviruses that display well-studied immune suppressive effects. However, little is known about the strategies of immunoevasion used by other parasitoid families, such as figitid wasps. The present study provides experimental evidence, based on superparasitism and injection experiments, that the figitid species *Leptopilina boulardi* uses an active mechanism to suppress the *Drosophila melanogaster* host immune response, i.e. the encapsulation of the parasitoid eggs. The immune suppressive factors are localised in the long gland and reservoir of the female genital tractus, where virus-like particles (VLPs) have been observed. Parasitism experiments using a host tumorous strain indicate that these factors do not destroy host lamellocytes but that they impair the melanisation pathway. Interestingly, they are not susceptible to heating and are not depleted with prolonged oviposition experience, in contrast to observations reported for *L. heterotoma*, another figitid species. The mechanisms that prevent encapsulation of eggs from *L. boulardi* and *L. heterotoma* differ in several respects, suggesting that different physiological strategies of immunosuppression might be used by specialised and generalist parasitoids.

© 2003 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Drosophila melanogaster*; Parasitoid wasps; Immune suppressive factors; Encapsulation; Injection experiments

1. Introduction

The insect immune system is able to react against endoparasitoid eggs using the encapsulation process. This complex cellular response results in the death of the parasitoid surrounded by a melanised capsule (Carton and Nappi, 1997, 2001; Fellowes and Godfray, 2000). The proliferation and/or differentiation of specific categories of haemocytes as well as the activation of the phenol oxidase cascade involved in the melanisation pathway are necessary for the formation of the capsule (Lavine and Strand, 2002; Nappi et al., 1991). Melanogenesis also induces generation of cytotoxic molecules that are supposed to be involved in killing the parasitoid egg (Nappi and Vass, 1993).

For successful parasitism, parasitoids must circumvent the host immunity using passive and/or active mechanisms. Immune local evasion occurs, for example, when the parasitoid egg develops in a location inaccessible to host haemocytes or is embedded into host tissues (Carton, 1975; Eslin and Prevost, 2000; Kraaijeveld and Van Alphen, 1994). The egg can also use a type of molecular disguise that prevents hosts from recognising it as non-self or be covered by a factor that induces local inactivation of the host defence (Davies and Vinson, 1986; Asgari and Schmidt, 1994; Asgari et al., 1998; Hayakawa and Yazaki, 1997; Kinuthia et al., 1999; Feddersen et al., 1986).

Active suppression of the immune response generally involves the action of substances that are introduced into the host's body by the female wasp at the time of oviposition. Ovarian proteins and venom display immunosuppression properties in some host–parasitoid systems (Webb and Luckhart, 1994; Luckhart and Webb, 1996; Asgari et al., 1998), while polydnviruses are well-stud-

* Corresponding author. Tel.: +33-2-47367357; fax: +33-2-47366966.

E-mail address: poirie@univ-tours.fr (M. Poirie).

ied immune suppressive factors of the related ichneumonid and braconid wasp families (superfamily Ichneumonoidea) (Beckage, 1998; Shelby and Webb, 1999). One of the targets of the polydnviruses is the host haemocytes that undergo significant changes in response to virus infection (Asgari et al., 1996), but the melanisation processes are also impaired (Shelby et al., 2000). A combination of different mechanisms involving the evasion of host defence and the suppression of host immunity by polydnvirus proteins can also be observed (Asgari et al., 1998). By contrast, little is known about the immune suppressive substances produced by endoparasitoid species that do not belong to the superfamily Ichneumonoidea.

Leptopilina bouhardi (Figitidae, superfamily Cynipoidea) is a specialised parasitoid of the *melanogaster* subgroup of the *Drosophila* genus (Carton and Nappi, 1991). Most of the parasitoid strains are virulent against the main parasitised host, *D. melanogaster*, i.e. they are able to bypass the immune reaction of this host species. Nevertheless, a *L. bouhardi* strain isolated from a population of Brazzaville (Congo) demonstrates a low immune suppressive ability against some *D. melanogaster* strains. This parasitoid strain is considered as the avirulent strain, and host strains that are able to perform encapsulation of avirulent parasitoids are considered as resistant strains. Virus-like particles (VLPs) have been detected in the female long gland and reservoir in both the avirulent and virulent strains of *L. bouhardi* using ultrastructural techniques (Dupas et al., 1996), the morphology of the particles being correlated with the immune suppressive capacity of the strains (Dupas et al., 1996, 1998). VLPs are supposed to target capsule-forming lamellocytes, changing their morphology from discoidal to bipolar, a modification which presumably diminishes their ability to adhere and to form capsules (Rizki et al., 1990; Rizki and Rizki, 1994; Russo et al., 2001). Occurrence of an active mechanism of protection in *L. bouhardi* was also suggested from the results of multiparasitism experiments showing a slight increase in survival of *Asobara tabida* parasitoids in *D. simulans* larvae previously parasitised by *L. bouhardi* females (Kraaijeveld, 1999). However, direct evidence that long gland products of *L. bouhardi* actively suppress the encapsulation response of *D. melanogaster* has so far been lacking.

In this report, we demonstrate using parasitism and injection experiments that *L. bouhardi* uses an active mechanism that involves the products of the long gland to suppress *D. melanogaster* encapsulation response. The immune suppressive factors affect both cellular (lamellocyte shape) and humoral (melanisation pathway) components of the host immune response. Interestingly, these factors are not susceptible to heating, and the age or the parasitism experience of the female wasps does not impair the efficiency of immune suppression. The

consequences of these observations are discussed under a physiological and an evolutionary point of view.

2. Materials and methods

2.1. Origin of strains

The origin of the avirulent strain (Gif stock number 486) and the virulent strains (Gif stock numbers 464 and 431) of *L. bouhardi* has been previously described in detail (Dupas et al., 1998). Briefly, the G486 and G464 strains were obtained, respectively, from populations collected in Congo (Brazzaville) and Tunisia (Nasrallah), and the G431 strain is an isofemale line derived from G464.

The origin of the *D. melanogaster* resistant strain 1088, homozygous for chromosome 2, is described in Carton et al. (1992). In this host–parasitoid system, encapsulation only occurs when resistant *D. melanogaster* strains are parasitised by the avirulent parasitoid strain (Carton and Nappi, 2001).

The hop^{Tum-1} strain (hop^{Tum-1} ; Hanratty and Ryerse, 1981), a tumour-forming stock, was provided by Dr. Hsiling Chiu (City College of City University of New York). Its genotype is $y v hop^{Tum-1}$ on chromosome X. Larvae homozygous or hemizygous for the mutation, identified by their yellow mouth hooks, were used in parasitism experiments.

All *D. melanogaster* strains were raised and parasitised at 25 °C using a standard medium.

2.2. Bioassay procedures

In all experiments, the encapsulation rate (ER) was calculated as the number of host larvae containing only encapsulated eggs (no parasitoid larva), divided by the total number of parasitised host larvae. (This index provides a good estimation of the efficient ER since it discriminates between host larvae that will give rise to an adult parasitoid or an adult fly.)

Statistical analyses were performed using standard ANOVA carried out using SYSTAT software (SPSS, Inc). The level of statistical significance was $p < 0.001$ for all ANOVA analyses except in experiments with tumoral host strains, where it corresponds to the significance of the Fisher test. For tests, parameters (ER, proportion of tumour-forming larvae, proportion of tumours per larva) were normalized with the arcsine function according to Rao (1951) and the residuals were analysed with a Fisher's least-significant-difference test.

2.2.1. Double infestation experiments

Groups of 50 resistant *D. melanogaster* second instar larvae (L2) were submitted to parasitism for 3 h by four females of the G464 virulent strain of *L. bouhardi*.

infestation and the superparasitism rates were estimated on a larval sample and the remaining larvae were submitted to oviposition by four females of the avirulent G486 *L. bouleari* strain, for 5 h. Eight separate experiments were conducted. The larvae were dissected 2 days later and the number of encapsulated and non-encapsulated eggs of the two parasitoid strains was recorded. The eggs of the G486 and G464 strains can be easily recognised since the pedicel of G486 eggs is always blackened in the host, even if the egg is not encapsulated (Carton, unpublished data). The capsules were recorded as G486 encapsulated eggs since no encapsulation of virulent G464 eggs was ever recorded in the controls.

2.2.2. Encapsulation rate changes during a female oviposition period

Ten *L. bouleari* females from the virulent G431 strain were isolated shortly after emergence. They were allowed to infest resistant *D. melanogaster* L2 larvae for 10 h, every day, until their death. The level of parasitism and superparasitism, as well as the encapsulation rate, was recorded every day or every two days.

2.2.3. Hop^{Tum-1} strain infestation experiments

The effects of parasitism on tumorigenesis can be used to investigate the mechanisms of immune suppression by parasitoid wasps by submitting patches of tumorous larvae to parasitism during the early second instar, about 24 h before tumours usually appear. Groups of 50 L2 Hop^{Tum-1} larvae (with yellow mouth hooks) were isolated and submitted to parasitism by three virulent G431 *L. bouleari* females for 4 h. Two days later, the larvae were dissected and the number and the aspect of the tumours were carefully examined. Three categories of tumours were clearly distinguished based on their pigmentation state: non-melanised tumours that appeared as white masses, tumours scattered with pigment particles that were considered as partially melanised, and pigmented masses that correspond to melanotic tumours. Hop^{Tum-1} parasitised larvae of the same developmental stage were observed as controls.

2.3. Injection experiments

2.3.1. Preparation of long gland extracts

Injections were performed using freshly collected extracts from virulent (G431) or avirulent (G486) parasitoid females. For each experiment, the long gland and the reservoir (Rizki and Rizki, 1984) (Fig. 3A) of 25 individuals were carefully removed and placed in a small volume of Ringer's saline solution. It should be noted that the term "long gland" as used throughout this paper corresponds to both the long gland and the reservoir tissues. The samples were homogenised manually in an Eppendorf tube and the extract was centrifuged at 12 000 g, 4 °C for 10 min to precipitate the cellular debris. The

supernatant was then kept on ice until being injected. The protein concentration in the samples was determined spectrophotometrically using the standard method of Bradford (1976). Injection of freshly collected extracts previously heated to 70 °C for 30 min was performed to determine the effect of temperature on the stability of the long gland products.

2.3.2. Injection procedure

D. melanogaster resistant females were allowed to lay eggs on a standard medium for 7 h. Two days later, groups of 20–50 L2 larvae were collected, transferred to a fresh medium and submitted to parasitism alone (control experiments) or to both injection and parasitism. For parasitism, two or three young parasitoid females were allowed to oviposit for 2 h. Injection experiments were performed during a 1-h period.

Injections were performed in *D. melanogaster* L2 larvae using an Eppendorf transjector (FemtoJet®). The successful injection of fluid was verified by observing a slight distension of the injected larvae. Approximately 200 larvae could be injected with a 5 µl sample (containing about 1 µg/µl of proteins), which corresponds to 0.05 wasp-equivalent injected in each larva. The host larvae were dissected 2 days later and the encapsulation rate was estimated as reported above. Not surprisingly, at least half of the larvae that were both injected and parasitised died due to the injuries induced by the manipulation.

2.4. Transmission electron microscopy

Long glands and reservoirs from *L. bouleari* females of the wasp strains G486 and G431 were processed for transmission electron microscopy as described by Russo et al. (1996). Ultrathin sections were examined at 80 kV.

3. Results

3.1. Protection assay using double infestation experiments

To provide final confirmation that the factors injected into the host by virulent *L. bouleari* females broadly impair the encapsulation response, *D. melanogaster* L2 resistant larvae were successively submitted to parasitism by a virulent strain (G464) and the avirulent strain (G486) and the encapsulation rate of avirulent eggs was determined. Eight experiments were performed and the results were pooled since no significant differences were observed between experiments. The encapsulation level in host larvae infested with eggs from one parasitoid strain only was 0% (26 larvae) for the virulent strain and 80.5% (20 larvae) for the avirulent strain, in accordance with the encapsulation rates recorded in parasitism con-

tol experiments (0% (240 larvae) and 85.3% (146 larvae), respectively). Interestingly, the encapsulation rate of the avirulent strain dropped to a mean value of 5.2% in larvae infested by both virulent and avirulent parasitoids (93 larvae; p value < 0.001). This result clearly demonstrates that parasitism by a virulent strain of *L. boulandi* prevents avirulent eggs of the same parasitoid species from being encapsulated.

3.2. Protection assay using injection of long gland extracts

To determine if the long gland products contribute to the active protection conferred by the virulent strain of *L. boulandi*, *D. melanogaster* L2 resistant larvae were injected with long gland extracts from virulent parasitoids (G431 strain) and submitted to oviposition by the avirulent strain. The experimental protocol and the results are summarised in Fig. 1.

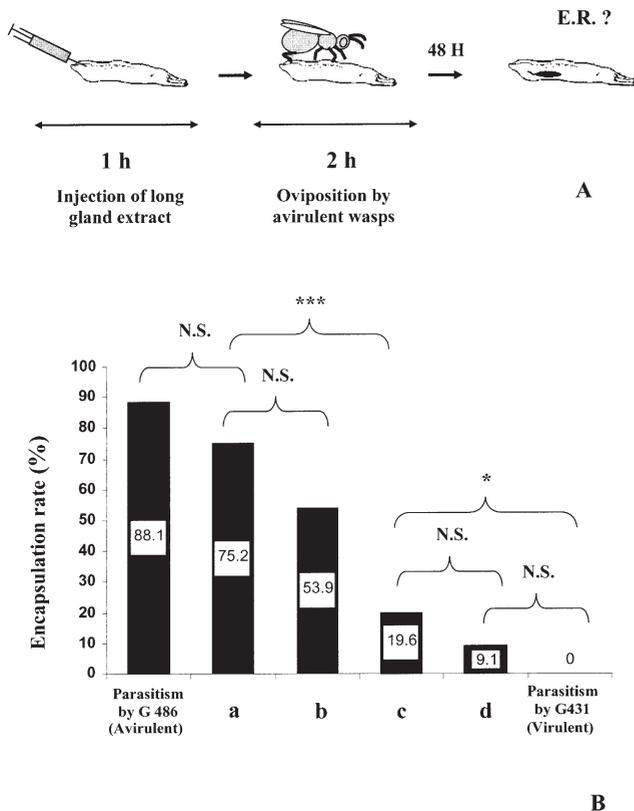


Fig. 1. Injection experiments. *D. melanogaster* resistant L2 larvae were both injected with parasitoid long gland extracts and parasitised with the G486 avirulent strain (A). The ER of avirulent eggs was recorded. Four experiments were designed and the results are provided and compared with control experiments (B). (a) Injection of G486 avirulent long gland extracts before parasitism by the same parasitoid strain; (b) parasitism by the G486 avirulent strain before injection of G431 virulent long gland extracts; (c) injection of G431 virulent long gland extracts before parasitism by the G486 avirulent strain; (d) injection of G431 virulent long gland extracts heated to 70 °C for half an hour before parasitism by the G486 avirulent strain (** p < 0.001; ** p < 0.01; * p < 0.05).

When long gland extracts of avirulent parasitoid females were injected into resistant host larvae before their infestation with the same avirulent strain of parasitoid, ER was 75.2% (50 larvae). This result does not differ significantly from the control, i.e. ER recorded for this parasitoid strain after infestation only (88.1% (156 larvae); p = 0.376). By contrast, injection of long gland extracts from virulent parasitoids (strain G431) resulted in a significant decrease of the encapsulation rate of avirulent eggs. When the host larvae were first injected and then parasitised, the encapsulation rate dropped to 19.6% (103 larvae; p < 0.001). The injection of virulent extracts thus prevents most avirulent eggs from being encapsulated. Interestingly, when the host larvae were parasitised before being injected, the encapsulation rate was not significantly reduced (ER = 53.9% (59 larvae); p = 0.098). The encapsulation rates differ significantly between the two experiments, injection first vs. parasitism first (p = 0.002). Finally, parasitism of resistant host larvae by the virulent strain led to a 0% encapsulation rate (240 larvae), which indicates that female oviposition remains slightly more efficient than injection of long gland extracts (p = 0.017).

Injection experiments were also conducted to determine if the factors that suppress encapsulation of *L. boulandi* eggs are inactivated by heating, as is the lamelloylin factor described in *L. heterotoma*. The ER of the avirulent strain of parasitoid was again significantly lowered in host larvae previously injected with long gland extracts of virulent parasitoid females that had been heated to 70 °C for 30 min (ER = 9.1% (64 larvae); p < 0.001). This was not significantly different from the results of injection experiments using extracts of the same parasitoid strain not submitted to heating (p = 0.282). Thus, the immune suppressive factors contained in the long gland of *L. boulandi* are not highly temperature sensitive.

3.3. Effects of female age and parasitism experience on immune suppressive ability

To better characterise the immune suppressive ability of *L. boulandi*, 10 virulent G431 females were isolated and the encapsulation rate of their eggs was recorded every day. For a 12-day oviposition period, 822 eggs were oviposited by the female wasps. The level of infestation decreased from 100% to 87.7% until day 6; for the sixth- to 12th-day period, the oviposition rate became irregular and fell to a value less than 50%. The mean level of superparasitism was 66.7% on the first laying day but dropped to 8% the next day and remained close to 0% until the end of the experiment.

The encapsulation rate of the eggs laid by the females remained equal to 0% from the beginning to the end of the experiment. Larvae of the same host strain were submitted to parasitism by females of the G486 avirulent

parasitoid strain and the recorded encapsulation level was about 85%, indicating that the host strain displays a normal encapsulation ability. The immune suppressive ability of the virulent parasitoid strain is thus independent both of female age and parasitism experience.

3.4. *Hop^{Tum-1}* infestation experiments

Larvae of the tumorous *Hop^{Tum-1}* strain produce an overabundance of lamellocytes and encapsulate various endogenous tissues to form melanotic tumours (Nappi and Streams, 1969). These characteristics can be used to investigate the mechanisms of immune suppression by a parasitoid wasp since the destruction of host lamellocytes or the modification of their adhesion properties might affect the incidence of tumours. Possible effects on the melanisation pathway can also be inferred from changes in the proportion of melanised tumours.

Hop^{Tum-1} homozygous and hemizygous larvae were subjected to parasitism by the G431 *L. boulandi* strain and the proportion of the tumour-forming larvae (as well as the aspect of the tumours) was recorded and compared with non-parasitised controls (Fig. 2). No significant difference was observed between parasitised ($n = 122$) and control samples ($n = 425$) considering all the tumours (21% as compared to 29.3%; $p = 0.144$) or melanised tumours only (16.7% and 28.8%, respectively; $p = 0.057$). However, two categories of melanised tumours could be distinguished in tumorous larvae, completely melanised tumours (melanotic masses) and partially melanised tumours (see Materials and methods). Considering only melanotic masses, the proportion of tumour-forming larvae was significantly higher in control as compared to parasitised larvae (23.4% vs. 10.8%; $p = 0.018$). Accordingly, the proportion of completely melanised tumours by larva was significantly decreased in the parasitised sample (43.5%, $n = 31$) as compared to the control (77.6%, $n = 128$) ($p < 0.001$), while the proportion of partially melanised tumours was significantly increased (37.1% as compared to 14.2%, $p = 0.001$). It thus appears that the immune suppressive factors injected by virulent female wasps do not impair the formation of the tumours but they display a significant inhibitory effect on the melanisation process.

3.5. VLPs in the long gland reservoir

VLPs had been previously described in the reservoir of long glands by Dupas et al. (1996). Our data confirm that these tissues contain large aggregates as well as 100–400 nm vesicle-containing particles, surrounded by a double membrane. The particles differ in their shape and length between virulent and avirulent strains (Fig. 3B and C), avirulent particles being more elongated and containing less vesicles. In the apical part of the reservoir, numerous microvilli can be observed (Fig. 3D). The

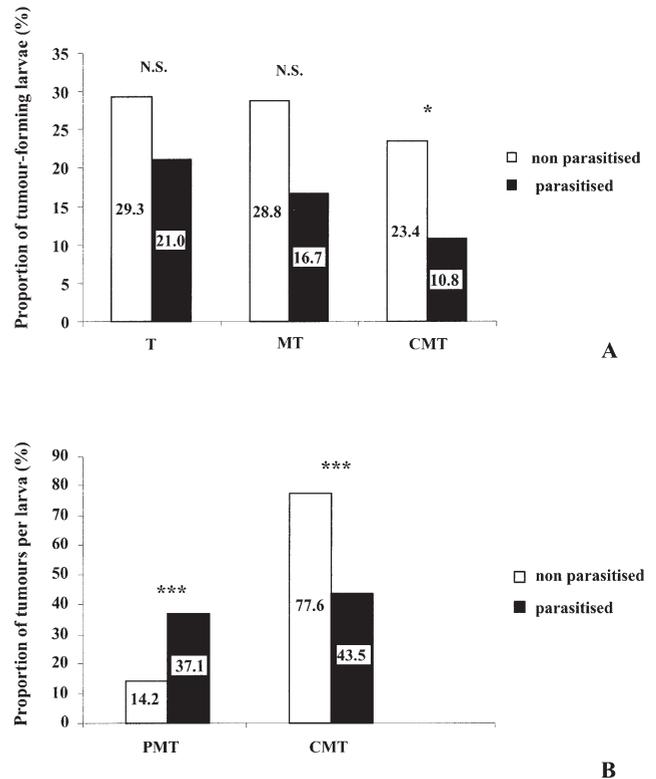


Fig. 2. Parasitism experiments on tumorous host larvae. *Hop^{Tum-1}* L2 larvae were isolated and submitted to parasitism by virulent G431 *L. boulandi* females. Two days later, the larvae were dissected and the number and the aspect of the tumours (T) were determined and compared with non-parasitised controls. Three categories of tumours are distinguished: non-melanised tumours (white masses), tumours scattered with pigment particles corresponding to partially melanised tumours, and melanotic masses recorded as completely melanised tumours (** $p < 0.01$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$). (A) Proportion of tumour-forming larvae (T, tumours; CMT, completely melanised tumours; MT: melanised tumours). (B) Proportion of partially melanised (PMT) and completely melanised tumours (CMT) per larva.

presence of microvilli has not been previously described and is consistent with a possible role of the reservoir as a secretory organ. This result is in agreement with data of Dupas et al. (1996), indicating that the long gland fluid is subjected to a chemical modification during its transfer through the reservoir.

4. Discussion

4.1. The long gland products confer active protection to parasitoid eggs

Results of multiparasitism experiments have shown that oviposition by *L. heterotoma* can protect eggs of other parasitoid species from being encapsulated (Streams and Greenberg, 1969; Carton and Kitano, 1981; van Striem-van Liempt, 1983), thus demonstrating the occurrence of immune suppressive factors in this spec-

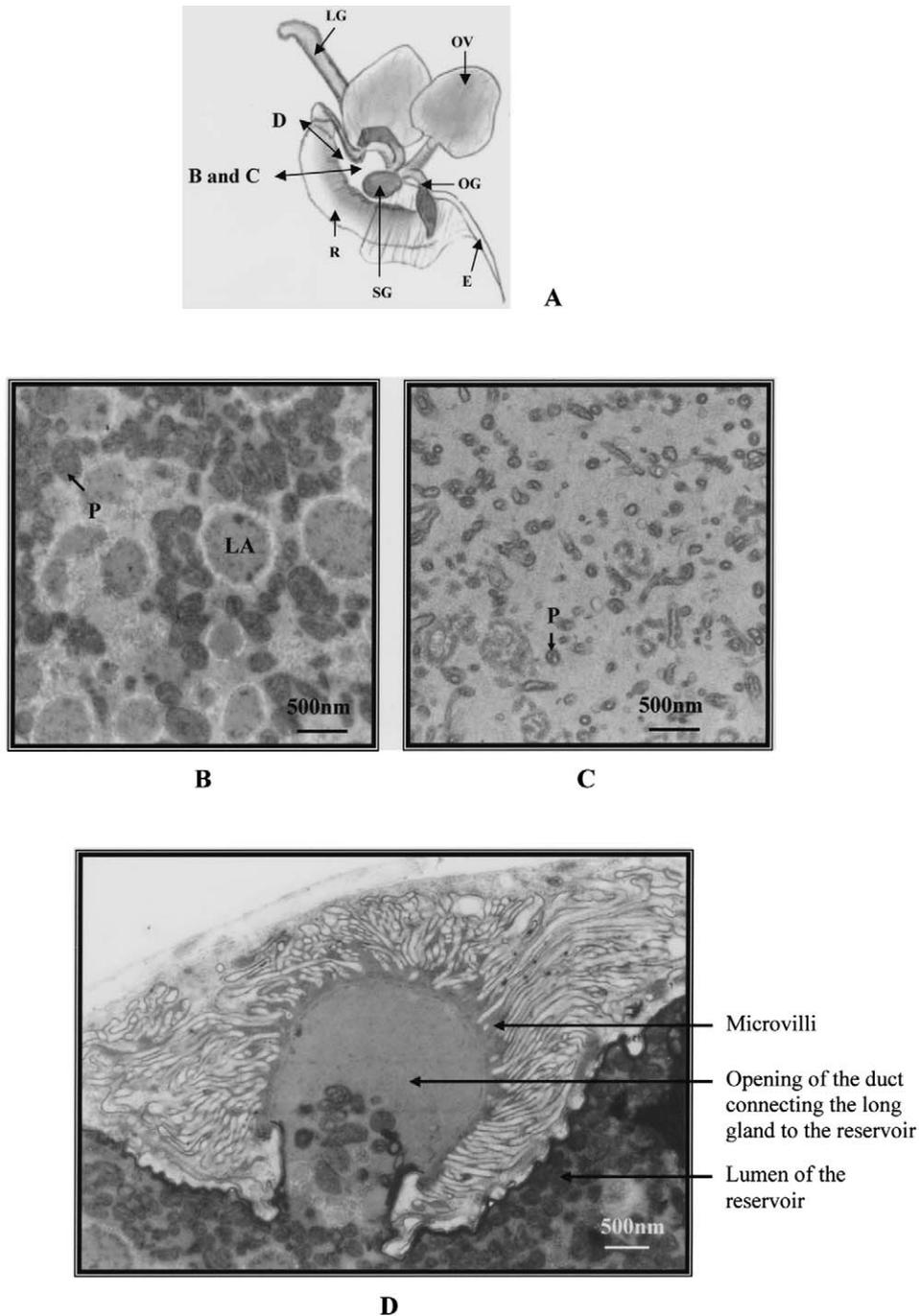


Fig. 3. Results of transmission electron microscopy. (A) Drawing of the ovary and associated glands of *L. bouleari* (OV, ovary; OG, oviducal gland; SG, sac gland; E, portion of the external genitalia; LG, long gland connected by a duct to its reservoir R). Localisation of the transversal sections corresponding to (B), (C) and (D) is indicated. (B) VLPs in the reservoir of a G431 virulent female. LA, large aggregates; P, particles. (C) VLPs in the reservoir of a G486 avirulent female. P, particles. (D) Transversal section of the apical part of the reservoir of a G431 virulent female. Numerous microvilli are observed.

ies. It has been previously suggested that *L. bouleari* also uses an active mechanism of immunosuppression based on the observation that VLPs are injected into parasitised hosts and that the host lamellocytes, normally involved in capsule formation, undergo morphological changes following wasp oviposition, as described for *L. heterotoma* (Rizki and Rizki, 1990; Dupas et al., 1996;

Russo et al., 2001). Moreover, multiparasitism data using *L. bouleari* indicate that oviposition by *L. bouleari* females can increase the survival of *A. tabida* parasitoids in *D. simulans* host larvae (from 0.5% to 15%, Kraaijeveld, 1999), which may be explained by immune protection.

The results of double infestation and injection experi-

ments presented in this paper clearly show that the substances injected by virulent *L. bouvardi* females prevent eggs of the avirulent strain from being encapsulated. This provides a definitive experimental demonstration that this cynipid parasitoid uses an active mechanism of immunosuppression to ensure successful development of its progeny in the host. We demonstrate here that the oviposition of eggs displaying a virulent genotype will protect eggs of avirulent genotype if superparasitism occurs. The incidence of virulence polymorphism in parasitoid populations will thus be of great interest to understand the evolution of this trait.

The results of injection experiments also demonstrate that the long gland products are involved in the active protection mechanism. Injection of long gland extracts from virulent parasitoids into host larvae strongly reduces the encapsulation rate of avirulent *L. bouvardi* eggs. In contrast to the results observed in case of parasitism by virulent females, encapsulation is not totally suppressed by injection of long gland extracts, suggesting that additional factors not produced in the long gland may also contribute to the immune suppressive capacity. Such a situation would not be surprising from what is known about the most studied ichneumonid wasps that combine several modes of protection using not only polydnvirus particles but also secreted ovarian proteins injected during oviposition (Webb and Luckhart, 1994; Luckhart and Webb, 1996). In *L. heterotoma*, another figitid species, trophic cells are released from the egg at the time of hatching that could also be involved in protecting the egg from encapsulation (Nappi, 1968). However, it remains possible that the quantity of long gland extracts injected was insufficient to mimic the amount of the active factors provided during natural parasitism and this might explain the lower rate of immune suppression observed following experimental injection.

4.2. What are the nature and physiological effects of *L. bouvardi* immune suppressive factors?

We have demonstrated that the long gland of virulent *L. bouvardi* females contains factors that ensure an active immunosuppression of the parasitised host. Unlike the situation described by Vass and Nappi (1998), the immune suppressive ability does not decrease with oviposition experience in the G431 virulent strain, indicating that immune suppressive factors are continually active or renewed during the female wasp's life. Similarly, polydnvirus associated wasps ensure parasitism success during all their life through the continuous production of polydnvirus particles (Webb, 1998).

VLPs have been described in the long gland of *L. bouvardi* and their morphology is correlated with the immune suppressive capacity of the strain (Dupas et al., 1996). Thus, VLPs might constitute the immune suppressive substances used by virulent parasitoid females.

The presence of DNA in the VLPs has never been established but mendelian segregation of the immune suppressive ability has been demonstrated (Dupas et al., 1998). The particles could thus represent wasp-encoded protein aggregates aimed at delivering immune suppressive factors into host cells, the secretory structures of the apical part of the reservoir being involved, for example, in the maturation of these assemblies. Alternatively, *L. bouvardi* VLPs might be considered as “defective” viruses, the genome of which resides within the parasitoid genome but fails to be packaged into virus particles, as suggested for *Venturia canescens* VLPs (Schmidt and Schuchmann-Federsen, 1989). Compared to polydnvirus–wasp association, this would represent another step of virus–wasp symbiosis. The experimental approach described in this paper should be helpful in designing protocols for the injection of purified VLPs aimed at testing their contribution in the suppression of encapsulation.

In several host–parasitoid systems, the parasitoid provokes a drop in the number of competent haemocytes (i.e. the lamellocytes in dipteran species), and this reduction is supposed to prevent the formation of a capsule. Parasitism of tumorous *D. melanogaster* strains can be used to detect these cellular changes since a reduction in lamellocyte abundance might affect the incidence of tumours (Walker, 1959; Nappi, 1975; Chiu et al., 2001). Our results, using the Hop^{Tum-1} host strain, suggest that parasitism by the *L. bouvardi* G431 strain does not affect the number of host lamellocytes, which confirms the results of Rizki et al. (1990) using the *tu-W* tumorous host strain and the *L. bouvardi* G317 virulent strain. Unexpectedly, comparison of the incidence of completely melanised and partially melanised tumours suggests that parasitism by the G431 strain has a significant effect on the host melanisation process. Such effects have previously been observed in response to the injection of polydnviruses by ichneumonid and braconid wasp species (Beckage et al., 1990; Shelby et al., 2000). Thus, if VLPs are responsible for immune suppression in *L. bouvardi*, they display both cellular (modification of the lamellocytes morphology) and humoral effects, as is the case for polydnviruses (Beckage, 1998).

Interestingly, injection experiments demonstrate that immune suppressive factors are able to ensure protection of parasitoid eggs only when they are supplied with the egg or very shortly after oviposition. Indeed, a significant level of protection is obtained when virulent extracts are injected before infestation (ER = 19.6%), in contrast to the results observed in response to injection less than 3 h after infestation (ER = 53.9%). The change in the morphology of host lamellocytes that occurs following parasitism by the virulent strain only becomes detectable much later, from 6 h post-infestation (Russo et al., 2001). The fact that *L. bouvardi* long gland factors are effective in the very early phase of parasitism indi-

cates either that there is no requirement for the expression of a virus genome in the host, or that different mechanisms act to protect parasite eggs in the early and late stages of parasitism, as described for example in *Heliothis virescens* parasitised by the polydnavirus-bearing wasp *Camponotus sonorensis* (Webb and Luckhart, 1996).

4.3. Do immune suppressive factors differ between *L. boulandi* and *L. heterotoma*?

The occurrence of an active immune suppression mechanism, localised in the long gland, is now clearly established in *L. boulandi* and strongly suggested in *L. heterotoma*, another figitid species. However, striking differences are found between these two species. In *L. boulandi*, we observed that the immune suppressive ability is independent of the age of the female wasp or her experience of parasitism, in contrast to the observations made with *L. heterotoma* (Streams, 1968; Streams and Greenberg, 1969). Using the same experimental conditions, the recorded encapsulation rate of *L. heterotoma* eggs was 0% at the beginning of the female life and increased from day 4, reaching 50% at day 8 (Streams, 1968), while no encapsulation of *L. boulandi* virulent eggs was ever recorded. The immune suppressive factors of the two species differ in their properties. The effectiveness of *L. boulandi* long gland virulent extracts is not reduced after heating, while *L. heterotoma* long gland extracts (mainly the lamelloylase factor) are inactivated by exposure to the same temperature conditions (Rizki and Rizki, 1990). Moreover, the ultrastructural aspect of the VLPs observed in the long gland is clearly different between the two *Leptopilina* species (Dupas et al., 1996; Rizki and Rizki, 1990).

In vitro studies have demonstrated that the VLPs of *L. heterotoma* selectively destroy host lamellocytes and are thus responsible for their decreased frequency in parasitised hosts and the striking reduction of tumour incidence in tumorous host strains (Rizki et al., 1990; Rizki and Rizki, 1991, 1992). With *L. boulandi*, cytomorphic changes are also apparent in lamellocytes but their destruction has not been reported (Russo et al., 2001). Accordingly, our results demonstrate a non-significant effect of parasitism by the G431 virulent strain on the proportion of tumour-forming larvae. In contrast, the melanisation processes appear to be impaired, a phenomenon that has not been studied in *L. heterotoma*.

Finally, we have shown that the injection of *L. boulandi* virulent factors along with the parasitoid egg or very shortly after oviposition is required to confer a significant level of protection to avirulent eggs. In contrast, parasitism by *L. heterotoma* can protect eggs of other parasitoid species oviposited in the same host larvae more than 36 h earlier (Streams and Greenberg, 1969).

Altogether, the available data suggest that the viru-

lence mechanisms used by the two figitid species differ in several biological and physiological aspects. The immune suppressive factors of *L. heterotoma*, a species that parasitises a broader range of hosts, display more destructive effects on host lamellocytes but their efficiency decreases with female oviposition. *L. boulandi* appears to target host defence mechanisms in a more specific way, a hypothesis supported by the results of Fellowes et al. (1999), which demonstrate that selection of *D. melanogaster* lines resistant to the braconid wasp *A. tabida* is correlated with an increased resistance to *L. heterotoma* but not to *L. boulandi*. The increase in haemocyte number observed in these lines (Kraaijeveld et al., 2001) is supposed to be responsible for resistance and would be efficient against the two generalist species *A. tabida* and *L. heterotoma*. In contrast, virulence in *L. boulandi*, as well as resistance against this parasitoid species, seems much more specific. The nature of the immune suppressive substances localised in the long gland of *L. boulandi* is currently under investigation and their identification will be helpful to solve this question.

The idea that physiological strategies of immunosuppression might differ between specialist and generalist parasitoid species is of great interest both for evolutionary and ecological theories. Indeed, the specificities of resistance and virulence mechanisms are major parameters involved in studying co-evolutionary processes in host–parasitoid systems and will also have a great impact on the structuring of host–parasitoid communities (Lapchin, 2002). This hypothesis remains of course to be tested using other parasitoid species and families.

Acknowledgements

This work was supported by the French CNRS–INRA program Biodiversité–Interactions Durables, the French GDR 2153 and the IFR “Biologie des Transposons et des Virus”. We are grateful to S. Trassard and P.Y. Sizarret for help with electronic microscopy, Dr. H. Chiu who provided us the Hop^{Tum-1} strain of *D. melanogaster*, Dr. C. Dupuy for the drawing of the *Leptopilina boulandi* long gland and Dr. E. Huguet for helpful comments on the manuscript.

References

- Asgari, S., Schmidt, O., 1994. Passive protection of eggs from the parasitoid, *Cotesia rubecula*, in the host, *Pieris rapae*. *Journal of Insect Physiology* 40, 789–795.
- Asgari, S., Hellers, M., Schmidt, O., 1996. Host haemocyte inactivation by an insect parasitoid: transient expression of a polydnavirus gene. *Journal of General Virology* 77, 2653–2662.
- Asgari, S., Theopold, U., Welby, C., Schmidt, O., 1998. A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 3690–3695.

- Beckage, N.E., 1998. Modulation of immune responses to parasitoids by polydnviruses. *Parasitology* 116 (Suppl.), 57–64.
- Beckage, N.E., Metcalf, J.S., Nesbit, D.J., Schleifer, K.W., Zetlan, S.R., Buron, I.D., 1990. Host hemolymph monophenoloxidase activity in parasited *Manduca sexta* larvae and evidence for inhibition by wasp polydnvirus. *Insect Biochemistry* 20 (3), 285–294.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254.
- Carton, Y., 1975. Reactions hémocytaires chez la chrysalide des Lépidoptères. Intensité de la réaction en fonction de sa localisation chez *Pieris brassicae*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* 281, 579–582.
- Carton, Y., Kitano, H., 1981. Evolutionary relationships to parasitism by seven species of the *Drosophila melanogaster* subgroup. *Biological Journal of the Linnaean Society* 16, 227–241.
- Carton, Y., Nappi, A.J., 1991. The *Drosophila* immune reaction and the parasite capacity to evade it: genetic and coevolutionary aspects. *Acta Oecologia* 12, 89–104.
- Carton, Y., Nappi, A.J., 1997. *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today* 13 (6), 218–227.
- Carton, Y., Nappi, A.J., 2001. Immunogenetics aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* 52, 157–164.
- Carton, Y., Frey, F., Nappi, A.J., 1992. Genetic determinism of the cellular immune reaction in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 69, 393–999.
- Chiu, H., Sorrentino, R.P., Govind, S., 2001. Suppression of the *Drosophila* cellular immune response by *Ganaspis xanthopoda*. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 484, 161–167.
- Davies, D., Vinson, S.B., 1986. Passive evasion by eggs of the braconid parasitoid *Cardiochiles nigriceps* from encapsulation in vitro by haemocytes of host *Heliotho virescens*. *Journal of Insect Physiology* 32, 1003–1010.
- Dupas, S., Brehelin, M., Frey, F., Carton, Y., 1996. Immune suppressive virus-like particles in a *Drosophila* parasitoid: significance of their intraspecific morphological variations. *Parasitology* 113 (Pt 3), 207–212.
- Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., 1998. A single parasitoid segregating factor controls immune suppression in *Drosophila*. *Journal of Heredity* 89 (4), 306–311.
- Eslin, P., Prevost, G., 2000. Racing against host's immunity defenses: a likely strategy for passive evasion of encapsulation in *Asobara tabida* parasitoids. *Journal of Insect Physiology* 46 (8), 1161–1167.
- Feddersen, I., Sanders, K., Schmidt, O., 1986. Virus-like particles with host protein-like antigenic determinants protect an insect parasitoid from encapsulation. *Experientia* 42, 1278–1281.
- Fellowes, M., Godfray, H.C.J., 2000. The evolutionary ecology of resistance to parasitoids by *Drosophila*. *Heredity* 84, 1–8.
- Fellowes, M., Kraaijeveld, A.R., Godfray, H.C.J., 1999. Cross-resistance following artificial selection for increased defense against parasitoids in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53 (3), 966–972.
- Hanratty, W.P., Ryerse, J.S., 1981. A genetic melanotic neoplasm of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* 83 (2), 238–249.
- Hayakawa, Y., Yazaki, K., 1997. Envelope protein of wasp PDV protects wasp eggs from cellular immune reactions of host. *European Journal of Biochemistry* 246, 820–826.
- Kinuthia, W., Li, D.M., Schmidt, O., Theopold, U., 1999. Is the surface of endoparasitic wasp eggs and larvae covered by a limited coagulation reaction? *Journal of Insect Physiology* 45 (5), 501–506.
- Kraaijeveld, A.R., 1999. Kleptoparasitism as an explanation for paradoxical oviposition decisions of the parasitoid *Asobara tabida*. *Journal of Evolutionary Biology* 12, 129–133.
- Kraaijeveld, A.R., van Alphen, J.M., 1994. Geographical variation in resistance of the parasitoid *A. tabida* against encapsulation by *D. melanogaster* larvae: the mechanism explored. *Physiological Entomology* 19, 9–14.
- Kraaijeveld, A.R., Limentani, E.C., Godfray, H.C.J., 2001. Basis of the trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 268 (1464), 259–261.
- Lapchin, L., 2002. Host–parasitoid association and diffuse coevolution: when to be a generalist? *American Naturalist* 160, 245–254.
- Lavine, M.D., Strand, M.R., 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32 (10), 1295–1309.
- Luckhart, S., Webb, B.A., 1996. Interaction of a wasp ovarian protein and polydnvirus in host immune suppression. *Developmental and Comparative Immunology* 20 (1), 1–21.
- Nappi, A.J., 1968. Hemocytic reactions of *Drosophila euronotus* to *Pseudocoila bochei* and their relationship to encapsulation in *Drosophila melanogaster*. *Connecticut, Storrs*, p. 121.
- Nappi, A.J., 1975. Inhibition by parasites of melanotic tumour formation in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 255 (5507), 402–404.
- Nappi, A.J., Streams, F.A., 1969. Hemocytic reactions of *Drosophila melanogaster* to the parasites *Pseudocoila mellipes* and *P. bochei*. *Journal of Insect Physiology* 15, 1551–1566.
- Nappi, A.J., Vass, E., 1993. Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Research* 6 (3), 117–126.
- Nappi, A.J., Carton, Y., Frey, F., 1991. Parasite-induced enhancement of hemolymph tyrosinase activity in a selected immune reactive strain of *Drosophila melanogaster*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 18 (3), 159–168.
- Rao, C.R., 1951. *Advanced Statistical Methods in Biometrical Research*. John Wiley and Son Inc, New York.
- Rizki, R.M., Rizki, T.M., 1984. Selective destruction of a host blood cell type by a parasitoid wasp. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 81, 6154–6158.
- Rizki, R.M., Rizki, T.M., 1990. Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 87, 8388–8392.
- Rizki, R.M., Rizki, T.M., 1991. Effects of lamelolysin from a parasitoid wasp on *Drosophila* blood cells in vitro. *Journal of Experimental Zoology* 257 (2), 236–244.
- Rizki, T.M., Rizki, R.M., 1992. Lamellocyte differentiation in *Drosophila* larvae parasitized by *Leptopilina*. *Developmental and Comparative Immunology* 16 (2-3), 103–110.
- Rizki, T.M., Rizki, R.M., 1994. Parasitoid-induced cellular immune deficiency in *Drosophila*. *The Annals of the New York Academy of Sciences* 712, 178–194.
- Rizki, T.M., Rizki, R.M., Carton, Y., 1990. *Leptopilina heterotoma* and *L. bouvardi*: strategies to avoid cellular defense responses of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Parasitology* 70 (4), 466–475.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., Brehelin, M., 1996. Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina bouvardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology* 112, 135–142.
- Russo, J., Brehelin, M., Carton, Y., 2001. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina bouvardi*. *Journal of Insect Physiology* 47 (2), 167–172.
- Schmidt, O., Schuchmann-Feddersen, I., 1989. Role of virus-like particles in parasitoid–host interaction of insects. In: Harris, J.R. (Ed.), *Subcellular Biochemistry*. Plenum Press, New York, pp. 91–119.
- Shelby, K.S., Webb, B.A., 1999. Polydnvirus-mediated suppression of insect immunity. *Journal of Insect Physiology* 45 (5), 507–514.
- Shelby, K.S., Adeyeye, O.A., Okot-Kotber, B.M., Webb, B.A., 2000. Parasitism-linked block of host plasma melanization. *Journal of Invertebrate Pathology* 75 (3), 218–225.

- Streams, F.A., 1968. Factors affecting the susceptibility of *Pseudocoila bochei* eggs to encapsulation by *Drosophila melanogaster*. Journal of Invertebrate Pathology 12, 379–387.
- Streams, F.A., Greenberg, L., 1969. Inhibition of the defence reaction of *Drosophila melanogaster* parasitized simultaneously by the wasps *Pseudocoila bochei* and *Pseudocoila mellipes*. Journal of Invertebrate Pathology 13, 371–377.
- van Striem-van Liempt, W.T.F.H., 1983. The competition between *Asobara tabida* (Nees von Esenbeck, 1834) and *L. heterotoma* (Thompson, 1862) in multiparasitized hosts. Netherland Journal of Zoology 33 (2), 125–163.
- Vass, E., Nappi, A.J., 1998. Prolonged oviposition decreases the ability of the parasitoid *Leptopilina boulardi* to suppress the cellular immune response of its host *Drosophila melanogaster*. Experimental Parasitology 89 (1), 86–91.
- Walker, I., 1959. Die Abwehrreaktion des Wirtes *Drosophila melanogaster* gegen die zoophage Cynipidae *Pseudocoila bochei* Weld. Revue Suisse de Zoologie 66, 570–632.
- Webb, B.A., 1998. Polydnavirus biology, genome structure, and evolution. In: Miller, L.K., Ball, L.A. (Eds.), The Insect Viruses. Plenum Publishing Corporation, New York, pp. 105–139.
- Webb, B.A., Luckhart, S., 1994. Evidence for an early immunosuppressive role for related *Campoletis sonorensis* venom and ovarian proteins in *Heliothis virescens*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 26 (2-3), 147–163.
- Webb, B.A., Luckhart, S., 1996. Factors mediating short- and long term immune suppression in a parasitized insect. Journal of Insect Physiology 42, 33–40.

RESUME

VARIATION INTRA SPÉCIFIQUE DE RÉSISTANCE ET DE VIRULENCE DANS UN SYSTÈME HÔTE-PARASITOÏDE :

Approche intégrative de la spécificité des interactions

Les insectes parasitoïdes emploient un mode de vie particulier situé à mi-chemin entre prédation et parasitisme. Ce sont des insectes qui effectuent leur développement larvaire aux dépens d'un autre arthropode, généralement un insecte, qui va mourir à l'issue de l'interaction. Comme pour tout parasite obligatoire, le succès reproducteur d'un parasitoïde dépend en grande partie de sa capacité à infester avec succès son hôte. De son côté, l'hôte étant totalement consommé avant d'avoir laissé une descendance en cas de réussite parasitaire, son succès reproducteur dépend de sa capacité à échapper au parasitisme. Au niveau immunitaire, la réponse de la plupart des insectes aux corps étrangers tels que les œufs de parasitoïdes est la réaction d'encapsulation, qui consiste en l'élaboration d'une capsule multicellulaire mélanisée autour de l'intrus. En réponse à ce mécanisme de résistance, de nombreuses adaptations visant à éviter l'encapsulation, appelées stratégies de virulence, ont été sélectionnées au cours de l'histoire évolutive des parasitoïdes. L'issue de l'interaction entre un parasitoïde et son hôte est donc fortement influencée par les adaptations réciproques des espèces hôtes et parasitoïdes considérées, mais aussi par les variations de virulence et de résistance existant au sein de chaque espèce, un aspect qui a été négligé jusqu'à présent.

Le travail de thèse présenté ici porte sur les variations de virulence du parasitoïde et les variations de résistance de l'hôte à l'origine de variations dans l'issue du parasitisme dans le modèle *Leptopilina boulardi* - *Drosophila yakuba*. Deux lignées du parasitoïde *L. boulardi*, présentant des capacités de virulence contrastées vis à vis de l'hôte *D. yakuba*, ont été étudiées et comparées pour leur comportement de sélection d'hôte et leur stratégie de virulence. Les résultats obtenus suggèrent une relation entre capacités de virulence et comportement de choix d'hôte chez *L. boulardi* et démontrent l'existence chez une même espèce de parasitoïde de stratégies parasitaires différentes utilisées contre deux espèces hôtes. Les effets physiologiques du parasitisme sur l'immunité de l'hôte sont décrits et l'étude de la nature des facteurs de virulence est abordée. Les bases génétiques et physiologiques de la variation de résistance à *L. boulardi* chez l'hôte *D. yakuba* ont été par ailleurs étudiées à l'aide de deux lignées hôtes respectivement sensible et résistante.

L'ensemble des données obtenues au cours de cette thèse ont été comparées avec les données disponibles dans le modèle *L. boulardi* - *D. melanogaster* dans une approche permettant d'aborder les problèmes de spécificité d'hôte au niveau physiologique et moléculaire..

Mots-clefs : *Leptopilina boulardi*, drosophiles, parasitoïde, spécificité parasitaire, interactions, résistance, virulence, comportement.

SUMMARY

INTRA SPECIFIC VARIATION IN RESISTANCE AND VIRULENCE IN

A HOST PARASITOID SYSTEM :

An integrative approach of the specificity of interactions.

Parasitoid species share an original way of life, between predation and parasitism. They are mostly insects that develop at the expense of other arthropods, generally other insects, which will die as a result of the interaction. As obligatory parasites, parasitoids have a reproductive success that totally depends on their ability to successfully infest their host. On the other hand, the host has no chance of reproducing if parasitism is successful, and its reproductive success thus depends on its ability to avoid or overcome parasitism.

The insect response against endoparasitoids mainly involve immune defences. Foreign invaders of large body size (such as a parasitoid egg) can be surrounded by a melanized, multicellular capsule, a process called “encapsulation”. The parasitoid success thus clearly depends on its ability to avoid or circumvent this host immune response. As a consequence, several adaptations aimed to avoid egg encapsulation (i.e. virulence strategies), have been selected during the evolutionary history of parasitoids.

The outcome of host – parasitoid interactions is thus basically determined by the reciprocal adaptations of interacting parasitoid and host species. However, intra specific variations of resistance and virulence, which are also of great importance for coevolutionary processes, have been totally unexplored.

The research work reported in this manuscript describes and analyzes intraspecific variations in parasitoid virulence and host resistance that explain variations in parasitism outcome in the *Leptopilina boulardi* - *Drosophila yakuba* system. Two parasitoid lines, having opposite virulence abilities against *D. yakuba*, have been compared for both host selection behaviour and virulence strategies. Results suggest the existence of a relationship between virulence properties and host selection behaviour in *L. boulardi*. Besides, they demonstrate that different virulence strategies, against different host species, can be found in a single parasitoid species. The physiological effects of parasitism on host immune processes are described and the nature of some of the virulence factors is analyzed.

In a last part, the genetic and physiological bases of resistance to *L. boulardi* in the host *D. yakuba* are considered, using two host lines respectively susceptible and resistant to this parasitoid.

Using data available in the *L. boulardi* - *D. melanogaster* model, the whole results are finally integrated in a broader model summarizing *L. boulardi* interactions with the two host species *D. melanogaster* and *D. yakuba*, which allows discussing the problem of host specificity in parasitoids at the physiological and molecular level.

Key-words : *Leptopilina boulardi*, *Drosophila*, parasitoid, parasite specificity, interactions, resistance, virulence, behaviour.

Interactions matrix

in the *Drosophila* - *Leptopilina boulardi* reference system

		Host: <i>D. melanogaster</i>		Host: <i>D. yakuba</i>	
		S line	R line	R ₁ line	R ₂ line
parasitoid: <i>L. boulardi</i> 	IS_m line "common type" (ref G431)	No encapsulation 	No encapsulation 	Encapsulation 	Encapsulation 
	IS_y line "atypical type" (ref G486)	No encapsulation 	Encapsulation 	No encapsulation 	Encapsulation 

"Virulent" on *D. melanogaster*
 "Avirulent" on *D. yakuba*

by misuse of language :
 "Avirulent" on *D. melanogaster*
 "Virulent" on *D. yakuba*