



**Virus manipulateurs du comportement des insectes :
prévalence et influence sur la structure des
communautés hôtes : exemple de l'association
Leptopilina boulardi / LbFV**

Sabine Patot

► **To cite this version:**

Sabine Patot. Virus manipulateurs du comportement des insectes : prévalence et influence sur la structure des communautés hôtes : exemple de l'association *Leptopilina boulardi* / LbFV. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2009. Français. NNT : 2009LYO10103 . tel-00451287

HAL Id: tel-00451287

<https://theses.hal.science/tel-00451287>

Submitted on 28 Jan 2010

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.

THESE

présentée

devant l'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON I

pour l'obtention

du DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

par

Sabine PATOT

Virus manipulateurs du comportement des insectes :
prévalence et influence sur la structure des communautés hôtes
Exemple de l'association *Leptopilina boulardi* / LbFV

présentée et soutenue publiquement le 10 juillet 2009 devant la commission d'examen :

Pierre JOLY, Prof. Univ. Lyon 1	<i>Examineur</i>
Jacques VAN ALPHEN, Prof. Univ. Leiden (Pays-Bas)	<i>Rapporteur</i>
Anne-Nathalie VOLKOFF, C. R. INRA, Montpellier	<i>Rapporteur</i>
Thierry RIGAUD, D. R. CNRS, Dijon	<i>Examineur</i>
Frédéric FLEURY, Prof. Univ. Lyon 1	<i>Directeur</i>
Julien VARALDI, M.C.U., Univ. Lyon 1	<i>Co-directeur</i>

Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558
Université Claude Bernard, Lyon 1
43 bd du 11 novembre 1918
69622 Villeurbanne Cedex

Avant-propos

Ce manuscrit présente l'ensemble du travail de recherche accompli au cours de ma thèse. Je me suis intéressée à l'étude d'un virus manipulateur du comportement d'infestation d'un parasitoïde de drosophiles. Le présent rapport est composé de six chapitres, encadrés d'une introduction et d'une discussion générales. Chaque chapitre, à l'exception du premier et du quatrième, est organisé autour d'un manuscrit publié, soumis ou en préparation. Avant chaque manuscrit, une synthèse des principaux objectifs, résultats et conclusions est présentée. Parfois, des expériences complémentaires, non présentées dans les articles, viennent s'y ajouter.

Le premier chapitre décrit les connaissances sur les parasitoïdes de drosophiles, et plus particulièrement *Leptopilina boulardi* et *Leptopilina heterotoma*. Il y est également présenté les connaissances disponibles en début de thèse sur les associations de ces deux espèces de parasitoïdes avec des partenaires symbiotiques (principalement *L. boulardi* / LbFV et *L. heterotoma* / *Wolbachia*) ainsi que les lignées d'insectes utilisées. Les chapitres suivants exposent les résultats obtenus au cours de la thèse. Le chapitre II décrit la mise au point d'un outil moléculaire diagnostic de l'infection du virus manipulateur du comportement chez les parasitoïdes de drosophiles et donne des informations, encore préliminaires, sur l'aspect moléculaire de la manipulation. La suite du manuscrit s'intéresse à la prévalence du virus dans les populations naturelles de *L. boulardi* du sud-est de la France et aborde la diversité génétique virale (chapitre III). Le chapitre IV présente les recherches menées sur la variabilité génétique du comportement de superparasitisme. Les deux derniers chapitres se focalisent sur l'infection virale et son aspect dans la communauté des parasitoïdes de drosophiles. Il est question de la circulation du virus au sein de cette communauté (chapitre V) ainsi que des conséquences de l'infection virale sur les relations interspécifiques entre espèces de parasitoïdes compétitrices (chapitre VI).

Des annexes viennent compléter le manuscrit. Le lecteur y trouvera le protocole de construction des banques soustraites, la liste des EST composant les banques soustraites ainsi que trois articles pour lesquels je suis co-auteur.

Résumé

Les insectes hébergent de très nombreux partenaires symbiotiques dont les effets sont pour le moins variés. De nouvelles associations sont découvertes régulièrement, impliquant différents types de micro-organismes à transmission verticale restés jusqu'alors inconnus car faiblement pathogènes avec des effets confondus avec des caractéristiques intrinsèques de l'hôte. Pour la plupart, ces partenaires symbiotiques récemment découverts sont des bactéries. Les virus sont encore souvent rapportés comme causant la mort de leur hôte. Pourtant, il est aujourd'hui connu l'existence de virus ayant un faible effet pathogène.

Chez l'insecte parasitoïde de drosophiles *Leptopilina boulardi* a été mis en évidence un virus infectieux, se transmettant aussi verticalement et modifiant le comportement de l'insecte. Les femelles infectées par ce virus nommé LbFV (*Leptopilina boulardi* Filamentous Virus) acceptent de pondre plusieurs fois dans une larve hôte déjà parasitée (superparasitisme), bien que celle-ci ne puisse donner naissance qu'à un seul parasite (parasitoïde solitaire). Cette modification comportementale permet aux particules virales d'être transférées horizontalement en plus de leur transmission verticale de mère à descendant, amplifiant ainsi leur propagation dans la population hôte. Outre la modification comportementale, le virus ne semble pas avoir d'effet délétère majeur sur son hôte. Le superparasitisme, jusqu'à présent interprété comme étant adaptatif pour le parasitoïde en cas de forte compétition, serait ici l'expression du phénotype étendu induit par les particules virales. Ce résultat a ouvert de nouvelles pistes de recherche dans le domaine des relations virus-eucaryotes, l'évolution des relations hôtes-symbiotes en général et la place des micro-organismes dans les interactions entre insectes hôtes et parasitoïdes.

Une première étape de la thèse a consisté à rechercher des marqueurs moléculaires du virus. Nous avons ainsi développé un outil moléculaire diagnostique de l'infection (PCR) permettant de déterminer aisément les statuts d'infection des insectes et d'étudier la présence du virus dans les populations naturelles de *L. boulardi*.

L'étude de 15 populations naturelles de *L. boulardi* du sud-est de la France a révélé un gradient nord-sud de la prévalence de LbFV: les populations les plus au nord de la zone géographique étudiée (situées à la limite de répartition de *L. boulardi*) ont des taux d'infection

très faibles voire nuls contrairement à celles situées le plus au sud où la présence du virus atteint des proportions élevées (jusqu'à 95%).

L'influence de la présence du virus dans la communauté de parasitoïdes de drosophiles du sud-est de la France a alors été recherchée en étudiant le rôle de LbFV sur les relations entre espèces en compétition pour les mêmes espèces hôtes. Lorsque *L. boulandi* n'est pas infectée par LbFV, l'avantage compétitif de cette espèce sur *L. heterotoma*, sa principale compétitrice et espèce réfractaire à l'infection par LbFV, est très net. En revanche, en présence du virus, la supériorité compétitive de *L. boulandi* diminue fortement et permet un quasi rééquilibrage des capacités compétitives des deux espèces de parasitoïdes. Nous avons montré que le gaspillage en œufs induit par LbFV chez *L. boulandi* de par le comportement de superparasitisme est la cause de cette modification. Le virus apparaît être un facteur important dans le maintien de la structure de la communauté de parasitoïdes du sud-est de la France modifiant profondément l'issue de la compétition interspécifique.

Ces résultats montrent que les micro-organismes à transmission verticale peuvent perturber et façonner les structures des communautés hôtes. Ils apparaissent alors comme des acteurs du fonctionnement des écosystèmes et donc de la biodiversité à prendre en compte pour l'étude de l'écologie des organismes libres.

Abstract

Insects harbor numerous symbionts that induce various effects on their hosts. New associations are regularly revealed implying various vertically transmitted micro-organisms previously unknown possibly because they have few, if any, detectable effects on the host phenotype. Mostly, these recently discovered symbionts are bacteria. Although most of the viruses commonly studied cause severe damage to their hosts, potentially killing them, some of these viruses have low impact on host fitness.

In the *Drosophila* parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*, we discovered a virus designated LbFV (*L. boulardi* Filamentous Virus) that manipulates the behaviour of its host. Infected females deposit their eggs in hosts that are already parasitized (superparasitism) despite the fact that secondary parasites most often lose the within-host competition that occurs. The virus is vertically transmitted through the maternal lineage and can be horizontally transferred when both uninfected and infected larvae are present in the same *Drosophila* host (*i.e.* during a superparasitism event). Besides the induction of superparasitism, infected females do not have major fitness costs. Superparasitism, until now interpreted as an adaptative decision of the parasitoid female, appears to be the expression of the extended phenotype of LbFV. This result provides novel insights in the reasearch of virus-eukaryot interactions, in the evolution of host-symbiont associations and in the role of micro-organisms in interactions between host insects and parasitoids.

The first step of the thesis consisted in looking for molecular markers of the virus. We developed a simple PCR test as a tool to detect the presence of the virus in *L. boulardi* females and to measure the prevalence of LbFV in natural *L. boulardi* populations.

We studied the prevalence of the virus in 15 *L. boulardi* French natural populations of south-eastern France. Our results revealed a north-south gradient of LbFV prevalence: it appeared very high in southerly *L. boulardi* populations (up to 95%) and almost absent from newly established peripheral northerly populations.

The influence of the presence of LbFV in the *Drosophila* parasitoid community of south-eastern France was then studied through the role of the virus on interactions between species competing for the same hosts. In case of absence of infection, *L. boulardi* holds a

competitive advantage against its major competitor *L. heterotoma*, a species refractory to LbFV infection. However, the presence of the virus strongly reduces the competitive ability of *L. boulardi* against *L. heterotoma*. We showed that the behavioural alteration caused by LbFV was in great part indirectly responsible for the decrease in the competitiveness of its host through the alteration of the egg load control. The waste of eggs for *L. boulardi* females strongly decreases the invasion capacity of the parasitoid species, to the advantage of its competitor *L. heterotoma*. Thus, the virus appeared to be an important factor in the maintenance of the structure of the parasitoid community of south-eastern France.

These results show that vertically transmitted micro-organisms can play a role in structuring host communities. They appear to play a major role in the functioning of the ecosystem and thus in the increase of biodiversity, and are thus to be taken into account in the study of the ecology of free-living animals.

Sommaire

Introduction	1
CHAPITRE I : Présentation des modèles biologiques	7
I- Les parasitoïdes de drosophiles	8
I.1. Aperçu de leur biologie	8
I.2. Le superparasitisme chez les parasitoïdes	10
I.3. Caractéristiques des espèces de parasitoïdes utilisées	12
I.3.1. <i>Leptopilina boulardi</i> Barbotin, Carton et Kelner-Pillault (Figitidae, Eucoïlidae)	12
I.3.2. <i>Leptopilina heterotoma</i> Thompson (Figitidae, Cynipidae)	13
I.4. Situation dans le sud-est de la France	14
II. Les symbiotes chez les parasitoïdes de drosophiles	15
II.1. L'association <i>Leptopilina heterotoma</i> / bactérie <i>Wolbachia</i>	15
II.1.1. Identité et détection des <i>Wolbachia</i> chez <i>L. heterotoma</i>	16
II.1.2. Les effets de <i>Wolbachia</i> chez <i>L. heterotoma</i>	17
II.2. L'association <i>Leptopilina boulardi</i> / virus LbFV	17
II.2.1. Un virus manipulateur du comportement de ponte chez <i>L. boulardi</i>	17
II.2.2. Identité du virus	19
II.2.3. Les effets du virus sur la physiologie et le comportement de <i>L. boulardi</i>	20
II.2.4. Signification adaptative de l'induction du superparasitisme	21
II.2.5. Test comportemental de l'infection de <i>L. boulardi</i> par le virus LbFV	22
III. Procédures expérimentales et origines des souches et lignées de parasitoïdes	23
III.1. Conditions d'élevage au laboratoire	23
III.2. Origines des <i>Leptopilina boulardi</i>	24
III.2.1. Lignées de référence	24
III.2.2. Populations naturelles du sud-est de la France	25

III.2.3. Autres populations naturelles de <i>L. boulandi</i>	26
III.3. Lignée de <i>L. heterotoma</i>	27

CHAPITRE II : Mise au point d'un outil moléculaire diagnostique de l'infection par LbFV

I. Analyse transcriptomique de l'infection par LbFV	29
I.1. La technique de SSH : hybridation soustractive et suppressive (Suppression Subtractive Hybridization)	29
I.1.1. Principe de la SSH	29
I.1.2. Avantages et inconvénients de la SSH	32
I.2. La technique MOS	33
I.3. Dot-blotting et séquençage	34
II. Collection de séquences et approche fonctionnelle	36
II. 1. Collection de séquences	37
II. 2. Approche fonctionnelle	38
III. Outil moléculaire diagnostique de l'infection (Manuscrit 1)	41
III.1. Mise au point d'un outil moléculaire de détection de l'infection virale	41
III.2. Présence du virus au sein des populations naturelles	43

CHAPITRE III : Prévalence dans les populations naturelles de *Leptopilina boulandi*

I. Prévalence du superparasitisme dans les populations naturelles du parasitoïde <i>L. boulandi</i>	55
I.1. Populations naturelles de <i>L. boulandi</i>	55
I.2. Mesure de la prévalence du superparasitisme	56
I.3. Validation du diagnostic phénotypique	59
I.4. Confirmation des statuts d'infection par test moléculaire	64
II. Epidémiologie moléculaire de LbFV : prévalence lors de l'extension de l'aire géographique de <i>L. boulandi</i> (Manuscrit 2)	65
II.1. Populations naturelles de <i>L. boulandi</i>	66
II. 2. Prévalences de LbFV	67
II. 3. Patrons des prévalences obtenus par tests phénotypiques et moléculaires	70

CHAPITRE IV : Analyse de la variabilité phénotypique du superparasitisme	105
I. Effet du génotype viral	106
I.1. Transferts intra-population (expérience A)	108
I.2. Transferts inter-populations (expérience B)	109
II. Effet du génotype de l'insecte	111
III. Discussion	112
 CHAPITRE V : Circulation du virus entre espèces parasitoïdes écologiquement interconnectées (<i>Manuscrit 1</i>)	 114
 CHAPITRE VI : Influence de LbFV sur les interactions compétitives interspécifiques (<i>Manuscrit 1</i>)	 135
 Discussion générale	 172
 Références bibliographiques	 185
 ANNEXES	 198

*I*ntroduction

De très nombreuses voir toutes les espèces eucaryotes hébergent durablement des micro-organismes symbiotiques (bactéries, virus, champignons, protozoaires, etc.). La symbiose qualifie toute relation durable d'au moins deux organismes appartenant à des espèces différentes (Combes 1995). Selon la balance entre coût et bénéfice pour chacun des partenaires (c'est-à-dire le bilan de l'association en terme de valeur sélective), le type de relations interspécifiques peut varier le long d'un continuum allant du parasitisme (bénéfices uniquement pour l'un des deux partenaires) au mutualisme (bénéfices réciproques entre partenaires) (Thompson 1988; Smith 1992). En plus des conditions environnementales, le mode de transmission des symbiotes, soit vertical (transmission souvent maternelle), soit horizontal (transmission infectieuse), est communément considéré comme un paramètre décisif de l'évolution des associations symbiotiques (Galvani 2003). Ainsi, les interactions impliquant les symbiotes à transmission horizontale stricte évolueraient plutôt vers une relation de parasitisme, leur fitness étant indépendante du succès reproducteur de l'hôte. A l'inverse, les partenaires symbiotiques à transmission verticale stricte évolueraient plutôt vers une relation mutualiste, la reproduction et donc la survie de l'hôte contribuant pleinement à la reproduction du symbiote.

Si cette théorie se vérifie pour certains systèmes biologiques, il n'existe pas toujours de relations claires entre type de transmission et nature de l'association. En réalité, tout symbiote transmis horizontalement n'évolue pas obligatoirement vers le parasitisme et inversement, tout symbiote transmis verticalement n'évolue pas obligatoirement vers le mutualisme. C'est le cas des éléments génétiques égoïstes ou des parasites de la reproduction à transmission verticale ou encore des symbioses mutualistes de plantes et de leurs bactéries fixatrices d'azote à transmission horizontale. Ces systèmes qui ne répondent pas au concept du compromis évolutif « nature de la transmission/virulence » sont nombreux, écologiquement important et posent la question des mécanismes qui influencent l'évolution des associations symbiotiques (Wilkinson 2001; Sachs *et al.* 2004; Vavre 2009).

Les insectes hébergent de très nombreux partenaires symbiotiques transmis verticalement aux effets pour le moins variés et, de par leurs prévalences élevées, aux conséquences écologiques et évolutives majeures (Moran 2002; Ishikawa 2003). Selon leur

caractère essentiel ou non pour l'hôte, on distingue les symbiotes primaires (ou obligatoires) et les symbiotes secondaires (ou facultatifs).

Les symbiotes primaires ou obligatoires

Les insectes offrent de nombreux exemples d'associations mutualistes avec des micro-organismes. 10% à 15% des espèces d'insectes hébergent des symbiotes transmis strictement verticalement qui leur apportent des nutriments essentiels. Ces symbiotes primaires ont permis l'adaptation de certains insectes à des types de nourriture pauvres ou déséquilibrés comme la sève (symbiose entre le puceron et la bactérie *Buchnera aphidicola* ; Baumann *et al.* 1995b), le sang (symbiose entre la mouche tsé-tsé et la bactérie *Wigglesworthia glossinidia* ; Aksoy 1995) ou le bois (symbiose entre la fourmi et la bactérie *Baumannia cicadellinicolla* ; Buchner 1965). Ces symbiotes nutritionnels entretiennent avec leurs hôtes des associations obligatoires ce qui assure leur fixation dans les populations hôtes. Parce qu'il y a 100% d'infection, ces populations ne présentent pas de variabilité phénotypique due à la présence/absence du symbiote et on peut considérer le phénotype étendu comme le résultat de l'expression de deux (ou plusieurs) génomes qui peuvent cependant avoir leur propre variabilité.

Les symbiotes secondaires ou facultatifs

Les insectes sont également colonisés par de nombreux symbiotes facultatifs (*i.e.* non indispensables à la reproduction de leur hôte), pouvant partager ou non « l'espace hôte » avec un symbiote primaire (d'où le terme de symbiotes secondaires). Ces symbiotes facultatifs peuvent être transmis horizontalement, ce qui leur permet de coloniser de nouvelles espèces et ainsi d'élargir leur spectre d'hôtes mais leur principal mode de transmission est vertical, souvent cytoplasmique. Leur maintien et l'invasion des populations hôtes malgré le coût physiologique qu'ils induisent (de par leur présence) est possible par deux types de stratégies : (i) manipuler la reproduction de l'hôte ou (ii) contribuer positivement à la fitness de l'hôte.

(i) Certains symbiotes héréditaires ne confèrent pas d'avantage à leur hôte et peuvent même avoir un coût sur sa physiologie. Ces symbiotes ont alors développé toute une batterie d'effets phénotypiques directement associés au fait que la transmission est verticale, généralement maternelle *via* le cytoplasme des ovocytes. Ceci leur permet de se maintenir et d'envahir les populations puisque seules les femelles sont impliquées dans la transmission des symbiotes, les mâles représentant des « culs de sacs » évolutifs pour les micro-organismes ; les « intérêts » des deux partenaires ne sont alors pas complètement alignés. Ces symbiotes

ont développé diverses stratégies de manipulation de la reproduction de leur hôte qui consistent à augmenter la production des femelles infectées aux dépens des femelles non infectées et à augmenter ainsi leur propre transmission. Ils sont pour cela capables d'induire une large gamme d'effets phénotypiques permettant aux bactéries d'envahir rapidement les populations hôtes: féminisation des mâles génétiques, induction de la parthénogénèse thélytoque et « *male-killing* » qui biaisent le sexe ratio des descendants de mères infectées en faveur des femelles (Werren 1997), ou l'incompatibilité cytoplasmique qui diminue la production de filles par les femelles non infectées. De nombreuses bactéries comme *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Cardinium* et *Arsenophonus* ainsi que des microsporidies sont des parasites de la reproduction, particulièrement fréquents chez les insectes, capables d'induire toute cette gamme d'effets phénotypiques (Balas 1996; Zchori-Fein & Perlman 2004; Montenegro *et al.* 2005; Perlman *et al.* 2006; Perlman *et al.* 2008; Werren *et al.* 2008). Les symbiotes les plus fréquents chez les insectes semblent être les bactéries endosymbiotiques du genre *Wolbachia* infectant 15% à 75% des espèces d'insectes selon les études (Werren *et al.* 1995; Jeyaprakash & Hoy 2000) (autour de 66% pour Hilgenboecker *et al.* 2008). De par les effets qu'ils induisent sur la reproduction de leurs hôtes, les manipulateurs de la reproduction tels que *Wolbachia* peuvent avoir des conséquences écologiques et évolutives importantes sur les communautés d'hôtes comme entraîner un isolement reproducteur ou une divergence génétique des populations hôtes.

(ii) Certains symbiotes mutualistes facultatifs augmentent la durée de vie et le succès reproducteur de l'hôte, augmentant ainsi la fréquence des hôtes infectés au travers de leur descendance. Ces bénéfices sont apportés de différentes manières. L'une d'entre elles consiste à améliorer la résistance de l'hôte aux attaques par des ennemis naturels, comme *Hamiltonella defensa*, associée à la protection de son hôte puceron contre les parasitoïdes (Oliver *et al.* 2003) et *Regiella insecticola* à la résistance contre un champignon entomopathogène (Scarborough *et al.* 2005). D'autres bénéfices ont également été répertoriés comme l'augmentation de la tolérance aux hautes températures (Montllor *et al.* 2002), l'accroissement de la longévité (Dale & Welburn 2001) ou la spécialisation à la plante hôte (Tsuchida *et al.* 2004). L'effet sur la fitness de l'hôte peut être dépendant de la souche du symbiote. Par exemple, le puceron montre des variations dans sa capacité de résistance à un insecte parasitoïde selon la souche de *Hamiltonella defensa* qui l'infecte. En revanche, en situation de compétition, les lignées de pucerons infectées sont avantagées uniquement en présence du parasitoïde et éliminées en son absence. L'apport bénéfique du symbiote est donc

variable selon les conditions écologiques ce qui pourraient expliquer pourquoi la population hôte n'est pas entièrement envahie par ces partenaires symbiotiques (Oliver *et al.* 2008).

Contrairement aux symbiotes primaires, les taux d'infection de ces symbiotes secondaires sont inférieurs à 100%. Dans ces cas-là, l'étude de la variabilité phénotypique observée doit donc prendre en compte le « déterminisme nucléaire » (l'hôte) mais aussi le « déterminisme cytoplasmique » (le symbiote). La présence ou l'absence du symbiote augmente donc considérablement la variabilité phénotypique ce qui constitue une emprise supplémentaire à la sélection.

Les études sur la diversité et les effets de ces partenaires symbiotiques montrent toute l'importance de prendre en compte la présence des symbiotes pour comprendre la biologie des insectes. Ces partenaires symbiotiques peuvent ainsi être des facteurs clefs dans les processus écologiques et évolutifs des populations hôtes. Les outils moléculaires ont révolutionné les capacités à découvrir ces micro-organismes restés longtemps inconnus car faiblement pathogènes avec des effets qui étaient alors confondus avec des caractéristiques intrinsèques de l'hôte. Pour la plupart, ces symbiotes récemment découverts sont des bactéries. Les virus sont encore considérés comme des agents fortement pathogènes. Pourtant, cette vision mérite d'être reconsidérée car certains montrent une transmission verticale et entretiennent une association durable avec leur hôte avec une moindre virulence (Griffiths 1999). Les questions qui se posent sont donc de savoir quels sont les impacts phénotypiques sur les hôtes de ces virus à transmission verticale maternelle, au niveau individuel mais aussi populationnel. Ont-ils développé des stratégies d'invasion similaires à celles que l'on observe chez les bactéries ?

Une étude récente rapporte le cas d'un virus ARN manipulateur de la reproduction de son hôte lépidoptère induisant du *male-killing* (Nakanishi *et al.* 2008). Chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*), certaines lignées sont hypersensibles au dioxyde de carbone, une courte exposition à ce gaz entraînant leur mort (Fleuriet 1976; Brun & Plus 1980). Cette hypersensibilité est due à la présence du virus sigma, l'un des premiers virus à faible pathogénicité à avoir été découvert chez les insectes. Chez les insectes parasites d'autres insectes (parasitoïdes), les virus peuvent devenir de véritables partenaires de l'association puisqu'ils peuvent permettre au parasitoïde de contourner les défenses immunitaires de l'hôte (Schmidt *et al.* 2001; Whitfield 2002; Federici & Bigot 2003). Egalement, les travaux de Burand *et al.* (2005) rapportent l'existence d'un virus bénéficiant d'un mode de transmission mixte (vertical et horizontal) qui manipule le comportement des noctuelles femelles lui

permettant une transmission et une invasion des populations hôtes efficaces. Ces études soulignent la diversité des relations qui peuvent exister entre les virus et leurs hôtes et posent toute une série de questions qui n'ont été encore que partiellement abordées sur les bactéries endosymbiotiques. Les associations commensalistes ou mutualistes entre les virus et leurs hôtes sont-elles répandues au sein des insectes et de leurs populations naturelles ? Quelles sont les stratégies d'invasion mises en œuvre par les virus à transmission verticale ou à transmission mixte ? Quels sont les mécanismes d'action de ces virus sur leurs hôtes ? Quel est le rôle des transmissions mixtes ? Y a-t-il d'importantes conséquences phénotypiques ? Quel est l'impact de ce type de micro-organismes sur l'écologie et l'évolution des populations hôtes ?

Nous avons abordé ces questions au travers l'étude d'une association entre le virus LbFV et l'insecte parasitoïde de drosophiles *Leptopilina boulardi*. Ce virus infectieux, qui se transmet aussi verticalement, manipule le comportement de ponte des insectes parasitoïdes sans conséquence létale (Varaldi 2003; Varaldi *et al.* 2003; Varaldi *et al.* 2006a). Les femelles infectées acceptent de pondre plusieurs fois dans les larves de drosophiles (superparasitisme), bien que celles-ci ne puissent donner naissance qu'à un seul insecte adulte (parasitoïde solitaire). Cette modification comportementale par le virus lui permet d'être transféré horizontalement (en plus de sa transmission verticale) et d'envahir les populations hôtes. Outre la remise en cause de l'interprétation adaptative du superparasitisme (van Alphen & Visser 1990), la découverte de cette association a offert de nouvelles perspectives sur l'effet phénotypique et la persistance de certains virus dont les effets n'ont pas été décrits. De plus, elle souligne la complexité et la diversité des relations qui peuvent exister entre les virus et leurs hôtes (relations antagonistes ou mutualistes) tout en maintenant un mode de transmission vertical et infectieux. Par ailleurs, compte tenu de l'impact majeur des insectes parasitoïdes sur la dynamique des populations d'insectes phytophages, certaines espèces étant parfois utilisées en lutte biologique pour réguler les populations de ravageurs, l'existence de tels virus modificateurs du comportement des parasitoïdes doit être connue et analysée en détail compte tenu de leur impact possible sur les interactions entre insectes hôtes et insectes parasitoïdes.

La première étape de ce travail de thèse a consisté à mettre au point des marqueurs moléculaires afin de disposer d'un diagnostic fiable et rapide de l'infection (chapitre II). En début de thèse, le statut d'infection des insectes était estimé au travers des conséquences phénotypiques que le virus induit sur le comportement de l'insecte. Cette technique indirecte

de détection de l'infection est lourde à mettre en place sur de grands échantillons et peut se révéler peu fiable, les effets de l'infection virale pouvant être confondus avec la variabilité naturelle du comportement de ponte des parasitoïdes. La mise au point d'un outil moléculaire de diagnostic de l'infection virale nous a ensuite permis d'estimer la prévalence du virus au sein des populations naturelles d'insectes et ainsi d'évaluer sa capacité d'invasion dans une situation où l'espèce hôte étend son aire de répartition avec des populations qui colonisent de nouveaux habitats (chapitre III). Nous avons aussi cherché à évaluer les parts respectives du virus et du génome de l'hôte dans la variabilité du comportement manipulé afin de poser les bases à la compréhension de la dynamique co-évolutive du système hôte-parasite (chapitre IV). L'étude de l'infection virale a également été menée à l'échelle de la communauté hôte où a été abordée la circulation du virus entre espèces écologiquement interconnectées (chapitre V). Enfin, l'impact de l'infection virale sur les interactions interspécifiques des parasitoïdes a été étudié (chapitre VI). En fin de manuscrit, nous discuterons des mécanismes d'action du virus, de son épidémiologie, de sa co-évolution possible avec le parasitoïde ainsi que du rôle de ce type de micro-organismes sur la structure des communautés.

*P*résentation des modèles biologiques

Selon les estimations, les parasitoïdes représenteraient entre 8% et 20% des espèces d'insectes décrites à ce jour, la majorité appartenant soit à l'ordre des hyménoptères (environ 50 000 espèces décrites), soit à l'ordre des diptères (environ 16 000 espèces connues ; Feener & Brown 1997). En plus de leur grande diversité et de leur forte abondance dans la nature, l'étude des parasitoïdes a été et est particulièrement développée car : (a) compte tenu de leur mode de vie (leur développement exigeant la mort de leur hôte), les insectes parasitoïdes peuvent être utilisés dans des programmes de lutte biologique contre des ravageurs de culture (pour revue, Wajnberg & Ris 2007); (b) ils constituent un excellent modèle d'étude en biologie évolutive mais également en écologie du comportement et en dynamique des populations (Godfray 1994; Godfray & Shimada 1999).

Les parasitoïdes sont fréquemment associés à des partenaires procaryotes, bactéries ou virus, dont l'influence sur le phénotype de leurs hôtes et dont l'impact écologique et évolutif sont de plus en plus reconnus (Boulétreau & Fleury 2005).

Nous nous sommes intéressés à l'association entre un virus manipulateur du comportement et le parasitoïde de drosophiles *Leptopilina boulardi*. Une grande partie du travail de recherche a donc été réalisée sur cette espèce. En outre, les conséquences du virus à l'échelle de la communauté a conduit à s'intéresser à d'autres espèces d'insectes comme l'espèce parasitoïde *Leptopilina heterotoma*. Ce chapitre présente quelques éléments de la biologie générale de ces parasitoïdes ainsi que les connaissances disponibles en début de thèse sur leurs associations avec des symbiotes : *L. boulardi* / LbFV et *L. heterotoma* / *Wolbachia*.

I- Les parasitoïdes de drosophiles

I.1. Aperçu de leur biologie

Les parasitoïdes sont des organismes dont les larves se développent aux dépens d'autres arthropodes, principalement les insectes, mais aussi les araignées et les centipèdes (Godfray 1994). À ce titre, ils représentent un mode de vie intermédiaire entre les prédateurs et les parasites puisque l'hôte est, à de rares exceptions près, systématiquement tué. Pourtant, ces organismes ne doivent pas être assimilés à des prédateurs dont la ressemblance se limite aux effets populationnels sur les hôtes. Pour Boulétreau & Fleury (2005) « *il n'y a aucun doute, ce sont des surdoués du parasitisme !* ».

Leptopilina boulandi et *Leptopilina heterotoma* sont des hyménoptères endoparasitoïdes s'attaquant aux larves de drosophiles. Une caractéristique importante de ces deux espèces qui sera l'objet de nos études est qu'un seul parasitoïde peut émerger de la larve hôte (espèces solitaires). Les œufs sont déposés à l'intérieur de la cavité générale de la larve hôte (stades L1 et L2) grâce à l'ovipositeur de l'insecte. L'œuf du parasitoïde éclot 24h à 48h après (selon les conditions de température et d'humidité). Les premiers stades du parasite se développent en consommant l'hémolymph de la larve qui poursuit son développement. Au moment de la métamorphose de son hôte (stade pupa), le parasitoïde tue la nymphe en la consommant entièrement avant de se transformer lui-même en nymphe et d'atteindre le stade adulte (Figure I.1). *L. boulandi* et *L. heterotoma* sont ainsi définies comme étant des espèces koïnobiontes puisqu'elles permettent à leur hôte de continuer plus ou moins normalement son développement avant de succomber sous l'effet du développement parasitaire. Chez les hyménoptères parasitoïdes de drosophiles, seuls les stades pré-imaginaux ont donc un mode de vie parasitaire, les stades adultes étant entièrement libres (Godfray 1994). La larve parasitoïde est totalement dépendante de l'hôte pour son développement. Pendant leur stade adulte libre, les femelles recherchent activement des hôtes pour y déposer leur progéniture. Leur succès reproducteur est ainsi directement relié à l'efficacité de leurs comportements au cours de cette période de recherche. Ces comportements sont donc sous forte contrainte sélective, ce qui a fait des parasitoïdes un modèle de choix pour l'étude des comportements (Godfray 1994; Godfray & Shimada 1999).

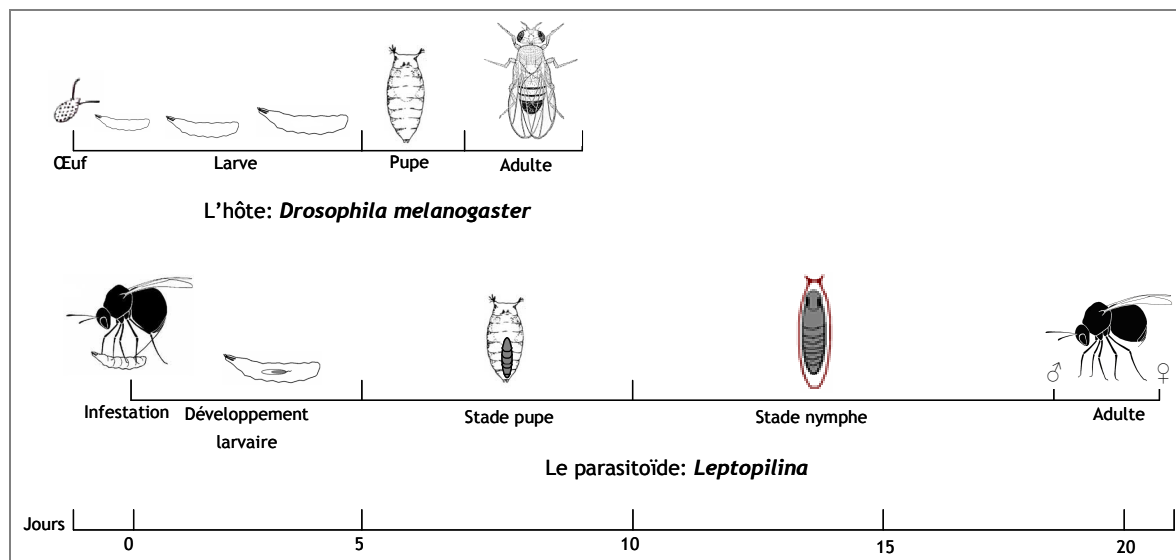


Figure I.1 : Représentation schématique des cycles de développement de *Drosophila melanogaster* et des parasitoïdes du genre *Leptopilina* à 25°C (d'après Fleury 1993).

Comme chez la plupart des hyménoptères parasitoïdes, le déterminisme du sexe chez *L. boulandi* et *L. heterotoma* est haplo-diploïde. Les femelles sont issues d'ovocytes fécondés et sont donc diploïdes tandis que les mâles fertiles proviennent d'ovocytes non fécondés et sont par conséquent haploïdes avec un patrimoine génétique uniquement d'origine maternelle. L'avantage de ce mode de reproduction est la possibilité, pour les femelles fécondées, de « choisir » la proportion des sexes dans leur descendance en fécondant ou non les œufs qu'elles pondent.

Ces deux espèces sont considérées comme principalement pro-ovigéniques, c'est-à-dire que les femelles disposent de la quasi-totalité de leurs œufs matures dès l'émergence et présentent donc peu d'ovogénèse imaginale (*i.e.* à l'état adulte).

Sur le plan phylogénétique, *L. boulandi* et *L. heterotoma* sont deux espèces relativement proches d'après des études basées sur des critères morphologiques et moléculaires (Nordlander 1980; Schilthuizen 1998; Allemand *et al.* 2002) (Figure I.2).

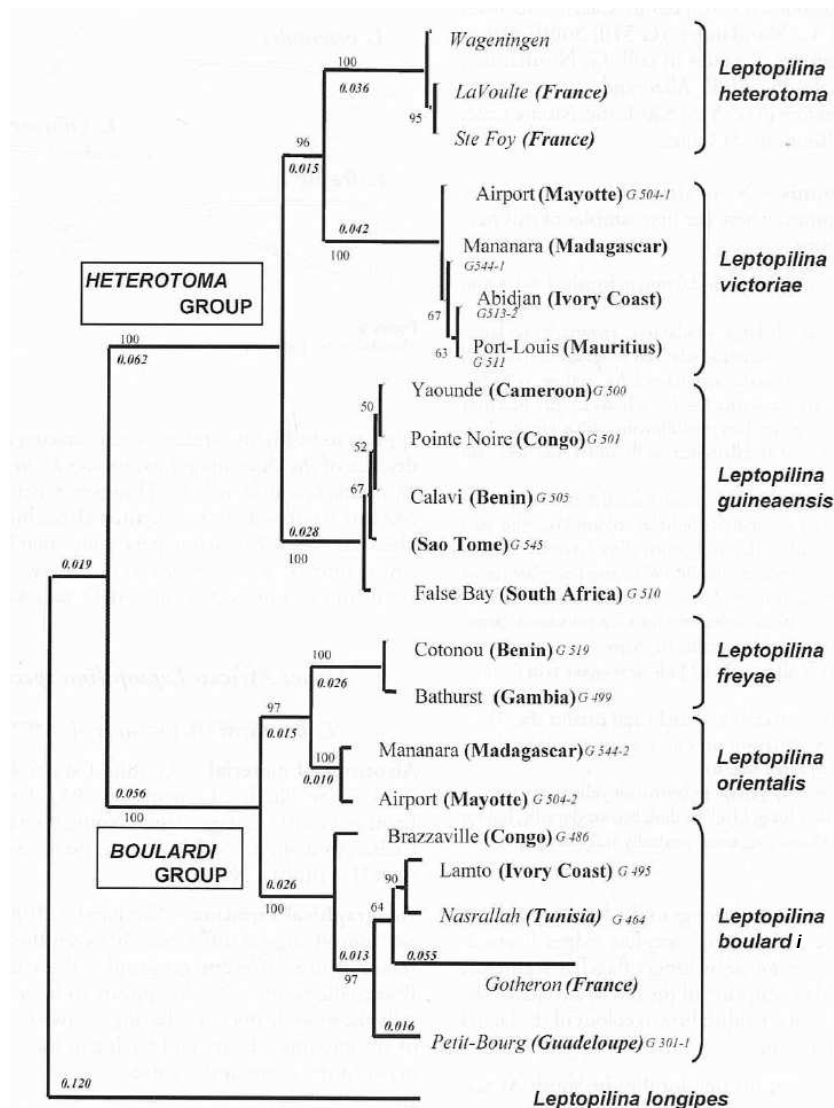


Figure I.2 : Arbre phylogénétique de six espèces de *Leptopilina* appartenant aux groupes *heterotoma* et *boulardi*, basé sur la comparaison de séquences de l'ITS2 (Allemand *et al.* 2002).

ITS2 de l'ADN ribosomal: Second Internal transcribed spacer.

Les valeurs de bootstrap sont données à la base des branches de chacun des clades. Les différentes souches utilisées sont notées selon le lieu de prélèvement et, entre parenthèses, le pays d'échantillonnage.

Les chiffres notés sur les branches en italique sont une indication de la distance évolutive.

I. 2. Le superparasitisme chez les parasitoïdes

Alors que chez les espèces de parasitoïdes dites grégaires plusieurs parasitoïdes peuvent se développer au sein d'un même hôte, chez les espèces de parasitoïdes solitaires, un hôte donne naissance à un seul parasitoïde. S'il y a superparasitisme, c'est-à-dire si plusieurs œufs parasites ont été déposés dans une même larve hôte, la compétition larvaire conduit à l'élimination de tous les parasites surnuméraires et au développement d'un seul parasitoïde

(Eijsackers & Bakker 1971; Vinson & Hegazi 1998). En cas de superparasitisme, le premier œuf déposé a un avantage compétitif sur le second et sa survie dépend de l'intervalle entre les deux ovipositions : la probabilité d'émergence du second œuf décroît drastiquement comme l'intervalle de temps entre les deux ovipositions augmente (van Alphen & Visser 1990; Visser 1992). Dans le cas où une femelle accepte plusieurs fois le même hôte (comportement de self-superparasitisme), elle subit une perte sèche en œufs puisque le combat larvaire se fera entre frères et sœurs. Il est ainsi attendu que le comportement de superparasitisme soit fortement contre-sélectionné.

Pourtant, l'infestation d'un hôte déjà parasité est couramment observé dans la nature (Janssen 1989; van Dijken *et al.* 1993; Santolamazza-Carbone & Rivera 2003; Fleury *et al.* 2004) comme au laboratoire (van Lenteren 1976; van Alphen & Visser 1990; Visser 1992). La recherche des causes conduisant les femelles à accepter le superparasitisme a suscité de nombreux travaux théoriques et empiriques. Jusqu'à aujourd'hui, deux explications majeures ont été retenues pour expliquer le maintien du comportement de superparasitisme malgré ses coûts sur la fitness de la femelle parasitoïde.

Historiquement, le superparasitisme a été interprété comme une erreur décisionnelle de la part des femelles, par incapacité à marquer les hôtes ou à les reconnaître comme étant parasités. Cependant, il est par la suite apparu que les femelles sont capables de discriminer entre des larves hôtes saines et parasitées (capacité de discrimination) soit par elles-mêmes, soit par une ou plusieurs femelles conspécifiques ou d'une autre espèce (van Lenteren 1981; van Alphen & Nell 1982; Bakker 1990). Il semble donc que les femelles superparasitant leurs hôtes « choisissent » de le faire.

Une deuxième explication a ainsi proposé que ce comportement pouvait être le produit d'une décision adaptative des femelles (van Alphen & Visser 1990). En effet, en cas de limitation en hôtes sains, la femelle accroît son succès reproducteur en acceptant des hôtes de moins bonne qualité pour sa descendance, puisqu'un œuf pondu, même dans un hôte déjà parasité, a une probabilité faible mais non nulle de survivre. Une femelle peut donc retirer un bénéfice de sa décision à accepter des hôtes parasités depuis peu de temps. Cependant, un tel comportement présente aussi des coûts pour le parasitoïde : coût en œufs et coût en temps. L'importance relative de ces coûts dépend du risque de limitation en œufs des femelles (Rosenheim 1996). Le comportement de superparasitisme est également fonction du comportement de ponte des autres femelles parasitoïdes : la tendance au superparasitisme augmente lorsque le nombre d'hôtes parasités est important, c'est-à-dire lorsque la

compétition pour les hôtes est forte (van Alphen & Visser 1990; Visser 1992). L'acceptation du superparasitisme est donc attendue dans les cas de forte compétition intraspécifique entre les parasitoïdes pour les hôtes.

Une troisième explication du maintien du superparasitisme dans les populations de parasitoïdes est récemment apparue avec la mise en évidence, chez le parasitoïde *L. boulandi*, de l'existence d'un virus infectieux, capable de manipuler le comportement de ponte des insectes parasitoïdes (Varaldi *et al.* 2003; Reynolds & Hardy 2004). Nous y reviendrons dans la suite de ce chapitre.

I.3. Caractéristiques des espèces de parasitoïdes utilisées

I.3.1. *Leptopilina boulandi* Barbotin, Carton et Kelner-Pillault (Figitidae, Eucolidae)

La femelle *L. boulandi* est reconnaissable à la coloration de ses antennes qui varie de manière très franche du jaune, à la base des antennes, au noir, à leur extrémité. Les antennes de la femelle sont courtes contrairement à celles du mâle beaucoup plus longues par rapport à la taille du corps (Figure I.3) (pour plus de détails, voir Nordlander 1980).



Femelle *L. boulandi*
infestant une larve de
drosophile.
Photo: Y. Carton.

La plupart des parasitoïdes de drosophiles sont spécialisés sur un microhabitat principal, dont la composition en espèces de drosophiles est relativement spécifique. *L. boulandi* s'attaque uniquement aux drosophiles frugivores, principalement *Drosophila melanogaster* et *Drosophila simulans* (espèce spécialiste).

Cette espèce est présente dans des pays à climat méditerranéen ou subtropical. Elle infeste les premiers stades de développement de ses hôtes qu'elle détecte en sondant le substrat avec son ovipositeur tout en se déplaçant. Elle semble également utiliser le mouvement des larves pour les localiser (Vet & Bakker 1985). Bien qu'il s'agisse d'une espèce de parasitoïde solitaire, *L. boulandi* accepte très fréquemment le superparasitisme (Fleury *et al.* 2004 ; Varaldi *et al.* 2005).

I.3.2. *Leptopilina heterotoma* Thompson (Figitidae, Cynipidae)

L. heterotoma est plus grande que *L. boulandi*. Le changement de coloration des antennes est beaucoup moins net que chez *L. boulandi* avec



Femelle *L. heterotoma*
infestant une larve de
drosophile.
Photo: F. Fleury.

un dégradé de couleur du jaune à la base des antennes vers le noir. Comme *L. boulandi*, les antennes de la femelle sont plus courtes que celles du mâle (Figure I.3). La forme générale du corps de *L. heterotoma* est plus allongée que celle de sa compétitrice (pour plus de détails, voir Nordlander 1980). La figure I.3 donne un aperçu des différences morphologiques entre *L. boulandi* et *L. heterotoma*.

L. heterotoma est une espèce généraliste qui infeste de nombreuses espèces de drosophiles du genre *Drosophila* dont *D. melanogaster* et *D. simulans* (Carton 1986).

Elle présente une répartition géographique étendue puisqu'elle se retrouve en abondance en Europe, en Amérique du Nord et dans le nord de l'Afrique (Carton 1986). Différant légèrement de *L. boulandi*, la localisation des hôtes chez *L. heterotoma* s'effectue principalement par le sondage du milieu au moyen de l'ovipositeur (Vet & Bakker 1985). Lorsque la femelle parasitoïde rencontre une larve déjà parasitée, le dépôt d'un œuf surnuméraire dépend du statut du parasitoïde déjà présent. Ainsi, *L. heterotoma* évite très fortement le self-superparasitisme (*i.e.* la femelle infeste une larve déjà parasitée par elle-même) et, dans une moindre mesure, le superparasitisme avec des conspécifiques (Visser 1993; Varaldi *et al.* 2005b). En revanche, le multi-parasitisme (*i.e.* la femelle infeste une larve parasitée par une autre espèce) n'est pas évité. Une seule larve se développera jusqu'au stade adulte. Le résultat de cette compétition entre larves parasitoïdes au sein de l'hôte dépend à la fois des espèces mises en compétition (*L. boulandi* est par exemple un meilleur compétiteur intra-hôte que *L. heterotoma*), du génotype du parasitoïde ou du délai entre les différentes infestations (Visser 1993; Fleury *et al.* 2000).

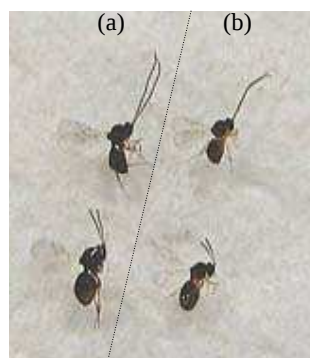


Figure I.3 : *Leptopilina heterotoma* (a) et *Leptopilina boulandi* (b).

Les mâles ont été positionnés sur la ligne supérieure, les femelles sur la ligne inférieure (Photo : S. Patot).

I.4. Situation dans le sud-est de la France

Afin de mieux connaître les variations de la structure et du fonctionnement des communautés de drosophiles et de leurs parasitoïdes dans le sud-est de la France, l'équipe a recueilli une grande quantité d'informations depuis que des études de terrain ont été initiées en 1994. Elles sont désormais poursuivies chaque année par R. Allemand (chargé de recherche, CNRS). Elles consistent à suivre l'abondance des différentes espèces de drosophiles et de parasitoïdes au cours de la saison, cela sur plusieurs sites distribués le long d'un axe nord-sud allant de la côte méditerranéenne à la Bourgogne. On retrouve dans cette zone d'étude principalement quatre espèces de drosophiles hôtes (*D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. immigrans* et *D. subobscura*), trois espèces de parasitoïdes larvaires (*L. heterotoma*, *L. boulardi* et *Asobara tabida*) ainsi que deux espèces de parasitoïdes de pupes (*Trichopria drosophilae* et *Pachicrepoideus dubius*).

A l'échelle de la vallée du Rhône, il existe une importante variation latitudinale de la présence et de l'abondance de ces espèces d'insectes démontrant que la structure et le fonctionnement des communautés varient à une faible échelle géographique, probablement sous l'effet des écarts de températures entre les régions méditerranéennes et septentrionales (Fleury *et al.* 2004). Concernant les parasites, *L. heterotoma* reste la principale espèce au nord pendant toute la saison alors que, plus au sud, ses effectifs diminuent progressivement au bénéfice de *L. boulardi* qui devient l'espèce majoritaire en fin de saison (juillet, août, septembre). Il existe en effet un très fort contraste entre les régions du sud où *L. boulardi* représente plus de 95% des effectifs des parasitoïdes larvaires et les régions au nord de la vallée du Rhône où cette espèce est complètement absente (Figure I.4) (Allemand *et al.* 1999). Les taux de parasitisme élevés, qui peuvent atteindre localement 90%, démontrent une limitation en hôtes et probablement de très fortes interactions compétitives entre les deux espèces de parasitoïdes *L. heterotoma* et *L. boulardi* (Fleury *et al.* 2004). La variation d'abondance de ces deux espèces entre les zones méditerranéennes et septentrionales ainsi que l'existence d'interactions compétitives fortes entre parasites suggèrent que *L. boulardi*, espèce à fort potentiel reproducteur et forte capacité compétitive, exerce des pressions de sélection importante sur le parasite *L. heterotoma* dans le sud de l'aire étudiée. En 1998, la limite d'aire de répartition de *L. boulardi*, très franche, se situait aux environs de Valence (Figure I.4). Mais depuis quelques années, *L. boulardi* remonte vers le nord, bouleversant probablement la structure des communautés de parasitoïdes, notamment l'abondance de *L. heterotoma*, et les pressions de ces parasitoïdes exercées sur leurs hôtes.

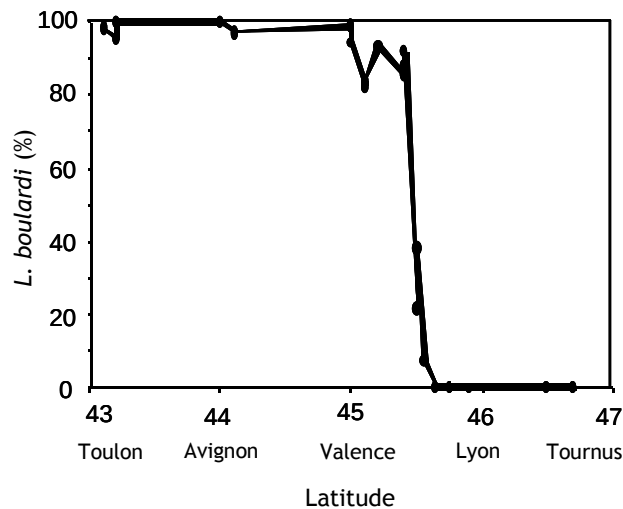


Figure I.4 : Variation latitudinale de l'abondance de *L. boultardi* (situation en septembre-octobre) en 1998 (Allemand *et al.* 1999).

II. Les symbiotes chez les parasitoïdes de drosophiles

Les insectes parasitoïdes hébergent divers types de micro-organismes, qui peuvent coexister chez le même individu, et qui peuvent être pathogènes ou mutualistes. Ces associations fréquentes entre parasitoïdes et partenaires symbiotiques (bactéries et virus) peuvent se révéler nécessaires à leur ovogénèse (Dedine *et al.* 2001) ou au développement parasitaire (auxiliaires immunosuppresseurs : polydnavirus ou particules d'allures virales (*Virus-Like Particle*) ; Schmidt *et al.* 2001; Whitfield 2002; Federici & Bigot 2003). Il s'agit de véritables « systèmes hôte-parasitoïde-symbiote emboîtés » qu'il faut étudier dans leur ensemble si l'on veut comprendre leur fonctionnement et leur évolution. Certains de ces symbiotes sont bien étudiés (*Wolbachia* : Cook & Butcher 1999; Stouthamer *et al.* 1999; *Cardinium* : Kenyon & Hunter 2007), d'autres sont régulièrement découverts et leur importance quantitative et qualitative reste à analyser (pour exemples : Zchori-Fein *et al.* 2001; Varaldi *et al.* 2003; Graham *et al.* 2006; Habayeb *et al.* 2006).

II.1. L'association *Leptopilina heterotoma* / bactérie *Wolbachia*

Les bactéries du genre *Wolbachia* sont des alpha-protéobactéries de la famille des Rickettsiaceae qui vivent exclusivement dans le cytoplasme de leur hôte. Leur transmission est essentiellement maternelle, *via* le cytoplasme des ovocytes, mais l'existence de rares

transferts horizontaux a été démontrée (O'Neill *et al.* 1992; Werren *et al.* 1995; Schilthuisen & Stouthamer 1997; Zhou *et al.* 1998; Vavre *et al.* 1999; Huigens *et al.* 2000).

II.1.1. Identité et détection des *Wolbachia* chez *L. heterotoma*

L. heterotoma est une espèce tri-infectée par *Wolbachia* : un même individu peut être infecté simultanément par trois souches différentes de cette bactérie, *wLhet 1*, *wLhet 2* et *wLhet 3* (caractérisées sur le gène *wsp*) (Vavre *et al.* 1999). Dans les populations naturelles françaises de *L. heterotoma*, seule la tri-infection a été retrouvée (Vautrin 2008). Il est possible d'obtenir au laboratoire des individus non infectés, mono et bi-infectés par les différentes souches de *Wolbachia*, ceci par traitements antibiotiques (Rifampicine et Tetracycline) (Vavre *et al.* 2000; Dedeine *et al.* 2001; Mouton *et al.* 2003).

Comme pour de nombreux symbiotes intracellulaires, la détection systématique et l'identification des *Wolbachia* ont été rendues possibles par l'outil moléculaire et plus particulièrement grâce à la technique de PCR. Cette technique permet de détecter spécifiquement la présence de la bactérie à partir d'extraits d'ADN totaux, comprenant les ADN de l'insecte (génomique et mitochondrial) et des symbiotes. Divers couples d'amorces sont aujourd'hui disponibles pour détecter *Wolbachia* chez les parasitoïdes du genre *Leptopilina*. Au cours de ce travail de thèse, il a été utilisé un couple d'amorces « généralistes » permettant d'amplifier un fragment du gène *ftsZ* des trois souches de *L. heterotoma*.

II.1.2. Les effets de *Wolbachia* chez *L. heterotoma*

Ce symbiote facultatif ne confère à son hôte aucun avantage métabolique. Il induit au contraire un coût physiologique, en terme de fécondité notamment (Fleury *et al.* 2000). Mais surtout, *Wolbachia* altère la reproduction de ses hôtes dans un sens qui augmente sa propre transmission. C'est pourquoi on considère ces bactéries comme des « parasites de la reproduction ». Chez *L. heterotoma*, *Wolbachia* induit de l'incompatibilité cytoplasmique (IC), c'est-à-dire un isolement reproductif post-zygotique dans les croisements entre une femelle qui n'est pas infectée par toutes les souches de *Wolbachia* qui se trouvent chez le mâle (pour revues, Dobson 2003; Werren *et al.* 2008). Chez les espèces diploïdes, les embryons incompatibles meurent. Chez les espèces haplo-diploïdes comme *L. heterotoma*, seuls les embryons issus d'œufs fécondés et qui donnent normalement des femelles subissent l'IC et les

œufs non fécondés se développent normalement en mâles. Les embryons incompatibles ont deux devenir possibles : soit ils meurent (on parle alors d'IC de type mortalité des femelles), soit ils se développent en mâle (on parle d'IC de type développement en mâle). Ces deux types d'IC sont rencontrés chez *L. heterotoma*. Cette modification de la reproduction de son hôte permet ainsi à la bactérie d'envahir très rapidement les populations d'insectes en diminuant la fitness des femelles non infectées.

II.2. L'association *Leptopilina boulardi* / virus LbFV

La présence de la bactérie *Wolbachia* n'a pas été démontrée chez *L. boulardi*. En revanche, *L. boulardi* est apparue infectée par un virus ayant d'étonnants effets sur son hôte.

II.2.1. Un virus manipulateur du comportement de ponte chez *L. boulardi*

Chez *L. boulardi*, il a été observé des taux de superparasitisme étonnamment élevés, certains individus étant capables de pondre plus de dix descendants dans le même hôte, ce qui entraîne parfois la mort du couple hôte-parasitoïdes (Varaldi *et al.* 2005b) (Figure I.5). Dans la plupart des populations analysées, ces individus superparasitants (phénotype S) coexistent avec des individus qui ne déposent qu'un seul œuf par hôte (phénotype non superparasitant : NS).

L'analyse du déterminisme génétique de ce comportement a démontré qu'il se transmet par voie maternelle (verticalement, de mère à descendant). Cette transmission verticale est au laboratoire très efficace ($T_v > 99\%$) mais néanmoins incomplète puisqu'il peut quelquefois être obtenu des individus infectés et non infectés à partir d'une lignée iso-femelle infectée (Varaldi *et al.* 2003). En outre, lorsque deux femelles de *L. boulardi*, l'une de phénotype S et l'autre de phénotype NS, déposent leurs œufs au sein de la même larve de drosophile, il a été montré que les femelles NS ayant gagné la compétition intra-hôte acquièrent le comportement de superparasitisme dans environ 70% des cas (Varaldi *et al.* 2003). Cela signifie que le comportement est induit par un élément infectieux qui est transmis horizontalement au sein des larves de drosophiles superparasitées ! La recherche de la nature de l'élément impliqué dans le comportement de superparasitisme par des traitements antibiotiques et des essais d'amplification par PCR à partir d'amorces bactériennes généralistes ont conduit à rejeter l'hypothèse bactérienne (Varaldi *et al.* 2003; Varaldi *et al.* 2006a). La recherche de facteurs cytoplasmiques par microscopie électronique à transmission (MET) a révélé la présence de particules virales au sein de l'appareil reproducteur de l'insecte

femelle (Varaldi *et al.* 2003). Plusieurs expériences ont montré une corrélation quasi-parfaite entre la présence du virus et le comportement de superparasitisme du parasitoïde. Aucun virion n'a été observé chez les femelles non superparasitantes contrairement à celles déposant plusieurs œufs par larve hôte.

Chez *Leptopilina boulardi*, il a ainsi été mis en évidence chez les femelles superparasitantes un virus, interférant dans les relations hôtes/parasitoïdes en forçant les femelles *L. boulardi* à déposer leurs œufs dans des hôtes déjà parasités (Figure I.5). Jusqu'à aujourd'hui, seule la transmission intra-spécifique a été démontrée (Varaldi *et al.* 2003).

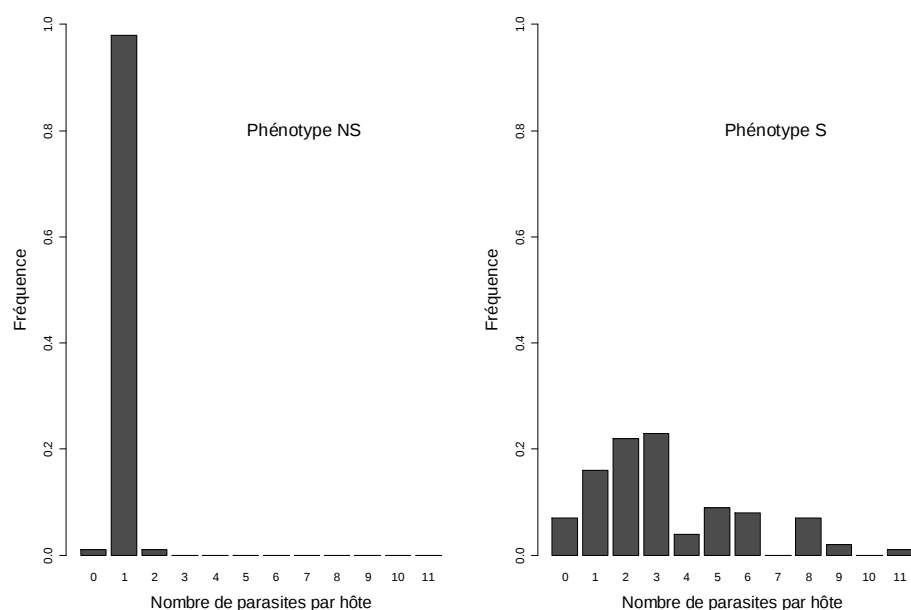


Figure I.5 : Distribution du nombre de parasitoïdes par larve de drosophiles pour des lignées *L. boulardi* non infectées par le virus (phénotype NS) et infectées (phénotype S).

Données issues de l'étude de 96 larves de drosophiles parasitées par 24 femelles de chaque phénotype (NS et S) : $N_{NS}=96$ et $N_S=96$. Source : S. Patot.

II.2.2. Identité du virus

Nous ne pouvons encore préciser avec certitude la nature de la particule virale ainsi que sa position dans la classification des virus. Des essais de purification du virus par centrifugation différentielle ont été plusieurs fois tentés sans succès (travaux de J. Varaldi et M. Maache). Les analyses de MET réalisées durant la thèse de J. Varaldi (2003) sur l'appareil reproducteur de femelles *L. boulardi* ont montré que les particules ont une forme allongée et que la nucléocapside mesure environ 45 nm de large et peut excéder 1 μm de long (Figure I.6)

(Varaldi *et al.* 2006c). De par sa forme, ce virus a été nommé LbFV pour *Leptopilina bouvardi* filamentous virus. Il a également été rapporté que la réplication des particules virales se déroule dans le noyau des cellules hôtes. Les particules matures se déplacent ensuite vers le cytoplasme où elles peuvent atteindre une densité importante. Elles acquièrent à ce moment-là une enveloppe (leur diamètre atteint alors 60 nm dans le cytoplasme). La réplication nucléaire du virus suggère qu'il s'agit d'un virus à ADN. Aucune particule n'a pour l'instant été observée dans les œufs de parasitoïdes.

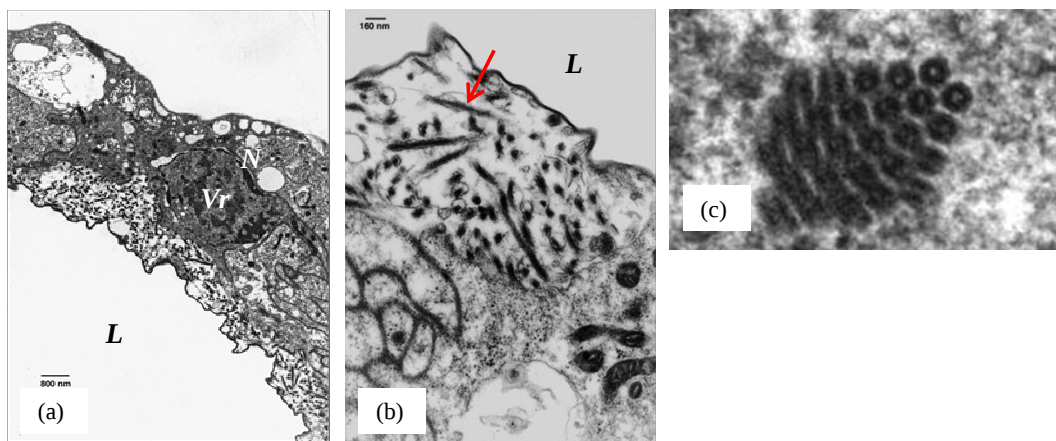


Figure I.6 : Particules virales filamenteuses (LbFV) observées par microscopie électronique à transmission à partir de la coupe d'un oviducte de *L. bouvardi*.

L : lumière de l'oviducte; *N* : noyau ; *Vr* : viroplasme. La flèche en rouge est pointée sur une particule virale.
 (a) Réplication intra-nucléaire dans les cellules de l'hôte bordant la lumière de l'oviducte. (b) Structure de particules virales agrégées. (c) Coupe transversale de nucléocapsides dans le noyau de l'hôte.
 Photos : M. Ravallec/J. Varaldi.

II.2.3. Les effets du virus sur la physiologie et le comportement de *L. bouvardi*

Afin de comprendre la prévalence et la dynamique d'invasion du virus dans les populations de *L. bouvardi*, il est dans un premier temps nécessaire de connaître les coûts et/ou les bénéfices potentiels de l'infection virale sur divers caractères intervenant dans l'efficacité des parasitoïdes. Des expériences menées au laboratoire sur des souches de *L. bouvardi* génétiquement identifiées (afin d'éliminer tout effet du génotype hôte) ont montré que l'infection virale n'a qu'un coût modéré sur la physiologie et la morphologie de son hôte puisqu'elle n'induit aucun biais sur le sexe-ratio, aucune conséquence néfaste sur la survie de l'insecte, un faible coût sur la durée de développement (+3%) ainsi que sur la taille du corps (-2%). Elle entraîne néanmoins une baisse significative de l'activité locomotrice du parasitoïde (-46%) (Varaldi *et al.* 2005a). Il a également été mesuré le stock d'œufs qui donne une bonne

estimation du succès reproducteur potentiel des femelles puisque *L. boucardi* est une espèce essentiellement pro-ovigénique (peu de production d'œufs au stade adulte). Il a été rapporté que les femelles superparasitantes testées disposaient d'un stock d'œufs supérieur de 11% à celui des femelles non superparasitantes (Varaldi *et al.* 2005a).

Pour qu'un parasitoïde puisse infecter un hôte et se développer, il est communément admis que plusieurs étapes chronologiques doivent être réalisées avec succès (étapes pré- et post-ovipositionnelles) au cours desquelles l'insecte déploie tout une panoplie de comportements spécifiques à la perception, à la reconnaissance ou à la détermination de la qualité de son hôte. Les études menées sur divers traits comportementaux (perception des kairomones de l'hôte par les femelles *L. boucardi*, recherche des patches d'hôtes, rythmes d'activité, capacité des mâles à localiser les phéromones sexuelles) n'ont montré aucun effet de l'infection virale (Varaldi *et al.* 2005a).

On sait également que la forte intensité du superparasitisme qu'expriment certaines femelles infectées par LbFV peut engendrer une mort précoce du couple parasitoïde/larve de drosophile hôte (Varaldi 2003; obs. pers.). Il s'agit dans ce cas d'un coût indirect dû à la modification comportementale de l'insecte par le virus.

Ainsi, la réduction de fitness de *L. boucardi* suite à l'infection par LbFV consiste (1) en des coûts directs sur la physiologie de l'insecte et (2) en des coûts indirects dus à la modification comportementale. Les résultats obtenus sur cette analyse de la virulence du virus mettent en évidence un coût modéré direct de l'infection virale sur son hôte (à l'exception de l'activité locomotrice) et une modification comportementale engendrée par le virus qui apparaît être restreinte à la manipulation du superparasitisme (Varaldi *et al.* 2005a). Les effets indirects sont plus difficiles à évaluer. Hormis une baisse du succès parasitaire en cas de superparasitisme intense, le fait pour l'insecte de superparasiter ses hôtes peut se révéler être désavantageux puisqu'il entraîne un fort gaspillage en œufs.

II.2.4. Signification adaptative de l'induction du superparasitisme

Y a-t-il une signification adaptative pour le virus à manipuler le comportement de superparasitisme de son hôte (Varaldi *et al.* 2003) ? Cette question a été abordée d'un point de vue théorique (Gandon *et al.* 2006). Il s'agissait de démontrer que si la modification comportementale est adaptative pour LbFV, alors l'infection virale devrait rapidement envahir les populations de parasitoïdes n'exprimant pas ou que très peu le comportement de superparasitisme. En d'autres termes, il s'agissait de tester si la stratégie évolutivement stable

(ESS) de superparasitisme (qui correspond au taux optimal de superparasitisme permettant de maximiser la fitness de l'organisme) du virus est supérieure à celle du parasitoïde (en l'absence du virus). Afin d'appréhender l'évolution du superparasitisme sous différentes conditions écologiques, un modèle a été développé intégrant les caractéristiques du modèle biologique *L. boucardi* / LbFV (Gandon *et al.* 2006).

L'analyse théorique montre qu'en l'absence d'infection virale, l'ESS de superparasitisme du point de vue du parasitoïde aboutit aux mêmes conclusions que celles déjà proposées sur la base de données empiriques : la femelle parasitoïde a intérêt à superparasiter en cas de forte compétition pour les hôtes (van Alphen & Visser 1990; Visser 1992). En revanche, lorsque le virus est intégré au modèle, l'ESS de superparasitisme du virus est toujours supérieure à celle du parasitoïde, démontrant bien la valeur adaptative pour le virus de la modification comportementale (Figure I.7). Sa transmission horizontale lui permettant d'envahir la population de parasitoïdes, le superparasitisme lui bénéficie plus qu'au parasitoïde. On observe alors un conflit d'intérêt entre le virus et le parasitoïde, le premier retirant fréquemment un bénéfice du superparasitisme *via* la transmission verticale ou horizontale, alors que le second n'a un intérêt que limité dans ce comportement (Figure I.7).

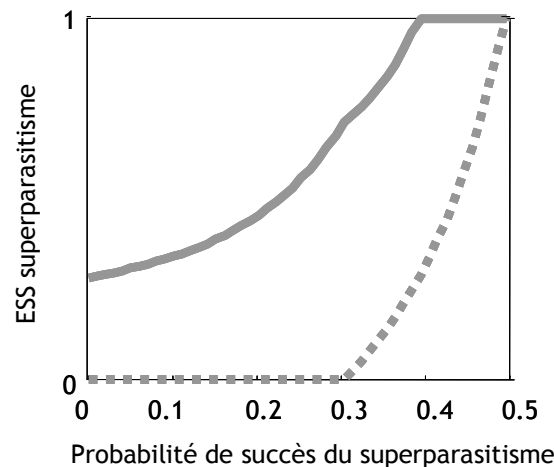


Figure I.7 : Stratégies évolutivement stables de superparasitisme pour le virus (ligne continue) et pour le parasitoïde (ligne pointillée) en fonction de la probabilité de succès du superparasitisme.

Paramètres du modèle : transmission verticale : $\tau_v=0,95$; transmission horizontale : $\tau_h=0,75$; probabilité de transmission horizontale du virus entre deux larves de *L. boucardi* en compétition au sein d'un même hôte : $\varepsilon = 0$; stock d'œufs des femelles à l'émergence : $E=10$; densité en hôtes : $N=100$; taux d'émergence du parasitoïde (= taux de mortalité de l'hôte) : $d=e=0,2$.

II.2.5. Test comportemental de l'infection de *L. boulandi* par le virus LbFV

En début de thèse, le seul moyen possible pour diagnostiquer la présence du virus était d'étudier les conséquences de l'infection sur l'hôte et donc d'utiliser un test diagnostique comportemental standardisé, les comportements de ponte entre femelles non superparasitantes et femelles superparasitantes étant tranchés (Figure I.5). L'existence d'une association étroite entre le phénotype superparasitant d'une femelle *L. boulandi* et la présence du virus LbFV (détecté par MET) avait alors été mise en évidence (Varaldi *et al.* 2003).

Le comportement de chaque femelle est estimé à travers la distribution des infestations au sein d'un patch de dix larves (stade L2) de *D. melanogaster*. Chaque femelle, âgée de 1 à 2 jours, est placée dans une boîte de Pétri remplie pour moitié de milieu gélosé sucré sur lequel est déposé un disque de levure boulangère (100 µl d'une suspension à 3 g / 20 ml) contenant dix hôtes. La levure constituant la seule ressource disponible pour les larves, on s'assure qu'elles restent sur ce patch artificiel. Le test a lieu à 25°C, de 17h jusqu'au lendemain matin, 10h. Cette période de la journée a été choisie car elle correspond à la période d'activité des parasitoïdes de cette espèce (Fleury *et al.* 2000). La présence d'un nombre restreint d'hôtes disponibles pendant un temps relativement long assure que les parasitoïdes se trouvent en situation de rencontrer des hôtes déjà parasités, et doivent donc « choisir » de les accepter ou non. Une fois les parasitoïdes enlevés, les boîtes sont remises à 25°C. Après deux jours de développement, trois à cinq larves de drosophiles de chaque boîte de Pétri sont disséquées afin de dénombrer les parasitoïdes dans chacune d'elles. Le comportement de superparasitisme de chaque femelle est alors estimé en calculant la moyenne du nombre de parasitoïdes par larve de drosophile parasitée.

III. Procédures expérimentales et origines des souches et lignées de parasitoïdes

III.1. Conditions d'élevage au laboratoire

Les parasitoïdes sont maintenus au laboratoire sur une lignée standardisée de *D. melanogaster* non infectée par *Wolbachia* (population de S^{te} Foy-lès-Lyon, Rhône, France). La lignée de drosophiles est maintenue en l'absence de parasitoïdes sur milieu contrôlé fabriqué à base de farine de maïs, de levure de bière et d'agar dans des tubes plastiques (2,5 cm de diamètre, 10

cm de hauteur), placés à 21°C (LD 12 :12), à raison d'environ 200 drosophiles par tube. Les parasitoïdes sont élevés en petite masse (3 à 6 femelles fondatrices / tube accompagnées de 2 ou 3 mâles) sur les mêmes types de tubes contenant environ 200 œufs de drosophiles et produisent en moyenne 150 descendants.

L. boulandi est élevée à 25°C. Son temps de génération est alors de trois semaines (LD 12 :12 ; RH = 70%). *L. heterotoma* est élevée à 21°C (LD 12 :12 ; RH = 70%), sa température optimale de développement (Ris 2004). Son temps de génération dans ce cas est d'un mois. En revanche, au cours des expériences, *L. heterotoma* a été confrontée à la même température que *L. boulandi* (25°C). Son temps de génération est alors de trois semaines.

Les femelles de parasitoïdes qui nécessitaient d'être vierges pour certaines expériences ont été obtenues par isolement individuel de la pupa parasite dans des cloches de Durham (hauteur : 4 cm, diamètre : 0,8 cm) un ou deux jours avant leur émergence (avec du miel et en condition humide).

III.2. Origines des *Leptopilina boulandi*

III.2.1. Lignées de référence

Une lignée de *L. boulandi* de phénotype S et une lignée de *L. boulandi* de phénotype NS ont été utilisées au cours du travail de thèse : il s'agit des « lignées de référence » qui sont de même génotype nucléaire (lignées iso-géniques) notées par la suite S_{réf} et NS_{réf}. La lignée NS_{réf} provient de Sienne (Italie) et a été fondée en 2000. Elle a été obtenue à partir d'une lignée iso-femelle maintenue en croisements frères-sœurs pendant huit générations (Varaldi 2003). Les femelles de cette lignée NS_{réf} ne déposent en moyenne qu'un seul œuf par hôte. La lignée S_{réf} a été obtenue par transfert horizontal de particules virales lors d'un événement de superparasitisme impliquant une lignée NS_{réf} et une lignée superparasitante originaire de Gothenon (Drôme, France). Les femelles de cette lignée S_{réf} superparasitent leurs hôtes. Le comportement de ces deux lignées est resté très clairement tranché au cours des nombreuses générations durant lesquelles ont eu lieu les expériences.

Notons que la souche virale des lignées S_{réf} utilisée par J. Varaldi au cours de sa thèse (2003) était différente de celle précédemment décrite, la lignée ayant été perdue. En effet, J. Varaldi avait alors construit une lignée de phénotype S par transfert artificiel de particules virales d'origine Sienne (Italie) dans la lignée NS_{réf} en utilisant un micro-injecteur (Varaldi *et al.* 2006c).

III.2.2. Populations naturelles du sud-est de la France

Plusieurs populations naturelles de *L. bouhardi* du sud-est de la France ont été échantillonnées pour le besoin des expériences de ce travail de thèse. Les campagnes de terrain ont au total été menées dans 15 stations distribuées le long de la vallée du Rhône, de la périphérie nord de Lyon jusqu'à la côte méditerranéenne. Les pièges consistent en des boîtes plastiques cylindriques fermées suspendues dans des arbres fruitiers ou dans des buissons (Figure I.8) et contenant une banane entaillée. Ce système expérimental simule un fruit standard que les insectes (drosophiles puis parasitoïdes) peuvent coloniser librement durant les 15 jours où ils sont laissés en place avant d'être ramenés au laboratoire pour être analysés. Dans les cas où il n'était pas possible de laisser des pièges durant 15 jours sur le terrain, il a alors été ramassé des fruits, déjà en décomposition avancée, de manière à ce que les parasitoïdes aient pu pondre dans les larves de drosophiles se nourrissant du fruit (une trentaine de fruits récoltés par site d'échantillonnage). Pièges et fruits ont été traités de la même façon une fois ramenés au laboratoire où les femelles *L. bouhardi* émergentes ont été mises à pondre en lignées iso-femelles dans des tubes contenant environ 200 drosophiles. Les élevages ont été maintenues en chambres climatisées, à 25°C (LD 12 :12 ; RH=70%).



Figure I.8 : Piège fermé et site d'échantillonnage type (Station INRA de Gotheron).

Les populations naturelles utilisées avec leur date d'échantillonnage sont les suivantes :

- Chasselay (69) (septembre 2007) ;

- Cailloux sur Fontaine (69) (septembre 2007) ;
- S^t Maurice de Beynost (01) (septembre 2007) ;
- S^{te} Foy-lès-Lyon (69) (septembre 2007) ;
- S^t Laurent d'Agny (69) (septembre 2007) ;
- Villette sur Vienne (69) (septembre 2007) ;
- Sonnay (38) (septembre 2007) ;
- Epinouze (26) (septembre 2007) ;
- Lens-Lestang (26) (septembre 2004 et 2007) ;
- Annonay (07) (octobre 2004 et septembre 2007) ;
- Gotheron (26) (octobre 2004, septembre 2006 et 2007) ;
- Avignon (84) (octobre 2004 et septembre 2007) ;
- Antibes (06) (novembre 2004) ;
- Bras (83) (octobre 2004) ;
- Pierrefeu du Var (83) (octobre 2004).

III.2.3. Autres populations naturelles de *L. bouhardi*

Trois populations naturelles de *L. bouhardi* issues de sites d'échantillonnage hors France métropolitaine ont été également utilisées. Le principe d'échantillonnage a été le même que celui détaillé précédemment : quelques bouteilles ou pots plastiques ont été déposés dans les différentes régions visitées durant plusieurs jours puis récupérés et ramenés au laboratoire. Le nombre de pièges posés n'est pas aussi élevé que précédemment (entre un et cinq pièges environ) et varie selon les sites. Leur provenance, leur date d'échantillonnage ainsi que leur « collecteur » sont les suivants :

- Rio de Janeiro (Brésil) (2007) (J. David);
- Martinique (1999) (M. Boulétreau);
- Sienne (Italie) (2000) (J. Varaldi);
- Sicile (2000) (M. Boulétreau);
- Lamto (Côte d'Ivoire) (1996) (Y. Carton);
- Palma de Majorque (Espagne) (2006) (S. Gandon).

III.3. Lignée de *L. heterotoma*

Une seule lignée de *L. heterotoma* a été utilisée au cours de ce travail de thèse. Il s'agit d'une lignée homozygote, obtenue par des croisements frères-sœurs répétés pendant 35 générations

et provenant d'Antibes (souche A7, Alpes-Maritime, France ; sympatrique avec *L. bouhardi*). Deux souches (correspondant à des sous-lignées) ont été utilisées. L'une est tri-infectée par *Wolbachia* (*wLhet 1*, *wLhet 2* et *wLhet 3*), ce statut d'infection étant celui le plus fréquemment rencontré dans les populations naturelles (Vavre *et al.* 1999 ; Vautrin 2008). La seconde souche est issue de la première. Des traitements antibiotiques réalisés sur la souche A7 tri-infectée ont permis d'obtenir une souche non infectée par *Wolbachia* (Mouton *et al.* 2003).

Mise au point d'un outil moléculaire diagnostic de l'infection par LbFV

Suite à la découverte du virus LbFV, le statut d'infection des femelles *L. boulandi* était établi soit par des tests comportementaux, soit par microscopie électronique à transmission (MET). Ces deux méthodes présentaient des limites aussi bien du point de vue de leur fiabilité (ambiguïté du comportement de certaines femelles, visualisation des particules virales) que de la lourdeur des expériences ce qui était un frein important à l'étude des populations de *L. boulandi* et des communautés d'insectes. Il était alors indispensable de disposer d'un outil moléculaire fiable et rapide de détection.

Les méthodes de transcriptomique permettent de visualiser l'expression des gènes de manière spatiale, temporelle ou conditionnelle et sont utilisées afin de déterminer les gènes clés intervenant dans divers mécanismes moléculaires. Concernant les infections virales, l'approche transcriptomique a permis de révéler l'existence de micro-organismes jusque là passé inaperçus comme pour le virus Nora (Habayeb *et al.* 2006). Cet agent viral ARN a été mis en évidence suite à l'analyse des transcriptomes de *D. melanogaster* infectée ou non infectée par une bactérie, dont l'objectif premier était d'étudier les gènes de la drosophile impliqués dans la réponse immunitaire (Asling *et al.* 1995). La technique d'hybridation soustractive et suppressive (*Suppression Subtractive Hybridization* ou SSH) (cf. partie suivante) est de plus en plus utilisée dans des modèles insectes afin de répondre à diverses questions. Nous citerons le cas du moustique chez qui l'on étudie les gènes exprimés au cours du développement du *Plasmodium*, parasite responsable du paludisme (Dessens *et al.* 2000), les gènes sur- ou sous-exprimés lors du phénomène de diapause (vie ralentie) (Robich *et al.* 2007) ou encore les mécanismes cellulaires impliqués lors du repas de sang de ces insectes (Chen *et al.* 2007). Dans leur article, Hu & Hirshfield (2005) proposent un protocole de détection et d'identification d'agents viraux inconnus par une approche de transcriptomique comparative (technique de la SSH), ce qui correspondait à notre objectif.

Lors de ce travail de thèse, des expériences de transcriptomique comparative ont ainsi été tentées afin de développer une approche moléculaire de l'étude du virus dans plusieurs buts : identifier les particules virales, préciser leur apparentement avec d'autres virus et développer un test moléculaire afin de diagnostiquer l'infection de façon rapide et fiable. Nous avons abordé ces questions en utilisant la technique de SSH couplée à la technique MOS (*Mirror Orientation Selection*) (Diatchenko *et al.* 1996; Diatchenko *et al.* 1999; Rebrikov *et al.* 2000). Par cette approche, outre le développement d'un outil diagnostique de l'infection, il était également possible d'aborder les mécanismes d'action du virus sur le comportement de son hôte parasitoïde.

I. Analyse transcriptomique de l'infection par LbFV

I.1. La technique de SSH : hybridation soustractive et suppressive (*Suppression Subtractive Hybridization*)

I.1.1. Principe de la SSH

La SSH permet, en comparant deux populations d'ARNm, d'identifier les gènes différentiellement exprimés entre deux modalités expérimentales en éliminant spécifiquement ceux qui montrent un même niveau d'expression. Dans nos expériences, les deux populations d'ADNc de *L. bouhardi* correspondaient aux modalités I (infectée) et NI (non infectée). Elles ont été construites à partir des ovaires des lignées de référence iso-géniques de *L. bouhardi*, respectivement S_{réf} et NS_{réf} (lors des observations par MET, les particules virales ont été observées dans les tissus ovariens ; Varaldi *et al.* 2003).

La technique consiste à mélanger une population d'ADNc obtenue à partir d'une population d'ARNm d'intérêt (*tester*), avec un excès d'ADNc obtenus à partir d'une population d'ARNm témoin (*driver*). L'objectif est de supprimer les ARNm de la population *driver* qui sont également exprimés dans la population *tester*, ceci afin de créer des sous-populations simplifiées ne contenant que les ARNm différentiellement exprimés dans l'échantillon *tester*. La soustraction d'ADNc permet donc d'isoler des séquences présentes dans une population d'ARNm, mais absentes ou très faiblement représentées dans une autre.

Il est ainsi obtenu une banque SSH qui est une banque soustraite et normalisée contenant les gènes différentiellement exprimés dans la condition d'intérêt. Le principe de la SSH s'appuyant sur deux hybridations successives est schématisé dans la figure II.1 et les étapes sont détaillées dans la légende.

La SSH associe une étape de normalisation entre les séquences abondantes et celles au contraire très rares ce qui a pour but de favoriser la détection des ARNm peu abondants, et une étape de soustraction qui exclut les séquences communes entre la population cible (*tester*) et la population témoin (*driver*). Cette méthode est fondée à la fois sur la cinétique de réassociation des brins d'ADN (les fragments abondants s'hybrideront plus vite que les fragments rares, la vitesse d'association étant proportionnelle à la quantité de séquences) et sur l'existence de l'effet suppresseur de la PCR (les brins portant les mêmes adaptateurs forment des structures en épingle à cheveux non amplifiables ; seules les séquences portant deux adaptateurs différents à leurs extrémités sont amplifiées exponentiellement). Les séquences amplifiées par PCR et clonées constitueront la banque soustraite.

La soustraction peut être menée dans deux directions pour chacune des deux populations d'ADNc (modalités I et NI) l'une et l'autre jouant alternativement le rôle de *tester* ou *driver*: dans notre cas, la soustraction *forward* permet l'enrichissement en séquences sur-exprimées dans l'échantillon I par rapport à l'échantillon NI. Dans une soustraction *reverse*, l'échantillon NI devient la population cible et on recherche les gènes sur-exprimés dans cette population NI. Le résultat est l'obtention de deux populations d'ADNc soustraits : les ADNc soustraits *forward* contenant les séquences spécifiques à l'échantillon I et les ADNc soustraits *reverse* contenant les séquences spécifiques à l'échantillon NI. L'objectif de cette partie de la thèse étant l'identification de séquences virales, les efforts ont été portés sur la soustraction *forward* (Figure II.2).

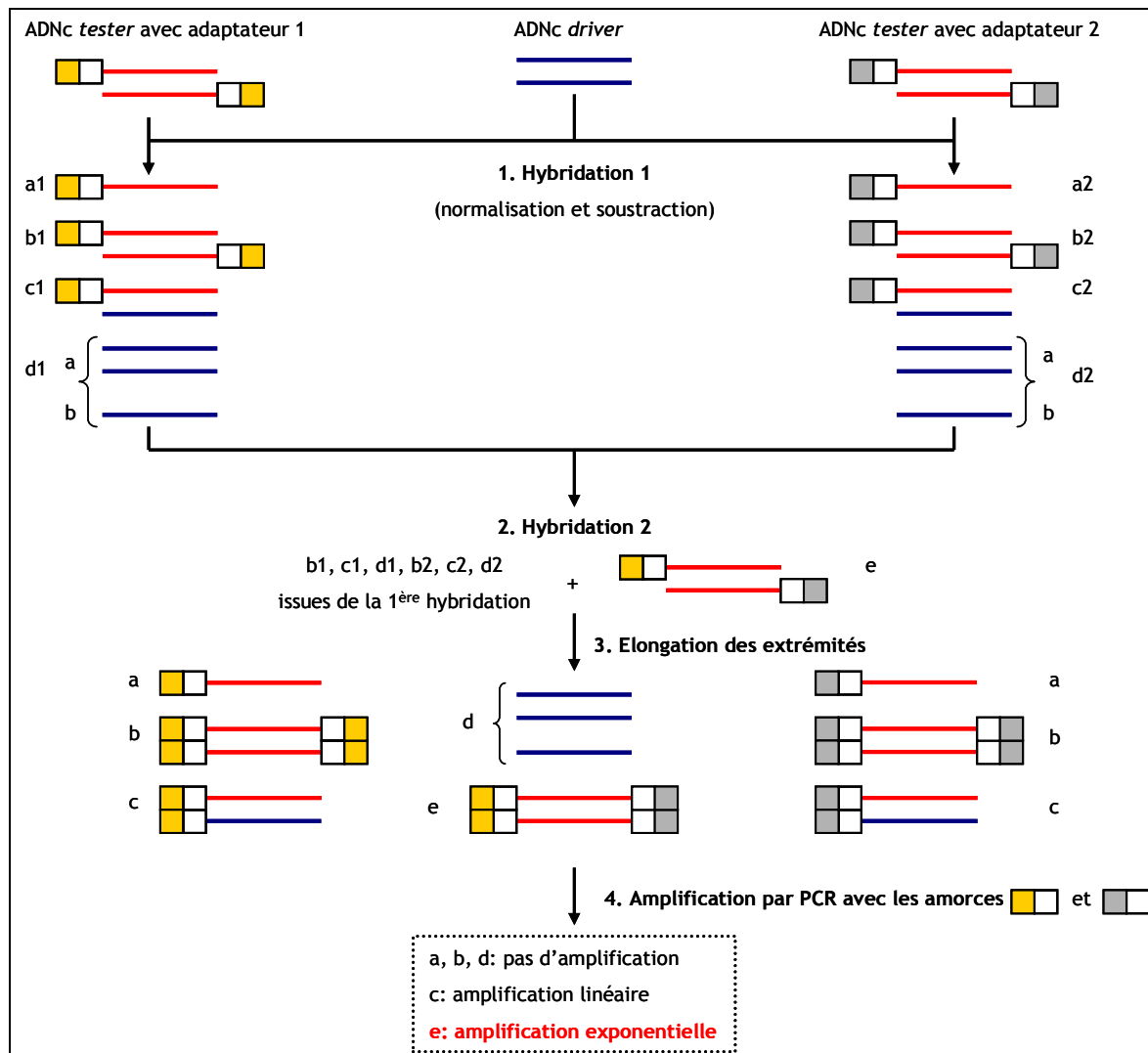


Figure II.1 : Principe de la technique de SSH (d'après Diatchenko *et al* 1996).

Après extraction et rétro-transcription des ARNm issus des deux échantillons à comparer, l'ADNc d'intérêt ou cible (*tester*) est séparé en deux fractions égales liguées en 5' à des adaptateurs différents (adaptateurs 1 et 2). Aucun adaptateur n'est ligué à l'ADNc témoin (*driver*) auquel sont comparés les pools *tester*. La soustraction proprement dite est réalisée par deux hybridations successives.

1. Pour la première hybridation, les ADNc à soustraire (*driver*) sont ajoutés en excès à chaque fraction d'ADNc *tester*. Après dénaturation et renaturation, plusieurs possibilités se présentent: les brins complémentaires des gènes présents dans les deux conditions (*tester* et *driver*) peuvent s'hybrider ensemble (formes c1 et c2), reformer les homoduplex initiaux (formes b1, b2, d1a et d2a) ou rester en simplex (formes a1, a2, d1b et d2b). Selon l'origine du brin d'ADNc, chacune des fractions possède ou non des adaptateurs aux extrémités. Les simplex de forme a1 ou a2 sont particulièrement intéressants: ils sont enrichis en séquences différentiellement exprimées (les gènes communs aux deux conditions créant des hétéroduplex de forme c) et ils sont présents à la même concentration pour des gènes plus ou moins exprimés.

2. Au cours de la seconde hybridation, les deux fractions de *tester* sont mélangées sans dénaturation préalable. Le mélange des deux échantillons permet la formation d'un nouvel hybride (forme e) portant un adaptateur différent à chaque extrémité.

3. et 4. Après élongation des extrémités de chaque complexe, une PCR est effectuée à l'aide d'amorces spécifiques des adaptateurs. A l'issue de cette PCR, seules les séquences qui portent deux adaptateurs différents à leurs extrémités (forme e), correspondant aux séquences préférentiellement exprimées dans la condition d'intérêt, sont amplifiées de façon exponentielle contrairement à celles portant les mêmes adaptateurs. Les brins portant les mêmes adaptateurs aux deux extrémités (forme b) forment des structures en épingle à cheveux non amplifiables (structures *pan*).

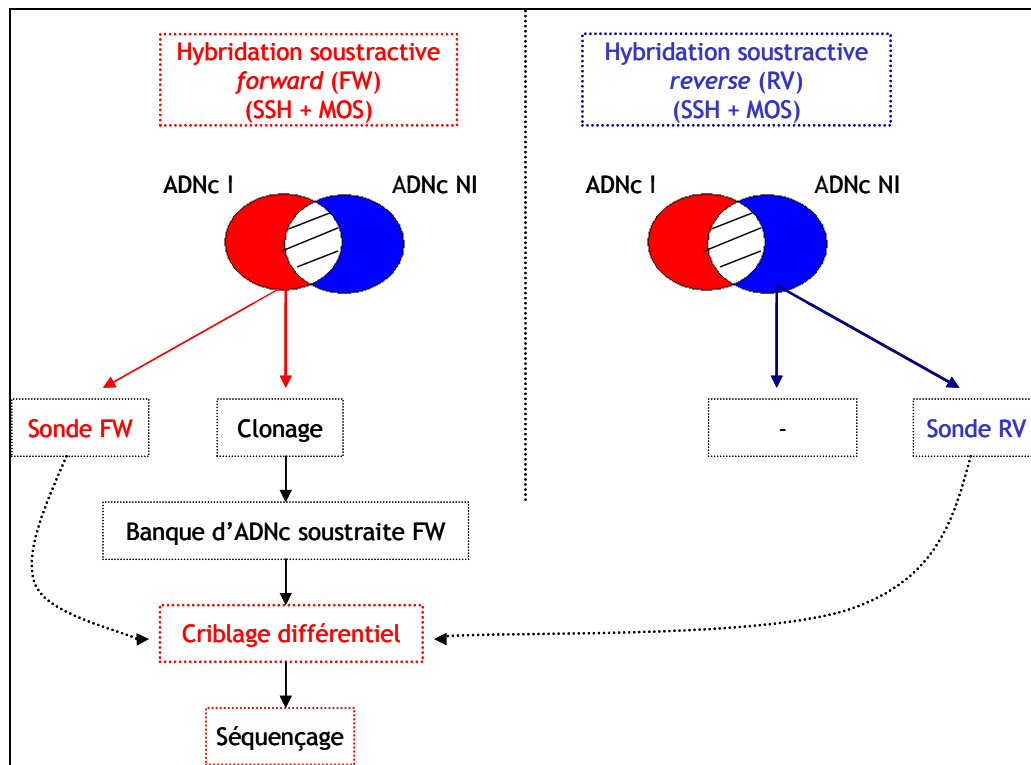


Figure II.2 : Etapes de construction de la banque soustraite dans le sens *forward*.

En rouge, modalité « infectée » (I). En bleu, modalité « non infectée » (NI).
L'objectif ici est l'identification de gènes sur-exprimés dans la modalité I.

I.1.2. Avantages et inconvénients de la SSH

La SSH est une technique d'hybridation soustractive performante car elle combine une grande efficacité de soustraction avec une représentation égalisée des ADNc exprimés à des niveaux différents dans la banque soustraite. Dans les meilleures conditions, la SSH permet un enrichissement d'un facteur 1 000 à 5 000 de rares molécules d'ADNc (quelques molécules par cellules) (Diatchenko *et al.* 1996).

Il existe cependant un certain nombre de biais inhérents aux modes opératoires pouvant expliquer un manque de reproductibilité des expériences. Cela est tout d'abord lié à la sélection initiale. Selon la technique des kits utilisés, tous les ARNm peuvent ne pas être rétrotranscrits avec la même efficacité et des séquences d'intérêt peuvent être d'emblée exclues de la sélection. La soustraction peut aussi varier en efficacité d'un cycle à l'autre et les résultats peuvent être pollués par des séquences d'ADNc communes aux deux modalités (faux positifs). Une manière d'éliminer ce bruit de fond produit dans les expériences de SSH est connu sous le terme de *Mirror Orientation Selection* (MOS) (Rebrikov *et al.* 2000) (cf. partie

suivante). Enfin, la sélection des colonies bactériennes peut introduire un troisième biais lors de l'étape de clonage selon l'effort d'échantillonnage effectué.

Cette technique d'hybridation soustractive est apparue adéquate dans le cadre de notre travail permettant d'accéder, sur un organisme non modèle (*L. bouvardi*) hébergeant un virus non identifié, donc sans connaissance génomique *a priori*, à des séquences de gènes candidats (gènes viraux ou gènes de l'insecte exprimés en conditions d'infection). Si l'approche SSH constitue la première étape vers une caractérisation du transcriptome de l'insecte infecté, les résultats obtenus devront être confirmés et complétés par une analyse du niveau d'expression génique appliquée à un plus grand nombre de gènes. Elle a eu dans notre cas l'avantage de pouvoir acquérir de l'information encore non explorée.

I.2. La technique MOS

Lors de la SSH, certaines molécules d'ADNc communes aux deux modalités peuvent échapper à leur élimination par hybridation avec le *driver* (molécules de forme c dans la figure II.1). Il se peut alors que le nombre de clones « faux positifs » devienne important dans la banque soustractive créant un bruit de fond conséquent. Ayant effectivement eu à faire à ce problème technique, une nouvelle étape a été alors intégrée au protocole initial avec la *Mirror Orientation Selection* ou MOS (Rebrikov *et al.* 2000) (Figure II.2). L'utilisation de la technique MOS en combinaison avec la SSH pour la mise en évidence de gènes différentiellement exprimés est bien documentée (pour exemples : Rebrikov *et al.* 2002; Boengler *et al.* 2003). Le principe de cette technique est schématisé dans la figure II.3 ci-contre.

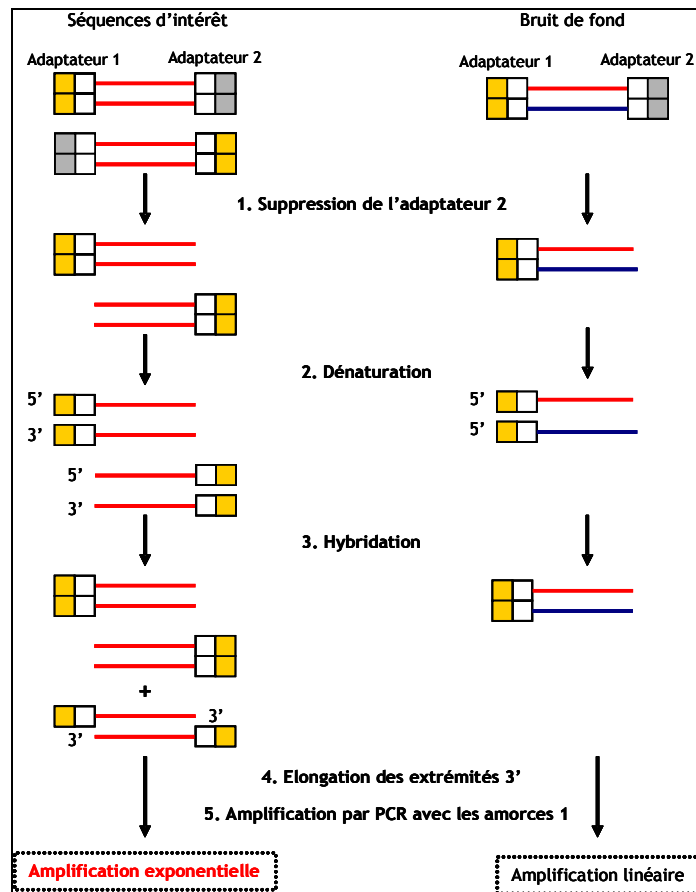


Figure II.3 : Principe de la technique MOS (d'après Rebrikov *et al.* 2000).

Les molécules d'ADNc d'intérêt sont représentées en rouge ; les molécules d'ADNc communes aux deux modalités sont représentées en bleu et rouge. Après SSH, les séquences d'intérêt sont présentes sous deux orientations contrairement à celles constituant le bruit de fond.

1. La première étape consiste en l'élimination d'un des deux adaptateurs (l'adaptateur 2 dans la figure ci-contre) par une endonucléase de restriction.

2. La dénaturation par la chaleur permet l'obtention de molécules monocaténares. Leur orientation est indiquée sur le schéma : une seule orientation pour les faux positifs, deux orientations pour les molécules d'intérêt.

3. Une étape d'hybridation est ensuite réalisée. Parmi les nouveaux hybrides formés avec les molécules d'intérêt, certaines possèdent l'adaptateur 1 à chacune de leur extrémité. Ce type de molécules a été généré par hybridation de molécules avec une orientation en miroir des adaptateurs 1 et 2. Ils correspondent donc obligatoirement aux molécules d'intérêt.

4 et 5. Après élongation des extrémités de chaque complexe, une PCR est effectuée à l'aide d'amorces spécifiques des adaptateurs. A l'issue de cette PCR, seules les séquences ayant l'adaptateur 1 aux deux extrémités, donc préférentiellement exprimées dans la condition d'intérêt, sont amplifiées de façon exponentielle. Le produit PCR final est donc enrichi en séquences d'intérêt.

I.3. Dot-blotting et séquençage

La banque soustraite obtenue rassemble les ADNc clonés représentant les gènes sur-exprimés dans la modalité I. Afin de diminuer encore une fois le nombre de clones faux positifs pouvant rester dans la banque (*i.e.* les séquences d'ADNc communes aux deux modalités), il a été réalisé un criblage différentiel supplémentaire par dot-blotting permettant de sélectionner les clones contenant les séquences des gènes différentiellement exprimés dans la modalité

cible. Le principe de la technique est détaillé dans la légende de la figure II.4. A partir des banques soustraites obtenues dans chacune des modalités, des ADNc monocaténaire de l'échantillon d'intérêt sont synthétisés par transcription inverse des ARN extraits des deux types de modalités. Les ADNc des deux modalités sont marqués pour servir de sonde utilisées pour cribler la banque. Certains clones d'ADNc de la banque soustraite vont s'hybrider avec les deux sondes : ils correspondent à des ARNm présents dans les deux modalités. En revanche, certains ADNc ne vont s'hybrider qu'avec la sonde d'ADNc de l'échantillon d'intérêt : ils correspondent à des ARNm spécifiques de cet échantillon. Ces clones sont supposés contenir les fragments d'ADN recherchés et sont donc séquencés.

Il est ainsi obtenu une collection d'EST (*Expressed Sequence Tag*) spécifiques de chaque modalité. Leur détermination a pour objectif de caractériser une partie de la séquence des ARNm sélectionnés. Ces EST vont ensuite faire l'objet d'une analyse bioinformatique avec comme objectif de les comparer à celles qui sont déjà présentes dans les banques de données internationales.

Les détails du protocole de construction de la banque soustraite et des analyses bioinformatiques sont disponibles en annexes (annexe 1).

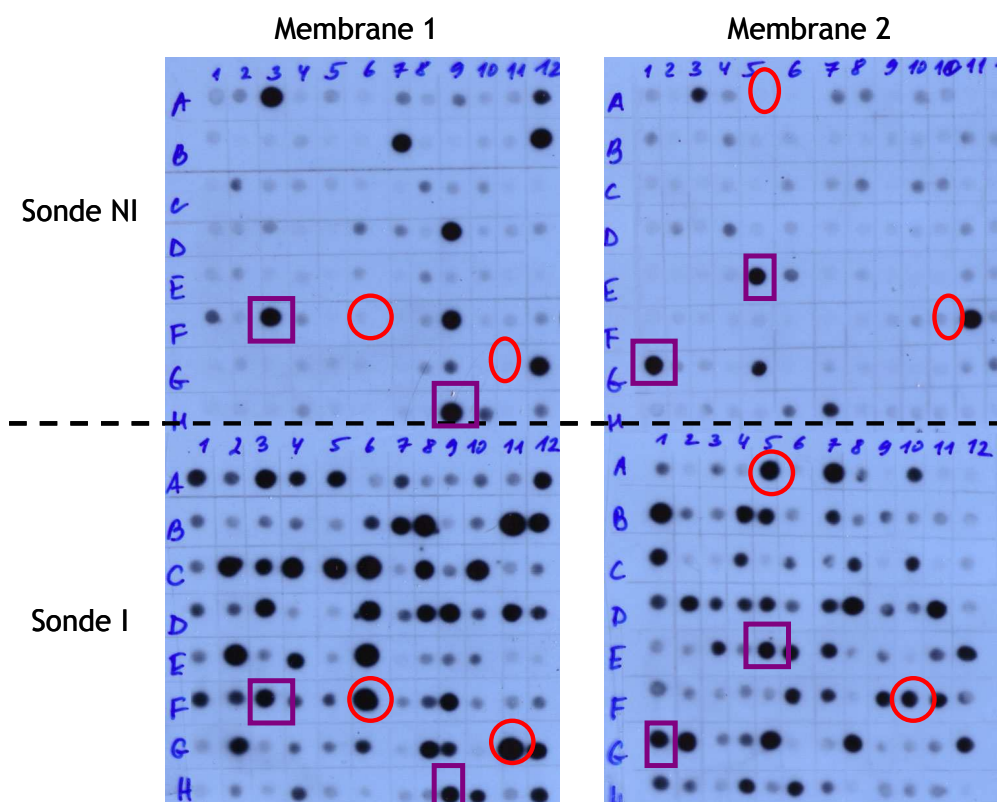


Figure II.4 : Membranes de dot blots des séquences des banques soustraites *forward* (gènes sur-exprimés dans la modalité I).

Le dot-blotting est une technique d'hybridation moléculaire entre une sonde ADN constituée de la séquence recherchée et une séquence ADN cible.

La première étape est le dépôt et le transfert de clones d'ADNc déposés sous forme de point (*dot*) et de façon ordonnée sur une membrane de nylon (*blotting*). Deux réplicats sont à chaque fois réalisés, l'étape suivante étant l'hybridation de sondes froides ADN issues de la SSH sur les clones plasmidiques de chacune des deux membranes (dot blots) : une sonde « I » pour la modalité « infectée » (*forward*) (partie basse de la membrane) et une sonde « NI » pour la modalité « non infectée » (*reverse*) (partie haute de la membrane).

On fait ensuite subir un lavage à la membrane afin d'éliminer les sondes non hybridées.

Lors de la dernière étape, les sondes restantes sont révélées par hybridation avec un anticorps couplé à une molécule fluorescente. On détecte ainsi, par présence/absence ou en comparant les différences d'intensité du signal entre les deux membranes réplicats, la présence et la quantité relative des ADNc. Dans notre cas, on sélectionne les clones où le signal est présent et plus fort avec la sonde « I » (ADNc spécifiques des individus infectés par le virus LbFV).

Les cercles rouges mettent en évidence des clones d'ADNc spécifiques ou sur-représentés dans la modalité I. Membrane 1 : clones F-6 et G-11 ; membrane 2 : clones A-5 et F-10.

Les carrés violets mettent en évidence des faux-positifs *i.e.* des ADNc communs aux deux modalités. Membrane 1 : clones F-3 et H-9 ; membrane 2 : clones E-5 et G-1.

II. Collection de séquences et approche fonctionnelle

La mise au point et l'obtention d'une première banque soustraite (SSH + MOS) a été faite au laboratoire, avec l'aide de David Lepetit (ingénieur d'étude, CNRS). Cette banque a été réalisée dans le sens *forward* afin d'identifier les gènes sur-exprimés chez les individus

superparasitants (modalité I) et pour laquelle ont été disséqués 100 paires d'ovaires de *L. bouhardi* S_{réf} et 100 NS_{réf}. Au total, 153 clones de la banque soustraite *forward* ont été séquencés.

Nous avons ensuite eu l'opportunité de faire réaliser une autre expérience « SSH+MOS » par une société de service (Evrogen, Moscou, Russie) qui nous a produit les banques d'ADNc soustraites dans les deux sens *forward* et *reverse*: la banque *forward* contient les ADNc spécifiques de la modalité I et la banque *reverse* contient les ADNc spécifiques de la modalité NI. Seule la banque *forward* a été exploitée durant le travail de thèse. 446 paires d'ovaires de *L. bouhardi* S_{réf} et 407 NS_{réf} ont été disséquées pour cette expérience. 112 clones de la banque soustraite *forward* ont été séquencés.

II. 1. Collection de séquences

Les banques soustraites obtenues au cours de cette thèse à partir des ovaires du parasitoïde *L. bouhardi* en condition d'infection par LbFV constituent une ressource inédite pour l'étude du virus manipulateur du comportement et de ses effets sur son hôte. L'annotation des EST a révélé 141 unigènes composant l'ensemble des banques soustraites (laboratoire et Evrogen) (Tableau II.1). La liste complète de ces unigènes est disponible en annexes (annexe 2). Un pourcentage élevé d'EST (12%) ne montre aucune similarité avec des séquences répertoriées dans les banques de référence attestant de la puissance de la technique pour la découverte de nouveaux gènes bien que nous ayons travaillé à partir d'un organisme non modèle. Ces séquences de type « *no hit* » sont très intéressantes pour la découverte de gènes potentiellement intéressants (gènes viraux ou gènes spécifiquement exprimés par l'hôte infecté) bien qu'elles ne permettent pas une annotation aisée. De même, une part non négligeable des EST est composée de séquences ne présentant qu'une très faible similarité avec les séquences connues (6%) (e-value>1). L'analyse bioinformatique des EST a également permis d'obtenir un grand nombre de nouvelles séquences similaires à celles connues dans les banques présentant une très grande diversité fonctionnelle (métabolisme de base, structure cellulaire, signalisation, régulation...) (cf. annexe 2).

En ce qui concerne la recherche de gènes viraux, l'annotation des EST n'a pas permis de trouver d'homologies avec des séquences virales connues contenues dans les banques. Nous n'avons donc pas pu trouver de séquences virales homologues à LbFV ni établir sa proximité phylogénétique avec les virus décrits.

Tableau II.1 : Bilan des banques soustraites *forward* contenant les séquences sur-exprimées dans la modalité infectée (I).

Expérience	EST	Unigènes	Singletons	Contigs	
Laboratoire	153	100	76	18 ¹	5 ²
Evrogen	112	41	30	12 ¹	
Total	265	141	106	35	

¹ : nombre contigs formés d'EST provenant de l'une des deux banques soustraites (laboratoire ou Evrogen).

² : nombre de contigs formés d'EST provenant des deux banques soustraites (laboratoire et Evrogen) : 4 protéines ribosomales et un histone.

II.2. Approche fonctionnelle

Par cette approche de transcriptomique comparative, il nous était possible d'aborder les mécanismes d'action du virus LbFV sur le comportement de *L. bouhardi*. Des gènes candidats de l'hôte différenciellement exprimés dans les deux lignées ont ainsi pu être identifiés et leur rôle dans l'expression du phénotype étendu abordé. En permettant l'analyse simultanée de l'expression d'un très grand nombre de gènes, ces études de transcriptomique peuvent fournir une première image globale des principaux processus physiologiques et moléculaires impliqués à différentes étapes de l'infection.

Un des résultats intéressants concerne deux séquences codant pour une peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase ou cyclophiline. Les cyclophilines forment des structures protéiques très conservées que l'on retrouve aussi bien chez les mammifères, plantes, insectes (au moins 9 cyclophilines chez la drosophile), bactéries et champignons avec des fonctions diverses : régulation de la transcription, rôle de protéines chaperonnes ou rôle dans la signalisation cellulaire (protéines ubiquitaires) (pour revue : Wang & Heitman 2005).

Les cyclophilines sont entre autres largement étudiées pour leur rôle dans les infections virales chez les vertébrés. En effet, pour le virus de l'immunodéficience humaine 1 (VIH-1), cette peptidyl-propyl isomérase, que le virus intègre à sa structure fonctionnelle lors de l'assemblage de la capsid virale, confère un pouvoir infectieux plus important (Zander *et al.* 2003; Hatzioannou *et al.* 2005; Luban 2007). L'importance de la cyclophiline chez d'autres lentivirus que le VIH a également été démontrée (Lin & Emerman 2006) ainsi que chez les virus de l'hépatite C (Heitman & Cullen 2005; Watashi *et al.* 2005) et du VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) (Bose *et al.* 2003). Chez les insectes, les connaissances sont bien

moins développées. Dans leur récente étude, Yang *et al.* (2008) ont identifié la cyclophiline comme jouant un rôle majeur dans la spécificité de la transmission virale chez les pucerons. Les auteurs ont mis en évidence un groupe de quatre protéines (dont la cyclophiline) se liant spécifiquement au virus étudié (le CYDV-RPV) et qui pourrait jouer un rôle dans le transport du virus au sein de son hôte vecteur.

La cyclophiline est également connue pour être une cible majeure de la cyclosporine. Le complexe cyclophiline-cyclosporine ainsi formé se fixe à la calcineurine ce qui a pour conséquences de limiter l'effet de la calcineurine. Ce qui est intéressant, c'est que cette enzyme a justement été mise en évidence dans l'équipe lors d'une expérience réalisée en amont du travail de thèse ayant mis en œuvre une autre technique de différentiel d'expression menée sur les femelles *L. bouhardi* infectées par LbFV (technique ADDER (*Amplification of Double-stranded cDNA End Restriction fragments*), travail de J. Varaldi, non publié). La calcineurine avait alors retenue l'attention car il est avéré qu'elle joue un rôle majeur dans l'expression comportementale chez la drosophile, la souris ou le nématode par exemple (pour revue : Lee & Ahnn 2004). La mise en évidence d'une sur-expression de ces deux gènes (cyclophiline et calcineurine) chez les femelles *L. bouhardi* infectées par LbFV constitue une voie intéressante pour explorer les mécanismes de la manipulation comportementale de LbFV. On peut imaginer que l'infection virale modifie le taux de calcineurine au travers de son action de manipulation du comportement de ponte. En réponse, l'expression de la cyclophiline chez l'hôte pourrait être favorisée afin de limiter la manipulation comportementale, même si les résultats de J. Varaldi méritent d'être approfondis et s'il est encore trop tôt pour présenter un scénario abouti prenant en compte l'ensemble de ces résultats.

Par ailleurs, les séquences présentes dans les banques soustraites *forward* permettent d'aborder un autre type de question : celle des mécanismes de défense de l'hôte face à l'infection de LbFV (réponse immunitaire). Dans ce contexte, la sur-expression du gène de la TCTP (*Translationally Controlled Tumor Protein*) chez les individus infectés constitue une voie intéressante à explorer. Surtout que cette protéine a également été obtenue lors du travail de J. Varaldi (technique ADDER) sur les femelles *L. bouhardi* infectées par LbFV.

La relation entre cette protéine et les infections virales est étudiée chez les crevettes (*Penaeus japonicus*, *Penaeus monodon*) infectées par le virus WSSV (*White Spot Syndrome Virus*) causant la mort de nombres de ses hôtes (Flegel 1997; Lightner & Redman 1998). Afin d'étudier les mécanismes de défense des crevettes face aux infections par le virus WSSV, il a

été analysé l'expression différentielle des gènes chez les individus sensibles ou résistants à l'infection virale. La sur-expression du gène de la TCTP ressort dans trois études indépendantes ayant mise en œuvre des approches EST (Bangrak *et al.* 2004 (SSH) ; Rojtinakorn *et al.* 2002 (approche EST) ; He *et al.* 2005 (SSH)). La TCTP semble jouer un rôle important dans la protection de l'hôte face aux infections virales puisqu'elle apparaît être abondamment exprimée chez les individus infectés comparé aux crevettes non infectées et ce durant la phase de l'infection, la proportion de TCTP diminuant par la suite chez les individus mourants (Graidist *et al.* 2006; Tonganunt *et al.* 2008). Il est supposé que cette protéine inhibe la réplication virale en jouant un rôle dans la transduction du signal durant l'infection virale (Tonganunt *et al.* 2008; Chen *et al.* 2009).

On peut faire l'hypothèse que les femelles *L. boulandi* infectées par LbFV expriment cette protéine TCTP dans un cadre de défense face à l'infection virale. Afin de tester ce postulat, il serait intéressant de savoir si certains parasitoïdes montrent des signes de résistance au virus et de mesurer l'expression de la TCTP chez ces individus.

L'étude des interactions fonctionnelles virus-parasitoïde n'a pas été menée en profondeur. Seules les séquences sur-exprimées chez les parasitoïdes infectés par LbFV ont été abordées. Il reste à analyser la modalité *reverse* qui rassemble les séquences sur-exprimées chez les parasitoïdes NI. Tout cet aspect demande à lui seul une analyse bioinformatique poussée complétée de confirmations moléculaires par rtPCRq et d'une large étude bibliographique. Le choix a été fait de ne pas développer plus en détails les aspects fonctionnels des interactions *L. boulandi* / LbFV suite à la découverte d'une séquence virale qui a permis d'entreprendre des études sur l'épidémiologie du virus et sur ses conséquences sur le fonctionnement de la communauté hôtes-parasitoïdes.

III. Outil moléculaire diagnostic de l'infection (*Manuscrit 1*)

III.1. Mise au point d'un outil moléculaire de détection de l'infection virale

En analysant la banque soustraite obtenue par Evrogen, nous avons noté que dix des séquences obtenues ne trouvaient aucune similarité dans les banques alors que leur expression apparaissait spécifique des lignées $S_{réf}$, comme c'est par exemple le cas pour les clones

entourés de rouge dans la figure II.4. (p.36). Nous avons dessiné des amorces à partir de ces dix séquences et testé par PCR différents extraits d'ADNc de parasitoïdes femelles issues de lignées $S_{réf}$ et $NS_{réf}$. Sur les dix couples d'amorces testés, sept ont révélé une amplification identique pour les deux types d'échantillons d'ADNc ($S_{réf}$ et $NS_{réf}$) ; il s'agissait donc de séquences « faux positifs ». En revanche, les trois autres couples d'amorces ont montré une amplification spécifique pour les échantillons d'ADNc d'individus de phénotype S (Figure II.5).

Nous avons alors réalisé une PCR avec les trois couples d'amorces précédents sur des échantillons d'ADN génomique. Trois résultats possibles pouvaient alors être envisagés : (1) sous l'hypothèse d'un gène de l'insecte spécifiquement exprimé en présence du virus, on s'attendait à observer une amplification dans les échantillons d'ADN $S_{réf}$ et $NS_{réf}$; (2) sous l'hypothèse d'un virus à ADN (ou d'un virus ARN présentant une phase ADN durant son cycle de réplication), on s'attendait à observer une amplification seulement pour les échantillons d'ADN $S_{réf}$; (3) sous l'hypothèse d'un virus à ARN, on s'attendait à n'observer aucune amplification dans les deux statuts d'infection.

Pour l'un des trois couples d'amorces (couple d'amorces 3), nous avons observé une amplification spécifique à partir des échantillons $S_{réf}$ et non des $NS_{réf}$ (Figure II.5). Cette amplification d'ADN, qui se produit uniquement chez les femelles parasitoïdes présentant le comportement de superparasitisme, suggérait que la séquence détectée était d'origine virale. Pour les deux autres couples d'amorces (couples d'amorces 1 et 2), aucune amplification n'a été détectée ni dans les échantillons $S_{réf}$, ni dans les échantillons $NS_{réf}$ d'ADN génomique (Figure II.5). Bien que l'étude de ces amorces n'ait pas été plus développée, on peut supposer que les conditions PCR n'étaient pas au point et que la quantité d'ADN amplifiée fut trop faible pour permettre de visualiser un signal. On ne peut pas non plus rejeter, au vu des hypothèses précédentes, le postulat de l'existence d'un second virus à ARN infectant spécifiquement les individus superparasitants.

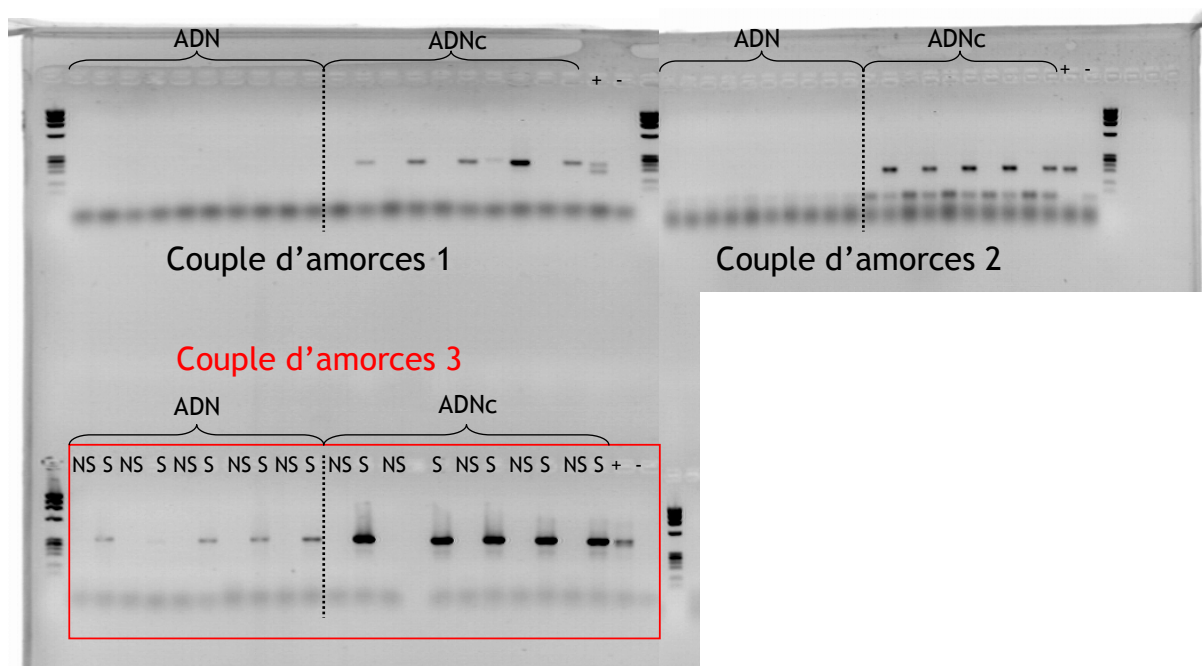


Figure II.5 : Test de trois couples d'amorces PCR sur des échantillons d'ADNc et d'ADN génomique de femelles *L. bouhardi* superparasitantes (S) et non superparasitantes (NS).

ADN : ADN génomique ; ADNc : ADN complémentaire.

Couple d'amorce 1 : séquence du clone I1-28 ; couple d'amorce 2 : séquence du clone I1-82 ; couple d'amorce 3 : séquence du clone I1-CL1.

S : superparasitant ; NS : non superparasitant.

En résumé, une seule des séquences testées s'est révélée être totalement spécifique des ADN génomique et ADNc des lignées $S_{\text{réf}}$. Ces expériences nous indiquent qu'à au moins un moment de son cycle de répllication, l'acide nucléique viral se trouve être sous forme ADN.

Après une phase de mise au point, nous avons, sur la base de cette séquence, défini un test diagnostique PCR de l'infection par LbFV à l'échelle individuelle (PCR multiplex). L'étape suivante a consisté à démontrer la fiabilité de cet outil dans le diagnostic de l'infection par LbFV. La corrélation entre amplification par PCR et comportement de superparasitisme a été testée par deux types d'expériences.

(1) L'association amplification PCR/superparasitisme a été testée en réalisant des tests PCR sur des lignées de *L. bouhardi* de différents génotypes dont le phénotype S ou NS était connu. En parallèle de quelques uns de ces tests moléculaires ont été menés des tests comportementaux. Les individus testés étaient issus des lignées de référence de laboratoire ($S_{\text{réf}}$ et $NS_{\text{réf}}$) ainsi que de souches issues de populations naturelles. L'association s'est révélée parfaite : aucune amplification par PCR pour les échantillons des souches de phénotype NS contrairement aux échantillons des souches de phénotype S où une amplification par PCR est

visible (n=93). Cependant, au sein de la lignée infectée $S_{réf}$, une minorité de femelles (7/36 femelles testées) n'expriment pas le comportement de superparasitisme bien qu'elles aient été diagnostiquées comme étant infectées par test moléculaire, traduisant une pénétrance incomplète du virus. Le virus ne manipule donc pas toujours le comportement de son hôte, ce qui peut être la conséquence d'une trop faible densité en particules virales. Ce résultat renforce l'intérêt de la mise au point de l'outil PCR pour une détection plus fiable de l'infection.

(2) L'association amplification PCR/superparasitisme a aussi été testée par le biais de la transmission horizontale des particules virales d'un hôte de phénotype S à un hôte de phénotype NS lors d'un événement de superparasitisme. Le principe consistait à transformer une lignée de phénotype NS en une lignée de phénotype S et à montrer qu'avant transfert horizontal du virus, les guêpes présentaient le phénotype NS mais aucune amplification PCR alors qu'après transfert, les lignées devenaient de phénotype S et présentaient un signal par PCR. La corrélation amplification PCR/superparasitisme s'est révélée parfaite (n=56). La réussite des expériences de transferts horizontaux ($\mathcal{T}_h \approx 70\%$) et le maintien pendant de nombreuses générations de l'infection dans les lignées nouvellement infectées confirment une transmission horizontale et verticale très efficace.

III.2. Présence du virus au sein des populations naturelles

Grâce à la mise au point de ce test moléculaire, la présence de LbFV et sa prévalence au sein de l'espèce *L. bouhardi* mais aussi chez d'autres espèces de la communauté de parasitoïdes de drosophiles ont alors été étudiées.

L'infection apparaît être spatialement répandue dans les populations naturelles de *L. bouhardi* puisqu'elle a été détectée en Europe (France, Italie, Espagne, Portugal), en Afrique (Côte d'Ivoire) et en Amérique du Sud (Brésil et île de La Martinique). En revanche, l'infection n'a été détectée ni chez l'hôte *D. melanogaster* ni chez le parasitoïde compétiteur *L. heterotoma*. De par les modifications phénotypiques sur son hôte, le virus pourrait jouer un rôle important dans l'écologie et l'évolution de son hôte. Il convient alors de se poser la question de la prévalence virale sur un plus grand nombre de populations naturelles de *L. bouhardi* et à une plus large échelle géographique.

La mise en évidence d'un outil moléculaire pour la détection de l'infection à l'échelle individuelle constitue une réelle avancée pour le sujet puisqu'il permet un diagnostic de l'infection par la technique de PCR plus rapide et plus fiable que le test comportemental. Il permet également d'envisager le développement de tout un programme d'épidémiologie moléculaire.

Manuscript published in *Applied Environmental Microbiology*

**Molecular detection, penetrance and transmission of an inherited virus responsible for a
behavioral manipulation of an insect parasitoid**

Sabine Patot,^{*} David Lepetit, Delphine Charif, Julien Varaldi and Frédéric Fleury

Université de Lyon; F-69000, Lyon; Université Lyon 1; CNRS, UMR5558, Laboratoire de
Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France.

Molecular Detection, Penetrance, and Transmission of an Inherited Virus Responsible for Behavioral Manipulation of an Insect Parasitoid[†]

Sabine Patot,* David Lepetit, Delphine Charif, Julien Varaldi, and Frédéric Fleury

Université de Lyon, F-69000 Lyon, Université Lyon 1, CNRS UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622 Villeurbanne, France

Received 1 August 2008/Accepted 26 November 2008

For insects, the prevalence of numerous vertically transmitted viruses can be high in their host populations. These viruses often have few, if any, pathological effects on their hosts, and consequently, many of them can remain unnoticed for long periods, despite their potential role in the evolution of the host phenotype. Some females of *Leptopilina boulardi*, a solitary parasitoid of *Drosophila* larvae, are infected by an inherited virus (LbFV) that manipulates the behavior of the wasp by increasing its tendency to lay eggs in a host that is already parasitized (superparasitism). This behavioral alteration allows horizontal transmission of the virus within superparasitized *Drosophila* larvae. Using suppressive subtractive hybridization with infected and uninfected lines, we identified one putative viral sequence. Based on this sequence, we developed a simple PCR test. We tested the correlation between the superparasitism phenotype and PCR amplification of the putative viral marker using several experimental conditions (including horizontal transfers) and several parasitoid genotypes. All of the results revealed that there was a perfect match between the superparasitism phenotype and the amplification profile, which validated use of the molecular marker as a tool to track the presence of the virus and provided the first genomic data for this fascinating virus. The results also show that there was very efficient horizontal and vertical transmission of LbFV, which probably explains its high prevalence in the French populations that we sampled (67 and 70% of infected females). This manipulative virus is likely to play a major role in the ecology and evolution of its parasitoid host.

Viruses are obligate intracellular parasites that inevitably disturb the normal functioning of the cellular machinery of their hosts. Although most of the viruses commonly studied cause severe damage to their hosts, potentially killing them, some of these viruses have few, if any, detectable effects on the host phenotype or have effects only under very specific environmental conditions. Some examples are the Sigma virus which infects *Drosophila melanogaster* and is responsible for mortality only under anoxic conditions (7, 16), a picorna-like virus in the fire ant *Solenopsis invicta* (32), deformed wing virus in honey bee colonies (10), and the salivary gland hypertrophy virus found in *Glossina pallidipes* (1). These viruses are usually involved in long-standing associations with their hosts through parent-to-offspring transmission (vertical transmission), and their prevalence in host populations may be high (8, 9, 31, 32). As a consequence of their low impact on host fitness, these viruses can remain unnoticed for long periods, despite the fact that they may be a crucial element of the host's phenotype determinism and affect the dynamics and evolution of host populations and communities.

During the last few decades, genomic or transcriptomic approaches have revealed (often fortuitously) new associations and have been shown to be powerful tools for discovering

asymptomatic viruses or viral particles that have unexpected effects on the host phenotype. Differential display screening for RNAs and sequencing expression libraries have allowed the identification of persistent viruses in several insect species, such as the recently described noravirus of *Drosophila* characterized as an iflavirus belonging to the picorna-like virus family, which have no pathological effects on their hosts (20). Iflaviruses were also fortuitously detected by cDNA-amplified fragment length polymorphism analysis in the parasitoid wasp *Venturia canescens* (25). Endoparasitoid wasps constitute one of the most diverse groups of insects, and there are tens of thousands of species of these wasps which develop inside the bodies of other insects and have established frequent and sometimes obligatory associations with viruses or virus-like entities (15). The best-known example of parasitoid-associated viruses is the polydnaviruses, which are injected by female wasps into the host larvae together with their eggs. Polydnaviruses neutralize host immune defenses, allowing successful development of the larvae of parasitoids until they emerge as free-living adults (15, 29). Uncharacterized viruses known as virus-like particles or viruses belonging to other families, such as the *Reoviridae* or *Ascoviridae*, play a similar role in other parasitoid species (14, 28).

The *Drosophila* parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Figitidae) is a solitary species; that is, only one parasite larva per host can complete development to the adult stage. Accordingly, females generally lay a single egg in a *Drosophila* larva. However, observations of naturally caught individuals revealed that a number of females superparasitized larvae; that is, they deposited their eggs in hosts that were

* Corresponding author. Mailing address: Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 boulevard du 11 novembre 1918, Villeurbanne F-69622, France. Phone: (33) 4 72 43 29 08. Fax: (33) 4 72 43 13 88. E-mail: patot@biomserv.univ-lyon1.fr.

[†] Published ahead of print on 5 December 2008.

already parasitized despite the fact that secondary parasites most often loose the within-host competition that occurs. Analyses of this unusual behavior revealed that superparasitism is induced by viral particles designated LbFV (*L. bouhardi* filamentous virus) observed in the ovaries of *L. bouhardi* females, where virus replication takes place in the nuclei of cells surrounding the oviduct lumen (34, 37). The virus is vertically transmitted through the maternal lineage and can be horizontally transferred when both uninfected and infected larvae are present in the same *Drosophila* host (34, 35). Besides induction of superparasitism, infected females do not have major fitness costs (33, 36). Theoretical models indicate that induction of superparasitism can be adaptive for the virus (18). Therefore, this phenomenon is best interpreted as host behavioral manipulation. To date, LbFV has not been molecularly characterized because it is difficult to purify viral particles, which probably are present in insects at a low density. The only method used to diagnose infection is based on the clear-cut behavioral modification that is expressed by infected females in an experimental procedure in which only a few hosts are available for parasitization. Using infected strains with the superparasitizing phenotype (S phenotype) and uninfected strains with the non-superparasitizing phenotype (NS phenotype) having the same nuclear background, we performed a gene expression analysis using suppressive subtractive hybridization (SSH) and mirror orientation selection techniques in order to obtain viral sequences. From the library obtained, we selected one viral sequence with which we developed a simple PCR-based test for infection. We performed horizontal transmission experiments to test the reliability of the molecular marker for detecting the virus. Finally, we used the PCR-based tool to detect and measure the prevalence of LbFV in natural populations of *L. bouhardi*, in the related species *Leptopilina heterotoma*, and in their common host *D. melanogaster*.

MATERIALS AND METHODS

Insect strains and rearing procedures. Two reference lines of *L. bouhardi*, designated NS_{ref} and S_{ref}, that had the same nuclear genetic background and differed only in their infection status were used for most experimental procedures. NS_{ref} is an inbred uninfected line (obtained by brother-sister mating that resulted in an estimated homozygosity greater than 82%) that originated from Siena, Italy. Females of this line lay only one egg per host according to the results of a standard experimental procedure (34), and this phenotype is referred to in this paper as the NS phenotype. The S_{ref} line, infected by LbFV, was derived from the NS_{ref} line and was obtained after artificial injection of viral particles (37). This newly infected line proved to be stable for generations for both virus infection and superparasitism behavior, and the mean number of eggs per host ranged roughly from two to four.

We also used wild-caught *L. bouhardi* strains that had the S or NS phenotype. Seventeen lines from Gotheron (near Valence, France) known for coexistence of the S and NS phenotypes and two lines from Epinouze (near Lyon, France) (S phenotype) were collected in 2007. We also used one Portuguese line from the island of Madeira (NS phenotype, collected in 2001), a Brazilian line from Rio de Janeiro (S phenotype, collected in 2007), and two Spanish lines from Palma de Mallorca (one S phenotype line and one NS phenotype line, collected in 2006).

In the laboratory, parasitoids were reared with a photoperiod consisting of 12 h of light and 12 h of darkness at 25°C, using as the host a strain of *D. melanogaster* that originated from Sainte-Foy-lès-Lyon (Rhône, France) and was fed on a standard diet (11).

Subtractive hybridization. Total RNA was prepared from *L. bouhardi* S_{ref} and NS_{ref} ovaries, since viral replication was observed in this tissue. Ovaries were immersed in a dispersion buffer (buffer D; Evrogen, Russia) and stored at -20°C until RNA was extracted (446 pairs of ovaries for the S_{ref} line and 407 pairs of

TABLE 1. Primers used in this study

Primer	Sequence	Length of amplicon (bp)
I1CL1-F	5'-GCAGCGGCTTATTAT TTGC-3'	345
I1CL1-R	5'-TGAAGAAATCGCTTT GCAG-3'	
102-F	5'-TGTGGCGTTTATCTTC TTTAGG-3'	399
500-R	5'-TGATGATGATGCTGCT GAAA-3'	
RPS2-F	5'-TGCTATTGGAGACAGC AACG-3'	162
RPS2-R	5'-AAACGCACCTGAACTG AACC-3'	
I1CL1-inv1-F	5'-AAACGCCACATTCGTG TTTA-3'	
I1CL1-inv1-R	5'-TTTTATTGAATAGTTA GTTGGCTTTGA-3'	
I1CL1-F2	5'-ATGCAAAACGCATTA ATTT-3'	929
I1CL1-R2	5'-AAAACTAATTTTAGC ATCACAAA-3'	
ITS2-F	5'-TGTGAAGTGCAGGACA CATG-3'	596 (<i>L. heterotoma</i>), 385 (<i>D. melanogaster</i>)
ITS2-R	5'-AATGCTTAAATTAGG GGGTA-3'	

ovaries for the NS_{ref} line). The total RNA of each line was extracted by using the procedure suggested by Evrogen (<http://www.evrogen.com/technologies/RNA-isolation.shtml>).

Aliquots of total RNA from both infected and uninfected ovaries were sent to Evrogen (Russia) for cDNA subtraction. SSH in only one direction (i.e., subtraction of NS phenotype from S phenotype [forward subtraction]) was performed as described previously (12, 13) in order to identify genes specifically expressed in the S_{ref} line. In order to reduce the number of false-positive clones in the SSH-generated library, the SSH technology was combined with a mirror orientation selection procedure (24). The subtracted cDNA samples enriched with differentially expressed sequences were used for library construction. cDNA was then cloned into the pAL16 vector (Evrogen, Russia) and used for *Escherichia coli* transformation. Four 96-well plates containing individual colonies were used for differential dot blot screening to further identify S phenotype-specific sequences. Finally, the whole subtraction procedure revealed 128 S phenotype-specific expressed clones that were sequenced by GATC Biotech (France). The sequence data were analyzed using the BLASTx algorithm with SpTrembl, the tBLASTx algorithm with NCBI Unigen for arthropods, and the NCBI nonredundant database.

DNA extraction and PCR-based detection of putative viral sequences. Because electron microscopy revealed viral particles replicating in the nuclei of the insect cells, we hypothesized that LbFV has a DNA genome. Thus, based on a putative viral sequence obtained from the subtracted library, we designed PCR primers that were used for amplification starting with simple DNA extracts. The results of our PCR assays were consistent with the hypothesis described above. DNA extraction was performed using individual females that were crushed in 150 µl of 5% (wt/vol) Chelex (Bio-Rad, United States) and 5 µl of proteinase K (20 mg/ml; Eurobio, France) and incubated overnight at 56°C. After 20 min of incubation at 95°C, samples were centrifuged, and 2-µl portions of the supernatants were used for PCRs. Two sets of primers were designed. The first set of primers, primers I1CL1-F and I1CL1-R, amplified a 345-bp fragment (Table 1) and was used in a uniplex PCR performed with a 25-µl (final volume) mixture containing 2 µl of DNA template, 1.5 mM MgCl₂, each deoxynucleoside triphosphate (dNTP) at a concentration of 50 µM, each primer at a concentration of 200 nM, and 0.5 U of Taq polymerase (EuroBlueTaq; Eurobio, France). The second set of primers, primers 102-F and 500-R, was designed to perform a multiplex PCR that amplified the putative viral sequence and also an insect gene as a control for the quality of DNA extraction. The insect sequence was obtained from a previous subtracted library (not shown) and putatively encodes a ribosomal protein (RPS2; E value for ribosomal protein S2 from *D. melanogaster*, 5 × 10⁻⁷⁶). Primer sets 102-F/500-R and RPS2-F/RPS2-R amplified 399- and 162-bp frag-

ments, respectively (Table 1). Multiplex PCRs were performed with a 25- μ l (final volume) reaction mixture containing 2 μ l of DNA template, 1.5 mM MgCl₂, each dNTP at a concentration of 50 μ M, each of the four primers at a concentration of 200 nM, and 0.5 U of *Taq* polymerase (EuroBlueTaq; Eurobio, France). The following cycling program was used for both uniplex and multiplex PCRs: 1 min at 95°C, 30 s at 56°C, and 30 s at 72°C for 30 cycles, followed by 10 min of elongation at 72°C (PTC-100; MJ Research, United States). Five microliters of amplification products was separated by electrophoresis on a 2% agarose gel at 100 V and visualized by ethidium bromide staining. All primers were designed using the Primer3 software (27; <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>) and were synthesized by Eurogentec (France).

Correlation between the viral marker and the S phenotype. Because the candidate sequence showed no homology with any known viral sequence in public databases, we examined whether the marker was a viral marker by performing a set of experiments to determine the association between the S phenotype and PCR amplification in naturally and artificially infected S phenotype individuals after horizontal transfers. The S phenotype was estimated by using the protocol described by Varaldi et al. (34). Briefly, females (1 or 2 days old) were placed from 5 p.m. to 10 a.m. on 10 first-instar *D. melanogaster* larvae in a petri dish containing an agar layer and a thin spot of yeast. About 48 h later, four or five hosts obtained from each petri dish were dissected, and the number of immature parasites (eggs and larvae) was determined. The superparasitism behavior of each female was estimated by determining the mean number of parasites per parasitized *Drosophila* host.

(i) Correlation in S phenotype and NS phenotype *L. bouvardi* females. In the first analysis, the correlation between putative viral sequence amplification (multiplex PCR) and superparasitizing behavior was tested using *S_{ref}* and *NS_{ref}* stocks. We analyzed 148 females of the *S_{ref}* line for which positive PCR amplification was expected and 186 *NS_{ref}* females for which no amplification was expected. For a subset of females, superparasitism behavior was individually estimated before the PCR test (42 *NS_{ref}* females and 36 *S_{ref}* females).

In the second set of experiments, we used isofemale lines established using wild-collected insects from different localities (France, Portugal, Brazil, and Spain) to correlate molecular marker amplification and superparasitism behavior. Each isofemale line was established with only one founding female and was maintained by mass rearing for several generations. For each line, four to six females were analyzed for superparasitism using the standard procedure, and a separate set of females was tested with the molecular diagnostic tool using 23 isofemale lines.

Finally, we separately tested amplification of the putative viral marker from heads, thoraxes, and abdomens of *S_{ref}* and *NS_{ref}* females.

(ii) Horizontal transfer of the virus and correlation with the putative viral sequence. To further test the reliability of the putative viral marker, we horizontally transferred the behavior-modifying agent. Intraspecific horizontal transfer of LbFV was attempted by letting two *L. bouvardi* females lay eggs in a single *Drosophila* host; one of these females was a member of an NS phenotype uninfected line that was PCR negative for the viral marker and fertilized (recipient), and the other was a member of an S phenotype infected line that was PCR positive and a virgin (donor). Since *L. bouvardi* has a haplodiploid mode of reproduction, daughters arise only from fertilized eggs (diploids), whereas sons emerge from unfertilized eggs (haploids). Thus, because we used fertilized females for the NS phenotype recipient line and virgin females for the S phenotype donor line, we were assured that the emerging females (F1) were daughters of the NS phenotype recipient females. We expected that after transfer, recipient females that had the S phenotype would also be positive for PCR amplification of the putative viral sequence. Horizontal transfer experiments were performed with 13 different donor lines originating from Epinouze, Gotheron, and Palma de Mallorca populations. In all cases, we used the uninfected PCR-negative *NS_{ref}* line as the recipient. Experiments were performed by providing 50 *D. melanogaster* larvae (strain Sainte-Foy-lès-Lyon from France) to a fertilized *L. bouvardi* *NS_{ref}* female for 24 h (at 21°C, with a photoperiod consisting of 12 h of light and 12 h of darkness). The *NS_{ref}* female was then replaced by virgin S phenotype females and incubated for 24 h at 25°C (to ensure virginity, single parasitized host pupae were isolated before emergence of the parasitoids). Note that for the first 24 h the temperature used was lower to slow host development and thereby provide young larvae to S phenotype females. At the end of the experiment, all females were stored in alcohol (100% ethanol) at -80°C before DNA extraction. Emerging F1 females were fertilized by *NS_{ref}* males, transferred to unparasitized *Drosophila* hosts for 24 h, and screened for putative viral infection by PCR. The newly established lines for which PCR tests were positive were kept for rearing. Four to fifteen generations after the transfer, superparasitism behavior and PCR tests were performed with each newly infected line using four to nine individuals per line.

iPCR. To increase the size of the putative viral genomic sequence, we performed an inverse PCR (iPCR). Genomic DNA (0.75 μ g) from S and NS phenotype strains were restricted with 20 U of *Rsa*I, *Mbo*I, *Eco*RI, or *Xba*I (Promega, France) in 25- μ l (final volume) mixtures according to the manufacturer's instructions. Intramolecular ligation was performed with 10 μ l of digest and 2 U of T4 DNA ligase (Invitrogen, France) in a 400- μ l (final volume) mixture for 16 h at 4°C. Ligated DNA was precipitated and resuspended in 40 μ l of TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 0.1 mM EDTA, pH 8.7). PCR were performed using EuroBlue *Taq* polymerase (EuroBlueTaq; Eurobio, France) according to the manufacturer's instructions with primers I1CL1-inv1-F and I1CL1-inv1-R (Table 1) and 3 μ l of ligated and precipitated DNA. The PCR conditions were 3 min at 95°C, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 45 s at 55°C, and 4 min at 72°C and then 10 min of elongation at 72°C. The PCR fragment obtained for the S phenotype strains was directly sequenced with the I1CL1-inv1-L primer. Using this sequence, we designed two primers (I1CL1-F2 and I1CL1-R2) (Table 1) to obtain the total DNA fragment. The PCR product (929 bp) was sequenced on positive and negative senses with the I1CL1-F2 and I1CL1-R2 primers.

Detection and prevalence in host-parasitoid communities. Using the viral primers 102-F and 500-R, we detected the virus and estimated its frequency in different parasitoid and host species for one location in the south of France (Annonay). In September 2007, 10 traps baited with split bananas were placed in an apple orchard. They were exposed for 15 days for natural colonization and brought back to the laboratory before insects emerged. After incubation, emerging *D. melanogaster*, the major *Drosophila* species during the sampling period, and two species of emerging parasitoids, *L. bouvardi* and *L. heterotoma*, the two main *Drosophila* larval parasitoid in the area, were collected and stored in alcohol (100% ethanol) at -80°C before DNA extraction. To control for the quality of DNA extraction, we used the multiplex reaction for *L. bouvardi* and PCR amplified the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region for *L. heterotoma* and *D. melanogaster*. A PCR for ITS2 was performed by using a 25- μ l (final volume) reaction mixture containing each dNTP at a concentration of 200 μ M, each ITS2 primer (ITS2-F and ITS2-R) at a concentration of 200 nM, 0.5 U EuroBlue *Taq* polymerase (EuroBlueTaq; Eurobio, France), and 2 μ l of DNA. The PCR conditions were 2 min at 95°C, followed by 35 cycles of 30 s at 95°C, 45 s at 55°C, and 1.5 min at 72°C and then 10 min of elongation at 72°C. The same set of primers was used to amplify the ITS2 regions of *L. heterotoma* and *D. melanogaster* (Table 1) (2). We also estimated the prevalence of LbFV in the *L. bouvardi* population of Avignon (France), sampled in September 2007, using the same sampling procedure.

We also determined the presence of LbFV in strains initiated by using individuals originating from Sicily (Italy, sampled in 2000), La Martinique (the West Indies, sampled in 1999), and Lamto (Ivory Coast, sampled in 1996). For these locations, the numbers of initial samples were very low (less than three founding females) and the strains were mass reared, which precluded obtaining estimated prevalences for the populations.

RESULTS

Putative viral marker identification. The whole subtraction procedure revealed 128 S phenotype-specific clones. The sequences clustered in 12 multisequence contigs and 38 singlets, yielding an estimated 50 unique sequences. The analysis revealed that 24 sequences displayed significant matches with entries in the databases and corresponded to insect sequences. The other 26 sequences had no significant matches with viral sequences in the databases, and we decided to focus our investigations on the contig containing the highest number of individual sequences ($n = 13$). This 809-bp contig was used to design two sets of primers (see Materials and Methods) (Table 1). The reliability of these primers for amplifying a viral sequence was then tested by analyzing the association between the S phenotype and PCR amplification in different sets of experiments.

Correlation between S phenotype behavior and PCR amplification. (i) Correlation using S and NS phenotype *L. bouvardi* females. A total of 186 *L. bouvardi* females of the *NS_{ref}* line and 148 females of the *S_{ref}* line were tested by performing PCR with the putative viral marker. We observed no amplification

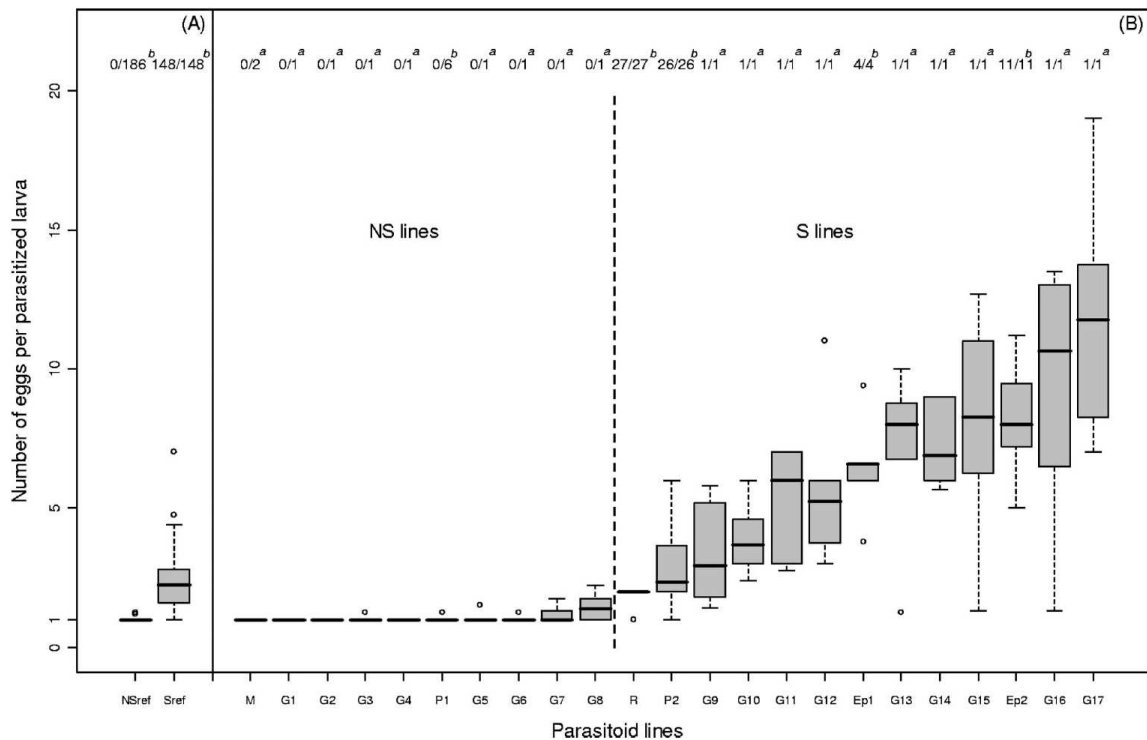


FIG. 1. Correlation between the egg-laying behavior and the molecular test of viral infection for the S_{ref} and NS_{ref} lines (A) and for S and NS phenotype isofemale lines originating from various populations of *L. boucardi* (B). The boxes indicate the mean number of parasitoid eggs per parasitized host calculated for each female, and the fraction above each box indicates the number of PCR-positive females/number of females tested. M, Madeira line; P1 and P2, Palma de Mallorca lines; R, Rio de Janeiro line; G1 to G17, Gotheron lines. a, uniplex PCRs; b, multiplex PCRs.

for females belonging to the NS_{ref} line, and we amplified the putative viral sequence for all females belonging to the S_{ref} line (Fig. 1A); thus, there was a perfect correlation between PCR amplification and superparasitism behavior. Heads, thoraxes, and abdomens were all PCR positive for the S_{ref} line and negative for the NS_{ref} line (not shown).

We also tested the putative marker of LbFV for various *L. boucardi* genotypes using isofemale laboratory strains founded by NS phenotype females from Gotheron ($n = 8$), Madeira ($n = 1$), and Palma de Mallorca ($n = 1$) and by S phenotype females from Gotheron ($n = 9$), Epinouze ($n = 2$), Rio de Janeiro ($n = 1$), and Palma de Mallorca ($n = 1$) (Fig. 1B). We detected no PCR amplification for females belonging to the NS phenotype lines of the different populations (0/16 PCRs). On the other hand, the molecular tests for all tested individuals belonging to the different S phenotype lines were positive (77/77 PCRs); thus, there was a perfect correlation between putative viral amplification and superparasitism behavior.

(ii) **Correlation using horizontal transfer experiments.** As previously reported (34, 35), intraspecific horizontal transfer of LbFV occurs between *L. boucardi* individuals sharing the same superparasitized host. We tried to infect the NS_{ref} line with several virus isolates originating from 13 different S phenotype

donor lines in superparasitism experiments. As expected, all NS_{ref} females used in the experiment initially were PCR negative for the putative viral marker. Furthermore, the NS_{ref} line clearly had the typical NS phenotype (Table 2 and Fig. 1A). However, after sharing hosts with the S phenotype lines, some of the offspring were PCR positive for the putative viral marker, indicating that there was horizontal transmission of the putative viral sequence. Horizontal transfer was successful for 9 of the 13 donor lines. The PCR-positive females were used to found lines, and their offspring also were PCR positive and showed clear signs of LbFV infection since superparasitism was abundant (Table 2). To summarize, we successfully transformed nine independent NS phenotype lines into nine S phenotype lines through horizontal transfer of LbFV; these lines were PCR negative before the transfer and positive after the transfer. This established that there was a perfect correlation between superparasitism behavior and the molecular tool in the horizontal transfer experiments.

Incomplete penetrance of the virus-induced phenotype. Thirty-six S_{ref} females and 42 NS_{ref} females were individually tested to determine their superparasitism behavior before molecular diagnosis of infection. All of the NS_{ref} females had an NS phenotype, and the PCR tests for these females were negative. However, although the PCR tests were positive for all of

TABLE 2. Horizontal cotransmission of the S phenotype and the putative viral marker^a

Donor			One generation after transfer (emerging F1)			Later after transfer		
Line ^b	Phenotype (n) ^c	No. of positive PCR tests/no. of individuals tested	No. of females tested	PCR results	n	No. of generations	Phenotype ^c	No. of positive PCR tests/no. of individuals tested
G9	3.3 ± 0.75 (6)	3/3 ^d	3	+ —	1 2	15	3.60 ± 0.33	4/4 ^e
G10	3.9 ± 0.52 (6)	3/3 ^d	11	+ —	6 5	15	3.35 ± 0.22	5/5 ^e
G11	5.3 ± 0.81 (6)	3/3 ^d	3	+ —	0 3			
G12	5.7 ± 1.17 (6)	3/3 ^d	2	+ —	2 0	15	3.31 ± 0.30	5/5 ^e
G13	7.1 ± 1.25 (6)	3/3 ^d	5	+ —	0 5			
G14	7.2 ± 0.61 (6)	3/3 ^d	14	+ —	0 14			
G15	8 ± 1.62 (6)	3/3 ^d	4	+ —	2 2	15	2.68 ± 0.34	5/5 ^e
G16	9.3 ± 1.93 (6)	3/3 ^d	6	+ —	3 3	15	3.55 ± 0.12	5/5 ^e
G17	11.9 ± 1.80 (6)	3/3 ^d	6	+ —	3 3	15	3.57 ± 0.07	5/5 ^e
G18	5.88 ± 1.51 (5)	18/18 ^e	21	+ —	3 18	4	2.51 ± 0.11	9/9 ^e
Ep1	6.48 ± 0.89 (5)	4/4 ^e	5	+ —	1 4	4	2.19 ± 0.07	9/9 ^e
Ep2	8.18 ± 1.05 (5)	11/11 ^e	10	+ —	0 10			
P2	2.89 ± 0.72 (6)	18/18 ^e	18	+ —	7 11	4	2.29 ± 0.10	9/9 ^e

^a The recipient lines were founded by females belonging to the NS_{ref} line. In each case before transfer the recipient had the NS phenotype (1.1 ± 0.01 parasitic larvae per parasitized host), and a PCR was negative.

^b The donor lines were S phenotype lines from different geographical areas. G9 to G18, Gotheron lines; Ep1 and Ep2, Epinouze lines; P2, Palma de Mallorca line.

^c The phenotype is expressed as the number of parasitic larvae per parasitized host (mean ± standard error).

^d Uniplex PCR.

^e Multiplex PCR.

the S_{ref} females, only 29/36 had the typical S phenotype behavior, which indicates that the virus does not always induce behavioral alteration (Fig. 2).

Molecular structure of the viral gene. Analysis of the mRNA revealed the position of a potential open reading frame, encoding 206 amino acids (Fig. 3), that did not exhibit significant matches with entries in the databases. iPCR was successful only with the RsaI enzyme, and the results allowed us to extend the DNA viral sequence for 230 bp to obtain a total length of 1,039 bp (GenBank accession number FM876312). We found a short 77-bp intron sequence at position 887 of the viral DNA sequence (Fig. 3). However, an analysis of this sequence did not result in further information for molecular characteriza-

tion of LbFV because this sequence did not display significant hits with entries in public databases.

Prevalence in a host-parasitoid community. The prevalence of LbFV was estimated for one location in southeastern France (Annonay) using the newly developed molecular marker for *L. boucardi*, its relative *L. heterotoma*, and their common host *D. melanogaster*. None of the tests with the 34 *L. heterotoma* individuals tested and the 35 *D. melanogaster* individuals tested were positive. In contrast, 20 of 30 (67%) *L. boucardi* individuals tested were positive for the virus. We estimated the frequency of LbFV only for *L. boucardi* at Avignon, where 16 of 23 (70%) individuals were positive for the virus.

We also detected viral infection in Sicily (1/1), La Martin-

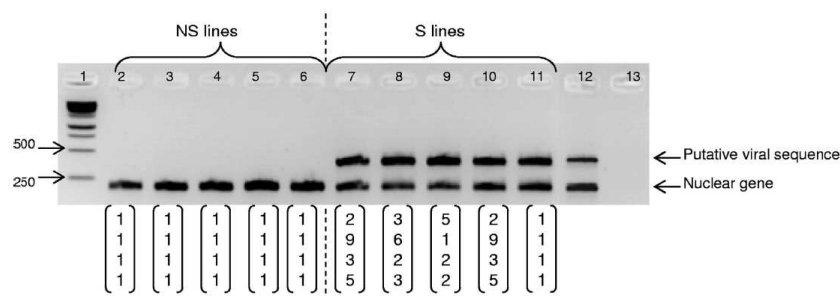


FIG. 2. Multiplex PCR amplification for 10 individuals belonging to the NS_{ref} and S_{ref} lines. Data for superparasitism behavior are indicated below the gel and show the number of *L. boucardi* larvae counted in each of the four dissected hosts. Lane 1, 1-kb DNA ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) used as a molecular weight marker; lanes 2 to 6, NS_{ref} line individuals; lanes 7 to 11, S_{ref} line individuals; lanes 12 and 13, positive and negative controls.

ique (4/4), and Lamto (3/3), indicating that LbFV has a broad geographic distribution.

DISCUSSION

A subtracted cDNA library was constructed to compare mRNAs of two lines of *L. boucardi* (S and NS phenotype lines) having the same nuclear genotype but having contrasting superparasitism behaviors due to the presence of a virus (LbFV) in the S phenotype line. In this subtracted library, we identified a sequence specific to the S phenotype line. This sequence had no homology with any sequence in public databases. Based on this sequence, we developed a simple PCR test for DNA templates. The results indicated that PCR amplification occurred with DNA extracts from S phenotype individuals but not with DNA extracts from NS phenotype individuals, ruling out the possibility that the difference was due to a differentially expressed insect gene. We also showed that this molecular tool reliably tracked the presence of the virus inducing superparasitism and consequently that the sequence is the first published sequence of LbFV. This result indicates that LbFV has at least an intermediate DNA stage during replication, and probably a

DNA genome, as previously hypothesized based on its apparent replication in the nuclei of insect cells (37).

Reliability. We tested the reliability of the PCR diagnosis in two ways. First, we tested both the S phenotype and the PCR amplification profile of numerous parasitoid lines originating from different locations. All assays indicated that the lines having the NS phenotype were PCR negative, whereas the S phenotype lines were PCR positive. Furthermore, we demonstrated that the DNA sequence examined is part of an infectious element since the sequence was horizontally transferred from an S phenotype line to an NS phenotype line. Indeed, initially NS phenotype PCR-negative lines were transformed into S phenotype PCR-positive lines after development under superparasitism conditions in competition with S phenotype PCR-positive lines. The horizontal cotransmission of the S phenotype and the DNA sequence observed in nine independent experiments supported the conclusion that this sequence is part of the virus genome.

Penetrance. We also found that although in LbFV-infected lines most females had the typical S phenotype, some females did not (7/36 females in our assay). This indicates that the

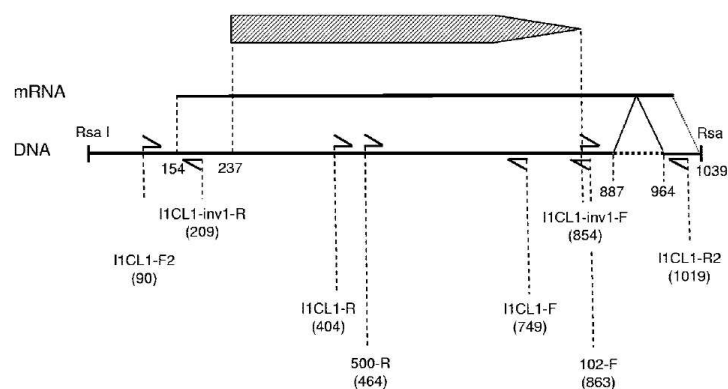


FIG. 3. Schematic diagram of the viral sequence and putative open reading frame. The arrow indicates the position and direction of the potential open reading frame. The upper line shows the mRNA sequence, and the lower line indicates the DNA sequence. The dotted line indicates the position of the intron. The positions of the primers are indicated on the DNA sequence, and their designations are indicated below the sequence. The numbers in parentheses are the positions of the primers.

penetration of the virus extended phenotype was incomplete. One potential explanation for this is that the density of the virus must exceed a certain threshold to manipulate wasp behavior, as suggested previously for other host-symbiont interactions (4, 5). According to this hypothesis, the nonmanipulated infected wasps would have lower viral densities. This emphasizes the importance of using molecular detection of LbFV instead of a phenotypic test to estimate viral prevalence. Notably, this observation is consistent with the results of previous experiments in which behavioral manipulation was shown to be transiently silent over generations in an infected line (35).

Epidemiology. LbFV seems to be very widespread because we detected it in populations from different continents, including Europe (France, Italy, Spain, and Portugal), Africa (Ivory Coast), and South America (Brazil and La Martinique). Furthermore, in the populations sampled in France, we found very high prevalence of the virus. The key factors affecting the epidemiology of a symbiont with a mixed mode of transmission (vertical and horizontal) are the rates of vertical and horizontal transmission, the direct effects on host fitness, and the benefits from any potential manipulation. Our results show that vertical transmission is very efficient since each of the nine newly infected lines that were constructed stably transmitted the virus until the assay was performed (4 or 15 generations depending on the line), confirming data obtained previously (37). Moreover, all 148 S_{ref} line females tested were PCR positive. However, vertical transmission is known to be incomplete since one infected line and one uninfected line were obtained previously from the progeny of a single wild-caught female (35). From a theoretical point of view, any costly symbiont with imperfect vertical transmission cannot be maintained in a host population unless it compensates by manipulation of host reproduction (e.g., reproductive parasites, such as *Wolbachia* bacteria [23]) or by horizontal transmission (3). Our results show that the prevalence of LbFV remains high in natural populations (67% at Annonay and 70% at Avignon) despite the slight fitness cost (33), which can be accounted for by the efficiency of horizontal transmission and of the manipulative process. For both of these locations, the estimates of LbFV prevalence obtained using the molecular marker are consistent with previous estimates based on phenotypic tests done in the same location but 3 years earlier (at Annonay, 15 of 35 S phenotype isofemale lines tested [$P = 0.081$, Fisher's exact test]; at Avignon, 24 of 38 S phenotype isofemale lines tested [$P = 0.782$, Fisher's exact test] [S. Patot, unpublished]). A high prevalence of vertically transmitted virus infecting parasitoids has been reported previously for other species (19). Some of these viruses are considered mutualists since they provide immune protection to the parasitoid egg inside the host (26, 30). However, for other viruses, no evidence of immune protection has been found (30), and the mechanisms that allow them to reach high prevalence are not understood. Occasional horizontal transfer, potentially associated with behavioral manipulation, provides a plausible and testable explanation. In the field, *L. boulardi* and the related species *L. heterotoma* attack the same hosts, mostly *D. melanogaster* at the location studied. The evidence for interspecific competition is strong, and it is likely that cases of multiparasitism (*Drosophila* larvae parasitized by both species) occur in the field (17), which would provide a

means for interspecific horizontal transfer. However, we did not find evidence of LbFV infection in *L. heterotoma* females, even though LbFV is common in the sampled populations of *L. boulardi* (67 and 70%). Although this requires further investigation, the results suggest that *L. heterotoma* may be somehow refractory to LbFV infection. Interestingly, in contrast to *L. boulardi*, *L. heterotoma* is infected by symbiotic *Wolbachia* bacteria (38), and interactions between symbionts may explain the observed pattern, as suggested by recent data for interactions between herpesvirus and pathogenic bacteria in humans (6) or between *Wolbachia* and RNA viruses in the fly *D. melanogaster* (21). Adults of the common host *D. melanogaster* also were not infected by LbFV. The presence of *Wolbachia* in *D. melanogaster* (22) may also be involved in this pattern or may simply be explained by the inability of LbFV to infect fly cells due to the phylogenetic distance between *L. boulardi* and *D. melanogaster*. Alternatively, LbFV may be able to infect *D. melanogaster* cells, but *Drosophila* may be unable to get rid of the developing parasitoid (that will kill it in most cases). In addition, the virus may impose a strong cost on LbFV-infected *D. melanogaster* (cleared of parasitoid infestation), preventing it from reaching the adult stage and transmitting the infection to offspring. Laboratory experiments controlling for exposure to the virus are necessary to further test these hypotheses.

Conclusion. Using a transcriptomic approach, we developed a marker and obtained the first molecular data on the behavior-manipulating virus infecting the parasitoid wasp *L. boulardi*. A simple PCR test to detect infection confirmed previous phenotypic data showing that the virus is common in natural populations and thus is an important factor in the host-parasitoid interaction. Furthermore, the molecular data obtained pave the way for future wide-scale epidemiological studies and provide an entry point for analysis of the viral DNA genome. Additional genomic information could provide a way to identify the closest relatives of this virus and investigate the proximal mechanisms mediating its fascinating manipulation effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Roland Allemand for his assistance with the field work and for helping with insect determination. We thank Sylvain Gandon and Nicolas Ris for providing some samples. We thank Jérôme Briolay for technical support. We also thank Sylvain Charlat for useful comments on the manuscript.

This work was financially supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS UMR 5558) and by the French Ministry Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Fond National de la Science, ACI Jeunes Chercheurs 2004, JC 10013 (Virus symbiotiques manipulateurs du comportement des insectes parasites).

REFERENCES

1. Abd-Alla, A. M., F. Cousseurans, A. G. Parker, J. A. Jehle, N. J. Parker, J. M. Vlask, A. S. Robinson, and M. Bergoin. 2008. Genome analysis of a *Glossina pallidipes* salivary gland hypertrophy virus reveals a novel, large, double-stranded circular DNA virus. *J. Virol.* 82:4595–4611.
2. Allemand, R., C. Lemaître, F. Frey, M. Boulétreau, F. Vavre, G. Nordlander, J. van Alphen, and Y. Carton. 2002. Phylogeny of six African *Leptopilina* species (Hymenoptera: Cynipoidea, Figitidae), parasitoids of *Drosophila*, with description of three new species. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 38:319–332.
3. Altizer, S. M., and D. J. Augustine. 1997. Interactions between frequency-dependent and vertical transmission in host-parasite systems. *Proc. Biol. Sci.* 264:807–814.
4. Anbutu, H., and T. Fukatsu. 2003. Population dynamics of male-killing and

- non-male-killing spiroplasmas in *Drosophila melanogaster*. Appl. Environ. Microbiol. **69**:1428–1434.
5. Anbutsu, H., and T. Fukatsu. 2006. Tissue-specific infection dynamics of male-killing and nonmale-killing spiroplasmas in *Drosophila melanogaster*. FEMS Microbiol. Ecol. **57**:40–46.
 6. Barton, E. S., D. W. White, J. S. Cathelny, K. A. Brett-McClellan, M. Engle, M. S. Diamond, V. L. Miller, and H. W. T. Virgin. 2007. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. Nature **447**:326–329.
 7. Brun, G. P. N. 1980. The viruses of *Drosophila*, p. 625–702. In M. W. Ashburner (ed.), The genetics and biology of *Drosophila*. Academic Press, New York, NY.
 8. Carpenter, J. A., D. J. Obbard, X. Maside, and F. M. Jiggins. 2007. The recent spread of a vertically transmitted virus through populations of *Drosophila melanogaster*. Mol. Ecol. **16**:3947–3954.
 9. Chen, Y. A., J. S. Pettis, A. Collins, and M. F. Feldlaufer. 2006. Prevalence and transmission of honeybee viruses. Appl. Environ. Microbiol. **72**:606–611.
 10. Chen, Y. P., J. A. Higgins, and M. F. Feldlaufer. 2005. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). Appl. Environ. Microbiol. **71**:436–441.
 11. David, J. 1962. A new medium for rearing *Drosophila* in axenic condition. *Drosophila* Info. Serv. **36**:128.
 12. Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, and P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **93**:6025–6030.
 13. Diatchenko, L., S. Lukyanov, Y. F. Lau, and P. D. Siebert. 1999. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. Methods Enzymol. **303**:349–380.
 14. Feddersen, I. K., Sander, and O. Schmidt. 1986. Virus-like particles with host protein-like antigenic determinants protect an insect parasitoid from encapsulation. Experientia **42**:1278–1281.
 15. Federici, B. A., and Y. Bigot. 2003. Origin and evolution of polydnviruses by symbiogenesis of insect DNA viruses in endoparasitic wasps. J. Insect Physiol. **49**:419–432.
 16. Fleuriot, A. 1976. Presence of hereditary rhabdovirus sigma and polymorphism for a gene for resistance to this virus in natural population in *Drosophila melanogaster*. Evolution **30**:735–739.
 17. Fleury, F., N. Ris, R. Allemand, P. Fouillet, Y. Carton, and M. Bouletreau. 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**:181–194.
 18. Gandon, S., A. Rivero, and J. Varaldi. 2006. Superparasitism evolution: adaptation or manipulation? Am. Nat. **167**:E1–E22.
 19. Graham, R. I., S. Rao, R. D. Possee, S. M. Sait, P. P. Mertens, and R. S. Hails. 2006. Detection and characterisation of three novel species of reovirus (Reoviridae), isolated from geographically separate populations of the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae) on Orkney. J. Invertebr. Pathol. **91**:79–87.
 20. Habayeb, M. S., S. K. Ekengren, and D. Hultmark. 2006. Nora virus, a persistent virus in *Drosophila*, defines a new picorna-like virus family. J. Gen. Virol. **87**:3045–3051.
 21. Hedges, L. M., J. C. Brownlie, S. L. O'Neill, and K. N. Johnson. 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. Science **322**:702.
 22. Mercot, H., and S. Charlat. 2004. *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. Genetica **120**:51–59.
 23. O'Neill, S. L., A. A. Hoffmann, and J. H. Werren. 1997. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press, New York, NY.
 24. Rebrikov, D. V., O. V. Britanova, N. G. Gurskaya, K. A. Lukyanov, V. S. Tarabykin, and S. A. Lukyanov. 2000. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. Nucleic Acids Res. **28**:E90.
 25. Reineke, A., and S. Asgari. 2005. Presence of a novel small RNA-containing virus in a laboratory culture of the endoparasitic wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). J. Insect Physiol. **51**:127–135.
 26. Renault, S., S. Bigot, M. Lemesle, P. Y. Sizaret, and Y. Bigot. 2003. The cytovirus *Diadromus pulchellus* RV-2 is sporadically associated with the endoparasitoid wasp *D. pulchellus* and modulates the defence mechanisms of pupae of the parasitized leek-moth, *Acrolepiopsis assectella*. J. Gen. Virol. **84**:1799–1807.
 27. Rozen, S., and H. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Methods Mol. Biol. **132**:365–386.
 28. Schmidt, O., U. Theopold, and M. Strand. 2001. Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. Bioessays **23**:344–351.
 29. Shelby, K. S., and B. A. Webb. 1999. Polydnvirus-mediated suppression of insect immunity. J. Insect Physiol. **45**:507–514.
 30. Stasiak, K., S. Renault, B. A. Federici, and Y. Bigot. 2005. Characteristics of pathogenic and mutualistic relationships of ascoviruses in field populations of parasitoid wasps. J. Insect Physiol. **51**:103–115.
 31. Tentcheva, D., L. Gauthier, N. Zappulla, B. Dainat, F. Cousserans, M. E. Colin, and M. Bergoin. 2004. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. Appl. Environ. Microbiol. **70**:7185–7191.
 32. Valles, S. M., C. A. Strong, P. M. Dang, W. B. Hunter, R. M. Pereira, D. H. Oi, A. M. Shapiro, and D. F. Williams. 2004. A picorna-like virus from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*: initial discovery, genome sequence, and characterization. Virology **328**:151–157.
 33. Varaldi, J., M. Bouletreau, and F. Fleury. 2005. Cost induced by viral particles manipulating superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. Parasitology **131**:161–168.
 34. Varaldi, J., P. Fouillet, M. Ravallec, M. Lopez-Ferber, M. Bouletreau, and F. Fleury. 2003. Infectious behavior in a parasitoid. Science **302**:1930.
 35. Varaldi, J., S. Gandon, A. Rivero, S. Patot, and F. Fleury. 2006. A newly discovered virus manipulates superparasitism behavior in a parasitoid wasp, p. 119–139. In K. Bourtzis and T. A. Miller (ed.), Insect symbiosis, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL.
 36. Varaldi, J., S. Petit, M. Bouletreau, and F. Fleury. 2006. The virus infecting the parasitoid *Leptopilina boulardi* exerts a specific action on superparasitism behaviour. Parasitology **132**:747–756.
 37. Varaldi, J., M. Ravallec, C. Labrosse, M. Lopez-Ferber, M. Bouletreau, and F. Fleury. 2006. Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. J. Insect Physiol. **52**:1202–1212.
 38. Vavre, F., F. Fleury, J. Varaldi, P. Fouillet, and M. Bouletreau. 2000. Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: epidemiologic and evolutionary consequences. Evolution **54**:191–200.

P*révalence de LbFV dans les populations naturelles de *Leptopilina boulardi

Le phénomène de manipulation de l'hôte joue un rôle essentiel dans la transmission du parasite en augmentant ses chances d'être transmis vers l'hôte suivant, en permettant que ses stades infestant soit libérés dans un habitat favorable ou en augmentant sa survie (Moore 2002; Thomas *et al.* 2005; Perrot-Minnot & Cézilly 2007).

Chez le parasitoïde *L. boulardi*, la manipulation comportementale par le virus LbFV se traduit par une augmentation de la tendance à superparasiter les larves de drosophiles. L'avantage pour le virus est une transmission favorisée puisque lors d'un événement de superparasitisme, le virus peut, par transfert horizontal, infecter de nouveaux génotypes hôtes et ainsi amplifier sa propagation au sein de la population de parasitoïdes (Varaldi *et al.* 2003). On peut ainsi s'attendre à une dynamique invasive de LbFV efficace. Mais qu'en est-il en conditions naturelles ? Les connaissances obtenues jusque là sur LbFV ont été acquises au laboratoire. Pour autant, l'efficacité de la manipulation parasitaire de *L. boulardi* est difficile à estimer dans la nature et peut fortement dépendre des conditions écologiques rencontrées (quantité en parasitoïdes et en hôtes, température, durée de vie des parasitoïdes).

L. boulardi peut être considérée comme une espèce en expansion si l'on considère son front de progression qui remonte vers les régions les plus au nord de la vallée du Rhône. Nous trouvons aujourd'hui de plus en plus de *L. boulardi* dans des zones situées au nord de Lyon alors que la limite d'aire de répartition de cette espèce se trouvait il y a quelques années seulement vers Vienne (Allemand *et al.* 1999). Les hypothèses sur les causes de cette invasion prennent en compte les modifications environnementales engendrées par le réchauffement climatique. Mais la mise en évidence du virus manipulateur du comportement d'infestation de *L. boulardi* pose la question de sa présence et de son impact au sein des communautés de parasitoïdes de drosophiles.

Un volet de la thèse a consisté à mesurer les taux d'infection (prévalences) dans les populations naturelles de *L. boulardi* de la vallée du Rhône présentant des situations

écologiques variées. Cette étude, commencée lors de mon master 2 Recherche (M2R), a pu être poursuivie à plus grande échelle en thèse grâce à la mise au point d'un outil moléculaire diagnostique de l'infection virale (cf. chapitre II).

I. Prévalence du superparasitisme dans les populations naturelles du parasitoïde *L. boulandi*

I.1. Populations naturelles de *L. boulandi*

La zone géographique couverte par cette étude s'étend de la zone méridionale jusqu'au sud de Vienne, le long de l'axe nord-sud formée par la vallée du Rhône, et correspond à la zone où *L. boulandi* a toujours été observée depuis le début des études de terrain (1994).

Au cours du mois d'octobre 2004, il a été échantillonné sept populations naturelles de *L. boulandi* (Figure III.1). Les proportions d'infection par LbFV dans ces populations ont été estimées par l'étude de la prévalence du superparasitisme.

1. Lens-Lestang (26) ;
2. Annonay (07) ;
3. Gothenon (26) ;
4. Avignon (84) ;
5. Antibes (06) ;
6. Bras (83) ;
7. Pierrefeu (83).

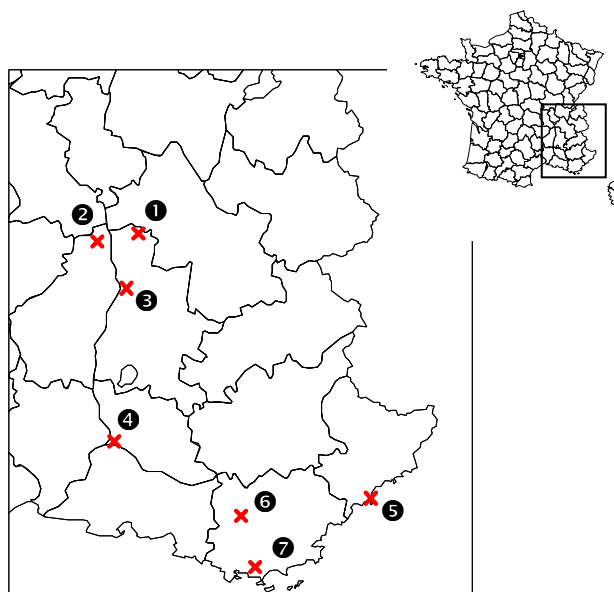


Figure III.1 : Situation géographique des populations françaises de *L. boulandi* échantillonnées pour l'étude de la prévalence du superparasitisme.

Après échantillonnage sur le terrain et retour des pièges au laboratoire (cf. chapitre I, partie III.2.2), pour chacune des sept localités, environ 35 femelles émergeantes ont été mises à pondre en lignées iso-femelles (seulement une dizaine pour Antibes). Le comportement de

superparasitisme a été estimé par la dissection de cinq larves de drosophiles pour deux ou trois descendants par lignée (cf. chapitre I, partie II.2.5 pour le protocole). Les femelles qui superparasitent leurs hôtes sont considérées comme infectées. Pour chacune des populations a ainsi été estimé la proportion des lignées iso-femelles dont la fondatrice était infectée. La lignée a été considérée infectée si au moins une des femelles sur les deux ou trois testées exprimait un comportement de superparasitisme.

I.2. Mesure de la prévalence du superparasitisme

Les femelles ne superparasitant pas leurs hôtes (phénotype NS) sont considérées comme non infectées (statut NI). A l'inverse, une femelle déposant plusieurs œufs par hôte (phénotype S) est considérée infectée (statut I). Cependant, les comportements d'infestation ne sont pas apparus tranchés comme en atteste la figure III.2. Nous avons alors arbitrairement considéré comme non superparasitante toute femelle déposant au maximum deux œufs par larve pour deux des cinq larves de drosophiles disséquées.

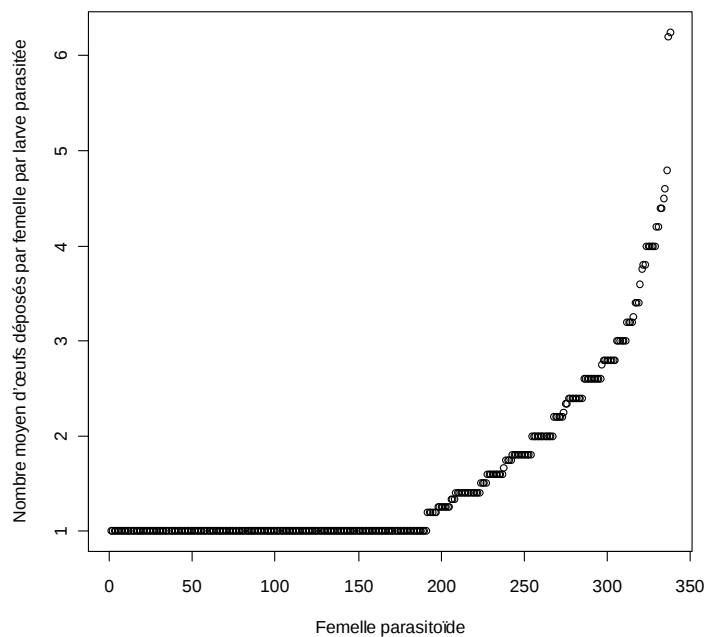


Figure III.2 : Nombre moyen d'œufs déposés par femelle par larve parasitée.

Le protocole d'étude est de nature hiérarchique comme explicité dans la figure III.3. Le plan étant déséquilibré et la distribution des données non normales, nous ne pouvons analyser les données par un modèle linéaire. Nous avons utilisé un système de permutations dont les détails se trouvent dans la légende de la figure III.3.

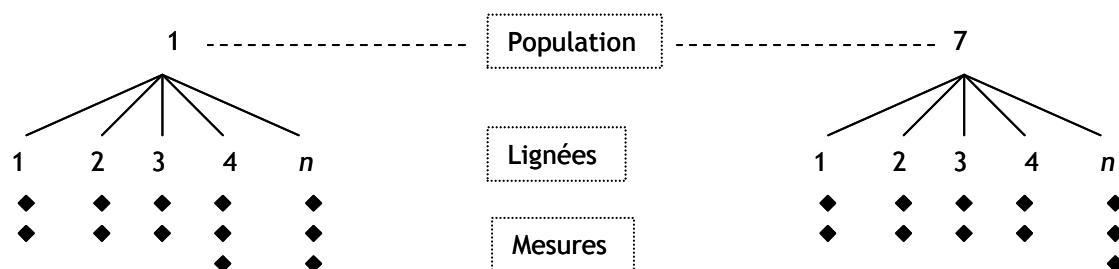


Figure III.3 : Plan hiérarchique de l'analyse de la variance.

Afin de rechercher un effet "population", c'est-à-dire que les populations présentent des valeurs de prévalences significativement différentes, il a été permuté les lignées des différentes populations entre elles. Au total, 300 permutations ont été faites.

Afin de rechercher un effet "lignée", c'est-à-dire que les individus des lignées présentent des valeurs de superparasitisme (mesures) significativement différentes, il a été permuté les individus entre lignées au sein de chacune des populations. Au total, 300 permutations ont été faites.

Sur chaque jeu de données permutees, une analyse de la variance pour modèle linéaire a été réalisée. Il a été calculé la p-value en dénombrant la proportion des simulations pour lesquelles le carré moyen était supérieur au carré moyen observé pour les niveaux correspondant.

Simulations réalisées avec le logiciel R ; script de J. Varaldi.

Les résultats des mesures de prévalence du superparasitisme indiquent que le virus est présent dans les sept populations du sud-est de la France étudiées (Tableau III.1). Cela indique qu'aucune population n'apparaît résistante à la manipulation comportementale induite par LbFV. En outre, les résultats montrent un polymorphisme de l'infection avec des taux d'infection variables entre populations : entre 27% pour Bras et 100% pour Antibes (p-value inter-populations=0). Au sein de six des sept populations échantillonnées, il y a donc coexistence de lignées infectées et de lignées non infectées (la population d'Antibes ne présentant que des lignées infectées).

Tableau III.1 : Estimations de la prévalence de LbFV dans sept populations de *L. bouleari* du sud-est de la France (tests comportementaux).

N° site ^a	Population	Nombre de lignées	Prévalence estimée
1	Lens-Lestang	37	29,7%

2	Annonay	36	33,3%
3	Gotheron	38	79%
4	Avignon	39	59%
5	Antibes	10	100%
6	Bras	26	26,9%
7	Pierrefeu du Var	36	44,4%

^a : indication géographique de la localité reportée sur la figure III.1.

En ce qui concerne l'intensité du superparasitisme *i.e.* l'intensité de la manipulation, on notera l'extraordinaire variabilité entre lignées dans le comportement de ponte des femelles *L. bouhardi* au sein de chacune des populations étudiées (p-value inter-lignées=0) (Figure III.4).

On remarque également que la variabilité du nombre d'œufs déposés par larve parasitée est importante pour les valeurs moyennes élevées (Figure III.4). Cela peut avoir deux explications : (1) des différences dans le degré de manipulation des parasitoïdes avec des individus exprimant un très fort superparasitisme et d'autres exprimant un superparasitisme plus modéré bien que supérieur à celui des individus des lignées non infectées ; (2) la coexistence, au sein de la même lignée, d'individus superparasitants et d'individus non superparasitants soit infectés mais n'exprimant pas le comportement de superparasitisme (résistance), soit non infectés à la suite de la transmission verticale incomplète.

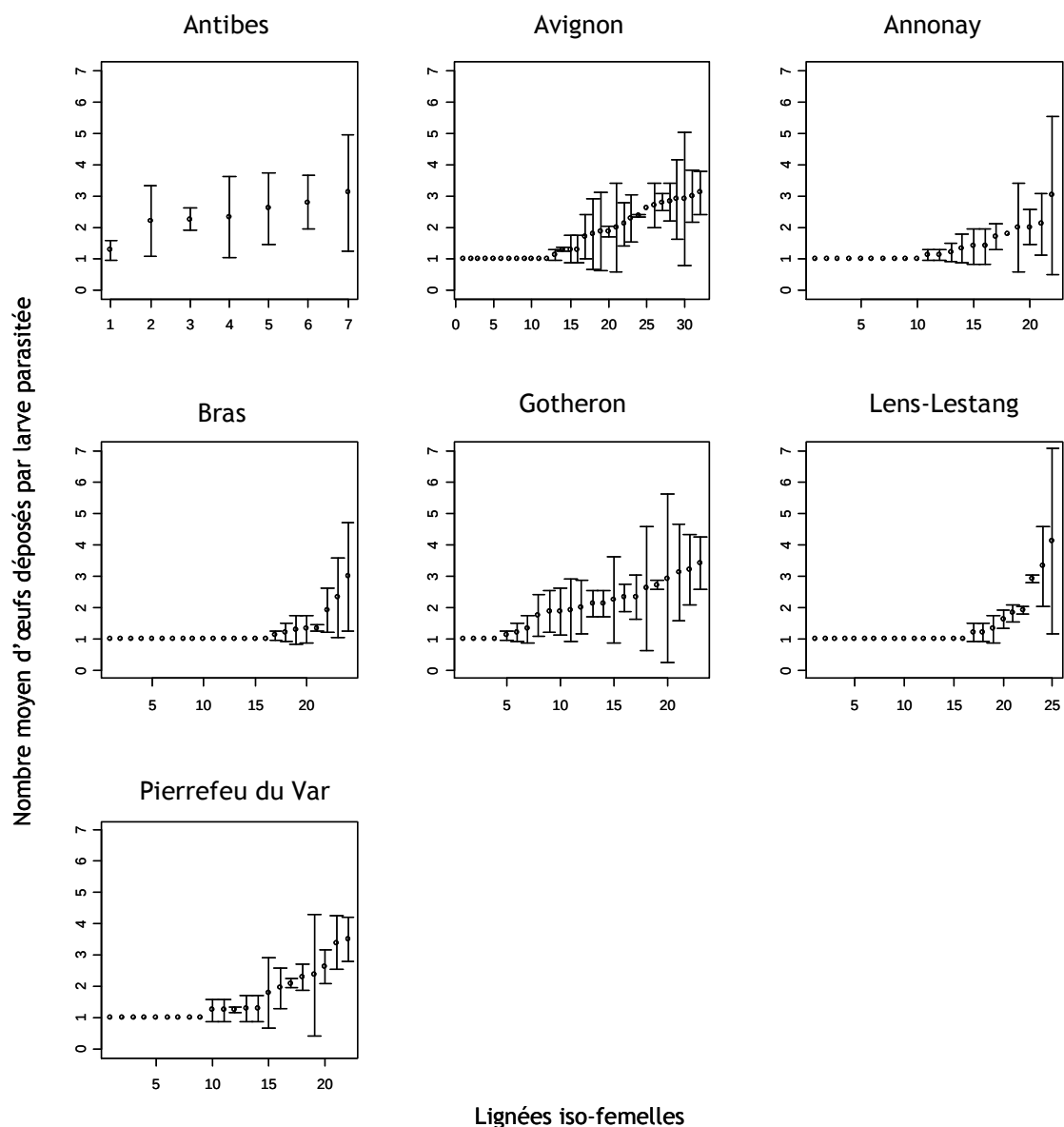


Figure III.4 : Nombre moyen d’œufs déposés par larve parasitée par lignée pour chacune des sept populations étudiées (moyenne et erreur standard).

Les lignées représentées sont celles pour lesquelles plusieurs femelles ont été testées (2 ou 3 femelles).

I.3. Validation du diagnostic phénotypique

Dans le but de vérifier la transmission maternelle du superparasitisme et ainsi d’étayer la fiabilité du test phénotypique dans la détermination du statut d’infection des individus (*i.e.* valider le lien superparasitisme-infection virale), nous avons réalisé des expériences de croisements entre lignées présentant ou non le comportement de superparasitisme.

Protocole

Les croisements ont été réalisés à partir de lignées iso-femelles de phénotypes S et NS échantillonnées à Gothéron en septembre 2006 (neuf lignées S et neuf lignées NS) avec des lignées de référence de *L. boulandi*, $S_{\text{réf}}$ et $NS_{\text{réf}}$. Leur comportement de superparasitisme est présenté dans la figure III.5.

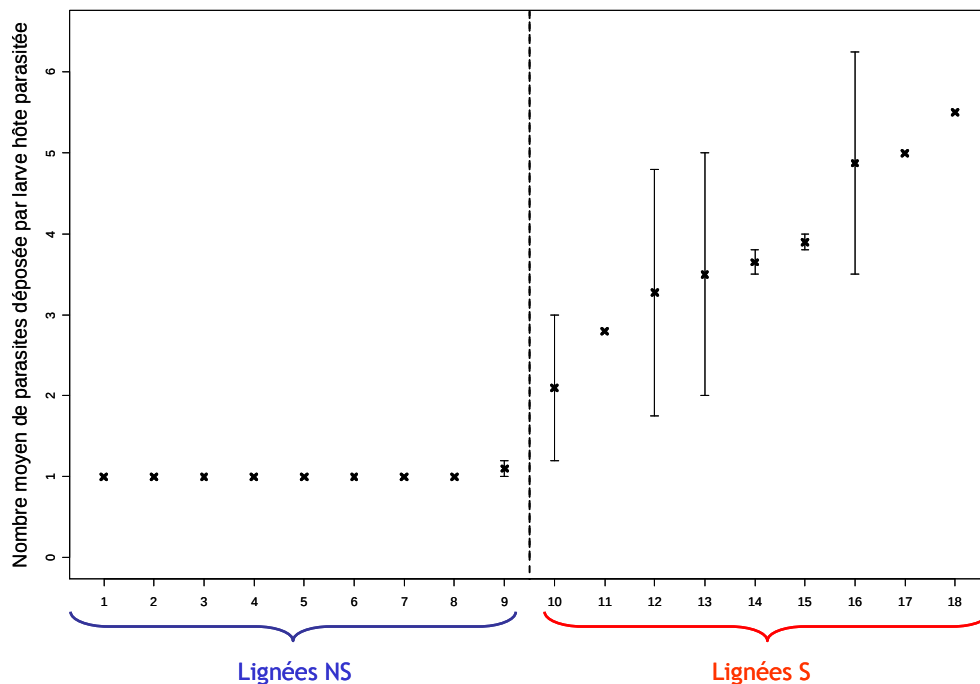


Figure III.5 : Comportement de superparasitisme des lignées de Gothéron S et NS utilisées pour les expériences de croisements (moyenne du nombre de parasites déposés par larve de drosophile hôte et erreur standard).

Deux individus par lignée ont été testés sauf pour les lignées 11, 17, 18 où un seul individu a été testé.

Les croisements furent entrepris dans des tubes d'élevage en y introduisant trois femelles vierges et cinq mâles sur environ 150 larves de drosophiles. Pour chacune des modalités S ou NS, nous avons réalisé trois types de croisements (dans les notations suivantes, le sens des croisements est le suivant : femelle $\times$ mâle) :

- croisement des souches parentales entre elles : $S \times S$ ou $NS \times NS$ (témoins lignées);
- croisement d'une femelle parentale avec un mâle de la lignée de référence de phénotype opposé : $S \times NS_{\text{réf}}$ ou $NS \times S_{\text{réf}}$;
- croisement d'une femelle de la lignée de référence de phénotype différent avec un mâle de la souche parentale : $NS_{\text{réf}} \times S$ ou $S_{\text{réf}} \times NS$.

Deux répliquats par croisement ont été à chaque fois réalisés.

Des croisements contrôles ont également été entrepris comme suit (femelle × mâle):

- $S_{\text{réf}} \times S_{\text{réf}}$
- $NS_{\text{réf}} \times NS_{\text{réf}}$
- $S_{\text{réf}} \times NS_{\text{réf}}$
- $NS_{\text{réf}} \times S_{\text{réf}}$

Cinq réplicats ont été réalisés pour chaque type de croisements contrôles.

Pour chacun des croisements, nous avons étudié le comportement des femelles émergentes (F1) : deux femelles par tube pour les croisements contrôles et trois pour les croisements expérimentaux.

Le tableau III.2 présente les prédictions des phénotypes des descendants pour chaque type de croisement :

- prédiction 1 : les variations du phénotype de superparasitisme sont causées par des différences de génotype de l'hôte (déterminisme nucléaire) ;
- prédiction 2 : les variations du phénotype de superparasitisme sont causées par la présence/absence du virus (déterminisme viral).

Tableau III.2 : Prédictions des phénotypes des descendants de *L. bouhardi* obtenus suite à différents types de croisements des lignées parentales.

Croisements ♀ × ♂	<i>Prédiction 1</i> Déterminisme nucléaire	<i>Prédiction 2</i> Déterminisme viral
S × S	S	S
NS × NS	NS	NS
NS × S	Intermédiaire	NS
S × NS	Intermédiaire	S

S : phénotype superparasitant ; NS : phénotype non superparasitant ; Intermédiaire : phénotype intermédiaire.

Prédiction 1 : le comportement de superparasitisme est déterminé par le génotype des insectes.

Prédiction 2 : le comportement de superparasitisme est déterminé par la présence/absence du virus.

Résultats

Les résultats des croisements contrôles confirment la transmission maternelle du caractère « superparasitant » dans les lignées de référence $S_{\text{réf}}$ (Figure III.6). Les croisements

impliquant une femelle $NS_{réf}$ engendrent une descendance de phénotype NS et ceux impliquant une femelle $S_{réf}$ engendrent une descendance de phénotype S quelque soit le phénotype de la lignée du père. Ces observations nous permettent de valider le phénotype des individus issus des lignées de référence qui ont largement été utilisées au cours de la thèse.

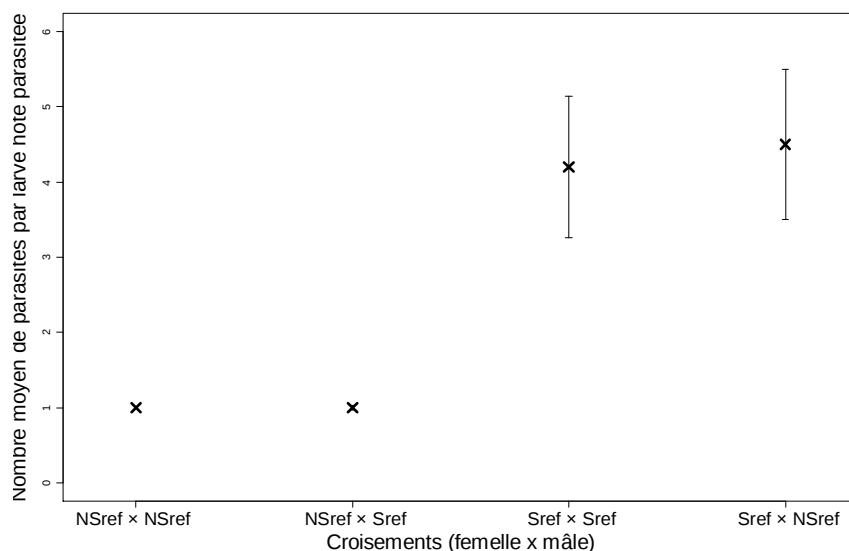


Figure III.6 : Nombre de parasites déposés par larve hôte parasitée pour quatre types de croisements à partir des lignées de référence $S_{réf}$ et $NS_{réf}$ (moyenne et erreur standard).

Les conclusions sont identiques pour les croisements expérimentaux : les descendants présentent le même phénotype que leur mère, quelque soit l'origine du père. Pour les croisements impliquant les lignées S de Gothéron, les descendants expriment un comportement de superparasitisme (phénotype S) uniquement lorsque la femelle de ces lignées est utilisée (Figure III.7.a). Les femelles issues des lignées NS de Gothéron auront une descendance de phénotype NS. Le phénotype des mâles de ces lignées ne contraint en rien le phénotype de leurs descendants (Figure III.7.b).

En conclusion, les expériences de croisements entre lignées de phénotype S ou NS nous ont permis de confirmer la transmission maternelle du caractère « superparasitant », validant les tests phénotypiques utilisés pour déterminer les statuts d'infection.

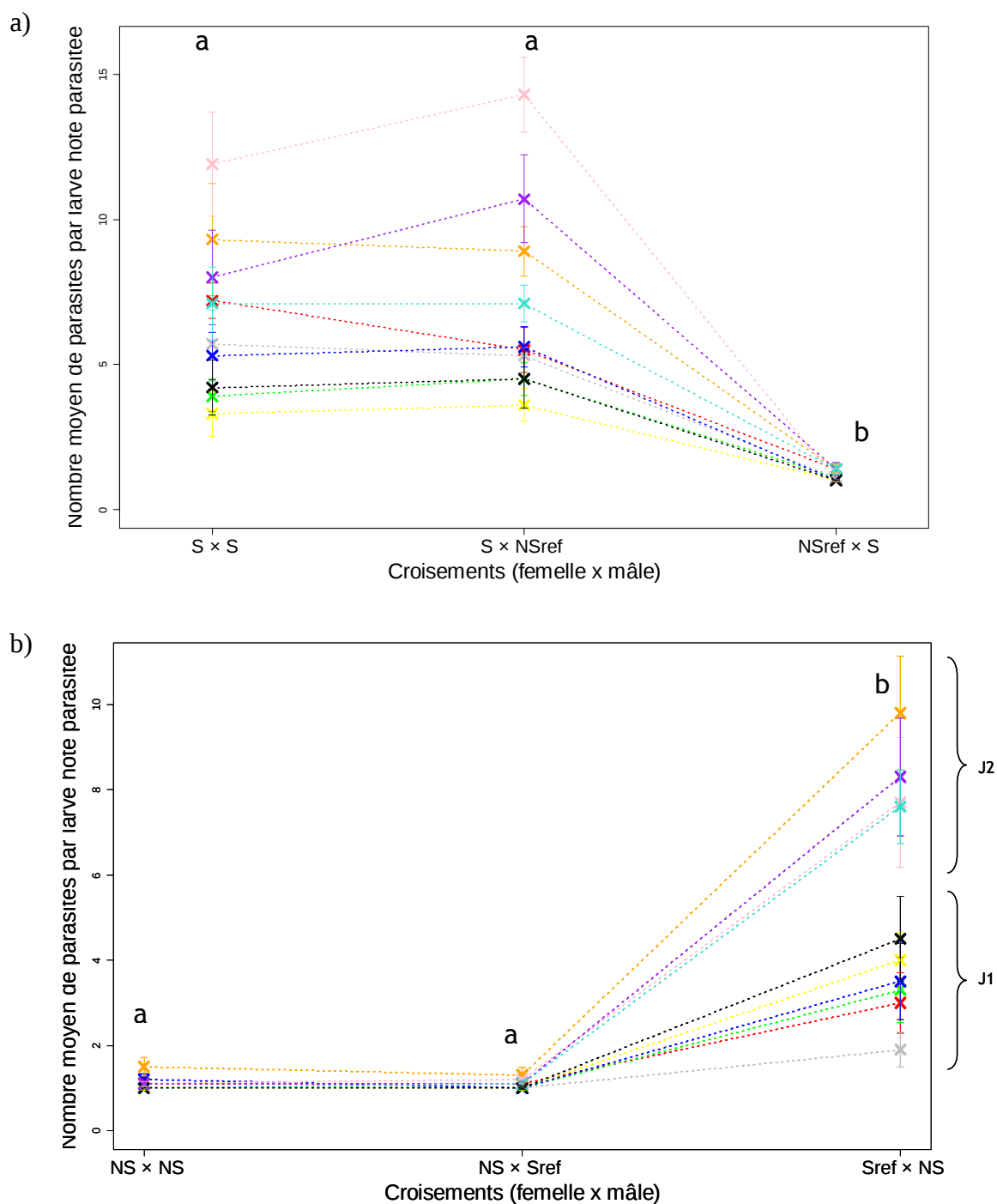


Figure III.7 : Nombre de parasites déposés par larve hôte parasitée pour les trois types de croisements à partir de (a) 9 lignées S de Gotheon et (b) 9 lignées NS de Gotheon (moyenne et erreur standard).

L'étude du comportement de superparasitisme s'est déroulée sur deux jours, ce qui est notifié sur le graphe par les caractères J1 et J2 (cf. chapitre IV, partie II).

Les valeurs moyennes notées d'une même lettre ne sont pas significativement différentes (test de Wilcoxon, $p=0.05$).

I.4. Confirmation des statuts d'infection par test moléculaire

Par la suite, des amorces spécifiques du virus LbFV ont été mises au point (cf. chapitre II) permettant un diagnostic moléculaire individuel de l'infection. Alors que jusque là la présence du virus était estimée au travers d'un test phénotypique, sa détection était désormais possible par un simple test PCR.

Dans le cadre de l'étude des prévalences de superparasitisme dans le sud-est de la France, j'avais conservé des femelles *L. boulandi* issues de la deuxième génération de parasitoïdes (F2) de la population de Lens-Lestang pour 11 lignées iso-femelles diagnostiquées S ou NS sur la F1 (diagnostic phénotypique) (conservation à sec, à -80°C). L'outil moléculaire ayant été par la suite mis au point, nous avons alors voulu tester sur une population autre que Goheron et par une autre technique que celles des croisements la fiabilité du diagnostic de l'infection par test comportemental en m'assurant que les individus issus des lignées caractérisées NS ne présentaient pas d'amplification par PCR d'ADN du génome viral contrairement à ceux des lignées S. Il pouvait être ainsi testé le choix du niveau seuil du comportement de ponte des parasitoïdes permettant de définir des lignées S et NS : est-ce que le seuil d'intensité du superparasitisme choisi pour caractériser les lignées de *L. boulandi* S ou NS et permettre ainsi de calculer les taux de prévalence de superparasitisme dans les populations naturelles était fiable ou non ?

Les résultats obtenus vont dans le sens attendu : aucune amplification par PCR de la séquence virale n'a été observée pour les femelles issues des lignées de phénotype NS contrairement à celles issues des lignées S (Tableau III.3). En d'autres termes, les lignées de phénotype NS ne sont pas infectées par LbFV alors que les lignées S sont infectées par LbFV. Le lien superparasitisme/infection virale est confirmé validant le choix du seuil de superparasitisme S/NS utilisé dans le cadre du test phénotypique. On observe que les femelles ne déposant en moyenne qu'un seul œuf par hôte sont issues de lignées non infecté par LbFV (Tableau III.3). En revanche, les lignées présentant un comportement de superparasitisme (dans les conditions de nos expériences), même faible (= 1,6), sont infectées par le virus.

Ces résultats confortent les valeurs de prévalence de LbFV dans les populations naturelles de *L. boulandi* du sud-est de la France estimées à partir de tests phénotypiques.

Tableau III.3 : Correspondance entre le phénotype de superparasitisme et le test moléculaire pour différentes lignées iso-femelles de *L. boulandi* issues de la population de Lens-Lestang.

<i>Lignée</i>	1.7	2.2	3.5	6.4	6.7	7.3	8.2	1.2	8.7	8.4	8.3
<i>Test comportemental</i> ^a	1 (n=2)	1 (n=2)	1 (n=2)	1 (n=1)	1 (n=2)	1 (n=2)	1,6 (n=2)	1,8 (n=2)	2,9 (n=2)	4,1 (n=2)	4,6 (n=1)
<i>Phénotype</i> ^b	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	S	S	S
<i>Test moléculaire</i> ^c	0/2	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	3/3	4/4	4/4	4/4	4/4
<i>Statut d'infection</i> ^d	NI	NI	NI	NI	NI	NI	I	I	I	I	I

^a Nombre moyen de parasites par larve hôte parasitée. Entre parenthèses est noté le nombre de femelles testées.

^b Phénotype observé par test comportemental sur les individus de la première génération de laboratoire (F1) lors de l'étude de la prévalence du superparasitisme. NS : phénotype non superparasitant ; S : phénotype superparasitant.

^c Nombre d'échantillons présentant une amplification par PCR / nombre d'échantillons testés ; tests effectués sur les individus de la deuxième génération de laboratoire (F2) conservés à -80°C.

^d Statut d'infection attribué par test moléculaire. NI : non infectée par LbFV ; I : infectée par LbFV.

II. Epidémiologie moléculaire de LbFV : prévalence lors de l'extension de l'aire géographique de *L. boulandi* (Manuscrit 2)

Parmi les mécanismes par lesquels les parasites affectent les assemblages d'espèces et la stabilité des écosystèmes, nous nous sommes intéressés à celui du rôle du parasitisme sur le succès des espèces invasives (Prenter *et al.* 2004). Les individus fondateurs d'une population invasive peuvent être dépourvus ou porteurs de peu de parasites (Torchin *et al.* 2003). Libérés de leurs parasites, le succès de l'invasion des espèces invasives dans le nouveau milieu est alors augmenté. L'espèce invasive peut également transporter avec elle des parasites capables d'infecter les espèces locales, qui peuvent alors être décimées facilitant le processus d'invasion.

L. boulandi est une espèce en expansion dont la limite d'aire de répartition tend à se déplacer plus au nord de la vallée du Rhône. De plus en plus de parasitoïdes de cette espèce sont piégés dans le nord de la région lyonnaise (Allemand, com. pers.) alors qu'il y a une dizaine d'années, il n'en était pas observé au-delà de Vienne, ville située au sud de Lyon (Allemand *et al.* 1999). Y a-t-il un lien entre la capacité invasive de *L. boulandi* et la présence du virus manipulateur du comportement d'infestation ?

La mise au point d'un outil moléculaire diagnostique de l'infection virale nous a permis d'envisager une étude populationnelle de la prévalence de LbFV à une plus grande échelle que celle menée précédemment. Le M2R de J. Martinez est venu compléter ce travail en

augmentant le nombre de populations échantillonnées et étudiées. Ces résultats sont présentés sous forme d'un article actuellement en révision pour le journal *Molecular Ecology*.

II.1. Populations naturelles de *L. boulandi*

La prévalence de LbFV a été mesurée pour 15 populations naturelles de *L. boulandi* de la vallée du Rhône en utilisant le diagnostic moléculaire. Une partie d'entre elles correspondent aux mêmes populations que celles utilisées pour l'étude de la prévalence par test comportemental, échantillonnées durant l'automne 2004 (cf. partie précédente). Des individus émergents des pièges (dont le phénotype n'a pas été testé) avaient été conservés (à sec, à -80°C). Un second échantillonnage effectué à l'automne 2007 est venu compléter le nombre de populations. Au total, quatre populations ont été échantillonnées uniquement en 2004, huit uniquement en 2007 et trois en 2004 et 2007.

Ces populations sont réparties le long d'un axe nord-sud allant de la zone marginale de l'aire de répartition de *L. boulandi* jusqu'à la zone méditerranéenne. Cette espèce se déplaçant progressivement vers le nord, trois groupes de populations ont été distinguées (Figure III.8) :

- les populations centrales de l'aire de répartition, à l'extrême sud de la zone d'échantillonnage (zone méditerranéenne jusqu'à Valence). Dans cette zone, *L. boulandi* est bien installée, présente en fortes abondances.
- les populations marginales, situées entre Valence et le sud de Lyon. Cette zone correspond à l'ancienne limite de l'aire de répartition de *L. boulandi*, désormais présente avec des abondances intermédiaires.
- les populations nouvellement colonisées, aux abords de Lyon, notamment au nord de l'agglomération.

Chasselay (69)	Populations nouvelles ×
Cailloux sur Fontaine (69)	
St Maurice de Beynost (01)	
St Foy-lès-Lyon (69)	
St Laurent d'Agnay (69)	
Villette de Vienne (38)	Populations marginales ▲
Sonnay (26)	
Epinouze (26)	

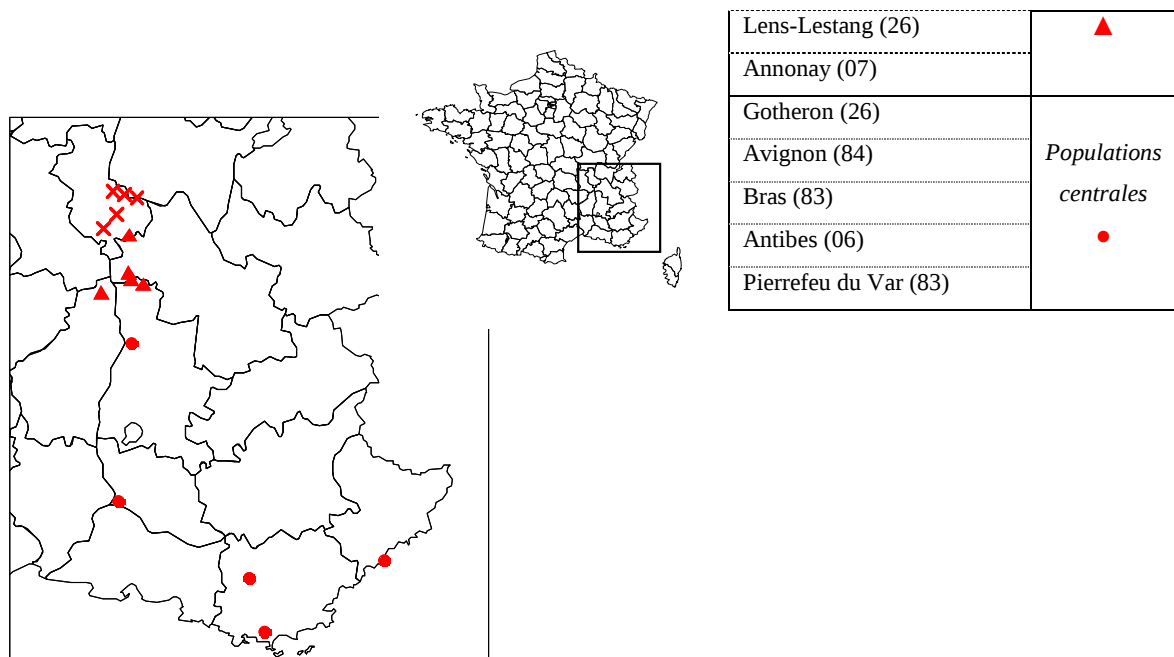


Figure III.8 : Situation géographique des populations de *L. bouvardi* échantillonnées pour l'étude moléculaire de la prévalence de LbFV.

Le tableau présente les 15 sites d'échantillonnages de *L. bouvardi* classés selon un gradient nord-sud (Chasselay étant la population la plus au nord de la zone de piégeage). La colonne de gauche indique les noms des localités ainsi que, entre parenthèses, leur département. La colonne de droite permet de classer les populations selon trois groupes : populations nouvelles, marginales ou centrales et explicite les symboles de la carte.

II. 2. Prévalence de LbFV

Le patron de prévalence de LbFV résultant de l'étude de 15 populations naturelles de *L. bouvardi* montre un cline croissant du nord au sud (Figure III.9) et apparaît ainsi corrélé à l'abondance et à la distribution géographique de son hôte. Alors que l'infection semble bien établie et présente une très forte prévalence en zone méditerranéenne (populations centrales) (jusqu'à 95%), les taux d'infection virale diminuent dans les populations marginales de *L. bouvardi* jusqu'à être très faibles voir nuls dans les populations nouvellement établies au nord de l'aire de répartition de *L. bouvardi*. Les populations nouvellement établies semblent donc très peu infectées. Différentes hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène.

La première hypothèse invoquée est le coût de l'infection sur ces populations nouvellement établies. Bien que LbFV ne semble pas avoir d'effets délétères majeurs sur la fitness de son hôte en conditions de laboratoire, on ne connaît pas l'importance de ce coût en

conditions naturelles. Il se pourrait qu'il soit important dans ces populations colonisatrices qui font face à de nouvelles conditions écologiques. On peut envisager un coût élevé sur la capacité de dispersion de *L. bouhardi* favorisant la présence d'individus non infectés dans les populations nouvelles.

Outre le coût de l'infection, il est possible que les paramètres de transmission du virus soient différents dans les nouvelles populations de *L. bouhardi* avec pour conséquences une plus faible prévalence virale. Cela peut être dû à un effet de la température dont les valeurs varient de manière croissante sur cette zone du sud-est de la France selon un gradient nord-sud (Thomas & Blanford 2003). Il se pourrait aussi que la propagation du virus soit dépendante de la densité de femelles *L. bouhardi* qui conditionne les opportunités de transmission horizontale. Les populations de *L. bouhardi* les plus au nord étant plus petites que celles du sud, le transfert du virus d'un insecte à l'autre en conditions de superparasitisme pourrait être moins fréquent. En effet, en raison d'une transmission verticale incomplète, des transferts horizontaux sont nécessaires pour que le virus se maintienne. On observerait alors des taux d'infection faibles jusqu'à ce que la population de *L. bouhardi* soit bien établie.

Les très fortes prévalences de LbFV observées dans les populations centrales de *L. bouhardi* étudiées posent la question de l'influence du virus sur la structure de la communauté de parasitoïdes. Ici le coût de l'infection pourrait favoriser le maintien d'autres espèces comme *L. heterotoma* présente en faible abondance et semble-t-il, réfractaire à l'infection virale (cf. chapitre V).

A l'inverse, la variabilité observée dans les prévalences de LbFV au sein des différentes populations pose une autre question : celle du rôle de la structure des communautés de parasitoïdes sur les taux d'infection du virus, en particulier en ce qui concerne *L. heterotoma*, la principale espèce de parasitoïde compétitrice de *L. bouhardi*, dont l'abondance varie fortement d'une faible représentativité dans la zone méditerranéenne jusqu'à une présence totale dans les populations les plus au nord.

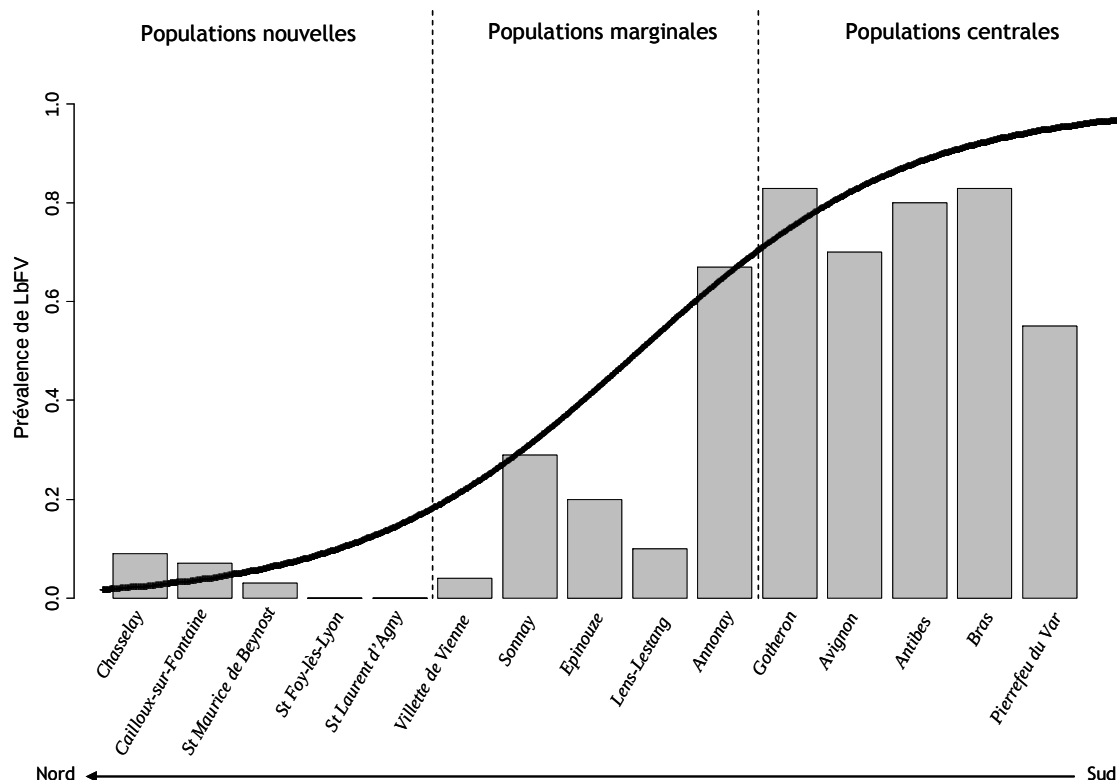


Figure III.9 : Prévalence de LbFV dans les populations naturelles de *L. bouhardi* du sud-est de la France.

Pour les trois populations échantillonnées à deux dates (2004 et 2007 ; Annonay, Gotheron, Avignon) ont été représenté les données de 2007. Pour accéder à l'ensemble des résultats, se référer au manuscrit 2.

Ligne noire : prédictions du modèle linéaire généralisé pour l'ensemble des données (échantillonnages réalisées en 2004 et 2007).

Les trois groupes de populations caractérisés sont délimités par une ligne en pointillées.

Afin d'étudier une éventuelle structuration génétique des populations virales dans le sud-est de la France et afin d'en inférer une histoire évolutive de ces populations, nous avons analysé la variabilité de l'unique séquence virale disponible. Le séquençage de cette séquence issue de populations mondiales (France, Italie, Espagne, Côte d'Ivoire, Brésil) a mis en évidence une absence quasi-totale de variabilité. Dans la discussion de l'article correspondant (manuscrit 2), nous formulons différentes hypothèses pouvant expliquer ce résultat. Est-ce parce que cette séquence code pour un gène à la fonction très conservée ? Est-ce parce que *L. bouhardi* et/ou son virus a récemment colonisé ces régions européennes ? Est-ce parce qu'un balayage sélectif récent a eu lieu installant une nouvelle souche virale dans les populations étudiées ?

Néanmoins, cette absence de variabilité suggère que le test moléculaire est très performant pour détecter l'infection par LbFV, la séquence apparaissant monomorphe.

II. 3. Patrons des prévalences obtenus par tests phénotypiques et moléculaires

Les patrons de prévalences de LbFV mesurés soit par test phénotypique soit par diagnostic moléculaire dans des populations naturelles de *L. bouvardi* de la vallée du Rhône montrent la même tendance (Figure III.10). Les différences de valeurs entre les deux mesures peuvent être en partie expliquées par le fait que les tests phénotypiques ont été faits après une génération d'élevage au laboratoire, ce qui pu entraîner une perte de l'infection dans certaines lignées de parasitoïdes. Les tests moléculaires ont eux été menés directement sur les individus sortis des pièges au laboratoire (une génération avant). En outre, la pénétrance incomplète de l'infection (absence de manipulation comportementale lors d'une infection virale) pourrait expliquer pourquoi les prévalences des populations du sud estimées par test comportemental sont souvent inférieures à celles estimées par le test moléculaire. Il se peut également que des individus soient résistants à la manipulation comportementale nous empêchant, lors du test phénotypique, de les comptabiliser parmi les individus infectés. Enfin, l'existence de souches virales non manipulatrices pourrait aussi tendre à sous-estimer la prévalence virale par test phénotypique, d'où la nécessité d'analyser la variabilité de la manipulation du comportement induite par le virus. Dans le chapitre suivant, cette variabilité a été étudiée ainsi que la variabilité du superparasitisme causée par les effets génétiques du parasitoïde.

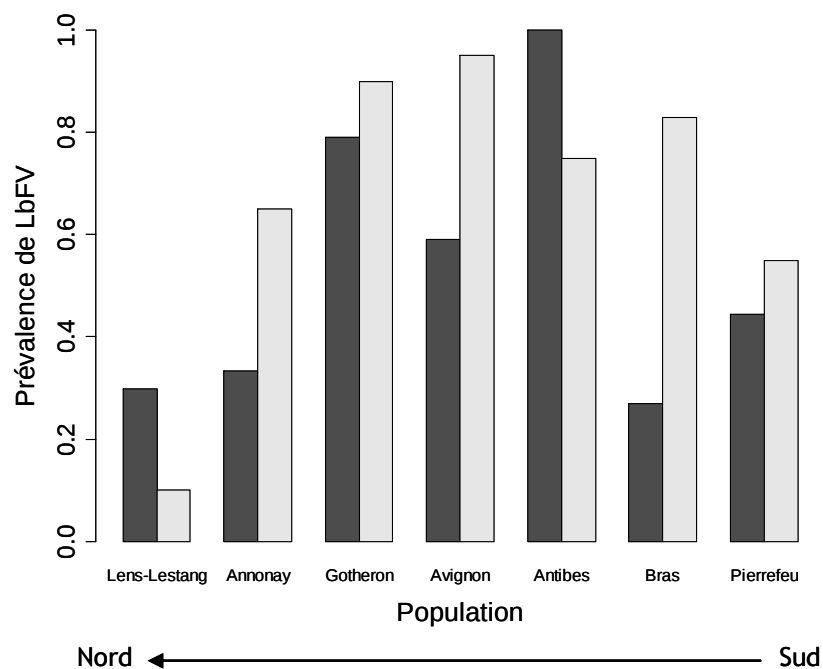


Figure III.10 : Prévalences de LbFV estimées par tests phénotypiques et moléculaires au sein de sept populations naturelles de *L. boucardi*.

Barre gris foncé : prévalence estimée par test phénotypique ; barre gris clair : prévalence estimée par test moléculaire.

Les tests phénotypiques et moléculaires ont été réalisés sur des femelles *L. boucardi* issues d'échantillonnages de 2004. Les analyses comportementales ont été menées sur des individus élevés pendant une génération au laboratoire. Les analyses moléculaires ont été réalisées sur les individus directement issues des pièges.

L'étude de la présence du virus dans les populations naturelles de *L. boucardi* dans le sud-est de la France a montré que la prévalence de LbFV suit un gradient décroissant nord-sud : les populations les plus au nord de la zone géographique étudiée (situées à la limite de l'aire de répartition de *L. boucardi*) ont des taux d'infection très faibles voire nuls contrairement à celles situées le plus au sud où la présence du virus atteint des proportions élevées (jusqu'à 95%). Il se pose la question du rôle de l'infection sur la capacité d'invasion des populations d'insectes.

Manuscript in revision in *Molecular Ecology*

Prevalence of a virus manipulating host behaviour during species range expansion

Sabine Patot, * Julien Martinez, Roland Allemand, Julien Varaldi and Frédéric Fleury

Université de Lyon; F-69000, Lyon; Université Lyon 1; CNRS, UMR5558, Laboratoire de
Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France.

*Corresponding author. Mailing address: Université de Lyon; Université Lyon 1; CNRS; UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 boulevard du 11 novembre 1918, Villeurbanne F-69622, France.
Phone: (33)4.72.43.29.08. Fax: (33)4.72.43.13.88.
E-mail: patot@biomserv.univ-lyon1.fr

Key words: vertically-transmitted virus, behavioural manipulation, species range expansion, parasite-mediated interactions, *Drosophila* parasitoids, *Leptopilina*.

Running title: Virus responsible for behavioural manipulation

ABSTRACT

The role of parasites in biological invasions is illustrated by many examples of horizontally transmitted parasites. However, many species, especially insects, may harbor vertically transmitted symbionts, that can reach high prevalence and markedly modify their host's biology. To date we know very little about the role of parasites in the expansion of the geographical range of their hosts. Using an approach based on molecular epidemiology, we studied the prevalence of a vertically transmitted virus during the expansion of its insect host, the *Drosophila* parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*. *L. boulardi* is a Mediterranean parasitoid species with a range that has recently expanded northwards (within France). The wasp carries a hereditary virus (LbFV), which manipulates the behaviour of females, forcing them to lay additional eggs in already parasitized *Drosophila* larvae (superparasitism). This benefits the virus, since it is horizontally transferred by superparasitism. We show that the prevalence of LbFV is very high in southern and central *L. boulardi* populations, intermediate in marginal populations, and almost absent in newly established peripheral populations located further north. Viral strains from each area (central, marginal and newly colonized) were all able to induce behavioural manipulation, and viral gene sequencing revealed very low sequence diversity. We suggest that LbFV has only recently spread into *L. boulardi* populations, and we discuss how viral infection may affect with the geographical range expansion of its host.

INTRODUCTION

Parasites are known to play a major role in host community structure and functioning by directly or indirectly influencing host populations (Poulin, 1999; Moller, 2005; Hudson *et al.*, 2006; Wood *et al.*, 2007). There is indeed increasing evidence that parasites can shape the host community, because they influence competitive or predatory interactions between species, thus contributing to the maintenance of species diversity (Hatcher *et al.*, 2006). During the last decade, parasites have also been recognized as a key factor in determining the success of invasive species when they first penetrate into a newly-colonized habitat (Prenter *et al.*, 2004; Tompkins & Poulin, 2006). According to one hypothesis, naive host populations may become infected with a new parasite transported by an introduced species. The naive host may then be decimated by the newly-introduced parasite, favoring the invasion of the introduced host species. In contrast, the “enemy release” hypothesis (Mitchell & Power, 2003; Torchin *et al.*, 2003; Torchin & Mitchell, 2004) postulates that invading organisms lose their co-evolved parasites during the invasion process as a result of either drift or selection, and this enables the invaders to outcompete the resident species, which facilitates the invasion process.

The main difficulty in attributing parasites a role in determining the outcome of biological invasion arises from the fact that conclusions have to be drawn from a very small number of introductions, each time involving a very small number of individuals originating from a source population. As a result of this bottleneck, whether a given invasive species does or does not retain its native parasite during a given invasion event may simply be the result of chance. One way round this problem would be to analyze several independent invasion events or multiple introductions involving the same species (Torchin *et al.*, 2003), but this rarely

happens. However, useful information can be gained by studying species that are expanding their geographic range because of climate change, natural expansion or some other reason. The expansion often occurs by establishing peripheral populations that regularly receive new migrants from the native area. In addition, repeated independent colonization events in the marginal area make it possible to control the effect of stochastic factors, such as drift. This can be viewed as repeated introduction and expansion events involving exotic species simulating situations of biological invasion. To our knowledge, there are no reports dealing with the involvement of parasites in geographic range expansion of their host species.

Most of the studies that report the implication of parasites in biological invasions deal with horizontally-transmitted pathogens that induce severe host-fitness reduction (e.g. Tompkins & Begon, 1999; Enserink, 2002; Tompkins *et al.*, 2002; Tompkins *et al.*, 2003). However, vertically-transmitted symbionts that produce only mild pathogenic effects (in the conventional sense) have received much less attention, possibly because their effects remained unnoticed within the host phenotype variability. However, such associations are widespread, especially in insects (Moran *et al.*, 2008), and it is important to consider them, because symbionts have important effects on host behaviour (Zchori-Fein *et al.*, 2001; Varaldi *et al.*, 2003), reproduction (Werren *et al.*, 2008), adaptation to the environment (Tsuchida *et al.*, 2004) and resistance to stress (Montllor, 2002; Oliver *et al.*, 2003; Scarborough *et al.*, 2005; Russell & Moran, 2006). For instance, Slothouber Galbreath *et al.* (2004) reported that the vertically-transmitted microsporidian parasite *Fibrillanosema crangonysis* may contribute to the success of biological invasions of their hosts. This parasite was introduced in Europe with its North American amphipod host *Crangonyx pseudogracilis*, and it induces host sex ratio distortion (excess of females), thus boosting the population dynamics of *C. pseudogracilis*. We must keep in mind that this conclusion is based on observation of a single

introduction, but the findings of this study are consistent with the hypothesis that vertically-transmitted parasites play a selective role during invasion events.

In this paper, we studied a host-parasitoid-virus community to address the possible role of vertically-transmitted viral particles in the process of species range expansion. In south-eastern France, *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* larvae are mainly attacked by two related solitary endoparasitic wasps, *Leptopilina heterotoma* and *L. boulardi* (Hymenoptera: Figitidae). The former has a cosmopolitan distribution, whereas the distribution of *L. boulardi* is restricted to tropical and Mediterranean climates. In the south of France, where these two species coexist, *L. boulardi* is by far the dominant species, outcompeting *L. heterotoma* (Fleury *et al.*, 2004). Further north, the abundance of *L. boulardi* falls sharply, with a clear-cut species border situated around Valence (45°N, 100 km south of Lyon, Allemand *et al.*, 1999 and Fig 1). Thirty kilometers further north, in 1998, *L. boulardi* was completely absent, and *L. heterotoma* completely dominated the whole parasitoid community. However, this situation has drastically changed during the last ten years, with *L. boulardi* advancing about 60 km northwards (Allemand, pers. com., CNRS, Lyon1). This progression of the geographic range of *L. boulardi* could be explained by climate change, and the high competitiveness of this species, which can be considered somewhat invasive in this situation. *L. boulardi* females are sometimes infected with a heritable virus that manipulates their egg laying strategy: infected females are more ready to oviposit in hosts that have already been parasitized (by conspecifics) than uninfected females, a type of behaviour known as superparasitism. The virus, designated LbFV (for *Leptopilina boulardi* filamentous virus), takes advantage of this behavioural change, since it can be transmitted horizontally when uninfected and infected parasitoid larvae coexist inside the superparasitized *Drosophila* larva (Varaldi *et al.*, 2003; Varaldi *et al.*, 2006a). Females infected by LbFV do not suffer any

93 major fitness cost, and its effects are mainly limited to superparasitism (Varaldi *et al.*, 2005;
94 Varaldi *et al.*, 2006b). Theoretical developments show that horizontal transmission
95 complements the imperfect vertical transmission, and the fitness cost caused by the virus,
96 allowing it to persist at high frequencies in wasp populations (Gandon *et al.*, 2006). Using a
97 recently-developed viral molecular marker (Patot *et al.*, 2009), we first observed a high
98 prevalence of LbFV in southern *L. bouleari* populations. In contrast, the sympatric species
99 *L. heterotoma* remained uninfected, probably because of virus specialization or refractoriness
100 of *L. heterotoma* to LbFV infection. Since LbFV infection is likely to influence the
101 competitive ability of *L. bouleari* (either enhancing or reducing it), we wanted to find out
102 whether its prevalence varies across the geographic range of *L. bouleari*. We studied the
103 prevalence of natural French populations of LbFV in 15 *L. bouleari* distributed along the
104 north-south axis of the Rhône valley. This sample includes central, marginal and newly
105 established populations. Our results revealed very different prevalences for the three types of
106 population, suggesting that this symbiont may indeed influence the colonization process.

MATERIALS AND METHODS

Sample sites and collection of *L. boulandi* parasitoids. Field populations of *L. boulandi* were sampled during 2004 and/or 2007 in 15 orchards in south-eastern France; the sampling sites were distributed from north to south along the Rhône valley axis (Table 1). We chose the sampling sites according to the ecological situation initially observed in 1998. We defined as central populations (sites 11-15) those that were always present at a very high level of abundance in the geographic range of the species, marginal populations (sites 6-10) those where *L. boulandi* had previously been detected at an intermediate level of abundance corresponding to the previous frontier of the species, and newly-established populations, those where *L. boulandi* had never been observed before 1998 (sites 1-5) (Table 1 and Fig.1).

Among the 15 wild-caught *L. boulandi* populations, four were collected during the autumn of 2004 (September or October), eight during the autumn of 2007, and three during both periods (Table 1). All the orchards sampled are planted with apple trees, and provide *Drosophila* with food resources from September to November. Mean temperatures during this period differ between sites, with an average of around 14°C for the northern populations, and of 17°C for the southern ones. Two sampling procedures were used to collect wasps. In 11 localities, we placed 10-12 traps baited with split bananas in each orchard, where they were exposed to natural colonization for 15 days. In the other four sites (7, 8, 10, 12), we collected 25-30 rotten apples off the ground. The traps and apples were then brought back to the laboratory, and after incubating at approximately 22°C, all emerging *L. boulandi* and *L. heterotoma* were collected daily. For 13 populations, individuals were kept in alcohol (100% ethanol) at -80°C until DNA extraction. For the other two populations (sites 11, 12; 2007 samples), a number of isofemale lines (one foundress per line) were established, and

reared under laboratory conditions. Molecular tests were performed on several emerging females of the first generation (F1), and the lines were declared positive if at least one daughter was infected.

As a PCR positive control, we used a laboratory line of *L. boulandi* infected by LbFV. This line was derived from an uninfected line (obtained through brother sister mating yielding a homozygosity rate in excess of 82%) originating from Sienna (Italy), after injecting viral particles. This artificially-infected line has proven stable over generations for virus infection (Varaldi *et al.*, 2006c).

In the laboratory, the parasitoids were reared under a 12L:12D photoperiod at 25°C, using *D. melanogaster* originating from Ste Foy-lès-Lyon (Rhône, France) as host. *Drosophila* larvae were fed with a standard diet (David, 1962).

PCR detection of LbFV in *L. boulandi* populations. LbFV undergoes at least one DNA stage during its replication, and probably has a DNA genome (Patot *et al.*, 2009). Total DNA was extracted from parasitoid females by crushing individuals individually in 150 µl 5% (w/vol) Chelex solution (Bio-Rad, USA), and 5 µl of proteinase K (20 mg/ml; Eurobio, France). Extracts were incubated overnight at 56°C. After 20 min at 95°C, samples were centrifuged, and 2 µl of the supernatant were used for PCR reactions.

We used a recently-developed molecular marker to detect the presence of LbFV in *L. boulandi* as described in Patot *et al.* (2009). Briefly, a specific viral sequence (accession n°: FM876312) was amplified using the primers I1CL1-F and I1CL1-R in a uniplex PCR reaction, or using viral primers 102-F and 500-R in combination with insect primers RPS2-F and RPS2-R (amplifying a ribosomal protein gene) in a multiplex reaction. This multiplex reaction made it possible to check the quality of the DNA extraction. PCR reactions were

performed in a 25- μ l final volume reaction using 2 μ l of DNA template, 1.5 mM MgCl₂, 50 μ M of each dNTP, 200 nM of each primers, 0.5 U of *Taq* polymerase (EuroBlueTaq, Eurobio, France). The following cycling program was used for both uniplex and multiplex PCR reactions: 1 min at 95°C, 30 sec at 94°C, 30 sec at 56°C, 30 sec at 72°C, 30 cycles and 10 min elongation time at 72°C (PTC-100, MJ Research, USA). PCR products were then analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. For six populations (sites 1, 2, 3, 4, 5, 9), all individuals were tested by multiplex reactions. For the other nine, the individual infection status was tested using uniplex PCR diagnosis, but to confirm the quality of DNA conservation and extractions, we re-analyzed samples with multiplex PCR for three to ten individuals per population. As expected, all individuals proved PCR-positive for the wasp gene, demonstrating the good quality of the DNA extracts, and all the multiplex tests confirmed the infection status previously established by uniplex PCR. The sample sizes used to calculate the prevalence in each of the 15 populations varied from 11 to 120 individuals per population (Table 1).

Viral sequences from various geographical populations of *L. boulardi*. To assess viral variability and possible divergence of the virus among host populations, we sequenced PCR products obtained with the viral primers 102-F / 500-R. Viral samples included 12 of the 15 populations studied from south-eastern France (Table 1), and we also added some samples from other Mediterranean populations originating from Italy (Sienna), and Spain (Palma de Mallorca). The sequences obtained were aligned with the program CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1997).

Host behavioural manipulation induced by LbFV strains. The effect of LbFV on superparasitism behaviour of their hosts was studied for six populations of *L. boulandi* using sympatric host-parasite associations. Five of them corresponded to populations previously described: two in the central area (sites 11 and 12; samples 2007), two in the marginal area (sites 6 and 8), and one in the newly-established populations area (site 2). In order to obtain duplicate data for the last area, we also included the superparasitism behaviour of *L. boulandi* individuals collected in October 2008 at Ville-Sollier (46°80' N-4°52' E). This location is situated 30 km to the north of site 1, and is the most northerly recorded population of *L. boulandi*. Because very few individuals emerged from the eight traps at this site, the LbFV prevalence was not estimated. For all populations, several isofemale lines founded by single infected or uninfected females were established.

For each of these six populations, 25 to 30 females from infected and uninfected isofemale lines were tested after one to five generations raised under laboratory conditions. The superparasitism phenotype was estimated using the same protocol previously described in Varaldi *et al.* (2003). Briefly, individual females (1 or 2 days old) were placed according to their daily rhythm (Fleury *et al.*, 2000) from 5 pm to 10 am on ten first instar *D. melanogaster* larvae in a Petri dish filled with agar and a yeast layer. Forty-eight hours later, three to five larvae from each Petri dish were dissected, and the number of parasites present (eggs and larvae) was counted. The superparasitism behaviour of each female was estimated as the mean number of parasites per parasitized *Drosophila* host.

Statistical analysis. Data were analyzed using the package of the R software version 2.7.0. The correlation between LbFV prevalence, and the latitude of population sampling was analyzed using generalized linear model (GLM). Given the binary nature of the data

202 (presence/absence of infection), we used a binomial error structure (logit link function) and χ^2
203 tests of significance. Wilcoxon tests were used to compare the mean number of parasites per
204 parasitized *Drosophila* host in infected and uninfected lines.

RESULTS

Prevalence of LbFV across the *L. boulandi* range. Rates of infection by LbFV varied according to the geographic origin of the *L. boulandi* populations (Fig. 2). Analyses performed separately on 2004 and 2007 samples both showed a significant negative correlation between latitude and LbFV prevalence (2004: dev = 30.03, ddl = 1, $p < 0.0001$; 2007: dev = 100.15, ddl = 1, $p < 0.0001$). Clearly, infection rates were very high in the central populations, with a mean infection rate of 77.5%. In marginal populations, the prevalence of the virus decreased sharply, reaching an average of 30% whereas in newly-established *L. boulandi* populations, the prevalence slumped to 3.3%, with two populations in this area being apparently virus free (sites 4, 5). Overall, these results show that viral infection is very common, since LbFV was detected in 13 out of 15 populations. However, *L. boulandi* range expansion is associated with a progressive decrease in LbFV prevalence.

Three populations were sampled both in 2004 and 2007, making it possible to test the stability of the viral infection over time. In these three populations, there was no very marked difference between these two sampling years for the prevalence of LbFV, although the difference was statistically significant (dev = 8.59, ddl = 1, $p = 0.0034$). The infection was found to have remained stable at site 10 (Annonay), whereas a slight decrease was observed in 2007 for sites 11 and 12 (Gotheron and Avignon). This could be explained by the fact that the molecular test was performed on F1 females (after one generation in the laboratory) in 2007, whereas it was done on individuals as they emerged from field traps in 2004 (see Material and Methods). If imperfect vertical transmission had occurred, lower prevalence would have been expected when the tests were performed on the F1 generation.

Alongside this study of viral prevalence, we also measured the frequency of *L. boulardi* among *Leptopilina* species emerging from different localities. As previously observed (Fleury *et al.*, 2004), *L. boulardi* outcompeted all other parasitoid species in the southern central area at this time of year, and the coexistence of *L. heterotoma* was only possible in marginal populations of *L. boulardi* (Table 1). In newly-colonized sites, the abundance of *L. boulardi* decreased sharply, but displayed sample variation among sites.

Viral sequence diversity. Twelve 399-bp viral sequences were obtained from the French populations (one per locality), together with two other viral sequences from southern Europe (Italy and Spain). The alignment of the 14 sequences revealed that only the one originating from the locality of Gotheron (site 11) differed from the others; it differed by only 1 bp (position 224), and this may have been caused by a *Taq* polymerase error. Apart from this difference, all the sequences were identical to the previously-reported sequence (Patot *et al.*, 2009).

Host behavioural manipulation induced by LbFV strains. The effect of viral infection on superparasitism behaviour was tested in two populations corresponding to each of the three types of site, *i.e.* central, marginal and newly-colonized sites (Ville-Sollier and sites 2, 6, 8, 11, 12). For all six sites, we compared superparasitism levels in the uninfected and infected lines, but as we were analyzing sympatric host-virus associations, where both the virus and host genotypes may vary, we could not test the site effect. Moreover, this comparison is limited, because behavioural assays were not performed simultaneously at the different sites. In all the virus-host associations tested whatever their origin, LbFV induces a very high level of superparasitism, with a mean of three to ten developing parasitoids observed in each

252 *Drosophila* larva, whereas uninfected lines did not display significant superparasitism (there
253 is usually just one parasitoid per *Drosophila* larva) (Fig. 3). Thus at all sites tested, LbFV was
254 able to manipulate the egg laying behaviour of the parasitoids by inducing superparasitism.

DISCUSSION

Research on species range expansion has paid little attention to the role of parasites in the colonization processes and the establishment of peripheral populations. As parasites can influence the outcomes of invasion by exotic species introduced into a new ecosystem by both direct and indirect effects on their hosts and their interactions (Prenter *et al.*, 2004; Tompkins & Poulin, 2006), they might also influence the frontline advance of species' geographic distribution where recurrent events of colonization and spread occur. In addition, knowing the possible links between parasites and host range expansion could shed light on how parasites influence the invasion success of introduced species. Our study shows that LbFV is widespread in *L. boulandi* populations, but that its prevalence is lower in marginal populations, and is drastically lower in newly-established populations. This prevalence cline suggests that forces other than simple stochastic effects, such as founder effects, are also involved in this pattern. This also raises the question of the impact of LbFV on *L. boulandi* range expansion, its impact on host evolution, and the role of the virus in determining the relative competitive ability of *Leptopilina* species.

A widespread virus with low sequence diversity

LbFV was detected in most of the *L. boulandi* populations in south-eastern France, in Italy and in Spain. The level of viral infection can be extremely high, as reported in central *L. boulandi* populations in the south of France, where infection is virtually fixed. LbFV gene sequencing revealed very little or almost no sequence diversity in France and southern Europe, since just one nucleotide difference was observed in a single sequence. This virtual absence of variation in viral sequences could have several non mutually-exclusive

explanations. First, the low viral diversity might be due to the fact that this gene has been subjected to strong stabilizing selection. So far, we have no information about the function of this gene in the viral genome, but it is possible that the viral sequence corresponds to a highly-conserved core gene involved in the replication machinery of the virus. This possibility is supported by the fact that the sequence, obtained after gene expression analysis, was the most frequent cDNA in the subtracted library (Patot *et al.*, 2009). However, this is the only LbFV sequence to have been identified to date. A second hypothesis is that *L. boulandi* may have only recently invaded Southern Europe, and particularly the south of France. Indeed, *L. boulandi* was first observed and reported in France only thirty years ago (Barbotin *et al.*, 1979), and its spread within France may be recent. This would imply that the spread of LbFV must also be recent, limiting the possibilities for viral sequence diversification. However, even when subjected to strong stabilizing selection and the virus generation time, this would be long enough for mutations accumulate in viral sequences, and so this hypothesis appears rather unlikely. Another possible hypothesis is that the virus itself has only recently spread into *L. boulandi* populations. This could have occurred either from an infected population, where the virus was latent, from newly-introduced infected individuals via the fruit trade, or after cross-species horizontal transfer. We know that such horizontal transfers of vertically transmitted micro-organisms do occur in parasitoid-*Drosophila* communities (Vavre *et al.*, 1999), but to date we have not detected the virus in any other species in the community (Patot *et al.*, 2009). Lastly, a recent selective sweep, in which one mutant viral strain has replaced the resident strain, could also account for the low sequence divergence. Whatever the mechanism, the most likely scenario is probably a recent spread of LbFV into the *L. boulandi* host populations in southern France. Such low-sequence diversity in a virus infecting an insect has previously been observed for another virus that infects *Drosophila*, and which

displays a low prevalence in natural *Drosophila* populations (Carpenter *et al.*, 2007). Here LbFV has spread, and is approaching fixation in some central *L. boulandi* populations. Whatever the situation, the spread of the virus probably results from its ability to induce behavioural alteration of its host, which we observed in all six populations analyzed in this study. Superparasitism allows the virus to be horizontally transferred from an infected parasitoid larva to an uninfected one inside the same *Drosophila* larva (Varaldi *et al.*, 2006a). This complements the imperfect maternal inheritance of viral particles, and the fitness cost for the wasp. Consequently, the level of superparasitism is a major parameter governing infection dynamics (Gandon *et al.*, 2006). This ability to manipulate host behaviour probably explains the high prevalence of LbFV observed in central populations of *L. boulandi*. More sequence information about other viral genes is clearly needed to enable us to decide in favor of one of the hypotheses discussed above.

Decreased viral prevalence during host range expansion

Our study reveals that the pattern of LbFV prevalence in natural *L. boulandi* populations is correlated with the abundance and geographic distribution of its hosts. Whereas LbFV is well established, and has reached very high prevalence in central southern populations, virus infection decreases in marginal populations, to reach a very low frequency in newly established peripheral populations. This indicates that the establishment and maintenance of *L. boulandi* populations at new sites outside the ancient natural range of the species mainly involves uninfected individuals. Studies of single introduction events have reported comparable results in other insect species infected by *Wolbachia* bacteria, the prevalence of which differs drastically between the geographical regions, with a loss of infection in

introduced populations (Shoemaker *et al.*, 2000; Reuter *et al.*, 2005). What mechanism could account for the pattern observed in our study?

Laboratory experiments have shown that viral infection in *L. boulandi* females exacts no cost on adult survival, but slightly impairs the developmental rate and adult body size, and leads to a significant decrease in locomotor activity (Varaldi *et al.*, 2005). Although we do not know how these costs are expressed under natural conditions, especially under unusual ecological conditions in newly-colonized sites, it is possible that the cost of infection is greater at the edges of the geographical range of the species, giving a greater advantage to virus-free individuals. It is also possible that the cost of infection affects the dispersal ability of the wasp. Dispersion would then mainly involve uninfected individuals, and so it is they colonize new sites. Since the peripheral populations have been founded recently, the virus has not yet had time to spread, and so newly-colonized sites show lower viral prevalence.

A second scenario implies that parameters other than the cost of infection are involved in the spread of infection, such as the rates of horizontal or vertical transmission, and that these are different in the newly-established populations. Under the most northerly environmental conditions, abiotic factors such as temperature may affect viral transmission. Indeed, temperature is known to play a crucial role in mediating the outcome of host-parasite interactions, because insects are ectotherms. In consequence, temperature can have direct effects on the host susceptibility, host recovery, parasite mortality and parasite replication (reviewed by Thomas & Blanford, 2003). For example, several authors have reported that larval host susceptibility to the nucleopolyhedrosis virus (NPV) depends on temperature, which controls the kinetics of NPV replication (Kobayashi *et al.*, 1981; Johnson *et al.*, 1982). Depending on the temperature-sensitivity profiles of the partners, the impact of temperature change on the host-parasite association could be advantageous for the host and detrimental for

the virus. In NPV, lower temperature seems to inhibit virus replication (Frid & Myers, 2002). Although the biological model is different, the effect of temperature or of other abiotic factors, could lead to a decrease or loss of LbFV infection in peripheral host populations through reduction of vertical or horizontal transmission.

Another possible explanation for the lower LbFV prevalence in peripheral *L. boucardi* populations could be simply a density-dependent process in the invasion dynamics, without any change in transmission parameters or infection cost. In new-colonized sites, where the abundance of *L. boucardi* and the level of superparasitism are low, LbFV might fail to spread because the rate of horizontal transmission is not sufficient to offset the incomplete maternal inheritance of the virus. In central populations, high *L. boucardi* density allows high rates of horizontal transmission to occur, and these compensate for the incomplete vertical transmission and the cost of infections, thus allowing the virus to spread. This suggests that once peripheral *L. boucardi* populations have become established, the virus may spread into these new populations once the density reaches a threshold that allows superparasitism to occur.

Finally, the presence of the virus severely impairs the competitive effectiveness of *L. boucardi* versus *L. heterotoma* and *L. boucardi* (Patot *et al.*, *in prep*). Consequently, since *L. heterotoma* is becoming increasingly frequent, as *L. boucardi* populations expand northward they are confronted by established *L. heterotoma* populations. When it colonizes new sites, uninfected *L. boucardi* may be more likely to establish new populations than infected ones, thus leading to the pattern observed. However, the intensity of inter-species competition in these situations remains to be determined.

Conclusion

374 Many empirical examples of parasites changing the outcome of host competitive interactions
375 have been reported during the biological invasion by exotic species introduced into a new
376 ecosystem (de Castro & Bolker, 2005; Hatcher *et al.*, 2006). Successful colonization and
377 invasion is often due to the fact that invaders are parasite free as a consequence of stochastic
378 or selective events. Our study illustrates that a similar phenomenon can occur as the
379 geographic range of a species expands. During range expansion, the development of newly-
380 colonized sites can be assimilated to multiple introductions, leading to successive repetitions
381 of the invasion process. Our results clearly show that LbFV prevalence has decreased during
382 the geographic range expansion of its host *L. boulandi*. This pattern is unlikely to be the result
383 of stochastic factors, since a cline was observed. Clearly, selective constraints are at work,
384 limiting the spread of infection within the newly-established populations. Since the virus has a
385 detrimental effect on its host, lower virus prevalence could increase the competitive ability of
386 *L. boulandi* in newly-colonized sites. Indeed, an uninfected parasitoid that does not express
387 strong superparasitism behaviour has greater fitness, since there is no egg wastage as a result
388 of superparasitism. From another point of view, and in view of the high viral prevalence in
389 central populations, infection may limit the first step in colonization, and LbFV could be
390 interpreted as a barrier to the faster expansion and invasion of *L. boulandi*. In the central area
391 of *L. boulandi* distribution, a high infection rate may also contribute to maintaining parasitoid
392 diversity, particularly the coexistence of *L. heterotoma* that has a very low level of abundance
393 (Fleury *et al.*, 2004). By inducing harmful effects on its host, LbFV would reduce the
394 superiority of *L. boulandi*, thus offsetting the imbalance in the competitive abilities of
395 *Leptopilina* species, and help to ensure the coexistence of the weaker competitor,
396 *L. heterotoma*. The challenge that now remains is to validate the ecological scenarios that
397 could explain this cline in viral prevalence across the geographical range expansion of

398 *L. boulandi*, and to determine the precise impact of this widespread, heritable virus on the
399 *Drosophila*-parasitoid community.

REFERENCES

- Allemand R, Fleury F, Lemaitre C, Boulétreau M (1999) Dynamique des populations et interactions compétitives chez deux espèces de *Leptopilina*, parasitoïdes de drosophiles, dans la vallée du Rhône (Hymenoptera: Figitidae). *Annales de la Société Entomologique de France* **35 (suppl.)**, 97-103.
- Barbotin F, Carton Y, Kelner-Pillault S (1979) Morphologie et biologie de *Cothonaspis* (*Cothonaspis*) *boulardi* n. sp. parasite de Drosophiles. *Bulletin de la Société entomologique de France* **87**, 20-26.
- Carpenter JA, Obbard DJ, Maside X, Jiggins FM (2007) The recent spread of a vertically transmitted virus through populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology* **16**, 3947-3954.
- David J (1962) A new medium for rearing *Drosophila* in axenic condition. *Drosophila Info Service* **36**.
- de Castro F, Bolker B (2005) Parasite establishment and host extinction in model communities *Oikos* **111**, 501-513.
- Enserink M (2002) Infectious disease. West Nile's surprisingly swift continental sweep. *Science* **297**, 1988-1989.
- Fleury F, Allemand R, Vavre F, Fouillet P, Boulétreau M (2000) Adaptive significance of a circadian clock: temporal segregation of activities reduces intrinsic competitive inferiority in *Drosophila* parasitoids *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **267**, 1005-1010.

422 Fleury F, Ris N, Allemand R, *et al.* (2004) Ecological and genetic interactions in *Drosophila*-
 423 parasitoids communities: a case study with *D. melanogaster*, *D. simulans* and their
 424 common *Leptopilina* parasitoids in south-eastern France. *Genetica* **120**, 181-194.

425 Frid L, Myers JH (2002) Thermal ecology of western tent caterpillars *Malacosoma*
 426 *californicum pluviale* and infection by nucleopolyhedrovirus. *Ecological Entomology*
 427 **27**, 665-673.

428 Gandon S, Rivero A, Varaldi J (2006) Superparasitism evolution: adaptation or manipulation?
 429 *American Naturalist* **167**, E1-22.

430 Hatcher MJ, Dick JT, Dunn AM (2006) How parasites affect interactions between
 431 competitors and predators. *Ecology Letters* **9**, 1253-1271.

432 Hudson PJ, Dobson AP, Lafferty KD (2006) Is a healthy ecosystem one that is rich in
 433 parasites? *TRENDS in Ecology and Evolution* **21**, 381-385.

434 Johnson DW, Boucias DB, Barfield CS, Allen GE (1982) A temperature-dependent
 435 developmental model for a nucleopolyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar,
 436 *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) *Journal of Invertebrate Pathology*
 437 **40**, 292-298.

438 Kobayashi M, Inagaki S, Kawase S (1981) Effect of high temperature on the development of
 439 nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate*
 440 *Pathology* **38**, 386-394.

441 Mitchell CE, Power AG (2003) Release of invasive plants from fungal and viral pathogens.
 442 *Nature* **421**, 625-627.

443 Moller A (2005) Parasitism and the regulation of host populations In: *Parasitism and*
 444 *Ecosystem* (eds. Thomas F, Renaud F, Guegan JF), pp. 43-53. Oxford Univ Press, 198
 445 Madison avenue, New York, NY 10016 USA

446 Montllor CB, Maxmen, A., Purcell, A.H. (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit
 447 pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* **27**, 189-
 448 195.

449 Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A (2008) Genomics and Evolution of Heritable
 450 Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics* **42**, 165-190.

451 Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in
 452 aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of*
 453 *Sciences, USA* **100**, 1803-1807.

454 Patot S, Lepetit D, Charif D, Varaldi J, Fleury F (2009) Molecular detection, penetrance, and
 455 transmission of an inherited virus responsible for behavioral manipulation of an insect
 456 parasitoid. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 703-710.

457 Poulin R (1999) The functional importance of parasites in animal communities: many roles at
 458 many levels? *International Journal for Parasitology* **29**, 903-914.

459 Prenter J, Macneil C, Dick JT, Dunn AM (2004) Roles of parasites in animal invasions.
 460 *TRENDS in Ecology and Evolution* **19**, 385-390.

461 Reuter M, Pedersen JS, Keller L (2005) Loss of *Wolbachia* infection during colonisation in
 462 the invasive Argentine ant *Linepithema humile*. *Heredity* **94**, 364-369.

463 Russell JA, Moran NA (2006) Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation
 464 among symbionts and across temperatures. *Proceedings of the Royal Society B:*
 465 *Biological Sciences* **273**, 603-610.

466 Scarborough CL, Ferrari J, Godfray HC (2005) Aphid protected from pathogen by
 467 endosymbiont. *Science* **310**, 1781.

468 Shoemaker DD, Ross KG, Keller L, Vargo EL, Werren JH (2000) *Wolbachia* infections in
 469 native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.). *Insect molecular*
 470 *biology* **9**, 661-673.

471 Slothouber Galbreath JG, Smith JE, Terry RS, Becnel JJ, Dunn AM (2004) Invasion success
 472 of *Fibrillanosema crangonycis*, n.sp., n.g.: a novel vertically transmitted
 473 microsporidian parasite from the invasive amphipod host *Crangonyx pseudogracilis*.
 474 *International Journal for Parasitology* **34**, 235-244.

475 Thomas MB, Blanford S (2003) Thermal biology in insect-parasite interactions. *TRENDS in*
 476 *Ecology and Evolution* **18**, 344-350.

477 Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X
 478 windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by
 479 quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* **25**, 4876-4882.

480 Tompkins D, Poulin R (2006) Parasites and Biological Invasions. In: *Biological invasions in*
 481 *New Zealand* (eds. Allen RB, WG L), pp. 67-84. Springer-Verlag Berlin, Heidelberger
 482 Platz 3, D-14197 Berlin, Germany.

483 Tompkins D, White A, Boots M (2003) Ecological replacement of native red squirrels by
 484 invasive greys driven by disease *Ecology Letters* **6**, 189-196.

485 Tompkins DM, Begon M (1999) Parasites can regulate wildlife populations. *Parasitology*
 486 *Today* **15**, 311-313.

487 Tompkins DM, Sainsbury AW, Nettleton P, Buxton D, Gurnell J (2002) Parapoxvirus causes
 488 a deleterious disease in red squirrels associated with UK population declines.
 489 *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **269**, 529-533.

490 Torchin M, Mitchell C (2004) Parasites, pathogens, and invasions by plants and animals
 491 *Frontiers in ecology and the environment* **2**, 183-190.

492 Torchin ME, Lafferty KD, Dobson AP, McKenzie VJ, Kuris AM (2003) Introduced species
 493 and their missing parasites. *Nature* **421**, 628-630.

494 Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T (2004) Host plant specialization governed by facultative
 495 symbiont. *Science* **303**, 1989.

496 Varaldi J, Bouletreau M, Fleury F (2005) Cost induced by viral particles manipulating
 497 superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. *Parasitology* **131**,
 498 161-168.

499 Varaldi J, Fouillet P, Ravallec M, *et al.* (2003) Infectious behavior in a parasitoid. *Science*
 500 **302**, 1930.

501 Varaldi J, Gandon S, Rivero A, Patot S, Fleury F (2006a) A Newly Discovered Virus
 502 Manipulates Superparasitism Behavior in a Parasitoid Wasp. In: *Insect symbiosis* (ed.
 503 Bourtzis KMTA), pp. 119-139. CRC Press.

504 Varaldi J, Petit S, Bouletreau M, Fleury F (2006b) The virus infecting the parasitoid
 505 *Leptopilina boulardi* exerts a specific action on superparasitism behaviour.
 506 *Parasitology* **132**, 747-756.

507 Varaldi J, Ravallec M, Labrosse C, *et al.* (2006c) Artificial transfer and morphological
 508 description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid
 509 wasp. *Journal of Insect Physiology* **52**, 1202-1212.

510 Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Bouletreau M (1999) Phylogenetic evidence for
 511 horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular*
 512 *Biology and Evolution* **16**, 1711-1723.

513 Werren JH, Baldo L, Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate
 514 biology. *Nature Reviews Microbiology* **6**, 741-751.

515 Wood CL, Byers JE, Cottingham KL, *et al.* (2007) Parasites alter community structure.
516 *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **104**, 9335-9339.

517 Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly SE, *et al.* (2001) A newly discovered bacterium associated
518 with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps.
519 *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 12555-12560.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to INRA centers (Avignon and Gothenon), and to the landowners for allowing us to collect insects in their orchards. This work was funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS 5558), Lyon1 University, and the French Ministry of Education and Research, "Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Fonds National de la Science, ACI Jeunes Chercheurs 2004 Projet 10013".

FIGURE LEGENDS

Table 1 Collection of *Leptopilina boulardi* populations, and prevalence of LbFV

Fig. 1 Relative abundance of *L. boulardi* (compared to all *Leptopilina* individuals: *L. heterotoma* + *L. boulardi*) along the Rhône valley (north-south latitude gradient) in 1998 (modified according to Allemand *et al.*, 1999).

Fig. 2 Prevalence of LbFV across the populations sampled in south-eastern France, and model predictions of prevalence.

Fig. 3 Superparasitism behaviour of uninfected (UI) and infected (I) lines from six *L. boulardi* populations in south-eastern France: Ville-Sollier (4 UI and 4 I lines), Cailloux-sur-Fontaine (4 UI and 4 I lines), Villette-de-Vienne (4 UI and 1 I lines), Epinouze (4 UI and 2 I lines), Gotheron (2 UI and 4 I lines) and Avignon (4 UI and 1 I lines).

TABLE

Table 1

Site n°	Locality	Geographic coordinates	Altitude	<i>L. boulardi</i> proportions ^a	Sampling year	n ^b	LbFV prevalence	Sequencing
1	Chasselay	45°87' N-4°77' E	235 m	0.05 (516)	2007	11	9 %	x
2	Cailloux-sur-Fontaine	45°85' N-4°87' E	258 m	0.41 (431)	2007	29	7 %	x
3	St Maurice-de-Beynost	45°83' N-4°98' E	200 m	0.62 (648)	2007	30	3 %	x
4	St Foy-lès-Lyon	45°74' N-4°80' E	298 m	0.52 (897)	2007	58	0 %	
5	St Laurent-d'Agny	45°64' N-4°69' E	380 m	0.03 (524)	2007	12	0 %	
6	Villette-de-Vienne	45°59' N-4°91' E	223 m	0.58 (53)	2007	25	4 %	x
7	Sonnay	45°36' N-4°91' E	260 m	0.66 (632)	2007	120	29 %	x
8	Epinouze	45°31' N-4°93' E	210 m	0.69 (566)	2007	15	20 %	x
9	Lens-Lestang	45°28' N-5°03' E	237 m	0.40 (1077)	2004	59	10 %	x
10	Annonay	45°23' N-4°67' E	340 m	0.96 (1617) 0.63 (100)	2004 2007	40 30	65 % 67 %	
11	Gotheron	44°93' N-4°93' E	190 m	/	2004	40	90 %	x
				0.97 (718)	2007	18	83 %	
12	Avignon	43°95' N-4°82' E	21 m	/	2004	40	95 %	x
				1 (127)	2007	23	70 %	
13	Antibes	43°58' N-7°20' E	10 m	1 (10)	2004	40	80 %	x
14	Bras	43°47' N-5°95' E	300 m	1 (50)	2004	40	83 %	x
15	Pierrefeu-du-Var	43°14' N-6°08' E	441 m	1 (50)	2004	40	55 %	x

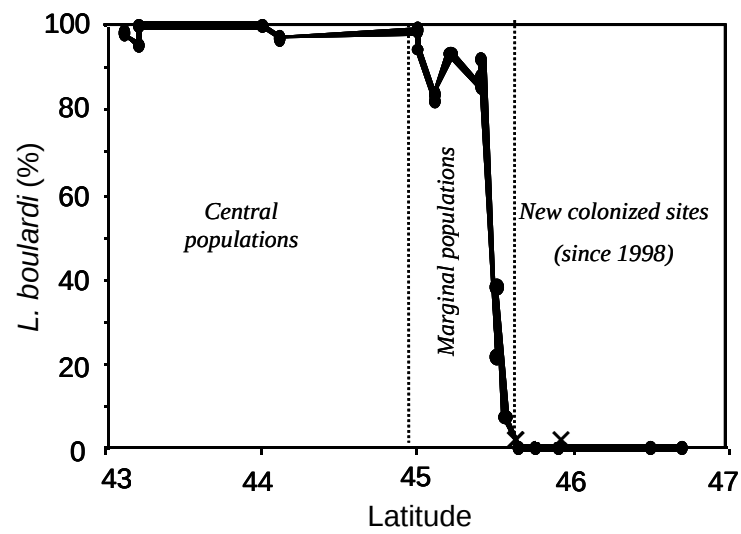
Samples correspond to newly-colonized (1-5), marginal (6-10) and central (11-15) populations.

^a Frequency of *L. boulardi* among *Leptopilina* species (*L. boulardi* and *L. heterotoma*). The overall abundance of *Leptopilina* emerging from all the traps or apples is shown in parentheses.

^b Number of independent females or isofemale lines tested by PCR in order to estimate LbFV prevalence.

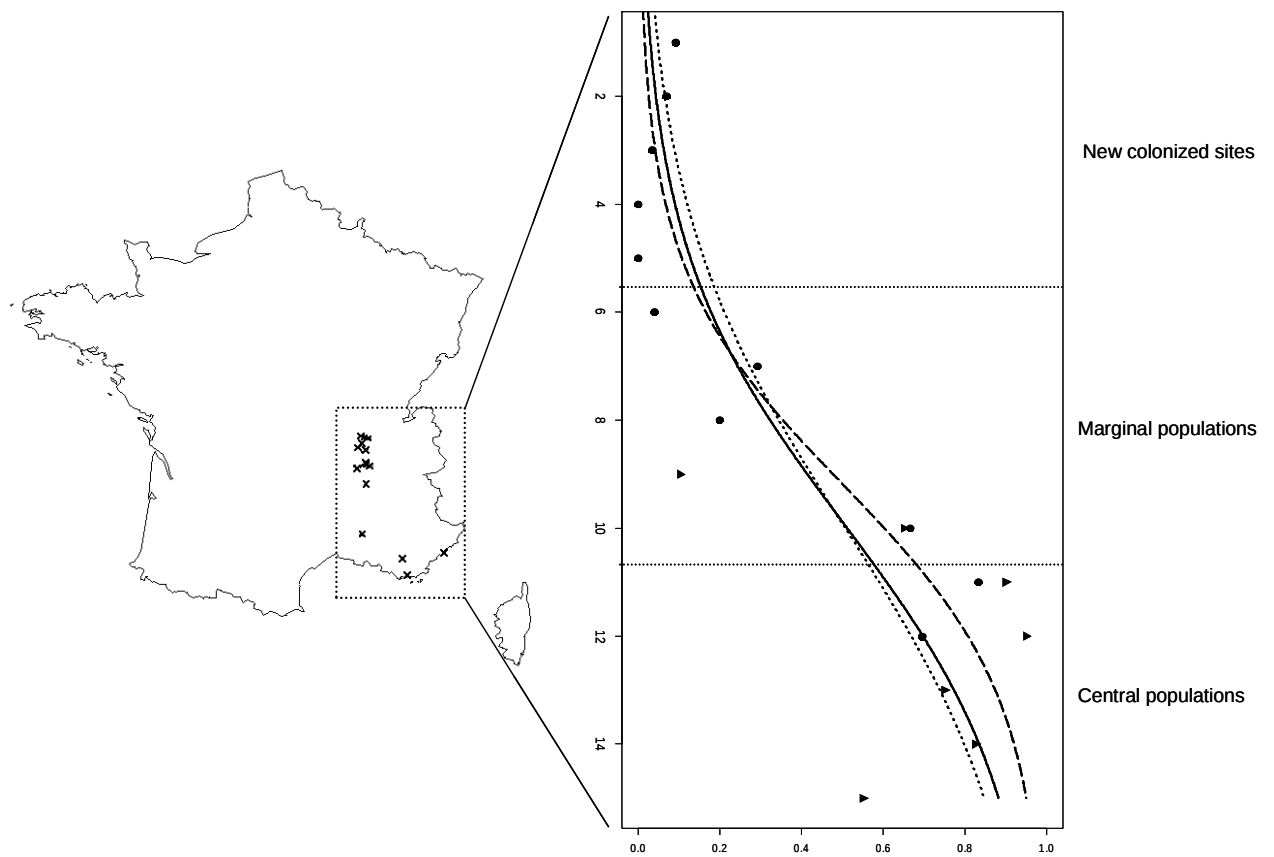
FIGURES

Fig. 1:



The three population groups described in this study are separated on the figure by dotted lines.

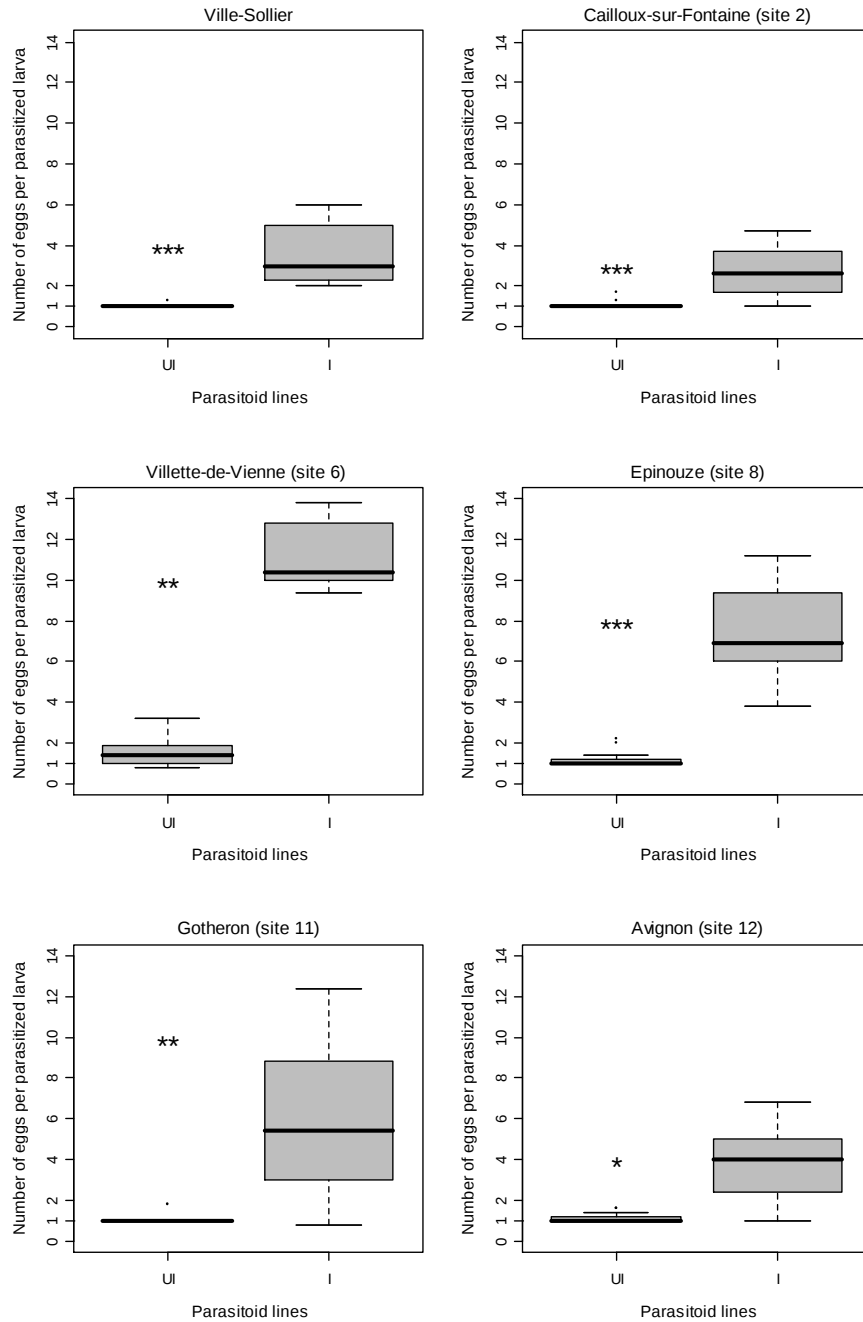
Fig.2



▲: prevalence in populations sampled in 2004; ●: prevalence in populations sampled in 2007.

Continuous line: model prediction for 2004 and 2007; dotted line: model prediction for 2004;

dashed line: model prediction for 2007.

Fig.3

The infection status of the females tested was checked by molecular tests. The horizontal lines in the boxes indicate the median upper of the mean of the number of parasitoid eggs per parasitized host calculated for each female. The bottom and top of the box show the 25th and 75th percentiles, respectively. The vertical dashed lines and the points (outliers) indicate the spread of the data. Wilcoxon test: * = $p < 0.01$, ** = $p < 0.001$, *** = $p < 0.0001$.

*A*analyse de la variabilité phénotypique du superparasitisme

Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence une grande variabilité dans l'expression du phénotype de superparasitisme entre populations et entre lignées au sein d'une population. Ces variations peuvent avoir diverses origines: (i) le statut d'infection ; (ii) une variabilité génétique virale ayant des conséquences sur la manipulation du comportement ; (iii) une variabilité génétique de l'hôte ayant des conséquences sur le comportement de superparasitisme ; (iv) les interactions entre génotype du parasite et génotype de l'hôte.

En testant le comportement de ponte de lignées à l'origine identifiées de phénotype S (par tests phénotypiques et moléculaires) (souche de Gotheron ; cf. partie I de ce chapitre), nous avons noté une variabilité significative entre lignées ($F(8,45) = 4,51$, $P = 4,45.10^{-4}$). Des différences dans l'intensité du superparasitisme existent donc indépendamment de la présence/absence du virus. Nous nous sommes intéressés aux deux facteurs suivants susceptibles d'expliquer cette variabilité du comportement : (ii) variabilité génétique virale et (iii) variabilité génétique insecte.

L'effet du « génotype du symbiote » sur l'intensité d'expression du phénotype étendu a été mis en évidence dans le système puceron *Acyrtosiphon pisum* / symbiote *Hamiltonella defensa*. Cette bactérie lui confère entre autres des capacités de résistance face aux attaques du parasitoïde *Aphidius ervi* (Oliver *et al.* 2003). Cependant, Oliver *et al.* (2005) montrent que différents isolats bactériens associés à une même lignée clonale de pucerons confèrent différents niveaux dans la capacité de résistance de leur hôte au prédateur *A. ervi*. A l'inverse, un même isolat de *H. defensa* injecté à différentes lignées d'*A. pisum* ne montre pas de variation significative dans le niveau de résistance. Les auteurs expliquent ainsi que la variation dans le phénotype « résistance au parasitisme » n'est pas due au génotype de l'hôte *A. pisum* mais à l'isolat bactérien présent. Un second exemple concerne cette fois le symbiote primaire *Buchnera aphidicola*, toujours chez le puceron *A. pisum* (Baumann *et al.* 1995a; Baumann *et al.* 1995b). Cette bactérie permet à son hôte d'exploiter les ressources pauvres ou déséquilibrées que représente la sève et se révèle donc obligatoire pour le puceron en lui

fournissant les acides aminés essentiels à son développement. L'étude de l'expression génique de la bactérie chez son hôte a révélé l'existence d'une mutation ponctuelle dans le génome de *Buchnera* dont l'effet est de réduire la réponse transcriptionnelle aux chocs thermiques et donc la tolérance du puceron aux températures élevées (Dunbar *et al.* 2007). En revanche, la mutation semble améliorer la reproduction du puceron à basse température.

En ce qui concerne le rôle du génotype hôte sur l'expression de la variabilité du phénotype étendu, plusieurs études peuvent être données en exemples. Le rôle de l'espèce hôte sur la densité en bactéries *Wolbachia* a été mis en évidence au cours de différentes études qui ont principalement été menées chez les drosophiles. Elles montrent que la même souche de *Wolbachia* est maintenue en plus forte densité chez *D. simulans* que chez *D. melanogaster* (Boyle *et al.* 1993; Poinot *et al.* 1998; McGraw *et al.* 2002). En cas de multi-infections (présence de plusieurs souches de *Wolbachia* au sein du même hôte), il a été mis en évidence l'effet du génotype hôte sur la densité des souches bactériennes (Mouton *et al.* 2007). Toujours sur le modèle *Wolbachia*, Bordenstein *et al.* (2001) se sont intéressés à l'analyse génétique des différents types d'incompatibilité cytoplasmique (IC) chez les guêpes parasitoïdes *Nasonia*, un genre de trois espèces, système modèle dans l'étude de l'IC. Les auteurs ont montré le rôle du « génotype » nucléaire de l'insecte dans la différence de types d'IC observés parmi les espèces de *Nasonia*.

I. Effet du génotype viral

L'objectif de l'expérience était d'associer par transfert horizontal différents génotypes viraux à un même génotype parasitoïde afin de tester l'hypothèse d'un polymorphisme viral déterminant l'intensité de la manipulation comportementale. Deux expériences indépendantes ont été réalisées : nous distinguerons l'expérience A visant à tester l'existence d'une variabilité virale intra-population, c'est-à-dire que les lignées donneuses sont issues de la même population, de l'expérience B où les femelles donneuses proviennent de différentes populations (Tableau IV.1).

Tableau IV.1 : Origine des lignées de *L. bouhardi* superparasitantes (phénotype S) utilisées pour les transferts horizontaux de particules virales dans un même génotype de parasitoïdes et expériences réalisées.

Localité (pays)	Nombre de lignées	Date de piégeage	Expérience
Gotheron (France)	9	Septembre 2006	A
Gotheron (France)	1	Septembre 2007	B
Epinouze (France)	2	Septembre 2007	B
Villette de Vienne (France)	1	Septembre 2007	B
Rio de Janeiro (Brésil)	1	2007	B
Palma de Majorque (Espagne)	1	2006	B

Expérience A : transfert horizontal de particules virales provenant de lignées d'une même population.

Expérience B : transfert horizontal de particules virales provenant de populations différentes.

La lignée receveuse est à chaque fois la lignée iso-génique NS_{réf}. Le protocole développé pour induire le transfert horizontal de l'agent viral consiste à enfermer dans une boîte de Pétri (5,5 cm de diamètre, sans ergot) contenant 50 larves de *D. melanogaster* (souche de S^{te} Foy-lès-Lyon, France), une femelle fécondée de la lignée NS_{réf} durant 24h, à 21°C (photopériode de 12h ; humidité relative de 70%) (Figure IV.1). Cette femelle NS_{réf} est ensuite remplacée par une femelle de phénotype S non fécondée issue d'une des lignées choisies, durant 24h à 25°C (photopériode de 12h ; humidité relative de 70%). La femelle non fécondée S qui va superparasiter et donc injecter le virus dans une larve de drosophile ne produira que des mâles ce qui permettra de s'assurer que toutes les femelles obtenues proviennent de la lignée NS_{réf} éventuellement néo-infectées par le virus de la lignée (Figure IV.1). La plus basse température utilisée durant les 24 premières heures de l'expérience nous permet de fournir des larves encore assez petites à la seconde femelle parasitoïde. Suite à leur période d'infestation, toutes les femelles *L. bouhardi* utilisées au cours de l'expérience ont été conservées dans l'alcool (EtOH-100) à -80°C avant l'extraction de leur ADN.

Les femelles émergentes (F1) ont été isolées puis fécondées individuellement avec des mâles issus de la lignée NS_{réf}, ont été ensuite mises en développement durant 24h sur des drosophiles saines et ont enfin été récupérées afin d'être testées par PCR. Les lignées iso-femelles issues des individus montrant un signal positif en PCR ont été conservées en élevage. Plusieurs générations après le transfert, le comportement de superparasitisme et le diagnostic moléculaire ont été réalisés pour chacune des lignées conservées.

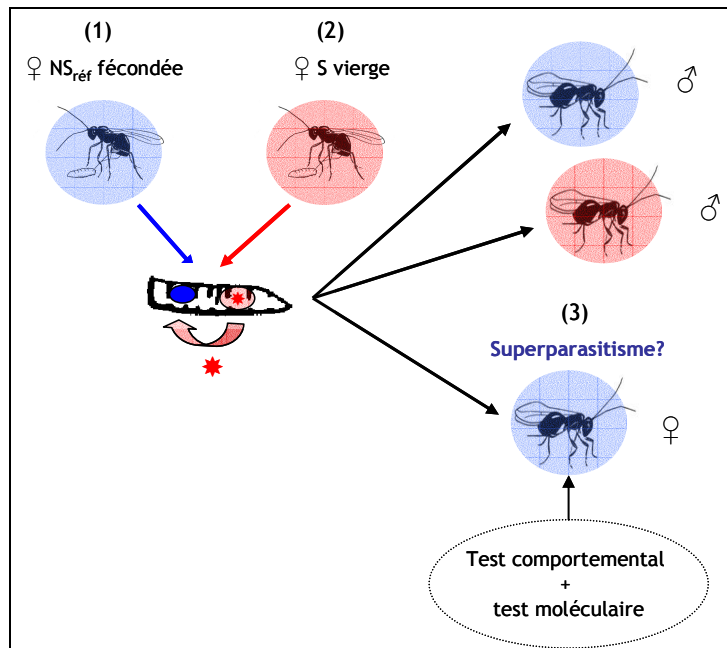


Figure IV.1 : Transmission du phénotype superparasitant par transfert horizontal de LbFV : représentation schématique du protocole.

Afin d'induire le transfert horizontal de particules virales d'un individu S vers un individu NS, nous avons fait parasiter une larve de *D. melanogaster* (stades L1 et L2) successivement par deux femelles *L. boulardi* : une femelle receveuse issue d'une lignée NS, négative en PCR (test de présence de LbFV) et fécondée, et une femelle donneuse provenant d'une lignée S, positive en PCR et vierge (Figure x). *L. boulardi* étant une espèce haplo-diploïde, les œufs fécondés se développent en femelles (diploïdes) alors que les œufs non fécondés sont à l'origine de mâles (haploïdes). Utiliser des femelles vierges comme lignées donneuses et des femelles fécondées comme lignées receveuses nous permet d'être assurés que les femelles émergentes (F1) sont issues de la lignée fécondée, c'est-à-dire de la lignée NS receveuse.

(1) Une femelle NS_{réf} fécondée est d'abord mise à pondre. (2) Une femelle S vierge remplace la précédente. (3) L'infection virale et le comportement des femelles émergentes sont étudiés.

La couleur rouge ou bleue est une représentation du génotype de l'individu parasitoïde.

I.1. Transferts intra-population (expérience A)

Nous avons réalisé des expériences de transferts de particules virales provenant de neuf lignées de la population de Gothenburg vers une même lignée homozygote de parasitoïdes initialement non infectée (lignée NS_{réf}) (Tableau IV.1). Entre deux et 12 femelles émergentes (F1) de chaque lignée ont été analysées par PCR. Le transfert a réussi pour six lignées sur les neuf utilisées. Les individus F1 testés positifs par PCR ont été à l'origine de lignées iso-femelles maintenues en élevage afin de réaliser des tests comportementaux au cours des générations suivantes. Nous avons étudié le comportement de superparasitisme des femelles *L. boulardi* issues de chacun de ces réplicats 15 générations après le transfert. Cinq femelles par lignée ont été testées, toutes issues d'un même tube, ainsi que cinq femelles issues de la lignée S_{réf} et cinq de la lignée NS_{réf} (origine du virus de la lignée S_{réf} : Gothenburg ; cf. chapitre

I, partie III.2.1.). Un test moléculaire a permis de confirmer le statut d'infection de chacune des femelles testées.

On peut noter que toutes les lignées nouvellement infectées montrent un niveau moyen de superparasitisme supérieur à la lignée témoin $NS_{réf}$ (Figure IV.2). Cependant, il n'y a pas d'effet significatif des lignées virales sur l'intensité de la manipulation ($F(6,28) = 0,36$, $P = 0,90$). Cette expérience n'a donc pas permis de mettre en évidence un effet de la variabilité virale sur l'intensité du comportement de superparasitisme à l'échelle intra-population.

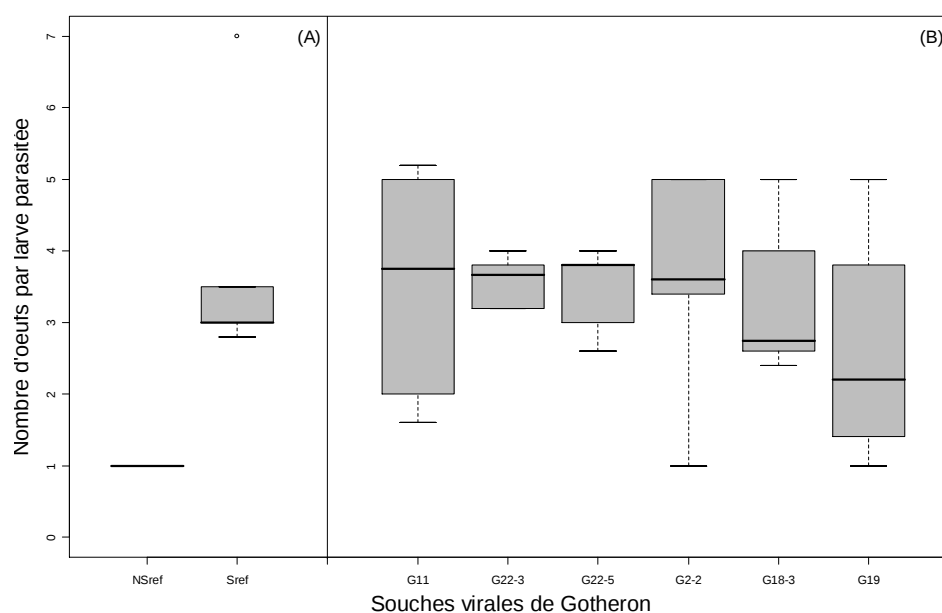


Figure IV.2 : Variabilité virale analysée après transfert horizontal de LbFV à l'échelle intra-population : comportement de ponte des femelles émergentes.

Transferts de particules virales provenant de neuf lignées de la population de Gotheron vers une même souche homozygote de parasitoïdes initialement non infectée.

(A) : comportement de ponte d'individus issus des lignées de référence superparasitantes ($S_{réf}$) et non superparasitantes ($NS_{réf}$).

(B) : comportement de ponte des femelles émergentes de l'expérience de transferts.

I.2. Transferts inter-populations (expérience B)

Nous avons réalisé des expériences de transferts de particules virales provenant de cinq populations vers une même lignée homozygote de parasitoïdes initialement non infectée (lignée $NS_{réf}$) (Tableau IV.1).

Les particules virales de quatre populations sur les cinq ont été transférées avec succès. Une femelle F1 pour Epinouze (sur 16 testées), sept pour Palma de Majorque (sur 17 testées) et trois pour Gotheron (sur 21 testées) ont montré un signal positif en PCR. Chacune a

permis d'établir une lignée iso-femelle. Un individu émergent (F1) issu du transfert de la lignée de Rio de Janeiro est apparu infecté par test PCR. Malheureusement, la lignée iso-femelle engendrée a été perdue à la génération suivante. Au final, ce sont les lignées néo-infectées de trois origines géographiques différentes qui ont pu être analysées : Epinouze, Palma de Majorque et Gothenburg. Pour chacune de ces localités, une seule lignée iso-femelle a été conservée pour l'étude en trois réplicats.

Sept générations après transfert, pour chacune des trois localités où le transfert a réussi, un test comportemental a été réalisé sur trois individus de chacun des trois réplicats ainsi que sur huit individus issus de trois lignées $S_{\text{réf}}$ et $NS_{\text{réf}}$. Comme précédemment, un test moléculaire a permis de confirmer le statut d'infection de chacune des femelles testées.

Là encore, les analyses ne permettent pas de mettre en évidence un effet de l'origine géographique des souches virales sur le degré de manipulation du comportement de *L. boulardi* ($F(3,30) = 0,371$, $P = 0,78$) (Figure IV.3). Pour chaque lignée, les femelles testées sont issues de la même mère. La variabilité du comportement de ponte pourrait donc être due à des effets maternels ou « tube d'élevage ». Mais cela ne semble pas le cas dans cette expérience car l'effet « tubes » s'est révélé non significatif (analyse hiérarchique de la variance : $F(3,21) = 1,46$, $P = 0,25$). Notons ici le faible niveau d'expression du superparasitisme (légèrement supérieur à deux œufs par larve de drosophile) (Figure IV.3).

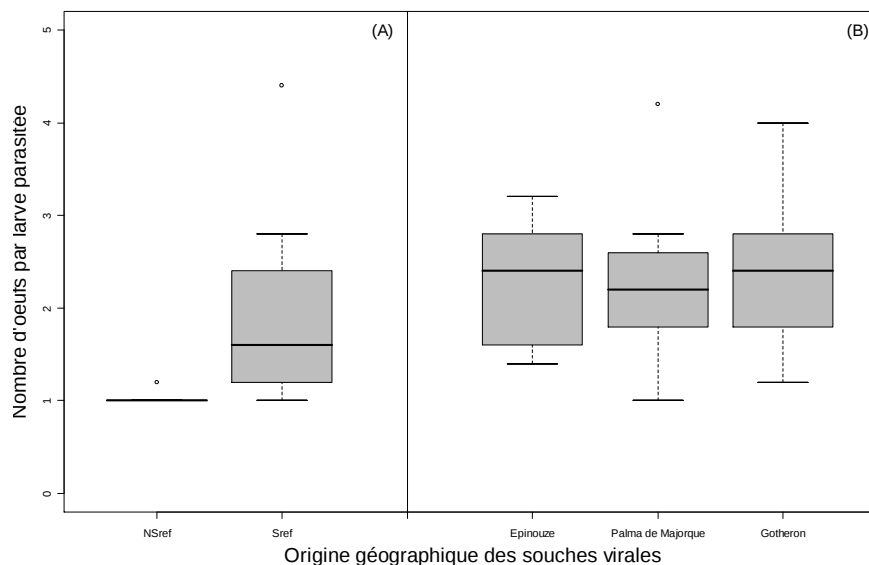


Figure IV.3 : Variabilité virale analysée après transfert horizontal de LbFV dans un même génotype hôte issu de différentes populations : comportement de ponte des femelles émergentes.

Transferts de particules virales provenant de trois populations (Epinouze, Palma de Majorque et Gothéron) vers une même souche homozygote de parasitoïdes initialement non infectée.

(A) : comportement de ponte d'individus issus des lignées de références superparasitantes (S_{réf}) et non superparasitantes (NS_{réf}).

(B) : comportement de ponte des femelles émergentes de l'expérience de transferts.

II. Effet du génotype de l'insecte

L'objectif de l'expérience était d'associer différents génotypes parasitoïdes issus d'une même population (Gotheron) à un même génotype viral afin de tester l'hypothèse d'un polymorphisme chez le parasitoïde déterminant l'intensité de l'expression du superparasitisme ou celle d'une éventuelle présence de gènes de résistance à l'expression du superparasitisme.

Cela a été réalisé dans le cadre des croisements exposés dans le chapitre III consacré à l'étude de la prévalence de LbFV dans les populations naturelles de *L. boulardi*. Nous nous sommes intéressés à l'origine de la variabilité phénotypique du comportement de superparasitisme sous l'effet du génotype de l'insecte en analysant l'expérience suivante : croisement d'une femelle issue de la souche de référence S_{réf} avec un mâle de phénotype NS issu de différentes lignées de la population de Gothéron : S_{réf} × NS (comparaison d'un « même génotype viral » dans neuf génotypes insectes) (Figure III.7b. p.63). Il est à noter que l'étude du comportement a été menée sur deux jours : les résultats des croisements de cinq

lignées ont été analysées un jour (jour 1) et ceux des quatre lignées restantes le lendemain (jour 2). Un test moléculaire a permis de confirmer le statut d'infection de chacune des femelles testées.

Au vu des résultats obtenus (Figure III.7b. p. 63), nous ne pouvons conclure à un effet du génotype de l'insecte, la différence de comportement de ponte entre croisements des différentes lignées paternelles avec une même souche virale n'étant significative pour aucun des jours de l'étude (jour 1 : $F(4,18)=0,29$; jour 2 : $F(3,11)=0,64$).

III. Discussion

Cette étude est une première tentative pour rechercher une origine génétique à la variabilité dans le degré de manipulation parasitaire dans le système *L. bouhardi* / LbFV, en d'autres termes, la variabilité du phénotype étendu. Cette variabilité étant présente entre lignées infectées, cela suggérerait un polymorphisme génétique chez le parasitoïde et/ou chez le virus. Pourtant, ce travail n'a permis de mettre en évidence ni un effet de la variabilité génétique hôte ni de la variabilité génétique virale dans l'intensité de l'expression du comportement de superparasitisme de *L. bouhardi*.

Côté variabilité virale, nous aurions pu attendre des degrés de manipulation différents entre populations dus à une différenciation génétique des souches virales d'origines géographiques différentes. L'origine de ce polymorphisme aurait pu être fonction des conditions écologiques locales selon les opportunités de transmission horizontale du virus dont dépend sa dynamique d'invasion et l'évolution de la virulence : prévalence du virus, disponibilité en hôtes, stratégie locale des parasitoïdes... Pourtant, nous n'avons mis en évidence aucun effet du génotype viral ni à l'échelle inter-population ni à l'échelle intra-population. Une explication pourrait être l'absence totale de variabilité virale. Pour cela, les données génomiques sur LbFV sont à étoffer et à étudier pour des souches de différentes origines géographiques et sur divers gènes afin de nous permettre de mieux appréhender la diversité génétique du virus.

Concernant la mise en évidence d'un effet du génotype de l'insecte dans l'expression de la manipulation comportementale, nous aurions aussi pu nous attendre à des degrés de manipulation différents entre populations dus à une différenciation génétique des parasitoïdes, potentiellement adaptative selon la disponibilité en hôtes (ou à une résistance à la

manipulation). Pourtant, aucun effet du génotype du parasitoïde n'a pu être mis en évidence. Il est possible que les lignées de parasitoïdes issues d'une même population soient peu différenciées expliquant ainsi l'absence d'effet du génotype hôte. Par ailleurs, les femelles F1 issues des croisements possèdent la même souche virale et 50% de leur génome en commun (d'origine maternelle). Seuls 50% du génome nucléaire sont d'origine paternelle et donc potentiellement variables entre lignées. Dans l'objectif de rechercher un polymorphisme génétique du parasitoïde, il aurait pu être envisagé, suite aux croisements, des introgressions par backcross successifs (croisement des femelles F1 avec un mâle de leur lignée paternelle) afin de remplacer progressivement et totalement le génotype de la femelle d'origine $S_{réf}$ par celui des mâles issus des différentes lignées de parasitoïdes. Ceci aurait pu mettre en évidence un effet du génotype de l'insecte. Ce type d'expérience a par la suite été mise en œuvre afin d'étudier cette même question qui est celle de la part de variabilité phénotypique attribuable au génotype du parasitoïde (Martinez 2008). Dans cette étude, il a été révélé la présence d'un polymorphisme de l'insecte à l'origine de variations dans l'intensité du superparasitisme chez le parasitoïde à une échelle intra-populationnelle et écarte l'hypothèse d'une résistance du parasitoïde à l'infection.

L'étude d'une origine génétique du degré de variabilité de la manipulation du superparasitisme n'a pas permis d'explicitier la part des variations phénotypiques attribuables au génotype viral, au génotype insecte voir à leur interaction. Il semble que des variations « environnementales » non contrôlées, autres que les effets maternels, soient à l'origine de la variabilité du degré de superparasitisme observé. Ce type d'étude requiert un protocole mettant en jeu un grand nombre de répétitions (augmenter la puissance statistique) afin de pouvoir tester chaque paramètre potentiellement mis en jeu.

Circulation du virus entre espèces parasitoïdes écologiquement interconnectées

(Manuscrit 3)

Ce chapitre s'intéresse à la question des transferts du virus LbFV entre espèces de la communauté des parasitoïdes de drosophiles. En plus de leur transmission verticale, les symbiotes héréditaires peuvent être sujets à des transferts horizontaux intra- ou interspécifiques (Chiel *et al.* 2009). Pour exemple, chez la bactérie *Wolbachia* a été démontré l'existence de transferts au sein d'une même espèce de parasitoïdes ainsi qu'entre différentes espèces de parasitoïdes (Vavre *et al.* 1999; Huigens *et al.* 2000; Huigens *et al.* 2004). Le système hôte-parasitoïde est propice aux transferts horizontaux de micro-organismes du fait des étroites interactions entre le parasite et son hôte mais également entre deux parasites (de la même espèce ou non) partageant le même hôte lors d'événements de super- ou multiparasitisme. Compte-tenu du caractère infectieux de LbFV, il se peut que des transferts horizontaux se produisent en direction des autres espèces de parasitoïdes qui s'attaquent aux mêmes larves de drosophiles que *L. boulandi* (multiparasitisme).

Dans le sud-est de la France, *L. boulandi* et *L. heterotoma* vivent en sympatrie et partagent les mêmes espèces hôtes (*D. melanogaster* et *D. simulans*). Les deux espèces entretiennent ainsi de fortes interactions compétitives et donc des relations intimes en cas de multiparasitisme (Fleury *et al.* 2004). Compte tenu de la capacité du virus à se transmettre d'une larve parasite à une autre chez *L. boulandi* lors d'un événement de superparasitisme, il se pose alors la question du transfert de LbFV de *L. boulandi* vers *L. heterotoma*. Cette question est d'autant plus pertinente que les deux espèces sont relativement proches phylogénétiquement (Nordlander 1980; Schilthuisen 1998; Allemand *et al.* 2002).

L'étude des transferts interspécifiques de LbFV pose une autre question : celle des interférences possibles entre les différents microparasites qui infectent les parasitoïdes. Parmi les *Leptopilina*, seul le clade *boulandi* apparaît totalement indemne d'infection par *Wolbachia* et c'est également le seul qui héberge le virus manipulateur du comportement, ce qui suggère

des interactions antagonistes entre cette bactérie et le virus. De telles interactions bactérie-virus ont été récemment mises en évidence dans deux études indépendantes montrant que des lignées de drosophiles infectées par *Wolbachia* avaient une meilleure survie face aux infections induites par des virus à ARN (mais pas à ADN) (Hedges *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 2008). Les auteurs mettent ainsi en évidence le rôle majeur joué par la bactérie dans les phénomènes de résistance aux infections virales. *L. heterotoma*, dont tous les individus sont naturellement tri-infectés par *Wolbachia*, ne semble jamais infectée par LbFV dans la nature (aucun individu infecté sur 34 testés par test moléculaire ; Patot *et al.* 2009).

Sur ce modèle d'étude, nous avons posé deux questions :

- (1) *L. heterotoma* est-elle réellement réfractaire à l'infection ?
- (2) L'infection par la bactérie *Wolbachia* chez *L. heterotoma* est-elle impliquée dans ce phénomène de protection ?

La mise au point d'un outil moléculaire diagnostique de l'infection rendait aisément réalisable le test d'un transfert interspécifique du virus. Des expériences de transferts horizontaux entre *L. boulandi* infectée (lignée S_{réf}) et *L. heterotoma* ont été tentées en co-infectant la même larve de drosophile par *L. boulandi* infectée par le virus et *L. heterotoma* infectée ou non par *Wolbachia* (souche A7, Antibes). Des transferts intraspécifiques (entre *L. boulandi* infectée (lignée S_{réf}) et non infectée (lignée NS_{réf}) par LbFV) ont également été réalisés en qualité de contrôles. Pour 65% des femelles émergentes (n=48), le virus est effectivement transféré vers la lignée non infectée de *L. boulandi*, indiquant que le protocole est satisfaisant. En revanche, nous n'avons pas pu mettre en évidence de transfert horizontal de LbFV de *L. boulandi* vers *L. heterotoma*, ni en présence de *Wolbachia* (n=41), ni en son absence (n=48). Nous en déduisons que *L. heterotoma* est intrinsèquement réfractaire à l'infection par LbFV, indépendamment de la présence de *Wolbachia*.

LbFV semble donc spécifique à son hôte *L. boulandi*. Pour reprendre l'expression de Combes (1995), le « filtre de compatibilité » ne semble pas permettre le transfert horizontal de LbFV chez *L. heterotoma* bien que le « filtre de rencontre » le permette. Ce résultat pose néanmoins la question de l'influence de ce virus, spécifique de *L. boulandi*, sur la compétition interspécifique entre ces deux espèces de parasitoïdes.

Manuscript in preparation for *Parasitology*

Absence of horizontal transfer of a behavioural manipulative virus between two competing *Leptopilina* wasp species

Sabine Patot,^{*} Julien Varaldi and Frédéric Fleury

Université de Lyon; F-69000, Lyon; Université Lyon 1; CNRS, UMR5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France.

*Corresponding author. Mailing address: Université de Lyon; Université Lyon 1; CNRS; UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 boulevard du 11 novembre 1918, Villeurbanne F-69622, France.
Phone: (33)4.72.43.29.08. Fax: (33)4.72.43.13.88.
E-mail: patot@biomserv.univ-lyon1.fr

Key words: *Leptopilina bouvardi*, *Leptopilina heterotoma*, LbFV, intraspecific horizontal transfer, interspecific horizontal transfer, *Wolbachia*.

ABSTRACT

Arthropods, especially insects, are hosts of a broad diversity of vertically transmitted symbionts. Some of them confer advantage to their hosts or are able to manipulate the reproduction or the behaviour of their hosts in a way that enhances their own transmission. These symbionts can also undergo low levels of horizontal transmission whereby they can colonize new hosts. Such horizontal transfers require intimate contacts between species as those involving during host-parasitoid interactions. Although horizontal transmission was previously reported in several cases of bacterial symbiont-parasitoid models, mechanisms involved in such transfers remain largely a mystery. Here, we investigated transmission of a virus (LbFV) from its host, the *Drosophila* parasitoid *L. boulardi*, to the competitor species *L. heterotoma*. LbFV is a hereditary virus which manipulates the behaviour of its host, *L. boulardi*, forcing it to lay additional eggs in already parasitized *Drosophila* larvae (superparasitism). This benefits the virus, since it is horizontally transferred by superparasitism. LbFV is prevalent in natural *L. boulardi* populations. However, we demonstrate that *L. heterotoma* is refractory to viral infection as no natural interspecific horizontal transfers of LbFV were successfully involved. These results suggest highly specific interactions between symbionts and their hosts. We discuss possible explanations for the absence of horizontal transmission between these phylogenetically related parasitoid species.

INTRODUCTION

Invertebrates, especially insects and other arthropods possess an extraordinary diversity of vertically transmitted symbionts (Ishikawa, 2003; Moran *et al.*, 2008). During the past 20 years, molecular studies have dramatically increased our knowledge and appreciation of the importance and effects of symbionts in the ecology and evolution of their hosts. Some of them are obligate for host survival and reproduction and are strictly vertically transmitted. They have been associated with their host lineages for a long evolutionary time as shown by congruent phylogenies between partners (Baumann, 2005; Moran *et al.*, 2008). Others heritable symbionts are facultative for their hosts. They are predominantly vertically transmitted and spread and persist in host populations by conferring fitness advantage or by manipulating the host's reproduction (Hedges *et al.*, 2008; Montllor, 2002; Oliver *et al.*, 2003; Scarborough *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2008; Tsuchida *et al.*, 2004; Werren *et al.*, 2008). However, facultative symbionts can also undergo low levels of horizontal transmission whereby they can colonize new hosts (Chiel *et al.*, 2009; Vavre *et al.*, 1999; Werren *et al.*, 1995; Zchori-Fein & Perlman, 2004). This is proved by incongruent phylogenies between symbiotic microorganisms and their hosts, *i.e.* closely related symbionts are found in distantly related hosts (Baumann, 2005; Russell *et al.*, 2003). However, if the occurrences of past horizontal transfers are well documented, the mechanisms by which such transfers occur in maternally transmitted micro-organisms remain to explore.

Such horizontal transfers might take place in nature when different parasite species use the same host thus coexisting with intimate relationships, as it is the case in host-parasitoid associations. Here, several individuals can be in close contact and infection can be laterally acquired from infected to uninfected individuals. Natural intraspecific transfers of bacterial or viral symbionts were experimentally demonstrated under superparasitism in such parasitoid

systems (Huigens *et al.*, 2000; Varaldi *et al.*, 2003; Werren *et al.*, 1986). However, less is known about interspecific transfers maybe because much negative results remain unpublished (Chiel *et al.*, 2009). Indeed attempts of symbiont transfer between host species appeared difficult and when acquisition succeed, its maintenance seems difficult to achieve (Huigens *et al.*, 2004). Here we studied natural intra- and interspecific horizontal transfer of a viral symbiont in a parasitoid model.

Leptopilina boulardi is a solitary parasitoid wasp of *Drosophila* host larvae that is one host permits the complete development of only one parasitoid. Some females of this species are infected by an inherited virus that manipulates their behaviour (Varaldi *et al.*, 2003). The virus (named LbFV for *L. boulardi* filamentous virus) forces the females to oviposit their eggs in an already parasitized *Drosophila* larva (a behaviour called superparasitism). It takes advantage of this behavioural change, since it can be transmitted horizontally when uninfected and infected parasitoid larvae coexist inside the superparasitized *Drosophila* larva (Varaldi *et al.*, 2003; Varaldi *et al.*, 2006a). The mixed mode of transmission allows LbFV to maintain and reach high prevalence in natural *L. boulardi* populations (up to 90% in the south of France) (Patot *et al.*, 2009). Effects of the virus are mainly limited to superparasitism and infected females do not suffer any major fitness cost (Varaldi *et al.*, 2005; Varaldi *et al.*, 2006b).

In south-eastern of France, *L. boulardi* competes with the related species *L. heterotoma* on *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* hosts mainly. As natural intraspecific transfers of LbFV occur very often under superparasitism conditions (Varaldi *et al.*, 2003), interspecific horizontal transfers may naturally take place in case of multiparasitism, in which larvae of an infected *L. boulardi* female and an uninfected *L. heterotoma* female share the same *Drosophila* host. However, in a previous molecular screening, we failed to observe any infected *L. heterotoma* in a sympatric population (n=34,

Patot *et al.*, 2009). This result may sound surprising because in this location, LbFV prevalence in *L. boulandi* was very high (67%) and that frequent cases of super- and probably multiparasitism are observed (Fleury *et al.*, 2004). In this paper, our aim was to definitely test whether *L. heterotoma* is refractory to LbFV infection (Patot *et al.*, 2009). Interestingly, contrary to *L. boulandi*, all *L. heterotoma* individuals are infected by three different strains of the symbiotic *Wolbachia* (Vavre *et al.*, 1999), a maternally transmitted obligate intracellular bacterium found in at least 20% of all insect species. Furthermore, *Wolbachia* has been recently found to confer protection against virus infection in flies, suggesting possible interactions between viruses and bacterial symbionts (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008).

The current study was initiated to address two questions:

- (1) Is LbFV able to colonize *L. heterotoma* under multiparasitism conditions?
- (2) Does *Wolbachia* interfere with this process?

To do so, we tested whether interspecific natural horizontal transfers of LbFV would occur under multiparasitism conditions, in which larvae of an infected *L. boulandi* female (donor) and an *L. heterotoma* female harbouring or not *Wolbachia* symbiont (recipient) share the same host.

MATERIALS AND METHODS

Insect strains. We used two laboratory lines of *L. bouhardi* with the same nuclear genetic background and differing only in their infection status for LbFV. An inbred uninfected line (UI line) (obtained through brother sister mating yielding to a homozygosity estimate exceeding 82%) was originating from Sienna (Italy). Females from this line lay only one egg per host according to standard experimental procedure (as Varaldi *et al.*, 2003) and this phenotype will be referred to as non-superparasitizing (NS phenotype). An infected line by LbFV (I line) derives from the former and has been obtained after natural horizontal transfer (superparasitism) of viral particles originating from the south of France (Valence). This newly infected line proved stable over generations for both virus infection and superparasitism behaviour with a mean number of eggs per host ranging roughly between two and four according to experimental standard procedure.

We also used two lines of *L. heterotoma* originating from Antibes (France), which was made homozygous after 35 generations of sib mating. The first one is named A7(123) line and harbours three different *Wolbachia* strains: *wLhet1*, *wLhet2* and *wLhet3* (Vavre *et al.*, 1999). A *Wolbachia* uninfected line, named A7(0), was derived from A7(123) using antibiotic treatments by feeding parasitized *Drosophila* larvae a standard diet containing low concentrations of rifampicin (Mouton *et al.*, 2003; Vavre *et al.*, 2001). Since this line derived from A7(123), they shared the same nuclear background and differed solely with regard to their infection by *Wolbachia*.

In the laboratory, parasitoids were reared under a 12L:12D photoperiod at 25°C, using as hosts a *Wolbachia*-free strain of *D. melanogaster* originating from Sainte-Foy-lès-Lyon (Rhône, France) fed with a standard diet (David, 1962).

Horizontal transfer of LbFV.

Interspecific transfer of viral particles was tested by creating parasitized *Drosophila* hosts that contained eggs of a virgin *L. bouhardi* I female (the donor) and a fertilized *L. heterotoma* infected or not by *Wolbachia* (the recipient).

Since *L. bouhardi* and *L. heterotoma* have a haplodiploid mode of reproduction, daughters arise only from fertilized eggs (diploids) whereas sons emerge from unfertilized eggs (haploids). Thus, when fertilized and virgin females lay their eggs inside the same host, emerging F1 females are necessarily daughters of the fertilized females. This provides a convenient way to identify the origin of a F1 female without using molecular markers. We used this property to test for the existence of intra and interspecific horizontal transfer of LbFV.

Because intraspecific horizontal transfer was known to occur among *L. bouhardi* individuals (Varaldi *et al.*, 2003; Varaldi *et al.*, 2006a), controls were established by allowing a fertilized *L. bouhardi* UI line, PCR negative for the viral marker (recipient) and a virgin *L. bouhardi* I line PCR positive (donor), to parasitize the same host larvae. They were done in parallel to interspecific transfer, at the same moment and in the same conditions.

Experiments were performed by providing 125 *D. melanogaster* larvae (strain Sainte-Foy-lès-Lyon, France), to six fertilized *L. heterotoma* A7(123) or A7(0) females (multiparasitism) or UI *L. bouhardi* (superparasitism), during 48h (21°C, 12L:12D photoperiod). Females were then replaced by four virgin I *L. bouhardi* females for 24h at 25°C. Note that the lower temperature used during the first 24 hours was aimed at slowing down the host development to provide suitable small *Drosophila* larvae to second females. At the end of the experiment, all the females were stored in alcohol (EtOH-100) at -80°C before DNA extraction. After development, emerging F₁ females (*L. heterotoma* and *L. bouhardi*)

were screened for viral infections by PCR. Six assays were done for each of the three types of transfer (*L. heterotoma* infected or not by *Wolbachia* and *L. boulardi* controls).

To make sure of the parasitisation of *Drosophila* larvae by both the donor and recipient parasitoids during transfer experiment, we dissected few hosts and checked for the presence of *Leptopilina* eggs or larvae. Briefly, five *Drosophila* larvae were taken after each round of parasitization by parasitoid females. They were deposited in a Petri dish filled with agar layer and poured with a thin spot of yeast. About 48 hours later, they were dissected and the number of immature parasites (eggs and larvae) was determined.

Test for the horizontal transfer of LbFV by molecular tools.

Total DNA was extracted from individual females *L. boulardi* and *L. heterotoma* following a standard procedure. Briefly, insect material was prepared for DNA extraction by being individually crushed in 150 µl 5% (w/vol) Chelex solution (Bio-Rad, CA, USA) and 5 µl of proteinase K (20 mg/ml; Eurobio, France) and incubated overnight at 56°C. After 20 min at 95°C, samples were centrifuged and two microliters of the supernatant were used for PCR reactions which amplified a viral DNA fragment (accession n°: FM876312). For *L. boulardi* females, PCR assays were done as described in Patot *et al.* (2009), by performing a multiplex PCR reaction amplifying the viral sequence (primers noted 102-F / 500-R) and an insect gene (primers noted RPS2-F / RPS2-R, Ribosomal Protein S2 region. This allowed a control for the quality of DNA extraction. For *L. heterotoma* females, we used the viral primers (102-F / 500-R) in uniplex PCR reactions. To control for the quality of DNA extraction in *L. heterotoma* females, we PCR-amplified the internal transcribed spacer (ITS) 2 region. PCR reaction for ITS2 was performed following conditions described in Allemand *et al.* (2002). The insect gene was successfully amplified for all DNA extracts (*L. boulardi* and *L. heterotoma*) indicating the good quality of the DNA extracts. In addition, all “recipient”

(fertilized) females proved PCR-negative for the virus, whereas all “donor” (virgin) females proved PCR positive for the virus, as was expected.

RESULTS

Evidence of super- or multiparasitism.

In controls, we observed 100% of superparasitism. For interspecific transfers, three and four of the six assays showed multiparasitism for *L. heterotoma* infected and *L. heterotoma* not infected by *Wolbachia* respectively. In order to test the presence of LbFV after transfer, we chose these replicates to screen the emerging parasitoids.

Intraspecific horizontal transfer of LbFV.

As expected, intraspecific horizontal transfers of LbFV occur frequently between *L. boulandi* individuals sharing the same superparasitized host. The infection status of 48 emerging F₁ *L. boulandi* females was tested by PCR (Table 1). We reported that 31 females proved PCR-positive for the viral marker indicating strong horizontal transmission. This high rate of horizontal transfer (64.6%) confirmed that viral particles can be successfully naturally transferred between *L. boulandi* individuals inside the same *Drosophila* larva.

Interspecific horizontal transfer of LbFV.

We tested the interspecific transfer of LbFV from *L. boulandi* to *Wolbachia* infected A7(123) strain or *Wolbachia* free A7(0) strain of *L. heterotoma* after both species have shared the same host larvae. We tested the LbFV infection by PCR for 41 emerging F₁ *L. heterotoma* A7(123) females and 48 *L. heterotoma* A7(0) (Table 1). We never detected any viral sequence amplification in all of these 89 *L. heterotoma* females. Thus, LbFV did not appear to transfer between *L. boulandi* and *L. heterotoma* within a multiparasitized *Drosophila* host. Moreover, *Wolbachia* infection appears to have no role in the absence of LbFV horizontal transfer from *L. boulandi* to *L. heterotoma*.

DISCUSSION

Our results showed specific relationships between LbFV and *L. bouleari* as it did not infect related parasitoid species *L. heterotoma*. We failed to observe any natural interspecific horizontal transfer of LbFV from *L. bouleari* to *L. heterotoma* although in the same conditions, there was massive horizontal transmission at the intraspecific level. This last point confirmed the frequent intraspecific horizontal transfers among *L. bouleari* individuals (Varaldi *et al.*, 2003). No viral infection was detected in *L. heterotoma* individuals that have been in close contact with an infected *L. bouleari* larva inside *Drosophila* host. *Wolbachia* infection status of *L. heterotoma* does not explain unsuccessful interspecific horizontal transfers as the results were identical whatever the *Wolbachia* infection status of *L. heterotoma*. Thus, we were not able to study possible antagonistic interactions between *Wolbachia* and LbFV as it was previously showed with *Drosophila* viruses (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2009).

There are several reasons that could explain the observed results. First, horizontal transfers toward *L. heterotoma* may remain undetected only because transferred viral particles in the new host do not reach densities detectable with the PCR condition we used. We should check *L. heterotoma* individuals with a more reliable technique like the PCR quantitative method. Moreover, we only tested for horizontal transfer in recipient *L. heterotoma* F1 females and therefore not in following generations. Viral particles may not attain sufficient titre to be detected at the first parasitoid generation due to the adaptation time to the new host. Maybe we should maintain *L. heterotoma* strains to test for the LbFV infection several generations after the attempt of interspecific transfer. Alternatively, LbFV may impose a strong cost on infected individuals killing it rapidly. I would be interesting to count emerging individuals from intra- and inter-specific transfers. Viral particles may also success their

physical transfer from *L. bouleari* to *L. heterotoma* but fail to survive and reproduce in the new host species. This may for example involve elevated immune responses from the new host or failure to integrate into host physiology. Tests of artificially viral infection of *L. heterotoma* could precise this hypothesis. Another possible explanation for the fact that we do not observe horizontal transfers between *L. bouleari* and *L. heterotoma* might be the phylogenetic distance between species that may be too high to permit successful transmission of LbFV (Allemand *et al.*, 2002). To reinforce this hypothesis, it would be necessary to test viral infection of others *Leptopilina* species of the *heterotoma* and *bouleari* group. Interestingly, while *L. heterotoma* is not infected by LbFV, *L. bouleari* was not found infected by *Wolbachia* in the field. However, this bacterium can be transmitted in *L. bouleari* species but undergo diminishing vertical transmission in this novel host species due to host-bacterial incompatibility (Heath *et al.*, 1999). It suggests specific interactions of these parasitoid species with their respective symbionts.

Our study suggests a specific association between LbFV and *L. bouleari* as indicated by the inability to readily undergo horizontal transmission in *L. heterotoma*, the principal competitor of *L. bouleari* in south-eastern of France. The absence of natural interspecific horizontal transfers of LbFV and the fact that we did not find evidence of infection in natural *L. heterotoma* populations (Patot *et al.*, 2009) suggests that *L. heterotoma* is refractory to LbFV infection. Thus, in the field, *L. heterotoma* species does not appear infected by LbFV with some possible consequences on interspecific interactions or species coexistence. Parasites can influence interactions between species that do not share the parasite (Anderson & May, 1986; Hatcher *et al.*, 2006) and it could be the case in our system. Indeed, the presence of the virus seems to severely impair the competitive capacity of *L. bouleari* confronted with *L. heterotoma* (Patot *et al.*, *in prep*). The coexistence of both species in the South of France thus may be at least partly due to the presence of the virus in *L. bouleari*

illustrating the role of such species-specific parasites in shaping ecological communities and maintaining species diversity (Fenton & Brockhurst, 2008).

REFERENCES

- ALLEMAND, R., LEMAÎTRE, C., FREY, F., BOULÉTREAU, M., VAVRE, F., NORDLANDER, G., VAN ALPHEN, J. and CARTON, Y. (2002). Phylogeny of six African *Leptopilina* species (Hymenoptera: Cynipoidea, Figitidae), parasitoids of *Drosophila*, with description of three new species. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, **38**, 319-332.
- ANDERSON, R. M. and MAY, R. M. (1986). The invasion, persistence and spread of infectious diseases within animal and plant communities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **314**, 533-570.
- BAUMANN, P. (2005). Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 155-189.
- CHIEL, E., ZCHORI-FEIN, E., INBAR, M., GOTTLIEB, Y., ADACHI-HAGIMORI, T., KELLY, S. E., ASPLEN, M. K. and HUNTER, M. S. (2009). Almost there: transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels. *PLoS ONE*, **4**, e4767.
- DAVID, J. (1962). A new medium for rearing *Drosophila* in axenic condition. *Drosophila Info Service*, **36**.
- FENTON, A. and BROCKHURST, M., A. (2008). The role of specialist parasites in structuring host communities. *Ecology Research*, **23**, 795-804.
- FLEURY, F., RIS, N., ALLEMAND, R., FOUILLET, P., CARTON, Y. and BOULETREAU, 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**, 181-194.
- HATCHER, M. J., DICK, J. T. and DUNN, A. M. (2006). How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecol Lett*, **9**, 1253-1271.

- HEATH, B. D., BUTCHER, R. D., WHITFIELD, W. G. and HUBBARD, S. F. (1999). Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Curr Biol*, **9**, 313-316.
- HEDGES, L. M., BROWNLIE, J. C., O'NEILL, S. L. and JOHNSON, K. N. (2008). *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, **322**, 702.
- HUIGENS, M. E., DE ALMEIDA, R. P., BOONS, P. A., LUCK, R. F. and STOUTHAMER, R. (2004). Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc Biol Sci*, **271**, 509-515.
- HUIGENS, M. E., LUCK, R. F., KLAASSEN, R. H., MAAS, M. F., TIMMERMANS, M. J. and STOUTHAMER, R. (2000). Infectious parthenogenesis. *Nature*, **405**, 178-179.
- ISHIKAWA, H. (2003). An introduction. In *Insect symbiosis*. (eds. Bourtzis, K. & T.A., M.), CRC Press
- MONTLLOR, C. B., MAXMEN, A., PURCELL, A.H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, **27**, 189-195.
- MORAN, N. A., MCCUTCHEON, J. P. and NAKABACHI, A. (2008). Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annu Rev Genet*, **42**, 165-190.
- MOUTON, L., HENRI, H., BOULETREAU, M. and VAVRE, F. (2003). Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Mol Ecol*, **12**, 3459-3465.
- OLIVER, K. M., RUSSELL, J. A., MORAN, N. A. and HUNTER, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **100**, 1803-1807.

- PATOT, S., LEPETIT, D., CHARIF, D., VARALDI, J. and FLEURY, F. (2009). Molecular detection, penetrance, and transmission of an inherited virus responsible for behavioral manipulation of an insect parasitoid. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 703-710.
- RUSSELL, J. A., LATORRE, A., SABATER-MUNOZ, B., MOYA, A. and MORAN, N. A. (2003). Side-stepping secondary symbionts: widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol Ecol*, **12**, 1061-1075.
- SCARBOROUGH, C. L., FERRARI, J. and GODFRAY, H. C. (2005). Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, **310**, 1781.
- TEIXEIRA, L., FERREIRA, A. and ASHBURNER, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*, **6**, e2.
- TSUCHIDA, T., KOGA, R. and FUKATSU, T. (2004). Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, **303**, 1989.
- VARALDI, J., BOULETREAU, M. and FLEURY, F. (2005). Cost induced by viral particles manipulating superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. *Parasitology*, **131**, 161-168.
- VARALDI, J., FOUILLET, P., RAVALLEC, M., LOPEZ-FERBER, M., BOULETREAU, M. and FLEURY, F. (2003). Infectious behavior in a parasitoid. *Science*, **302**, 1930.
- VARALDI, J., GANDON, S., RIVERO, A., PATOT, S. and FLEURY, F. (2006a). A Newly Discovered Virus Manipulates Superparasitism Behavior in a Parasitoid Wasp. In *Insect symbiosis*, Vol. 2 (ed. Bourtzis, K. M. T. A.), pp. 119-139. CRC Press.
- VARALDI, J., PETIT, S., BOULETREAU, M. and FLEURY, F. (2006b). The virus infecting the parasitoid *Leptopilina boulardi* exerts a specific action on superparasitism behaviour. *Parasitology*, **132**, 747-756.

- VAVRE, F., DEDEINE, F., QUILLON, M., FOUILLET, P., FLEURY, F. and BOULETREAU, M. (2001). Within-species diversity of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects. *Evolution*, **55**, 1710-1714.
- VAVRE, F., FLEURY, F., LEPETIT, D., FOUILLET, P. and BOULETREAU, M. (1999). Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol*, **16**, 1711-1723.
- WERREN, J. H., BALDO, L. and CLARK, M. E. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, **6**, 741-751.
- WERREN, J. H., SKINNER, S. W. and HUGER, A. M. (1986). Male-killing bacteria in a parasitic wasp. *Science*, **231**, 990-992.
- WERREN, J. H., ZHANG, W. and GUO, L. R. (1995). Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci*, **261**, 55-63.
- ZCHORI-FEIN, E. and PERLMAN, S. J. (2004). Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Mol Ecol*, **13**, 2009-2016.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS 5558) and the French Ministry « Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Fond National de la Science, ACI Jeunes Chercheurs 2004 », JC 10013 « Virus symbiotiques manipulateurs du comportement des insectes parasites ».

TABLE

Table 1. Intraspecific and interspecific horizontal transmission of LbFV[illegible]

*I*nfluence de LbFV sur les interactions compétitives interspécifiques

(Manuscrit 4)

« *L'influence du parasitisme sur les organismes libres est telle qu'il est pratiquement impossible d'envisager comment serait le monde en absence de parasites* » (Thomas *et al.* 2007). Le rôle des parasites dans le fonctionnement des écosystèmes a longtemps été considéré comme négligeable du fait de leur faible biomasse et du fait qu'ils soient peu ou non visibles. Pourtant, il est aujourd'hui largement admis que les parasites jouent un rôle fondamental dans le fonctionnement des écosystèmes comme facteur influençant la composition des communautés d'hôtes, leur structure et donc la biodiversité (Dobson & Hudson 1986; Mouritsen & Poulin 2005; Thomas *et al.* 2005; Lafferty *et al.* 2006) : ils jouent « *beaucoup de rôles à différents niveaux* » selon Poulin (1999). Il se pose alors la question : « *Est-ce qu'un écosystème en "bonne santé" est un écosystème riche en parasites ?* » (Hudson *et al.* 2006). A cette question, les auteurs répondent sans conteste par la positive en mettant en avant le rôle des parasites dans la mise en place et le maintien de la biodiversité.

De nombreuses études théoriques et empiriques ont étudié l'impact des parasites sur les relations de compétition entre espèces en s'intéressant aux caractéristiques de l'infestation (prévalence, spécificité, abondance, intensité) et aux troubles pathologiques associés, qui peuvent être différentiels entre espèces. Dès lors, les parasites peuvent influencer l'assemblage des espèces de par leurs actions sur les traits d'histoire de vie des hôtes. Les conséquences sur la survie et la fécondité de l'hôte infecté sont particulièrement bien documentées (notions d'arbitrage parasitaire) (ex. : Schall 1992; Yan & Norman 1995). Mais les parasites peuvent également influencer d'autres traits d'histoire de vie chez leurs hôtes tels que la dispersion (Sorci *et al.* 1994; Heeb *et al.* 1999), la croissance (Agnew *et al.* 2000) ou l'effort de reproduction (Richner & Tripet 1999). Dans ce cas, les études empiriques manquent et peu d'articles relatent les conséquences de la présence de parasites non létaux sur la communauté d'hôtes.

Nous avons recherché l'influence de la présence du virus LbFV sur la compétitivité des individus infectés dans la communauté hôtes-parasitoïdes. Il est en effet possible que la capacité compétitive de *L. boulandi* soit modifiée par la présence du virus lui conférant (i) soit un avantage en permettant à son hôte de saturer la larve drosophile en parasites de par le comportement de superparasitisme et d'assurer ainsi que cette larve ne soit pas infestée par une autre espèce de parasitoïdes ; (ii) soit un désavantage induit par un coût de l'infection en terme de temps et de nombres d'œufs « gaspillés » lors du superparasitisme. Nous avons alors tenté de répondre à la question suivante : le virus LbFV a-t-il un impact sur la compétition entre son hôte *L. boulandi* et l'espèce réfractaire à LbFV *L. heterotoma*, espèce parasitoïde phylogénétiquement proche et principal compétiteur de *L. boulandi* ?

Pour cela, nous avons réalisé des expériences comparant la capacité compétitive des souches de *L. boulandi* superparasitantes (lignée S_{réf}, infectées par LbFV) et non superparasitantes (lignée NS_{réf}, non infectées par LbFV) mises en compétition face à *L. heterotoma* (espèce sympatrique ; souche A7, Antibes). Nous avons dans un premier temps réalisé ces expériences avec un système expérimental simplifié mais très contrôlé où les parasitoïdes étaient mis en compétition dans des tubes d'élevage. Dans un second temps, la mise en place de cages à populations ou mésocosmes (Figure VI.3) nous a permis d'aborder la question de l'influence de LbFV sur les interactions compétitives interspécifiques à une échelle d'étude plus grande avec des caractéristiques de compétition et de densité non contrôlées mais dépendantes de la dynamique du système.

Les résultats obtenus ont montré une très forte influence du virus sur l'issue des interactions compétitives entre espèces parasitoïdes (Figures VI.1 et VI.4). Lorsque *L. boulandi* n'est pas infectée par LbFV, l'avantage compétitif de cette espèce sur *L. heterotoma* est très net ce qui restreint très fortement les possibilités de maintien de ces deux espèces ensemble dans les mêmes sites. En revanche, en présence du virus, la supériorité compétitive de *L. boulandi* peut fortement diminuer et permettre un quasi rééquilibrage des capacités compétitives des deux espèces de parasitoïdes. Nous avons montré que le gaspillage en œufs induit par LbFV est la cause de cette modification (Figure VI.3). Au bout de quelques jours, les femelles superparasitantes se trouvent plus rapidement dépourvues en œufs, contrairement aux femelles non infectées ; ce qui laisse la place à sa compétitrice *L. heterotoma* qui présente une dynamique de ponte beaucoup plus étalée dans le temps. Rappelons que ces espèces de parasitoïdes sont pro-ovigéniques, c'est-à-dire que leur stock d'œufs est constitué dès leur émergence et qu'elles ne présentent pas d'ovogénèse à l'état adulte.

De par son influence sur les relations de compétition entre *L. boulandi* et *L. heterotoma*, le virus LbFV apparaît être un facteur important dans le maintien de la structure de la communauté de parasitoïdes de la vallée du Rhône modifiant profondément l'issue de la compétition interspécifique. Il se pose la question de son rôle dans la progression du front de répartition de l'espèce en direction du nord comme évoqué précédemment et celle du maintien de la coexistence de *L. boulandi* et *L. heterotoma* dans certains sites de la zone méditerranéenne.

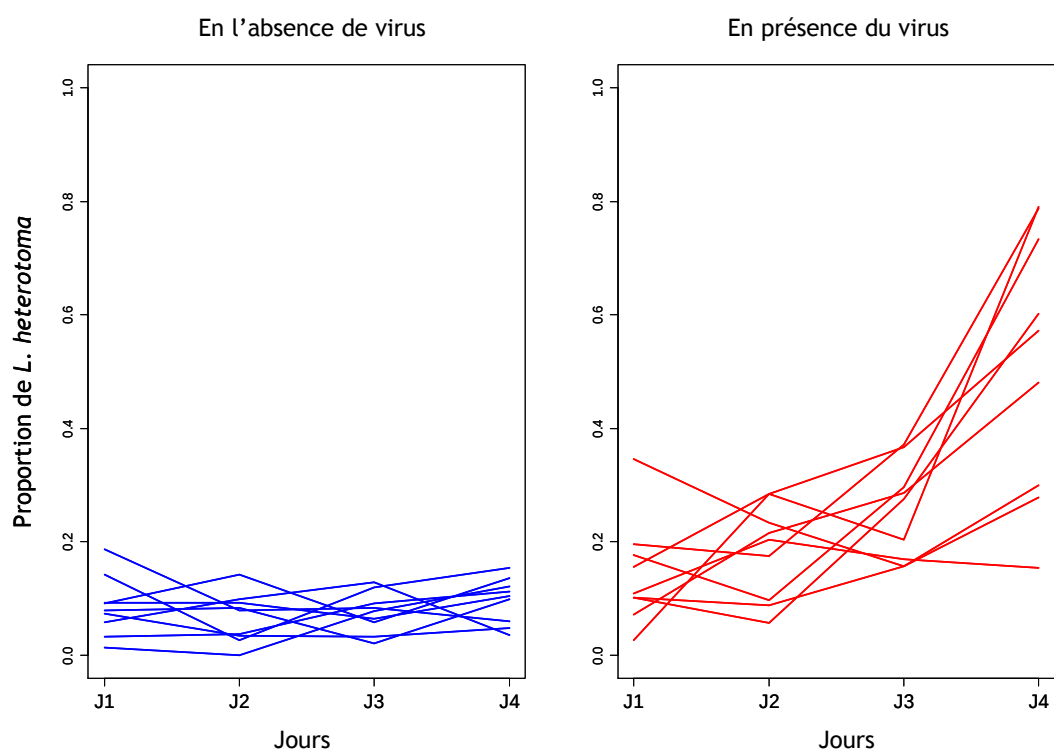


Figure VI.1 : Proportion de *L. heterotoma* au cours de l'expérience de compétition en tubes.

En bleu : compétition entre *L. heterotoma* et *L. boucardi* non infectée par LbFV.

En rouge : compétition entre *L. heterotoma* et *L. boucardi* infectée par LbFV.

Il a été réalisé 9 réplicats pour chacune des modalités avec ou sans virus.

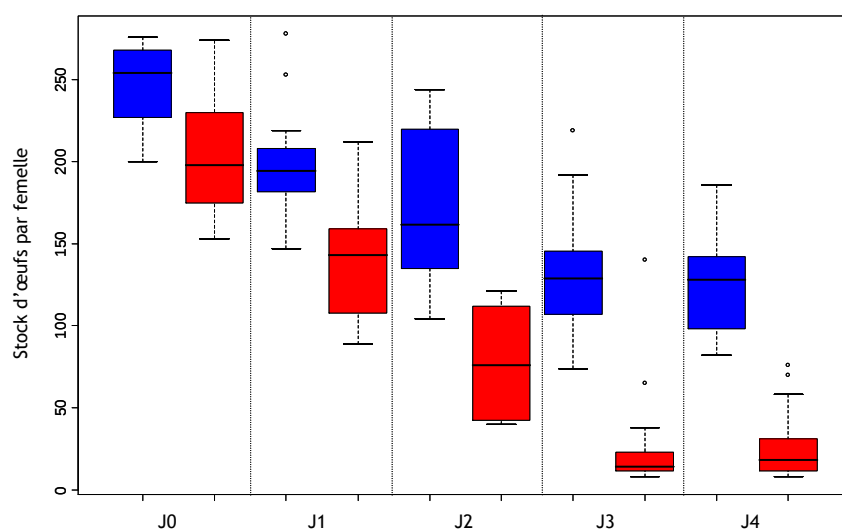


Figure VI.2 : Dynamique du stock d'œufs des femelles *L. boucardi* non infectées (en bleu) ou infectées par LbFV (en rouge) au cours des 4 jours de l'expérience de compétition en tubes.

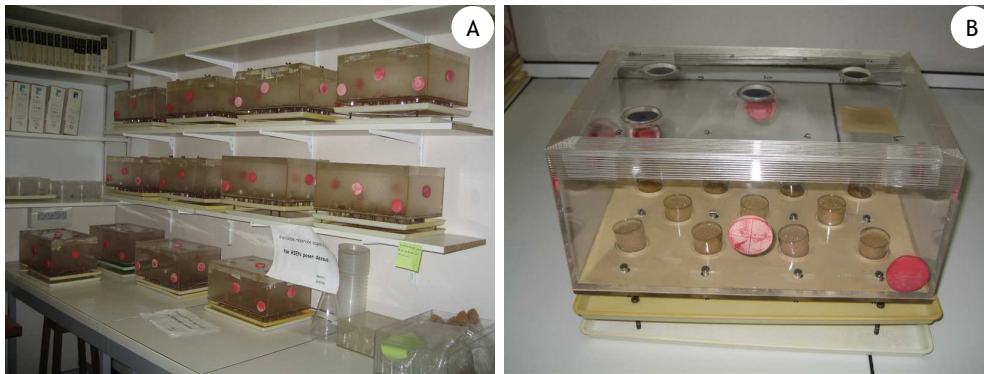


Figure VI.3 : Cages à populations (Photo : S. Patot).

A. Cages à populations utilisées dans le cadre de notre étude sur l'impact de l'infection virale sur les interactions compétitives entre *L. boucardi* et *L. heterotoma*.

B. Nos cages à populations comportaient l'emplacement de onze godets. Dix étaient utilisés comme source de nourriture et de développement pour les drosophiles et comme lieu de ponte pour les parasitoïdes. Le onzième (placé au centre de la cage) correspond au « blocage ». Il permet de réaliser des échantillonnages pour mesurer la l'abondance des deux espèces de parasitoïdes et la prévalence de LbFV.

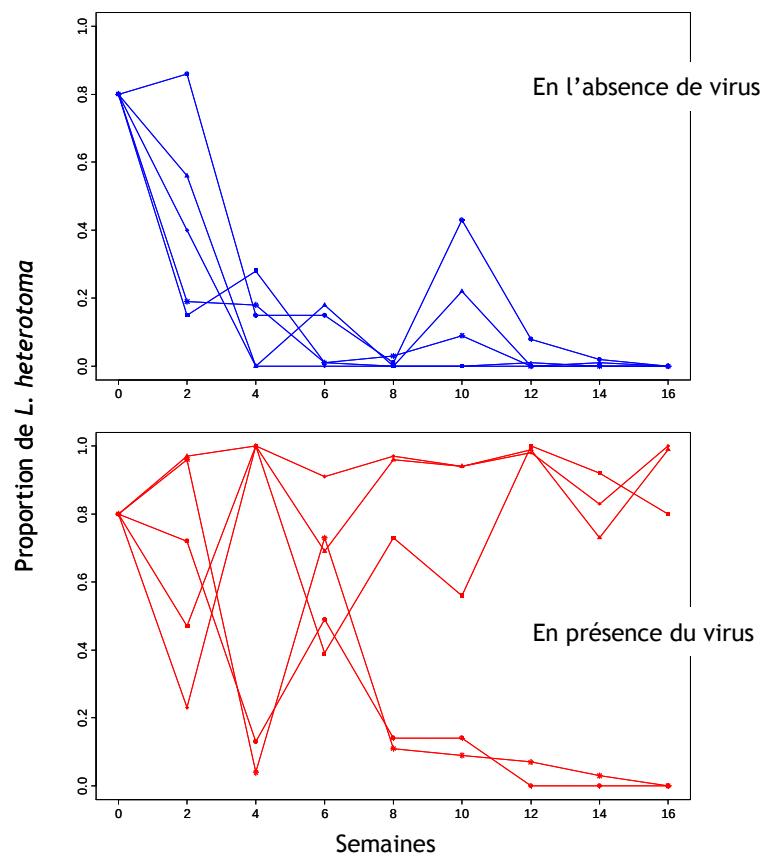


Figure VI.4 : Proportion de *L. heterotoma* au cours de l'expérience de compétition en cages à population.

En bleu : compétition entre *L. heterotoma* et *L. boucardi* non infectée par LbFV.

En rouge : compétition entre *L. heterotoma* et *L. boucardi* infectée par LbFV.

Il a été suivi 5 cages à population pour chacune des modalités avec ou sans virus.

Manuscript in preparation for *Ecology Letters*

**Vertically transmitted viral particles influence coexistence between parasitoid
species through manipulation of host behaviour.**

Sabine Patot,^{*} Roland Allemand, Julien Varaldi and Frédéric Fleury

Université de Lyon; F-69000, Lyon; Université Lyon 1; CNRS, UMR5558, Laboratoire de
Biométrie et Biologie Evolutive, F-69622, Villeurbanne, France.

*Corresponding author. Mailing address: Université de Lyon; Université Lyon 1; CNRS;
UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 boulevard du 11 novembre
1918, Villeurbanne F-69622, France.
Phone: (33)4.72.43.29.08. Fax: (33)4.72.43.13.88.
E-mail: patot@biomserv.univ-lyon1.fr

ABSTRACT

Parasites can play an important role in shaping population and community dynamics and maintaining biodiversity. This is well illustrated with horizontally transmitted parasites. However, many species, especially insects, may harbor vertically transmitted symbionts, that can reach high prevalence and markedly modify their host's biology, as this is the case for manipulative symbionts. Some females of *Leptopilina boulardi*, a solitary parasitoid of *Drosophila* larvae, are infected by an inherited virus that manipulates the behaviour of the wasp by increasing its tendency to lay supernumerary eggs in a host that is already parasitized (superparasitism). This behavioural alteration allows horizontal transmission of the virus within superparasitized *Drosophila* larvae. Our study showed that the presence of LbFV may affect inter-specific interactions between *L. boulardi* and *L. heterotoma*, the main competitive parasitoid species of *L. boulardi* that is not infected by the virus. In absence of the virus, *L. boulardi* is the superior competitor face to *L. heterotoma*. However, when it is infected with LbFV, *L. boulardi* can lose competition with *L. heterotoma*. We showed that by forcing its host to superparasitized *Drosophila* larvae, LbFV induces a strong wastage of eggs in *L. boulardi* with consequences for decrease its competitive ability. These results suggest that this manipulative virus may be a crucial determinant of structure in ecological communities through indirect effects on its host.

INTRODUCTION

Identifying the mechanisms underlying species coexistence and hence the maintenance of diversity in animal communities is a central topic in ecology. Besides competition and predation involving free organisms, parasitism appears to play a key role in structuring host communities (Poulin 1999; Mouritsen & Poulin 2002; Mouritsen & Poulin 2005; Hudson *et al.* 2006; Wood *et al.* 2007). Most of the existing evidence for parasitic consequences on community functioning concerns “parasitic arbitration” where a parasite influenced competitive interactions between two species (Hudson & Greenman 1998; Thomas *et al.* 2005; Hatcher *et al.* 2006). By specifically infecting some host species or by harming some of them more than others, parasites can play a role of mediator in competitive interactions between species. Consequently, horizontally-transmitted pathogens that usually induce important fitness cost have received much of the attention in this context (e.g. (Schall 1992; Yan & Norman 1995). However, vertically transmitted symbionts with much more subtle effects are very widespread, especially in insects (Moran *et al.* 2008) and they have received much less attention. Because they can affect various traits of their hosts, their influence on the population dynamics and community interactions between species needs to be studied. Their effects include reduction in survival (as observed for *Drosophila* sigma virus; Fleuriet 1983), reproductive manipulation (as observed for *Wolbachia*, *Arsenophonus* or *Cardinium* bacteria; (Balas 1996; O'Neill 1997; Werren 1997; Stouthamer *et al.* 1999; Kenyon & Hunter 2007; Werren *et al.* 2008) and eventually positive effects. Examples of symbionts with positive effects include increase of longevity (Dale & Welburn 2001), tolerance to high temperatures (Montllor 2002; Russell & Moran 2006), plant specialization (Tsuchida *et al.* 2004) or protection from virus infection (Hedges *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 2008). Moreover, vertically transmitted symbiont may play a significant role in mediating inter-specific interactions.

Indeed, it has been recently found that aphids harbouring the facultative bacteria *Hamiltonella* gains protection against parasitoid attacks (Oliver *et al.* 2003) whereas aphids harbouring the facultative bacteria *Regiella insecticola* gains protection against fungi pathogens (Scarborough *et al.* 2005). Although these net positive effects could cancel out or become negative under alternative conditions (Bensadia *et al.* 2006; Oliver *et al.* 2008), these examples provide clear evidence that symbiont can deeply influence interspecific interactions. However, to date, there is no evidence that vertically transmitted symbionts mediate interactions between species at the same trophic level (competition) and thus could be involved in the coexistence of competing species. The present study reports that heritable virus that manipulates host behaviour modifies the outcome of the interspecific competition existing between two insect parasitoid species.

Leptopilina boulardi and *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera: Figitidae) are related solitary parasitoid wasps of frugivorous *Drosophila* larvae (mainly *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*). The adult females lay one egg inside a *Drosophila* host, and the parasitic larva feeds and develops inside the fruit flies until it kills it. One host allows the development of only one parasitoid. In the south of France, these two species are the most common parasitoids of fruit flies larvae (Allemand *et al.* 1999). In this area, high rates of parasitization (up to 95% in some fruits) make a number of *Drosophila* larvae multi-infected (parasitized several times, either by the same species or by both) that leads to strong within-host competition among parasitoid larvae, which results in the death of all but one. Thus, in this system, strong intra and inter-specific competition exist (Fleury *et al.* 2004).

It was recently reported that some females of the dominant species *L. boulardi* are infected by a virus. This virus, called LbFV for *L. boulardi* filamentous virus, is responsible for the induction of superparasitism behaviour, *i.e.* females accept to oviposit in already parasitized host (by itself: self-superparasitism or by conspecifics) (Varaldi *et al.* 2003;

Varaldi *et al.* 2006a). The level of viral infection can be extremely high as reported in natural *L. boulardi* populations of the south of France where up to 95% of parasitoids are infected by LbFV (Patot *et al.*, submitted). On the contrary, LbFV is never observed in wild-caught *L. heterotoma*. Consistently with this observation, *L. heterotoma* has been found refractory to LbFV infection (Patot *et al.*, 2009 and *in prep.*). This virus is maternally inherited but can also be horizontally transmitted between immature *L. boulardi* sharing the same host. Theoretical developments show that the horizontal transmission offsets the imperfect vertical transmission, allowing it to reach high frequencies and to spread across *L. boulardi* populations (Gandon *et al.* 2006). Infection imposes an overall low cost on parasitoid physiology (Varaldi *et al.* 2005) and specifically affects superparasitism behaviour (Varaldi *et al.* 2006b). However, by forcing *L. boulardi* females to lay several eggs in each host, LbFV modifies the egg load dynamics of females. The egg distribution in hosts is consequently modified with an increase of the aggregation of eggs: some *Drosophila* larvae are superparasitized by *L. boulardi* with several eggs per host whereas others are unparasitized. This contrasts with the regular egg distribution observed for uninfected *L. boulardi* or *L. heterotoma* that rarely superparasite their hosts. By inducing alteration of the egg-laying strategy of *L. boulardi*, LbFV may modify the outcome of the interspecific competition between the both *Leptopilina* species in one direction or another. To address this question, we monitored interspecific competition between *L. heterotoma* and *L. boulardi* (by controlling for virus infection) under laboratory conditions (rearing tubes and population cages). Our results show a significant impact of LbFV in the competitive interactions between the two parasitoid species.

MATERIALS AND METHODS

Parasitoid strains. To test the effect of viral infection without confusing factors such as host genetic background, we used two *L. boulardi* homozygote lines. The uninfected line (noted “UI”) is an inbred line (homozygosity estimate is superior to 82%) originating from Sienna (Italy). The infected line (noted “I”) was derived from the former and infected by injection of viral particles originated from the south of France (Valence, Drôme) (Varaldi *et al.* 2006c). This artificially infected line proved stable over generations for virus infection. *L. boulardi* is not infected with the symbiotic bacteria *Wolbachia*.

L. heterotoma line used belongs to a strain originating from Southern France (Antibes, Alpes-Maritime). All laboratory-reared individuals proved to be infected with three different *Wolbachia* strains (*wLhet1*, *wLhet2* and *wLhet3*) which correspond to the natural infection status of this parasitoid species (Vavre *et al.* 1999).

Rearing and experiments were performed under a 12L:12D photoperiod at 25°C ±1°C, using as hosts a *Wolbachia*-free strain of *D. melanogaster* originating from Sainte-Foy-lès-Lyon (Rhône, France) fed with a standard diet (David 1962). *D. melanogaster* has been shown to be a better host than *D. simulans* for both parasitoid species used (Fleury *et al.* 2004). The *D. melanogaster* strain used in the experiments did not display encapsulation against *Leptopilina* eggs.

To evaluate the degree of the manipulation of the superparasitism behaviour, behavioural tests on *L. boulardi* individuals were realized according to a standard procedure (Varaldi *et al.* 2003): briefly, sisters of females used for experiments (aged for 1 or 2 days) were placed according to their biological rhythm (Fleury *et al.* 2000) from 5 pm to 10 am on ten *D. melanogaster* larvae in a Petri dish filled with agar layer and poured with a thin spot of yeast. 48 hours later, four hosts from each Petri dish were dissected to count for the number of

parasite eggs. Molecular tests of LbFV infection consisted of PCR diagnostics that showed a good correlation with superparasitism behaviour (Patot *et al.* 2009). The DNA extraction protocol, diagnostic PCR primers and reaction conditions are described in Patot *et al.* (2009).

Competition experiments in tubes: kinetics of infestation. We tested the effect of viral infection on the outcome of competition between *L. bouleari* and *L. heterotoma* under laboratory conditions during four days. Competition assays were performed on groups of second instar larvae hatched from 150 *D. melanogaster* eggs exposed for 24 hours to parasitism by eight female wasps: four *L. heterotoma* and four *L. bouleari* either I or UI. Those conditions were chosen to ensure strong competitive interactions between individuals. Before experiments, infection status of *L. bouleari* female I and UI strains was checked by behavioural tests (molecular diagnostic was not available at that time). The experiment lasted four consecutive days (noted D1, D2, D3, D4) during which a new patch of 150 *Drosophila* hosts was presented each day to the same group of parasitoids. For each competition modality (UI *L. bouleari* / *L. heterotoma*, I *L. bouleari* / *L. heterotoma*), nine replicates were simultaneously run. Controls (no interspecific competition) consisting of four female wasps on 150 *Drosophila* hosts were also done for each parasitoid species and each infection status: *L. heterotoma*, I *L. bouleari* and UI *L. bouleari*. Five replicates of controls were run. In addition, every day five additional controls were done in order to quantify the spontaneous mortality of *Drosophila* larvae in the absence of parasitoid (named “*Drosophila* controls”): groups of second instar larvae hatched from 150 *D. melanogaster* eggs were kept without parasitoid. All procedures were carried out in plastic tubes (95 mm × 23 mm) containing 15 ml of standard medium and placed at 25°C under a 12L:12D photoperiod.

After development, emerging adult *Drosophila* and wasps were collected, for the four days of experiment and were counted to estimate two parameters in each competition and

control replicates. (1) The parasitoid induced mortality (PIM) was estimated by the difference between the mean number of *Drosophila* adults emerging from *Drosophila* controls (without parasitoid) and from experimental replicates (with parasitoids), divided by the mean number of adults emerging from *Drosophila* controls. This parameter measures the rate of *Drosophila* larvae that the parasitoid killed and thus estimates the intensity of the competition for hosts. (2) The proportion of *L. heterotoma* among emerging *Leptopilina* sp.. Data were analyzed using the package of the R software version 2.7.0. PIM values and *L. heterotoma* proportions were arcsine square root transformed before the use of a repeated measures analysis of variance model.

To investigate whether horizontal transfers of viral particles can occur between *L. boulandi* and *L. heterotoma* during the period of time they coexist within a superparasitized host, we investigated the presence of LbFV in *L. heterotoma* emerging from the first day of the competition experiment (D1) (see below) using the PCR diagnostic. Because *L. boulandi* expressed strong superparasitism behaviour at D1, we hypothesized that it would be the most appropriate day to examine possible horizontal transfers of LbFV.

Dynamics of egg load. To test whether the virus influences the dynamics of egg load of *L. boulandi*, we measured two parameters describing the egg laying activity of parasitoid females at each day of the experiment: (1) the intensity of superparasitism (several ovipositions done by the same species within the same host) or multiparasitism (several ovipositions done by different species within the same host) and (2) the egg load. To do so, additional replicates were performed, exactly in the same conditions and at the same time as the competition experiment: at each day of the experiment, four (interspecific competition) or three (controls) replicates were sacrificed and the groups of four *L. boulandi* females were dissected to

determine their egg load. In each arrested replicate, five *Drosophila* larvae were also sacrificed to measure the intensity of super/multiparasitism.

(i) Super/multiparasitism behaviour

To quantify the occurrence and intensity of super/multiparasitism, three days after exposition to parasitoids, five third instar *Drosophila* larvae were dissected in each replicate (controls and interspecific competition modalities) in order to count for the number of parasitoid eggs. Note that we could not discriminate between *L. heterotoma* and *L. boulandi* immature stages, so that in competition modalities we are not able to distinguish between superparasitism and multiparasitism. Super/multiparasitism intensity was then measured as the mean number of parasitoids per *Drosophila* larva (excluding unparasitized *Drosophila* larvae).

(ii) Egg load

Since *L. boulandi* is a proovigenic species (egg production almost complete when the adult emerge), egg load gives a good estimation of the reproductive potential of females. The groups of four *L. boulandi* females from sacrificed replicates were collected and females were frozen before dissection in a drop of physiological saline. Egg-load was also measured on freshly emerged females that never encountered hosts to determine the initial egg load at the beginning of experiments (at D0). Eggs (from both ovaries) were directly counted under the microscope with the help of a video system (Imager Z1 AxioCam, AxioVision software, Zeiss).

Population cages experiments. Laboratory studies may permit to reveal and understand the possible influence of viral infection on parasitoid interactions. But general conclusions must

be considered with caution because conditions used may be bias approximations of processes that occur in the field. In order to take in count a population level in our study, we repeated competition experiments using population cages that are presumably closer to environmental conditions encountered by field populations.

The cages (35 cm × 25 cm × 16 cm of Altuglas[®]) were kept in climatic chambers at 25°C ±1°C under a 12L:12D photoperiod. While every attempt was made to ensure all cages were exposed to similar conditions (e.g. temperature, lighting), cages were routinely rotated during cage maintenance to randomize any positional effects. In population cages, a succession of food cups simulates the natural succession of fruits available for flies. Insect populations were maintained by introducing two food cups each week. We established ten population cages. Half of the cages were infested with UI *L. boulardi* and *L. heterotoma* while the other half was exposed to parasitism by I *L. boulardi* and *L. heterotoma*. Wasps were resulted from the same lines that used for competition experiments in tubes. Before experiments, infection status of *L. boulardi* I and UI strains was checked using behavioural tests and further confirmed with molecular diagnostic.

All cages were initially seeded with approximately 100 second to third instar larvae of *D. melanogaster*. Because previous reports established the superior competitive ability of *L. boulardi* against *L. heterotoma* (Carton *et al.* 1991; Fleury *et al.* 2004) and to reinforce possible impact of viral infection, we seeded cages with a number of *L. boulardi* much smaller than *L. heterotoma*. In each cage, young mated females of parasitoids were introduced in proportions 0.20 for *L. boulardi* and 0.80 for *L. heterotoma* (26 and 105 females respectively). After this initial step, no additional insects were introduced within the cages. Thus, all subsequent parasitism resulted from wasps emerging from the first bout of parasitism.

To sample the population of parasitoids, one food cup was introduced in each cage and exposed for four days to the colonization of *Drosophila* and parasitoids. This sampling food cup was then extracted and incubated in a large plastic vial until the emergence of all *Drosophila* and parasitoids (25°C $\pm$ 1°C, 12 L:12 D dark/light cycle). Emerging parasitoids were identified and counted. The first sampling began five weeks after the first introduction of parasitoids in cages and samplings were then performed every 15 days. We analysed the proportions of *L. heterotoma* using the generalized linear model of the logit of number of emerged *L. heterotoma* against time and according to competition modality and cages. We tested changes in the proportions of *L. heterotoma* using the slope of the model: a slope of zero would indicate no change in parasitoid proportions contrary to a positive or negative slope.

In order to provide a supplementary test of the influence of viral infection on competitive interactions between *L. boulandi* and *L. heterotoma*, we introduced *L. boulandi* females infected by LbFV in two population cages initialized with UI *L. boulandi* females. For cage n°2, twenty infected individuals were added between the fifth and the sixth weeks and in cage n°3, twenty infected individuals were added between the sixth and the seventh weeks.

RESULTS

Behavioural differences between UI and I strains of *Leptopilina boulardi*. Superparasitism behaviour of *L. boulardi* strains was checked using standard test before the competition experiments (tubes and population cages). As expected, the intensity of superparasitism was clearly influenced by the infection status of *L. boulardi* ($p < 0.0001$, Kruskal-Wallis tests, tubes: $\chi^2 = 15.7$, population cages: $\chi^2 = 39.8$) (Figure 1a,b). UI females deposited in most cases one egg per *Drosophila* larvae (Fig.1a) while I females superparasitized most hosts, laying up to eleven eggs per host (Fig.1b).

Competition experiments in tubes: kinetics of infestation.

(a) Impact of viral infection on species proportions. The dynamics of the proportion of parasitoid species appeared strongly influenced by viral infection (Fig.2) ($F_{1,48} = 8.49$, $p < 0.001$). In the absence of LbFV, *L. boulardi* completely outcompeted *L. heterotoma* (between 86% and 96% of *L. boulardi* at each day of experiment) ($F_{3,24} = 1.0$; $p = 0.41$) (Fig.2a). On the other hand, in the case of competition involving infected *L. boulardi*, we found a significant increase in the proportion of *L. heterotoma* by the end of the experiment ($F_{3,24} = 14.0$; $p < 0.0001$) (Fig.2b). At day 1, *L. heterotoma* proportion was similar to that observed in absence of LbFV. However, at day 4, *L. heterotoma* was in equal proportion of *L. boulardi* (approximately 52% of *L. heterotoma*). These results thus revealed that the presence of LbFV may reverse the outcome of the competition.

About the interspecific transfer of the virus, we did not detect LbFV infection in *L. heterotoma* individuals emerging from the first day of the competition experiment (D1).

(b) Mechanisms of viral impact on species proportions

Intensity of super/multiparasitism. As expected, intensity of superparasitism behaviour appeared clearly dependent on infection status of *L. boucardi* females (Fig. 4). At D1, dissections of *Drosophila* larvae indicated strong super- or multiparasitism in modalities that involved I *L. boucardi* females (either alone, Fig. 4a or in competition with *L. heterotoma*, Fig. 4b). But intensity of superparasitism of I wasps strongly decreased during the course of the experiment until reaching values comparable to those of UI *L. boucardi* (alone, Fig. 4a or in competition with *L. heterotoma*, Fig. 4b). Control replicates indicated that *L. heterotoma* females do not accept to superparasitize a host (Fig. 4b).

Egg load. Measurements of egg load on freshly emerged *L. boucardi* females (D0) revealed a cost to LbFV infection: I females have a lower egg load (- 20%) than UI females (Fig. 5). This result was opposite to Varaldi et al. (2005). However, this apparent discrepancy could result from differences in viral isolates used in each study.

Whatever the initial egg load, results showed a difference in the dynamics of egg load which decreased more rapidly for I *L. boucardi* females compared to UI females ($F_{4,113}=2.72$; $p=0.03$; competition: interaction modalitie*day) (Fig. 5a,b). On day 4, it just remained less than 30 eggs in I *L. boucardi* females (competition: mean $\pm$ SE = 27.33 ± 2.91 eggs; controls: mean $\pm$ SE = 19.25 ± 1.03 eggs) whereas UI females had more than 95 remaining eggs (competition: mean $\pm$ SE = 122.46 ± 5.08 eggs; controls: mean $\pm$ SE = 96.10 ± 13.10 eggs) (Fig. 5). Moreover, the egg load of I *L. boucardi* females involved in competition experiment is stable for last two days of the experiment what seems indicated a minimal threshold of the egg load needed to induce a laying behaviour.

Infestation of Drosophila hosts. In competition experiments, parasitoid induced mortality (PIM) was not affected by infection status and appeared stable during the course of the

experiment ($F_{3,48} = 0.69$; $p = 0.57$; interaction modality*day) (Fig.3). PIM values indicated a high parasitism rate of *Drosophila* larvae by parasitoids (more than 95%) demonstrating heavy larval competition among wasps, i.e. strong competitive interactions between parasitoids (Fig.3). However, controls showed a significant decrease of PIM values on day 4 for I *L. boucardi* but not for UI *L. boucardi* ($F_{3,24} = 14.62$; $p < 0.0001$; interaction status*day) (Fig.3). This indicates that on the last day of experiment (D4), most *Drosophila* hosts were not attacked by I *L. boucardi* females in control tubes. PIM values of *L. heterotoma* controls were stable during the experiment ($F_{3,12} = 1.85$; $p = 0.19$) (Fig.3).

Competition experiments in population cages. In the absence of the virus, UI *L. boucardi* appeared to be in competitive advantage as it completely eliminated *L. heterotoma* over time in all of the five cages (dev=117.48, ddl=4, $p < 0.0001$ with all five slopes negative), although statistical analyses indicate differences in the dynamics of the cages (dev=50.33, ddl=4, $P < 0.0001$; interaction cage*time) (Fig. 6a).

While UI *L. boucardi* rapidly ousted *L. heterotoma* from all cages, we observed exactly the opposite pattern for three out of five replicates involving I *L. boucardi*. For three cages (cages n°: 6, 8 and 9), the competitiveness of *L. boucardi* is reduced when it is infected with LbFV at the advantage of *L. heterotoma* that tended to take the place of its competitor over time (slopes=1.23, cage n°6; -0.08, cage n°8; 0.21, cage n°9). However, for the two others (cages n°: 7 and 10), the pattern of *L. heterotoma* proportions during time is similar to that obtained in the absence of LbFV: *L. boucardi* has a superior competitive ability and wins the competition against *L. heterotoma* that was phased out (slopes=-0.68, cage n°7; -0.96, cage n°10). After six weeks of parasitism (before cages showed two different pattern of *L. heterotoma* proportions), we checked infection status of *L. boucardi* from each cage using diagnostic PCR. As expected, most females appeared infected with LbFV (number of infected

individuals/number of tested individuals: 5/6 cage n°6, 15/15 cage n°7, 14/15 cage n°8, 14/15 cage n°9 and 13/15 cage n°10).

Moreover, in order to further test the viral effect, we introduced infected *L.boulardi* females in two cages seeded with uninfected females. Results revealed that infected *L. boulardi* introduced in cages n°2 and 3 during experiment did not produce any modification on the proportions of *L. heterotoma* emerging (Fig. 6). To control for viral infection in cages n°2 and 3, we performed PCR tests before and after *L. boulardi* introduction. As expected, we detected no viral infection in both cages before introduction (10 weeks of parasitism, 20 *L. boulardi* tested). PCR diagnostic performed after introduction (16 weeks of parasitism) showed that LbFV infection did not spread among *L. boulardi* wasps (number of infected individuals/number of tested individuals: 0/24, cage n°2 and 2/24, cage n°3). As expected, no viral contamination was found in the other cages of this modality (on five tested individuals, after 10 and 16 weeks of parasitism).

DISCUSSION

Parasites can alter host communities by having debilitating effects on their hosts that can be differential between hosts that they exploit or that can directly affect a host that is abundant or ecologically influential. Parasites can also influence community structure by indirectly (*i.e.* not via pathology) modifying the importance of the role played by their hosts. This is the case for manipulative parasites that have been shown to interfere with apparent competition phenomena, playing the role of mediator by manipulating host species more than others (Thomas *et al.* 1995; Bauer *et al.* 2000). These changes in host phenotype can result in an increase or decrease in the availability of resource that in turn, can modify species abundance, interactions between species and coexistence in host community (Mouritsen & Poulin 2005). Our study showed that the manipulation of *L. boulandi* superparasitism behaviour by a heritable microparasite can have indirect consequences on other parasitoids exploiting *Drosophila* larvae.

Influence of LbFV on the outcome of interspecific competition

Our results show that LbFV can mediate interspecific competition outcome between *L. boulandi* and *L. heterotoma*. The population cage data are in agreement with the competition experiments in tubes results: *L. heterotoma* can outcompete *L. boulandi* when *L. boulandi* is infected by LbFV. This contrasts with what is observed in the absence of infection: in all replicates, *L. boulandi* rapidly outcompeted *L. heterotoma* confirming that *L. boulandi* is intrinsically the dominant competitor.

A good way to prove previous conclusions would have been to show a rise of *L. heterotoma* proportions after the introduction of infected *L. boulandi* individuals in both cages from the UI *L. boulandi* / *L. heterotoma* modality. Unfortunately, The viral infection did not

spread through *L. bouleari* individuals. We observed any effect of the introduction of LbFV in these cages probably because of a too late parasitoid introduction compared to the weak proportions of *L. heterotoma* that may be insufficient to reverse the tendency. It may also need to introduce a larger size of infected *L. bouleari* individuals introduced.

We do not always find successful competitive outcome of *L. heterotoma* in cages infected with LbFV. Environmental conditions of the population cages certainly lead to the loss of the one of the two species. For *L. heterotoma* to be successful of the competition, it need to attain a sufficient frequency in cages to outcompete *L. bouleari*. The value of this threshold may have been reached in three of the population cages but not in the other two. These results underscore the importance to multiplate replicates when searching parasite effects at a population-level.

Mechanisms

What are the mechanisms by which viral infection modifies the competitive ability of *L. bouleari*? Previously, Varaldi *et al.* (2005) reported that viral infection does not induce strong fitness costs on *L. bouleari* females and that it exerts a specific action on superparasitism behaviour (Varaldi *et al.* 2006b). Indeed, in our experiments, superparasitism clearly appeared dependant of viral infection: uninfected females rarely superparasitized their hosts, whereas infected *L. bouleari* deposited several eggs per host. However, we reported a strongly decrease of the tendency to superparasitize as the experiment progressed. The measure of egg load of *L. bouleari* indicated a decrease in egg load through time for *L. bouleari* infected by the virus whereas the decrease is really less important for uninfected *L. bouleari*. At the end of experiment, the egg load of infected *L. bouleari* was very low compared to the one of uninfected *L. bouleari* for which many eggs were still available. After four days of parasitism, infected *L. bouleari* had not enough egg to parasite *Drosophila* hosts, as confirmed by the fall

of infestations of *Drosophila* hosts (see PIM values). Thus, laying activity assays indicated that the behavioural alteration caused by LbFV was in great part indirectly responsible for the decrease in the competitiveness of its host through the alteration of the dynamics of egg load. The lack of eggs for infected *L. boucardi* females just after four days of parasitism activity strongly decreased the invasion capacity of the parasitoid species, at the advantage of its competitor *L. heterotoma*.

Our study reinforced the increasing evidence that parasites can be important to the structuring of natural animal communities or functioning of ecosystems, particularly when parasites alter the behaviour of hosts. A recent example comes from the infection of the herbivorous snail *Littorea littorea* by the digenean parasite *Cryptocotyle lingua*. Infection with this digenean induces behavioural changes on its host and consequently reduces macroalgal biomass consumption by snails what in turn modulates snail's influence on rocky intertidal community of the northern Atlantic coast of North America probably through the apparent severity of the physiological effects of parasitism on the digestive system of the snails (Wood *et al.* 2007). In this model, the structure in ecological intertidal communities is modified because at the origin, there is a pathological effect due to parasitism. In *L. boucardi* / virus system, host fitness traits relevant to viral propagation appear to be unaffected by viral infection but the behaviour induced by viral manipulation seems to be at the origin of modification in the interaction between parasitoid species and consequently in the structure of parasitoid community.

Ecological significance

We also tested the hypothesis that during superparasitism, virus could be horizontally transferred from a *L. boucardi* egg to a *L. heterotoma* one and thus invade *L. heterotoma* population. However, viral infection was never detected in *L. heterotoma* that were in

competition with infected *L. boulardi*. In previous works, we never detected LbFV infection in *L. heterotoma* and interspecific horizontal transfer tentative of viral particles using superparasitism always failed (Patot *et al.* 2009; Patot *et al. in prep*). Taken together, the results indicated a specific relationship between the virus and the *L. boulardi* species. Specialist parasites can allow species coexistence where it would otherwise not be possible due to the competitive exclusion of the weaker competitor (Fenton & Brockhurst 2008). Therefore specialist parasites can play a powerful role in structuring ecological communities.

Field studies showed that LbFV can reach very high prevalence in some *L. boulardi* populations of the south of France (up to 95%) (Patot *et al.* 2009; Patot *et al. submitted*). In the south of France, *L. heterotoma* is outcompeted by *L. boulardi* but not eliminated since it is maintained in proportions around 5% (Fleury *et al.* 2004). Previous works reports that coexistence of *L. boulardi* and *L. heterotoma* was due to environmental conditions (i.e. temperature) (study in Tunisia: Carton *et al.* 1991), by avoiding competition and local differentiations of behavioural traits in the south of France (Allemand *et al.* 1999), by a temporal segregation of activity on a daily basis (Fleury *et al.* 2000) or by various mechanisms of resource partitioning, mainly difference in their host range (Fleury *et al.* 2004). However, at that time, the presence of LbFV was not controlled for, since it had not been described yet. The decrease of the competitive ability of *L. boulardi* due to viral infection may explain coexistence of the two *Leptopilina* species.

On the other hand, infection rates by LbFV appeared to be very weak in the marginal zone of *L. boulardi* repartition (Patot *et al. submitted*), an area where *L. heterotoma* is the most abundant parasitoid species. Does LbFV modify the invasion capacity of *L. boulardi*? We could hypothesises that in the north, only UI *L. boulardi* were observed because the virus prevents its host to maintain when confronted with increasing densities of *L. heterotoma*.

Conclusion

Classically, horizontally transmitted parasites have been shown to influence interspecific interactions through pathogenic effects on host viability, fecundity or reproduction. However, to our knowledge, this is the first time that a vertically transmitted symbiont without lethal effect is shown to be involved in host community structure and biodiversity. The behaviour manipulation induced by the virus is at the origin of an indirect change in the interaction between parasitoid species. The net effect of this manipulation on local biodiversity seems positive: by reducing competition for hosts, local coexistence of *L. boulardi* and *L. heterotoma* is made possible. It is important to bear in mind, however, that in addition to virus presence and its prevalence, other variables (e.g., temperature, host availability, competitors) simultaneously exert strong influence on parasitoid community composition.

REFERENCES

- Allemand R., Fleury F., Lemaitre C. & Boulétreau M. (1999) Dynamique des populations et interactions compétitives chez deux espèces de *Leptopilina*, parasitoïdes de drosophiles, dans la vallée du Rhône (Hymenoptera: Figitidae). *Annales de la Société Entomologique de France* 35 (suppl.), 97-103
- Balas M.T., Lee M. H. & Werren J. H. (1996) Distribution and fitness effects of the son-killer bacterium in *Nasonia*. *Evolutionary Ecology*, 10, 593-607
- Bauer A., Trouve S., Gregoire A., Bollache L. & Cézilly F. (2000) Differential influence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on the behaviour of native and invader gammarid species. *International journal for parasitology*, 30, 1453-1457
- Bensadia F., Boudreault S., Guay J.F., Michaud D. & Cloutier C. (2006) Aphid clonal resistance to a parasitoid fails under heat stress. *J Insect Physiol*, 52, 146-57
- Carton Y., Haouas S., Marrakchi M. & Hochberg M. (1991) Two competing parasitoid species coexist in sympatry. *Oikos*, 60, 222-230
- Dale C. & Welburn S.C. (2001) The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. *Int J Parasitol*, 31, 628-31
- David J. (1962) A new medium for rearing *Drosophila* in axenic condition. *Drosophila Info Service*, 36
- Fenton A. & Brockhurst M., A. (2008) The role of specialist parasites in structuring host communities. *Ecology Research*, 23, 795-804
- Fleuriet A. (1983) Influence of the population size on the frequency of flies infected by sigma virus in populations of *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol*, 42
- Fleury F., Allemand R., Vavre F., Fouillet P. & Boulétreau M. (2000) Adaptive significance of a circadian clock: temporal segregation of activities reduces intrinsic competitive

- inferiority in *Drosophila* parasitoids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267, 1005-1010
- Fleury F., Ris N., Allemand R., Fouillet P., Carton Y. & Bouletreau 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, 181-94
- Gandon S., Rivero A. & Varaldi J. (2006) Superparasitism evolution: adaptation or manipulation? *American Naturalist*, 167, E1-22
- Hatcher M.J., Dick J.T. & Dunn A.M. (2006) How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecology Letters*, 9, 1253-71
- Hedges L.M., Brownlie J.C., O'Neill S.L. & Johnson K.N. (2008) *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, 322, 702
- Hudson P. & Greenman J. (1998) Competition mediated by parasites: biological and theoretical progress. *Trends Ecol Evol*, 13, 387-390
- Hudson P.J., Dobson A.P. & Lafferty K.D. (2006) Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 381-5
- Kenyon S.G. & Hunter M.S. (2007) Manipulation of oviposition choice of the parasitoid wasp, *Encarsia pergandiella*, by the endosymbiotic bacterium *Cardinium*. *J Evol Biol*, 20, 707-16
- Montllor C.B., Maxmen, A., Purcell, A.H. (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27, 189-195
- Moran N.A., McCutcheon J.P. & Nakabachi A. (2008) Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annual Review of Genetics*, 42, 165-190

- Mouritsen K.N. & Poulin R. (2002) Parasitism, community structure and biodiversity in intertidal ecosystems. *Parasitology*, 124 Suppl, S101-17
- Mouritsen K.N. & Poulin R. (2005) Parasites boosts biodiversity and changes animal community structure by trait-mediated indirect effects. *Oikos*, 108, 344-350
- O'Neill S.L., Hoffmann, A. A., Werren, J. H. (1997) *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford University Press USA.
- Oliver K.M., Campos J., Moran N.A. & Hunter M.S. (2008) Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proc Biol Sci*, 275, 293-9
- Oliver K.M., Russell J.A., Moran N.A. & Hunter M.S. (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 100, 1803-7
- Patot S., Lepetit D., Charif D., Varaldi J. & Fleury F. (2009) Molecular detection, penetrance, and transmission of an inherited virus responsible for behavioral manipulation of an insect parasitoid. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 703-10
- Poulin R. (1999) The functional importance of parasites in animal communities: many roles at many levels? *International Journal for Parasitology*, 29, 903-14
- Russell J.A. & Moran N.A. (2006) Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 603-10
- Scarborough C.L., Ferrari J. & Godfray H.C. (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310, 1781
- Schall J.J. (1992) Parasite-mediated competition in *Anolis* lizards. *Oecologia*, 92, 58-64
- Stouthamer R., Breeuwer J.A. & Hurst G.D. (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol*, 53, 71-102

- Teixeira L., Ferreira A. & Ashburner M. (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*, 6, e2
- Thomas F., Adamo S. & Moore J. (2005) Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behav Processes*, 68, 185-99
- Thomas F., Renaud F., Rousset F., Cézilly F. & Demeus T. (1995) Differential mortality of two closely-related host species induced by one parasite. *Proc Biol Sci*, 260, 349-352
- Tsuchida T., Koga R. & Fukatsu T. (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303, 1989
- Varaldi J., Bouletreau M. & Fleury F. (2005) Cost induced by viral particles manipulating superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. *Parasitology*, 131, 161-8
- Varaldi J., Fouillet P., Ravallec M., Lopez-Ferber M., Bouletreau M. & Fleury F. (2003) Infectious behavior in a parasitoid. *Science*, 302, 1930
- Varaldi J., Gandon S., Rivero A., Patot S. & Fleury F. (2006a) A Newly Discovered Virus Manipulates Superparasitism Behavior in a Parasitoid Wasp. In: *Insect symbiosis* (ed. Bourtzis KMTA), pp. 119-139. CRC Press
- Varaldi J., Petit S., Bouletreau M. & Fleury F. (2006b) The virus infecting the parasitoid *Leptopilina boulardi* exerts a specific action on superparasitism behaviour. *Parasitology*, 132, 747-56
- Varaldi J., Ravallec M., Labrosse C., Lopez-Ferber M., Bouletreau M. & Fleury F. (2006c) Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Journal of Insect Physiology*, 52, 1202-12

- Vavre F., Fleury F., Lepetit D., Fouillet P. & Bouletreau M. (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1711-23
- Werren J.H. (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol*, 42, 587-609
- Werren J.H., Baldo L. & Clark M.E. (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 741-51
- Wood C.L., Byers J.E., Cottingham K.L., Altman I., Donahue M.J. & Blakeslee A.M. (2007) Parasites alter community structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104, 9335-9
- Yan G. & Norman S. (1995) Infection of *Tribolium* beetles with a tapeworm: variation in susceptibility within and between beetle species and among genetic strains. *J Parasitol*, 81, 37-42

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS 5558) and the French Ministry « Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Fond National de la Science, ACI Jeunes Chercheurs 2004 », JC 10013 « Virus symbiotiques manipulateurs du comportement des insectes parasites ».

FIGURES

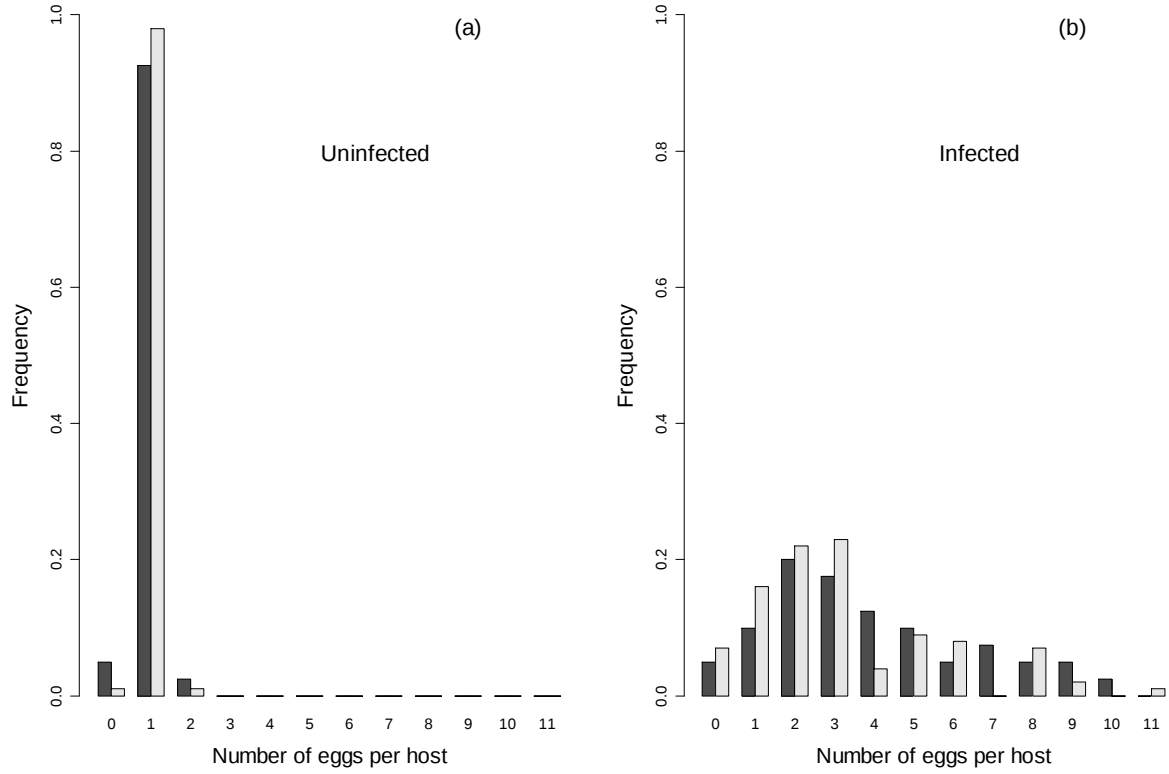


Figure 1 Frequency distribution of parasitic eggs laid by (a) uninfected and (b) infected *L. boulandi* females within host larvae. The phenotypical tests were done on sisters of the individuals used for the competition experiments in tubes (dark bars) and in population cages (clear bars). For the competition experiments in tubes, ten females of each infection status were tested. For the competition experiments in cages, 24 females of each infection status were tested. For each female tested, four larvae were dissected on ten available.

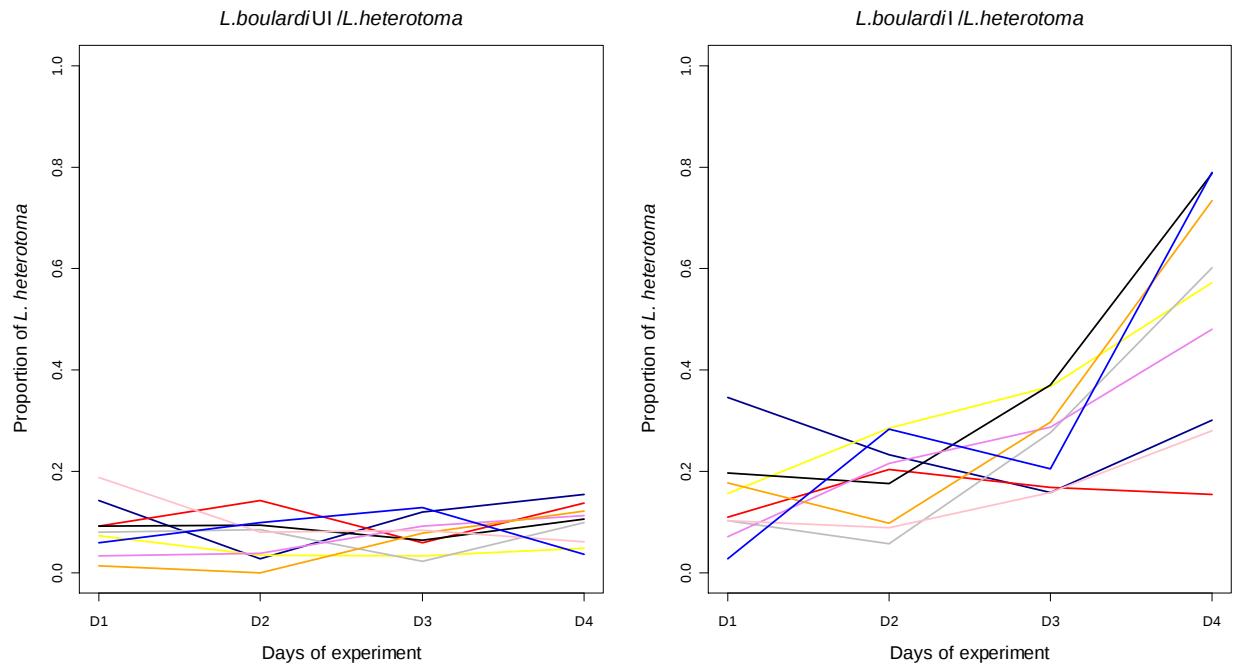


Figure 2 Relative proportion of *L. heterotoma* in both modalities of interspecific competition: uninfected *L. boulardi* / *L. heterotoma* (UI *L. boulardi* / *L. heterotoma*) and infected *L. boulardi* / *L. heterotoma* (I *L. boulardi* / *L. heterotoma*) for each of the nine replicates and at each day of experiment (D1, D2, D3, D4).

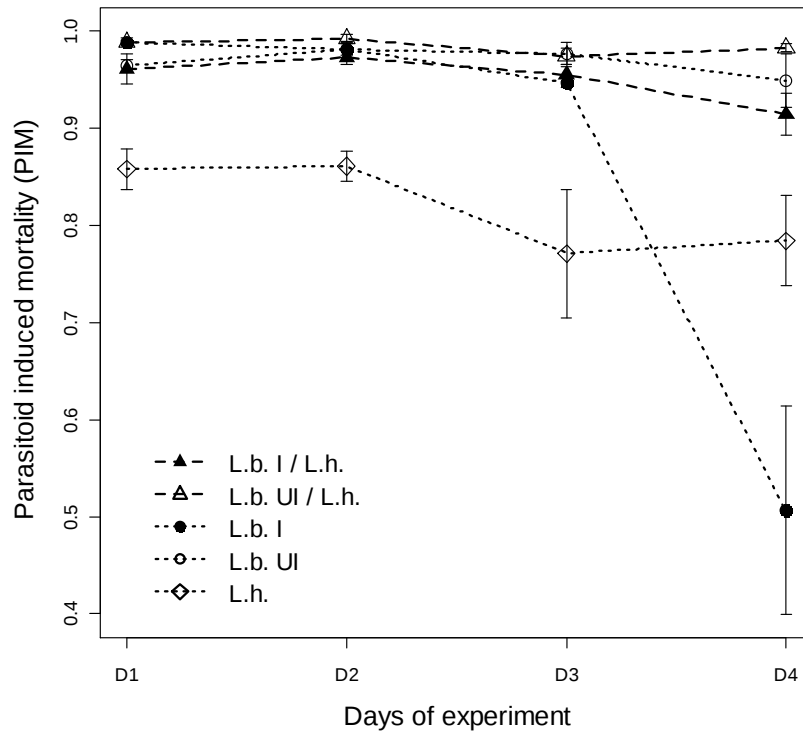


Figure 3 Parasitoid induced mortality (PIM) in both modalities of interspecific competition infected *L. boulandi* /*L. heterotoma* (I *L.b* /*L.h*) and uninfected *L. boulandi* /*L. heterotoma* (UI *L.b* /*L.h*) and in controls (*L.b* I, *L.b* UI). PIM, represented as mean of values between repeats (mean $\pm$ SE), was followed during four days (D1, D2, D3, D4).

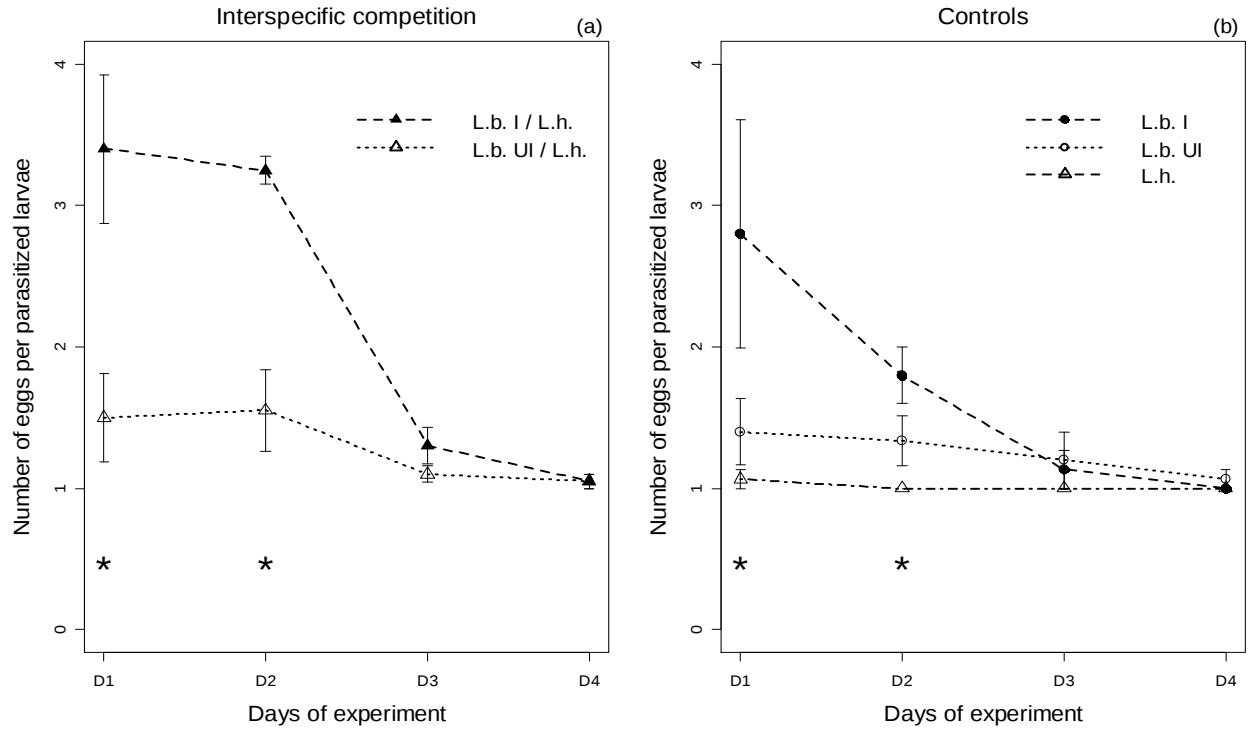


Figure 4 Superparasitism intensity of *L. boulardi* in both modalities of interspecific competition infected *L. boulardi* /*L. heterotoma* (I *L.b* /*L.h*) and uninfected *L. boulardi* /*L. heterotoma* (UI *L.b* /*L.h*) and in controls (*L.b* I, *L.b* UI). Superparasitism behaviour was estimated by a count of parasites in five dissected *Drosophila* larvae. Dissections obtained from all replicates were pooled together within each combination. The number of parasites in one host, represented as mean of values between repeats (mean±SE), was followed during four days (D1, D2, D3, D4). * = $P < 0.05$, Kruskal-Wallis.

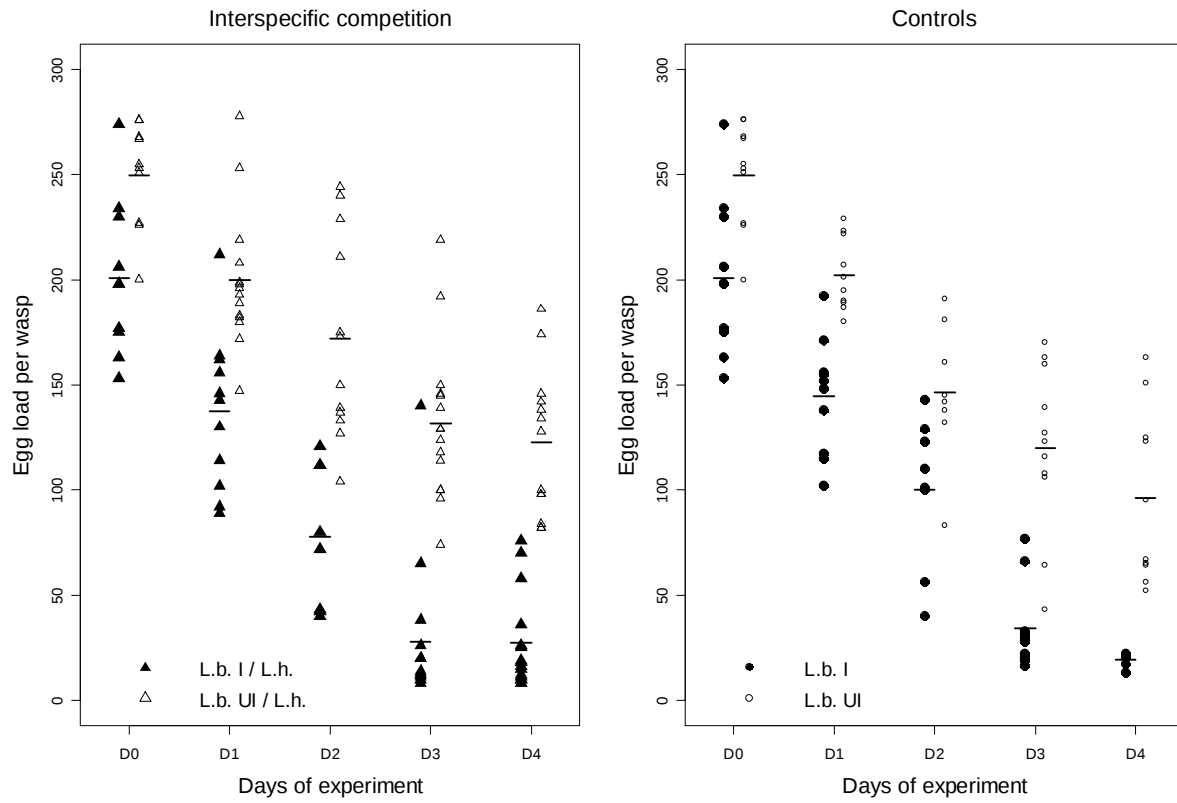


Figure 5 Egg load of *L. boulardi* in both modalities of interspecific competition infected *L. boulardi* /*L. heterotoma* (I *L.b* /*L.h*) and uninfected *L. boulardi* /*L. heterotoma* (UI *L.b* /*L.h*) and in controls (*L.b* I, *L.b* UI). The number of eggs measured from dissections of both ovaries was realized before experiment (D0) and followed during the four days of experiment (D1, D2, D3, D4). Horizontal lines indicate the mean of egg load on all studied individuals.

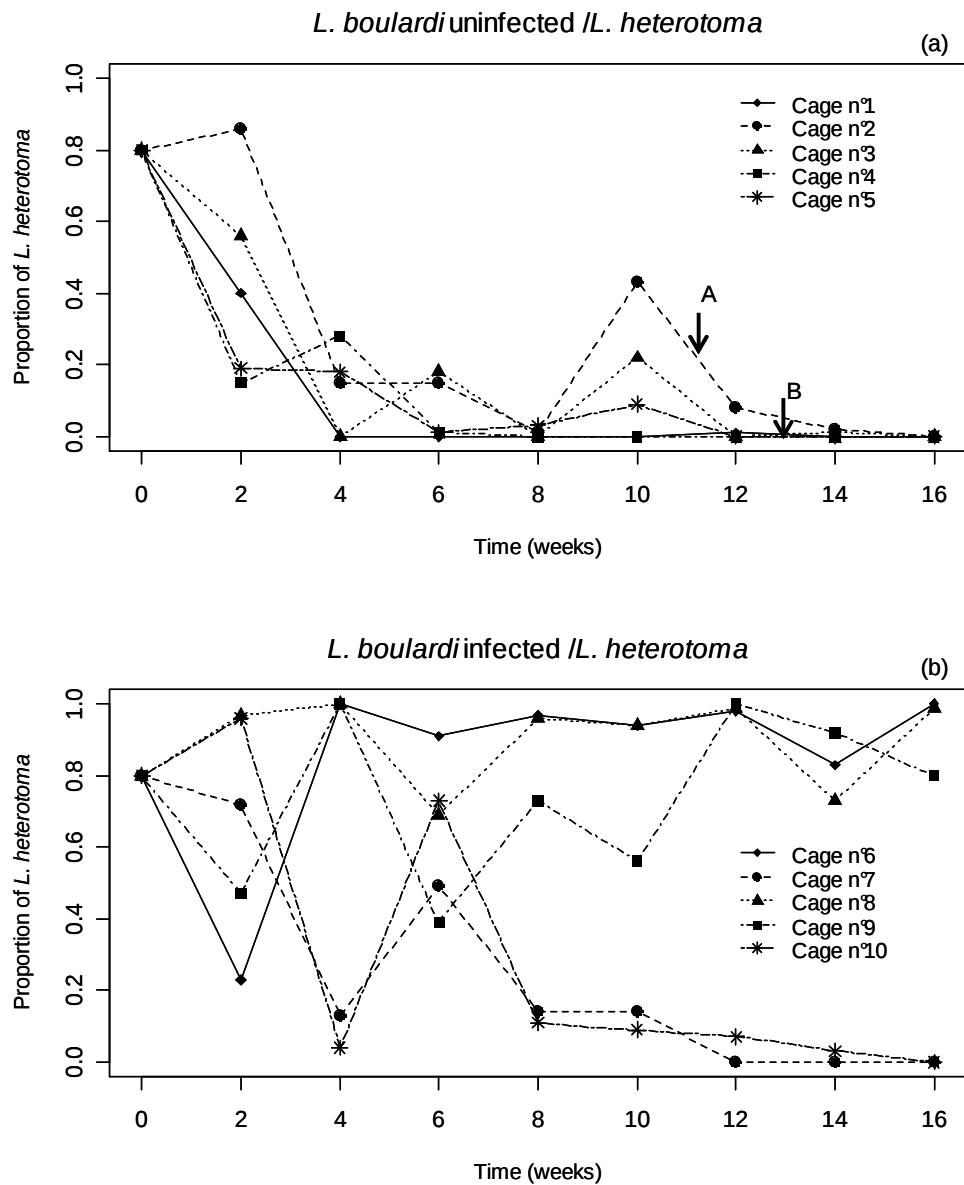


Figure 6 Relative proportion of *L. heterotoma* over time in case of interspecific competition between (a) infected *L. bouhardi* / *L. heterotoma* (I *L.b* / *L.h*) and (b) uninfected *L. bouhardi* / *L. heterotoma* (UI *L.b* / *L.h*).

A: introduction of 20 infected *L. bouhardi* in cage n°2.

B: introduction of 20 infected *L. bouhardi* in cage n°3.

Discussion générale

La détection des virus faiblement pathogènes reste difficile, les effets phénotypiques qu'ils induisent pouvant être confondus avec les caractéristiques propres de leur hôte. Pourtant, ces virus infecteraient une part importante des populations d'insectes. Chez *D. melanogaster* par exemple, Brun & Plus (1980) ont estimé que 39% des 49 populations naturelles étudiées, originaires d'Europe, d'Afrique et d'Amérique, étaient infectées par au moins un virus de ce type. Chez cette même espèce de drosophile, le virus héritable sigma a été trouvé à des prévalences de 15% dans des populations naturelles de Grèce (Fleuriet 1976, 1983; Carpenter *et al.* 2007). Dans certaines populations du sud de la France, ce virus a même atteint des taux d'infection de 65% (Fleuriet & Periquet 1993). Chez l'abeille *Apis mellifera*, le virus DWV (*Deformed Wing Virus*) a été détecté dans 98% des adultes composant certaines ruches françaises (Tentcheva *et al.* 2004). Ce virus présente une transmission verticale (Chen 2005; Chen *et al.* 2006) en plus d'une transmission horizontale par l'acarien vecteur *Varroa destructor* et n'a apparemment pas d'effets pathogènes forts sur son hôte (Tentcheva *et al.* 2004). D'autres agents viraux à transmission verticale de la famille des réovirus ont été détectés dans plus de 46% des populations naturelles de parasitoïdes lépidoptères sans que l'on connaisse l'effet qu'ils induisent sur leurs hôtes (Graham *et al.* 2006). Il apparaît que ces virus hérithables atteignent de fortes prévalences dans les populations naturelles d'insectes et représentent ainsi d'importants acteurs potentiels de l'écologie et de l'évolution de leurs hôtes.

Nous avons tenté d'évaluer l'importance écologique et évolutive d'un virus hérithable infectant un insecte parasitoïde de drosophile en étudiant le système *L. bouhardi* / LbFV. Chez la guêpe, le comportement de superparasitisme apparaît être l'expression du phénotype étendu induit par le virus. Cette manipulation comportementale permet une transmission horizontale des particules virales. Ce virus, sans effet délétère majeur sur les traits d'histoire de vie de *L. bouhardi* ou sur d'autres caractéristiques comportementales, a pu être détecté après la mise au point d'un outil moléculaire diagnostique de l'infection et sa prévalence au sein des populations naturelles de *L. bouhardi* a été estimée. La prévalence virale peut atteindre des valeurs

extrêmement fortes dans certaines localités du sud-est de la France. La présence de LbFV a été détectée chez *L. boulandi* et non chez son compétiteur *L. heterotoma* suggérant une forte spécificité de l'infection. Ceci a posé la question de l'impact de la présence du virus dans la communauté de parasitoïdes, ou en d'autres termes, de l'impact de l'induction d'un tel comportement sur la structure et le fonctionnement de la communauté hôte dont nous discuterons dans cette dernière partie.

I- Manipulation parasitaire : une approche fonctionnelle

Bien que de nombreux exemples de manipulation parasitaire aient été décrits (Moore 2002; Thomas *et al.* 2005), on sait encore peu de choses sur les dialogues et conflits moléculaires entre l'hôte et le parasite au cours du processus de manipulation.

Chez le crustacé amphipode *Gammarus culex* parasité par des acantocéphales, Tain *et al.* (2006) ont pu établir que l'inversion du phototactisme du crustacé induit par les parasites est fonctionnellement liée à une augmentation de l'activité sérotonergique dans le cerveau des individus infectés. La sérotonine (neuropeptide) a été impliquée dans l'inversion du phototactisme chez les crustacés amphipodes infectés par des acantocéphales (Maynard *et al.* 1996; Tain *et al.* 2006) ou des trématodes (Helluy & Thomas 2003). Mais si la voie physiologique impliquée dans le phénomène de manipulation du phototactisme est mieux cernée, le mode d'action précis de ces parasites manipulateurs n'est pas encore connu. Il semble peu probable que les parasites puissent produire de la sérotonine en assez grande quantité dans le système nerveux de leurs hôtes. Il est cependant possible que les parasites sécrètent des substances interagissant avec le système nerveux de l'hôte. Il se peut aussi que les parasites puissent directement agir sur les gènes à l'origine de la production de sérotonine ou sur ceux des récepteurs du neuropeptide dans le cerveau des crustacés (voir Tain *et al.* 2006 pour une discussion complète).

D'autres travaux récents se sont intéressés aux mécanismes moléculaires de la manipulation parasitaire qui fait intervenir un orthoptère et son ver parasite nématomorphe. Ces parasites manipulent le comportement de leurs hôtes en poussant ces derniers à un acte suicidaire en se jetant à l'eau, ce qui permet au parasite d'accomplir son cycle de vie et de rejoindre un habitat favorable pour la rencontre de partenaires sexuels (Thomas *et al.* 2002). Au travers d'une approche de protéomique, Biron *et al.* (2005) ont montré que le

nématomorphe *Spinochondodes tellinii* peut modifier le comportement de la sauterelle *Mecanema thalassinum* en produisant des molécules « effectrices » qui agissent directement sur le système nerveux central de l'hôte (largage des neurotransmetteurs, apoptose, production de protéines mimétiques).

Le mode d'action de LbFV sur *L. boulandi* n'est pas connu. Un grand nombre d'espèces de parasitoïdes sont capables de reconnaître les hôtes parasités des hôtes sains (capacité de discrimination, van Lenteren 1981; van Alphen & Visser 1990). Il semble que des marquages internes ou externes de l'hôte permettent aux insectes de connaître son statut d'infestation ce qui semble être le cas chez *L. boulandi* (Varaldi 2003). Le virus pourrait alors induire une déficience dans la perception du signal ou dans son intégration.

Chez *L. boulandi*, la perception du signal pourrait se faire par l'ovipositeur (reconnaissance interne), comme chez *L. heterotoma* (van Lenteren 1976). La femelle pique la larve hôte avec son ovipositeur et la perception du signal se fait *via* les chémo-récepteurs disposés à l'extrémité de l'organe d'oviposition. Ces récepteurs pourraient être des cibles de la manipulation parasitaire ce qui induirait une non-reconnaissance des hôtes parasités conduisant à l'acceptation de ces hôtes par la femelle parasitoïde. Les récepteurs ont été étudiés en détails chez *L. heterotoma* et il apparaît que chacun des sept chémo-récepteurs existant est innervé par six neurones (van Lenteren *et al.* 2007). L'hypothèse proposée est que le virus pourrait altérer ces connexions neuronales ce qui diminuerait la capacité de discrimination de *L. boulandi*. Les femelles infectées par LbFV accepteraient ainsi de pondre dans des larves de drosophiles déjà parasitées (superparasitisme) contrairement à celles non infectées par LbFV.

L'infection virale pourrait également être à l'origine d'une déficience dans l'intégration de l'information du marquage de l'hôte. En début de thèse, le virus avait été recherché et observé seulement dans les organes reproducteurs de *L. boulandi* expliquant pourquoi nous avons choisi ces tissus pour construire les banques soustraites. Grâce à l'outil moléculaire, nous avons depuis détecté le virus aussi bien dans l'abdomen de la guêpe, que dans la tête et le thorax (Patot *et al.* 2009). On peut faire l'hypothèse que le virus altère le traitement du signal à l'origine de la discrimination des hôtes en infectant le système nerveux central (SNC) de la guêpe. Plusieurs études ont rapporté les effets directs et indirects des parasites sur le SNC de leurs hôtes (Adamo 2002; Helluy & Thomas 2003; Biron *et al.* 2005). Néanmoins, il faudrait que cette action de LbFV sur le SNC de *L. boulandi* modifie

spécifiquement le comportement de ponte de la guêpe puisqu'aucun autre comportement ne semble modifié par l'infection (Varaldi *et al.* 2006b).

Des études de l'expression différentielle des gènes de l'hôte selon son statut d'infection, comme l'expérience de transcriptomique réalisée durant ce travail de thèse, peuvent permettre d'apporter des éléments de réponse à ces hypothèses puisque le virus pourrait altérer la transmission de l'influx nerveux ou le SNC en manipulant l'expression génique du parasitoïde. En plus d'analyser le contenu des banques soustraites obtenues durant cette thèse, il pourrait être intéressant de construire d'autres banques à partir d'organes différents de *L. boucardi*. L'ovipositeur pourrait être un choix judicieux afin d'étudier la première hypothèse (effet sur la perception du signal). Concernant la seconde hypothèse (effet sur l'intégration du signal), il pourrait être envisagé de réitérer la construction d'une banque soustraite à partir de la tête des femelles *L. boucardi* dans le but de se focaliser sur l'analyse de l'expression différentielle des gènes du cerveau de l'insecte. Comparer différentes banques construites à des temps différents pourrait également augmenter les chances de mettre en évidence des gènes de l'hôte voir du virus impliqués dans la manipulation parasitaire. Dans le cas du système *L. boucardi* / LbFV, la recherche des facteurs responsables du superparasitisme peut se révéler plus subtile que dans d'autres cas biologiques car il ne s'agit pas d'un comportement nouveau pour l'hôte (comme par exemple le comportement suicidaire du grillon ou de la sauterelle ; Thomas *et al.* 2002) mais de l'expression exacerbée d'un comportement faisant parti du répertoire comportemental normal de *L. boucardi*.

II. Epidémiologie du virus

La mise au point d'un outil moléculaire de détection de l'infection a permis d'étudier la prévalence de LbFV dans les populations naturelles de *L. boucardi* à l'échelle du quart sud-est de la France. Nous avons mis en évidence des valeurs de prévalence de LbFV très variables selon l'origine géographique des populations : celles les plus au sud présentent d'importants taux d'infection alors que celles les plus au nord échantillonnées à la limite de l'aire de répartition de *L. boucardi* présentent des prévalences très faibles voir nulles. Il s'agit de la première approche épidémiologique du virus sur la base d'un diagnostic moléculaire de l'infection. Il se pose désormais la question suivante : quels sont les facteurs pouvant

expliquer l'épidémiologie de LbFV ? Nous proposons différentes hypothèses, pas forcément exclusives les unes des autres, différents facteurs pouvant expliquer l'épidémiologie du virus.

Le mode de transmission d'un symbiote est un paramètre majeur pour la compréhension de son maintien et de ses effets dans les populations hôtes. Pour un symbiote à transmission exclusivement verticale, les intérêts des deux partenaires vont s'aligner et tout symbiote induisant un coût sur la fitness de son hôte sera contre-sélectionné (excepté pour les parasites de la reproduction). A l'inverse, pour un symbiote transmis horizontalement, les fitness des deux partenaires tendent à diverger et les symbiotes virulents pourront être sélectionnés, dès que leur virulence augmente leur transmission. La situation est plus complexe pour les symbiotes à transmission mixte (verticale et horizontale).

Dans le système *L. bouhardi* / LbFV, les deux modes de transmission sont présents (Varaldi *et al.* 2003). Selon les conditions écologiques comme la densité en parasitoïdes et en drosophiles, les opportunités de transmission verticale et horizontale peuvent varier. La transmission verticale va permettre au virus d'établir de nouvelles voies d'infection *via* le potentiel de la transmission horizontale qui peut avoir lieu entre une larve de parasitoïde infectée et non infectée lors d'un événement de superparasitisme. Il se pose la question des conséquences des deux types de transmission sur la prévalence de LbFV dans les populations de *L. bouhardi* en fonction de l'hétérogénéité environnementale.

Dans les cas d'un faible ratio parasitoïde/hôte (faible compétition pour les larves de drosophiles), les événements de superparasitisme sont faibles et par conséquent, la probabilité pour le virus de se transmettre horizontalement également. Dans ce cas-là, les prévalences de LbFV se maintiennent à un niveau bas. Si le ratio parasitoïde/hôte est fort (forte compétition pour les larves de drosophiles), les événements de superparasitisme vont être plus fréquents, augmentant la probabilité que des transferts horizontaux de particules virales se fassent. Il est par conséquent attendu une forte prévalence de LbFV.

Cette relation entre disponibilité en hôtes drosophiles et efficacité de la transmission des particules virales pourrait expliquer le gradient des prévalences de LbFV obtenu durant le travail de cette thèse. Les populations méditerranéennes présentent de fortes densités en parasitoïdes *L. bouhardi* et la compétition pour les drosophiles est importante (Fleury *et al.* 2004). En remontant vers le nord, les populations de *L. bouhardi* diminuent en densité (R. Allemand, com. pers.) avec, pour celles échantillonnées à la limite de l'aire de répartition de cette espèce, de petites populations nouvellement établies. Cependant, l'intensité du

superparasitisme mériterait d'être mesurée dans ces populations naturelles de *L. boulandi* réparties le long de la zone d'étude (zone méditerranéenne jusqu'au nord de Lyon). *L. boulandi* étant une espèce dont l'aire de répartition est en progression vers le nord, un suivi annuel nous permettrait de suivre l'évolution de la prévalence de LbFV en fonction de la remontée de son hôte et de pouvoir confirmer ces scénarii.

Un autre facteur pouvant être impliqué dans l'épidémiologie de LbFV est la température. Ce paramètre est variable entre les différentes localités où les populations de *L. boulandi* ont été échantillonnées dans le but de mesurer la prévalence de LbFV. Cette variabilité suit un gradient nord-sud croissant, tout comme les taux d'infection de LbFV. Il semble qu'une température trop élevée puisse être néfaste aux particules virales comme l'a suggéré l'étude de Varaldi (2003). Lors de l'analyse de la prévalence d'une population de Gotheron durant l'été 2003, il a été observé une brutale disparition du virus au mois d'août sans doute liée à l'exceptionnelle canicule de cette année (l'infection réapparaît ensuite en septembre). A l'inverse, il se pourrait qu'une trop faible température puisse réduire les taux d'infection du virus en agissant négativement sur sa réplication par exemple.

Un autre scénario pouvant expliquer le gradient nord-sud croissant des prévalences de LbFV peut être énoncé. Il est possible que l'invasion des populations de *L. boulandi* par LbFV soit récente ce qui pourrait expliquer ce gradient. Les populations africaines de *L. boulandi* auraient pu être infectées par ce virus au contact d'une autre espèce. Les populations de la côte méditerranéenne auraient par la suite été infectées et l'infection remonterait alors progressivement vers le nord. Les prévalences virales observées ne correspondraient donc pas à l'équilibre épidémiologique, l'invasion du virus étant en train de se réaliser. Ce type de scénario a été proposé pour d'autres types de systèmes insecte/virus afin d'expliquer l'invasion de certaines espèces par des infections virales (Carpenter *et al.* 2007).

Les études épidémiologiques de ce travail de thèse se sont aussi intéressées à la circulation du virus LbFV au sein de la communauté de parasitoïdes de drosophiles. L'efficacité de la transmission horizontale étant avérée au niveau intraspécifique et la compétition pour les hôtes entre *L. boulandi* et *L. heterotoma* pouvant être forte (événements de multiparasitisme probables), il se posait la question du transfert de LbFV de *L. boulandi* vers *L. heterotoma*. Nous n'avons pas mis en évidence la présence du virus chez *L. heterotoma* (Patot *et al.* 2009) et il n'a pas été possible de transférer les particules virales entre

L. bouhardi et *L. heterotoma* lors d'un événement de multiparasitisme. Il semble donc que cette espèce soit réfractaire à l'infection (Patot *et al.* en préparation). Ce point est à compléter dans l'avenir en élargissant l'étude du spectre d'hôte du virus aux autres parasitoïdes en compétition avec *L. bouhardi* (*Asobara tabida* ou l'hyperparasitoïde facultatif *Pachycrepoideus dubius*). A partir de l'analyse d'une population naturelle, l'hôte *D. melanogaster* non plus ne semble pas infecté par LbFV (Patot *et al.* 2009).

LbFV semble être spécifique à *L. bouhardi* et atteint de fortes prévalences dans certaines populations de cette espèce de parasitoïdes. Il se pose alors la question des conséquences de l'infection virale sur la structure des communautés de parasitoïdes de drosophiles.

III. Co-évolution entre les partenaires

III.1. Variabilité génétique et co-adaptation

La mise au point d'un outil moléculaire diagnostique de l'infection par LbFV nous a permis d'aller plus loin dans l'étude de la variabilité du comportement de superparasitisme chez *L. bouhardi*. Mais nous n'avons pas réussi à mettre en évidence de variabilité génétique ayant des conséquences sur la manipulation comportementale ni du côté parasitoïde, ni du côté virus. Nous restons cependant prudents sur ces résultats car il s'agissait d'une première tentative. Le protocole pourrait être amélioré en augmentant le nombre de génotypes hôtes et virus étudiés ainsi que le nombre de réplicats. Il est en effet possible qu'une variabilité environnementale importante ait masqué une éventuelle variabilité génétique. En outre, une seconde expérience réalisée par la suite suggère l'existence d'une variabilité génétique du comportement de superparasitisme côté hôte (Martinez 2008).

D'autre part, les virus présentent généralement d'importants taux mutationnels affectant leur expression phénotypique et il est possible que ce soit le cas pour LbFV ce qui pourrait induire des différences dans la manipulation comportementale de *L. bouhardi*. Des études actuellement en cours viennent de mettre en évidence un polymorphisme important sur d'autres séquences virales (M. Maalouly, master 1). De manière tout à fait intéressante, il a aussi été mis en évidence l'existence d'un nouveau variant de LbFV dans une population du sud de la France (Avignon) (Martinez 2008). Malgré une délétion sur la séquence ADN

connue, ce variant induit un comportement de superparasitisme mais il reste à comparer l'intensité du superparasitisme entre ce variant et celui habituellement étudié sur un même génotype de parasitoïde ainsi que sa capacité invasive.

L'existence de différentes souches virales pose la question suivante : lors d'un événement de superparasitisme, est-ce que la souche virale de la seconde femelle parasitoïde infestante va pouvoir éliminer la souche virale résidente originaire du premier œuf de parasitoïde pondu dans la larve de drosophile ? En d'autres termes, est-ce que la souche virale résidente joue le « rôle de vaccin » en empêchant la super-infection (*i.e.* le remplacement d'une souche virale par une autre) ? Si oui, quelles sont les conséquences sur l'évolution de la manipulation comportementale ? Cette question a été abordée par une approche théorique selon la probabilité de transferts horizontaux de LbFV (Varaldi *et al.* soumis ; cf. annexe 5).

Intéressons-nous dans un premier temps au cas où il n'y pas de remplacement d'une souche virale par une autre. Lorsque la probabilité de transmission horizontale du virus augmente, la prévalence virale augmente également puisque la diffusion du virus entre parasitoïdes de génotypes différents est favorisée. En considérant que la situation correspond à celle observée à l'équilibre épidémiologique, la prévalence virale augmente et donc les opportunités de transmission horizontale diminuent. Une plus faible tendance à superparasiter devrait être sélectionnée. Paradoxalement, une forte prévalence du virus devrait donc sélectionner une plus faible tendance à superparasiter.

Dans le cas où le remplacement d'une souche virale par une autre est possible, l'évolution de la stratégie optimale du superparasitisme du virus va être différente. Lorsque la probabilité de transmission horizontale du virus est faible, la prévalence virale est faible (à l'équilibre épidémiologique). Si la probabilité de transferts horizontaux est augmentée, il y a sélection pour plus de superparasitisme, la souche virale résidente pouvant être remplacée par une souche virale induisant plus de superparasitisme, et ce jusqu'à un seuil de probabilité de transferts horizontaux où la prévalence de LbFV est tellement élevée que les opportunités de transferts horizontaux deviennent plus faibles. Dans ces conditions, il devrait alors y avoir sélection pour moins de superparasitisme.

Il pourrait être envisagé de tester ces prédictions sur des souches virales issues de populations naturelles de *L. bouhardi* présentant des prévalences de LbFV différentes et d'analyser l'intensité du superparasitisme qu'elles induisent. Cela pourrait se faire à partir de populations de parasitoïdes échantillonnées dans le nord et le sud du quart sud-est de la France où nos résultats montrent des prévalences virales particulièrement distinctes.

Si polymorphisme génétique il y a, une évolution du système hôte-parasite est possible en permettant à chacun des partenaires de faire face aux changements sélectifs dans une situation où l'hétérogénéité environnementale peut conduire à la mise en place d'adaptations locales. Pour le parasitoïde, selon les conditions locales telles que la densité en drosophiles, le comportement des autres femelles ou la prévalence de LbFV, la valeur adaptative du superparasitisme varie (van Alphen & Visser 1990 ; Gandon *et al.* 2006). Pour le virus, ces variations environnementales conditionnent la valeur adaptative de la manipulation comportementale selon les opportunités de transferts horizontaux entre individus *L. bouhardi*. Selon les conditions locales rencontrées, il y a un conflit d'intérêt plus ou moins important entre le virus et le parasitoïde (Gandon *et al.* 2006). Les intérêts tendent à converger en cas de forte compétition pour les larves de drosophiles, situation dans laquelle le parasitoïde peut bénéficier du superparasitisme.

Une adaptation locale du virus pourrait se traduire par une différenciation de sa capacité à manipuler le comportement de son hôte ce qui favoriserait une transmission optimale. En réponse à l'infection virale sur la stratégie de ponte, il pourrait y avoir eu sélection de gènes de résistance chez le parasitoïde. Néanmoins, sur les données expérimentales actuellement disponibles, aucune résistance de la manipulation virale n'a pu être mise en évidence puisque les individus des différentes lignées iso-femelles ayant nouvellement acquis le virus par transfert horizontal (lors d'un événement de superparasitisme) (Patot *et al.* 2009) ou par transmission verticale (Martinez 2008) ont exprimé un comportement de superparasitisme.

L'étude d'une adaptation locale entre le virus et le parasitoïde peut être envisagée expérimentalement par transfert horizontal de particules virales originaire d'une localité A vers une souche de parasitoïde originaire d'une localité B et inversement (protocole croisé). Les différentes expériences de transferts horizontaux réalisées pendant la thèse ont montré qu'il est possible de transfecter des populations éloignées de l'origine géographique d'où provient la souche virale. Les résultats obtenus nous ont également appris que l'infection virale peut s'installer et être transmise aux descendants. Il est donc potentiellement possible d'étudier la co-adaptation entre *L. bouhardi* et LbFV en mesurant divers paramètres de la fitness du parasitoïde (mortalité, fécondité, résistance, longévité, capacité compétitive) et du virus (charge virale, manipulation du comportement de ponte).

Nous avons jusque-là discuté du comportement de superparasitisme des femelles infectées par LbFV. Un autre point intéressant relevé par les travaux théoriques de Gandon *et*

al. (2006) concerne le comportement des femelles non infectées par LbFV. En cas de co-évolution avec un virus manipulateur du comportement (type LbFV), il est prédit que ce sont des stratégies de superparasitisme plus faibles qu'en absence du virus qui devraient être sélectionnées chez les femelles non infectées. Au vu des prévalences de LbFV très variables dans le sud-est de la France, il pourrait être comparé l'expression du comportement de superparasitisme pour des femelles non infectées originaires de populations exemptes d'infection virale à celui de femelles non infectées originaires de populations à fortes prévalences virales. Si la prédiction du modèle est vérifiée, on s'attend à une plus faible intensité dans l'expression du superparasitisme pour le second groupe de femelles non infectées.

III.2. Evolution conjointe des caractères ?

Le coût physiologique de *L. bouhardi* à l'infection par LbFV semble relativement faible (étude au laboratoire ; Varaldi *et al.* 2005a). Cependant, lors de l'expérience de compétition en cages à population, nous avons mesuré le stock d'œufs des femelles infectées et non infectées par LbFV et nous avons noté une valeur plus faible pour les femelles infectées que pour les femelles saines. Il s'agit d'un résultat inattendu puisque lors d'une étude précédente, il avait été obtenu un résultat contraire : le stock d'œufs des femelles *L. bouhardi* infectées était apparu positivement influencé par la présence de LbFV (+11%) (Varaldi *et al.* 2005a).

La souche virale et le parasitoïde utilisés dans les travaux de Varaldi *et al.* (2005a) étaient originaires de Sienne (Italie) (association sympatrique). La souche virale ayant été perdue par la suite, les études réalisées dans le cadre de l'expérience de compétition ont utilisé le même génotype insecte mais une souche virale originaire de Gotheron (France) (association allopatrique). Si l'association parasitoïde/virus présente une co-adaptation locale, il se pourrait que la différence entre les deux résultats proviennent du fait que dans un cas a été étudié le stock d'œufs des femelles *L. bouhardi* pour une association sympatrique et dans l'autre pour une association allopatrique, ce qui conduit à favoriser les premiers résultats.

Le stock d'œufs des femelles *L. bouhardi* infectées est un paramètre *a priori* essentiel à la propagation du virus. Rappelons que les femelles *L. bouhardi* sont pro-ovigéniques, c'est-à-dire qu'à leur naissance, elles ont leur stock d'œufs quasi définitif. La limitation en œufs pour les femelles va donc dépendre de la taille de leur stock d'œufs. Il se pose la question suivante : qu'est-ce qui pourrait expliquer cette augmentation du stock d'œufs chez les

femelles infectées par LbFV observée lors des travaux de Varaldi *et al.* (2005a)? Il pourrait s'agir soit d'une adaptation du parasitoïde en réponse à l'infection virale, soit d'une adaptation du virus, ce qui augmenterait sa propre transmission, l'induction de superparasitisme nécessitant une ressource en œufs importante. Un conflit d'intérêt pourrait ainsi émerger entre les deux partenaires. Le nombre optimal d'œufs pourrait être supérieur pour le virus que pour le parasitoïde : en cause, le gaspillage en œufs induit par le superparasitisme ; sachant que pour le parasitoïde, augmenter son stock d'œufs signifie allouer moins d'énergie à d'autres traits d'histoire de vie.

Ces questions ont été abordées au travers d'une approche de modélisation (Gandon *et al.* en préparation) d'où ressortent deux scénarios possibles quant à l'évolution du stock d'œufs des femelles infectées par LbFV. Le premier scénario suggère une augmentation du stock d'œufs chez les femelles infectées due à une plasticité phénotypique adaptative. Les femelles infectées ont « malgré elles » un taux d'oviposition supérieur aux femelles saines. Elles encourent donc plus de risques d'être limitées en œufs. En augmentant leur stock d'œufs, les femelles infectées diminuent ce risque. Le second scénario propose que cette augmentation du nombre d'œufs à l'émergence soit la conséquence de la manipulation virale. Dans ce cas, il s'agirait d'une réponse adaptative du virus puisque cela lui procure des opportunités supplémentaires de transferts horizontaux et verticaux.

Dans le cas du stock d'œufs, les intérêts des deux partenaires semblent donc s'aligner puisque le processus de co-évolution semblerait favoriser une augmentation du stock d'œufs des femelles *L. boulardi* infectées par LbFV. D'après les résultats du modèle, nous ne pouvons donc *a priori* pas distinguer entre une réponse du parasitoïde ou du virus.

IV- Les parasites manipulateurs au sein des écosystèmes

« *Les hôtes manipulés [par des parasites] peuvent être vu comme des organismes complexes parce qu'ils conservent quelques unes des propriétés et spécificités des individus non infectés mais expriment également de nouveaux caractères qui sont impliqués dans des interactions directes ou indirectes avec d'autres espèces et/ou des congénères* » (Lefèvre 2009). De par la singularité de leurs effets et leur forte prévalence (jusqu'à 95% pour LbFV), il est d'un intérêt majeur d'étudier quels peuvent être les impacts de ces symbiotes sur les écosystèmes dans

lesquels ils évoluent afin de compléter les connaissances déjà recueillies sur le rôle des parasites au sein des communautés d'organismes libres (Poulin 1999).

Les manipulateurs du comportement peuvent entraîner des modifications dans les réseaux trophiques et les flux d'énergie ainsi que dans la stabilité des écosystèmes. Ils peuvent aussi engendrer la création de nouveaux habitats pour les organismes libres de la communauté ou encore altérer les interactions intra- et interspécifiques (Lebarbenchon *et al.* 2007; Lefèvre 2009). C'est dans ce dernier cadre que l'on peut replacer l'effet de LbFV sur la communauté des parasitoïdes de drosophiles. Nous avons en effet vu qu'en altérant la gestion des œufs de *L. boulandi* en forçant celle-ci à pondre de manière excessive dans les larves de drosophiles, le virus engendre indirectement une modification des interactions compétitives entre *L. boulandi* et *L. heterotoma*.

La forte spécificité de l'infection (présence du virus chez *L. boulandi* mais pas chez *L. heterotoma*) donne un aspect particulier à l'issue de la compétition. En infectant l'espèce compétitrice dominante, un parasite peut être à l'origine d'un changement dans la composition de la communauté hôte en permettant à l'espèce dominée de persister voir même avec un renversement de l'issue de la compétition si l'espèce habituellement dominante est fortement affectée par l'infection (en fonction du degré de virulence infligé) (Anderson & May 1986; Schall 1992). Dans la zone méditerranéenne où la prévalence du virus est très élevée, LbFV pourrait permettre le maintien de *L. heterotoma* dans les populations en diminuant les capacités compétitives de *L. boulandi*, laissant ainsi « une chance » à sa compétitrice. Le rôle de LbFV sur la structure des communautés de parasitoïdes de drosophiles est d'autant plus plausible que l'effet de la manipulation comportementale est immédiat. Contrairement à d'autres effets indirects du parasitisme (comme l'effet sur la densité), les répercussions de l'effort de ponte accru observé chez les individus *L. boulandi* infectés se font immédiatement ressentir, *L. heterotoma* bénéficiant de cette situation lui permettant d'augmenter ses effectifs. Dans les populations de *L. boulandi* où la prévalence de LbFV est apparue forte, l'impact du virus sur la structure des communautés de parasitoïdes de drosophiles pourraient se révéler significatif.

Le maintien de la coexistence de ces deux espèces de parasitoïdes sur une même ressource que constitue les larves de drosophiles avait déjà suscité des travaux. De précédentes études suggèrent que *L. heterotoma* peut se maintenir en présence de *L. boulandi* par le biais de divers mécanismes complémentaires : ségrégation temporelle (saisonnière et

circadienne), partage des hôtes sur une base spécifique et spatiale, adaptation locale des traits de vie avec ajustement de la capacité compétitive des espèces (Carton 1986; Fleury 1993; Fleury *et al.* 2004). L'effet de LbFV sur les interactions compétitives entre *L. boulandi* et *L. heterotoma* constitue une nouvelle hypothèse permettant d'expliquer la coexistence de deux espèces dans le sud-est de la France, là où les prévalences virales les plus fortes ont été mesurées.

Bien qu'un effort ait été fait pour s'approcher des conditions naturelles (expériences en tubes répétées ensuite en cages à populations), ce travail a été réalisé au laboratoire. Il manque maintenant des études relatant le rôle des parasites manipulateurs sur la structure des communautés d'hôtes et réalisées en conditions naturelles. Un moyen de répondre à cette question serait de réaliser des échantillonnages de parasitoïdes dans différentes localités du sud-est de la France où les prévalences de LbFV sont variables afin de relier prévalence de l'infection et proportion de *L. heterotoma* versus *L. boulandi*. Nous avons tenté ce type d'expériences pour deux localités : Sonnay (9 pièges) et Epinouze (10 pièges). Mais aucune relation entre les deux paramètres n'a été mise en évidence, sans doute à cause de la prévalence très similaire des deux populations (31% pour Sonnay et 34% pour Epinouze).

Conclusion

Il existe des virus à transmission verticale qui n'induisent pas d'effets pathologiques forts sur leurs hôtes. Pour se maintenir à des prévalences élevées dans les populations hôtes, certains ont développé des stratégies étonnantes comme la manipulation comportementale de l'hôte. Le virus LbFV induit un comportement de superparasitisme favorisant sa propagation au sein des populations de parasitoïde de drosophiles *L. boulandi*. Ce travail de thèse a montré que ce virus n'est pas anecdotique avec des prévalences pouvant être proches de la fixation. Ces systèmes hôte/parasite originaux restent encore peu étudiés et leur importance au sein des écosystèmes est à évaluer. Les travaux de cette thèse ont mis en évidence l'impact de LbFV sur les interactions compétitives interspécifiques chez les parasitoïdes de drosophiles. La prise en compte de ces micro-organismes peut donc se révéler essentielle si l'on souhaite comprendre le fonctionnement des écosystèmes.

Références bibliographiques

- Adamo S.A. (2002) Modulating the modulators: parasites, neuromodulators and host behavioral change. *Brain Behav Evol*, 60, 370-7
- Agnew P., J C.K. & Michalakis Y. (2000) Host life history responses to parasitism. *Microbes Infect*, 2, 891-6
- Aksoy S. (1995) *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *Int J Syst Bacteriol*, 45, 848-51
- Allemand R., Fleury F., Lemaitre C. & Boulétreau M. (1999) Dynamique des populations et interactions compétitives chez deux espèces de *Leptopilina*, parasitoïdes de drosophiles, dans la vallée du Rhône (Hymenoptera: Figitidae). *Annales de la Société Entomologique de France* 35 (suppl.), 97-103
- Allemand R., Lemaître C., Frey F., Boulétreau M., Vavre F., Nordlander G., van Alphen J. & Carton Y. (2002) Phylogeny of six African *Leptopilina* species (Hymenoptera: Cynipoidea, Figitidae), parasitoids of *Drosophila*, with description of three new species. *Ann. Soc. Entomol. Fr.*, 38, 319-332
- Anderson R.M. & May R.M. (1986) The invasion, persistence and spread of infectious diseases within animal and plant communities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 314, 533-70
- Asling B., Dushay M.S. & Hultmark D. (1995) Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. *Insect Mol Biol*, 25, 511-518
- Bakker K., Peulet, P. & Visser, M.E. (1990) The ability to distinguish between hosts containing different numbers of parasitoid eggs by the solitary parasitoid *Leptopilina heterotoma* (Thompson) (Hym., Cynip.) *Netherlands Journal of Zoology* 40, 514-520
- Balas M.T., Lee M. H. & Werren J. H. (1996) Distribution and fitness effects of the son-killer bacterium in *Nasonia*. *Evolutionary Ecology*, 10, 593-607
- Bangrak P., Graidist P., Chotigeat W. & Phongdara A. (2004) Molecular cloning and expression of a mammalian homologue of a translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from *Penaeus monodon* shrimp. *J Biotechnol*, 108, 219-26

- Baumann P., Baumann L., Lai C.Y., Rouhbachsh D., Moran N.A. & Clark M.A. (1995a) Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annu Rev Microbiol*, 49, 55-94
- Baumann P., Lai C., Baumann L., Rouhbachsh D., Moran N.A. & Clark M.A. (1995b) Mutualistic Associations of Aphids and Prokaryotes: Biology of the Genus *Buchnera*. *Appl Environ Microbiol*, 61, 1-7
- Biron D.G., Marche L., Ponton F., Loxdale H.D., Galeotti N., Renault L., Joly C. & Thomas F. (2005) Behavioural manipulation in a grasshopper harbouring hairworm: a proteomics approach. *Proc Biol Sci*, 272, 2117-26
- Boengler K., Pipp F., Schaper W. & Deindl E. (2003) Rapid identification of differentially expressed genes by combination of SSH and MOS. *Lab Invest*, 83, 759-61
- Bordenstein S.R., O'Hara F.P. & Werren J.H. (2001) *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature*, 409, 707-10
- Bose S., Mathur M., Bates P., Joshi N. & Banerjee A.K. (2003) Requirement for cyclophilin A for the replication of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype. *J Gen Virol*, 84, 1687-99
- Boulétreau M. & Fleury F. (2005) Les insectes parasitoïdes et leurs partenaires multiples: des surdoués du parasitisme? *Bulletin de la Société entomologique de France*, 130, 177-192
- Boyle L., O'Neill S.L., Robertson H.M. & Karr T.L. (1993) Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science*, 260, 1796-9
- Brun G. & Plus N. (1980) The viruses of *Drosophila*. In: *The Genetic and Biology of Drosophila* (ed. Ashburner MW, T.), pp. 625-702. Academic Press, New York
- Buchner P. (1965) *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Wiley, New York.
- Burand J.P., Tan W., Kim W., Nojima S. & Roelofs W. (2005) Infection with the insect virus Hz-2v alters mating behavior and pheromone production in female *Helicoverpa zea* moths. *J Insect Sci*, 5, 6
- Carpenter J.A., Obbard D.J., Maside X. & Jiggins F.M. (2007) The recent spread of a vertically transmitted virus through populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 16, 3947-54
- Carton Y., Boulétreau, M., van Alphen, J.J.M. & van Lenteren, J.C. (1986) The *Drosophila* parasitic wasp. In: *The genetics and biology of Drosophila* (ed. Ashburner M, Carson, H.L. & Thompson, J.N.). Academic Press INC, London

- Chen D., He N., Lei K. & Xu X. (2009) Genomic organization of the translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from shrimp *Marsupenaeus japonicus*. *Mol Biol Rep*, 36, 1135-40
- Chen H.H., Zhang R.L., Geng Y.J., Cheng J.Q., Zhang S.X., Huang D.N., Yu L., Gao S.T. & Zhu X.Q. (2007) Identification of differentially expressed genes in female *Culex pipiens pallens*. *Parasitol Res*, 101, 511-5
- Chen Y., Evans J. & Feldlaufer M. (2006) Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol*, 92, 152-9
- Chen Y.A., Pettis, J.S., Collins, A., Feldlaufer, M.F. (2005) Prevalence and Transmission of Honeybee Viruses. *Appl Environ Microbiol*, 72, 606-611
- Chiel E., Zchori-Fein E., Inbar M., Gottlieb Y., Adachi-Hagimori T., Kelly S.E., Asplen M.K. & Hunter M.S. (2009) Almost there: transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels. *PLoS ONE*, 4, e4767
- Combes C. (1995) *Interactions durables: Ecologie et Evolution du parasitisme*. Masson, Paris.
- Cook J.M. & Butcher R.D.J. (1999) The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. *Researches on population ecology*, 41, 15-28
- Dale C. & Welburn S.C. (2001) The endosymbionts of tsetse flies: manipulating host-parasite interactions. *Int J Parasitol*, 31, 628-31
- Dedeine F., Vavre F., Fleury F., Loppin B., Hochberg M.E. & Bouletreau M. (2001) Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6247-52
- Dessens J.T., Margos G., Rodriguez M.C. & Sinden R.E. (2000) Identification of differentially regulated genes of *Plasmodium* by suppression subtractive hybridization. *Parasitol Today*, 16, 354-6
- Diatchenko L., Lau Y.F., Campbell A.P., Chenchik A., Moqadam F., Huang B., Lukyanov S., Lukyanov K., Gurskaya N., Sverdlov E.D. & Siebert P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6025-30
- Diatchenko L., Lukyanov S., Lau Y.F. & Siebert P.D. (1999) Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*, 303, 349-80
- Dobson A.P. & Hudson P.J. (1986) Parasites, Disease and the Structure of Ecological Communities. *Trends Ecol Evol*, 1

- Dobson S.L. (2003) *Wolbachia pipientis*: impotent by association. . In: *Insect Symbiosis* (ed. Miller TB, K.), pp. 199-216. CPC Press LLC, Boca Ranton
- Dunbar H.E., Wilson A.C., Ferguson N.R. & Moran N.A. (2007) Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biol*, 5, e96
- Eijsackers H.J.P. & Bakker K. (1971) Elimination by physical attack of supernumerary larva of *Pseudeucoila bochei* Weld (Cynipidae) in their hosts larvae of *Drosophila*. *Neth. J. Zool.*, 21, 205-207
- Federici B.A. & Bigot Y. (2003) Origin and evolution of polydnaviruses by symbiogenesis of insect DNA viruses in endoparasitic wasps. *J Insect Physiol*, 49, 419-32
- Feener D.H. & Brown B.V. (1997) Diptera as parasitoids. *Annu Rev Entomol*, 42, 73-97
- Flegel T.W. (1997) Major viral diseases of the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) in Thailand. *World journal of microbiology and biotechnology*, 13, 443-442
- Fleuriet A. (1976) Presence of hereditary Rhabdovirus Sigma and polymorphism for a gene for resistance to this virus in natural population in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 30, 735-739
- Fleuriet A. (1983) Influence of the population size on the frequency of flies infected by sigma virus in populations of *Drosophila melanogaster*. *J Insect Physiol*, 42
- Fleuriet A. & Periquet G. (1993) Evolution of the *Drosophila melanogaster*-sigma virus system in natural populations from Languedoc (southern France). *Arch Virol*, 129, 131-43
- Fleury F. (1993) Les rythmes circadiens d'activité chez les Hyménoptères parasitoïdes de Drosophiles. Variabilité, déterminisme génétique, signification écologique. Thèse. Université Claude Bernard - Lyon1, Lyon
- Fleury F., Allemand R., Vavre F., Fouillet P. & Boulétreau M. (2000) Adaptive significance of a circadian clock: temporal segregation of activities reduces intrinsic competitive inferiority in *Drosophila* parasitoids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267, 1005-1010
- Fleury F., Ris N., Allemand R., Fouillet P., Carton Y. & Bouletreau 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, 181-94
- Galvani A. (2003) Epidemiology meets evolutionary ecology. *Trends Ecol Evol*, 18, 132-139
- Gandon S., Rivero A. & Varaldi J. (2006) Superparasitism evolution: adaptation or manipulation? *American Naturalist*, 167, E1-22

- Godfray H.C. & Shimada M. (1999) Parasitoids as model organisms for ecologists. *Researches on population ecology*, 41, 3-10
- Godfray H.C.J. (1994) *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Graham R.I., Rao S., Possee R.D., Sait S.M., Mertens P.P. & Hails R.S. (2006) Detection and characterisation of three novel species of reovirus (Reoviridae), isolated from geographically separate populations of the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae) on Orkney. *J Invertebr Pathol*, 91, 79-87
- Graidist P., Fujise K., Wana K., Sritunyalucksana K. & Phongdara A. (2006) Establishing a role for shrimp fortilin in preventing cell death. *Aquaculture*, 255, 157-164
- Griffiths P. (1999) Time to consider the concept of a commensal virus? *Rev Med Virol*, 9, 73-4
- Habayeb M.S., Ekengren S.K. & Hultmark D. (2006) Nora virus, a persistent virus in *Drosophila*, defines a new picorna-like virus family. *J Gen Virol*, 87, 3045-51
- Hatzioannou T., Perez-Caballero D., Cowan S. & Bieniasz P.D. (2005) Cyclophilin interactions with incoming human immunodeficiency virus type 1 capsids with opposing effects on infectivity in human cells. *J Virol*, 79, 176-83
- He N., Qin Q. & Xu X. (2005) Differential profile of genes expressed in hemocytes of White Spot Syndrome Virus-resistant shrimp (*Penaeus japonicus*) by combining suppression subtractive hybridization and differential hybridization. *Antiviral Res*, 66, 39-45
- Hedges L.M., Brownlie J.C., O'Neill S.L. & Johnson K.N. (2008) *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, 322, 702
- Heeb P., Werner I., Mateman A.C., Kolliker M., Brinkhof M.W.G., Lessells C.M. & Richner H. (1999) Ectoparasite infestation and sex-biased local recruitment of hosts. *Nature*, 400, 63-65
- Heitman J. & Cullen B.R. (2005) Cyclophilin B escorts the hepatitis C virus RNA polymerase: a viral achilles heel? *Mol Cell*, 19, 145-6
- Helluy S. & Thomas F. (2003) Effects of *Microphallus papillorobustus* (Platyhelminthes: Trematoda) on serotonergic immunoreactivity and neuronal architecture in the brain of *Gammarus insensibilis* (Crustacea: Amphipoda). *Proc Biol Sci*, 270, 563-8
- Hilgenboecker K., Hammerstein P., Schlattmann P., Telschow A. & Werren J.H. (2008) How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett*, 281, 215-20

- Hu Y. & Hirshfield I. (2005) Rapid approach to identify an unrecognized viral agent. *J Virol Methods*, 127, 80-6
- Hudson P.J., Dobson A.P. & Lafferty K.D. (2006) Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology and Evolution*, 21, 381-5
- Huigens M.E., de Almeida R.P., Boons P.A., Luck R.F. & Stouthamer R. (2004) Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc Biol Sci*, 271, 509-15
- Huigens M.E., Luck R.F., Klaassen R.H., Maas M.F., Timmermans M.J. & Stouthamer R. (2000) Infectious parthenogenesis. *Nature*, 405, 178-9
- Ishikawa H. (2003) An introduction. In: *Insect symbiosis*. (eds. Bourtzis K & T.A. M). CRC Press
- Janssen A. (1989) Optimal host selection by *Drosophila* parasitoids. *Functional Ecology*, 3, 469-479
- Jeyaprakash A. & Hoy M.A. (2000) Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol*, 9, 393-405
- Kenyon S.G. & Hunter M.S. (2007) Manipulation of oviposition choice of the parasitoid wasp, *Encarsia pergandiella*, by the endosymbiotic bacterium *Cardinium*. *J Evol Biol*, 20, 707-16
- Lafferty K.D., Dobson A.P. & Kuris A.M. (2006) Parasites dominate food web links. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 11211-6
- Lebarbenchon C., Poulin R. & Thomas F. (2007) Parasitisme, biodiversité et biologie de la conservation. In: *Ecologie et Evolution des Systèmes Parasités* (ed. Thomas F, Renaud, F. & Guégan, J.F.), pp. 229-251. De Boeck Université, Bruxelles, Belgium
- Lee J.I. & Ahnn J. (2004) Calcineurin in animal behavior. *Mol Cells*, 17, 390-6
- Lefèvre T., Lebarbenchon, C., Gauthier-Clerc, M., Missé, D., Poulin, R. & Thomas, F. (2009) The ecological significance of manipulative parasites. *Trends Ecol Evol*, 24, 41-48
- Lightner D.V. & Redman R.M. (1998) Shrimp diseases and current diagnostic methods. *Aquaculture*, 164, 201-220
- Lin T.Y. & Emerman M. (2006) Cyclophilin A interacts with diverse lentiviral capsids. *Retrovirology*, 3, 70
- Luban J. (2007) Cyclophilin A, TRIM5, and resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 81, 1054-61
- Martinez J. (2008) Variabilité phénotypique et symbiose à transmission verticale. Rapport master 2 Recherche. Université Claude Bernard, Lyon1, Lyon

- Maynard B.J., DeMartini L. & Wright W.G. (1996) *Gammarus lacustris* harboring *Polymorphus paradoxus* show altered patterns of serotonin-like immunoreactivity. *J Parasitol*, 82, 663-6
- McGraw E.A., Merritt D.J., Droller J.N. & O'Neill S.L. (2002) *Wolbachia* density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2918-23
- Montenegro H., Solferini V.N., Klaczko L.B. & Hurst G.D. (2005) Male-killing *Spiroplasma* naturally infecting *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol Biol*, 14, 281-7
- Montllor C.B., Maxmen, A., Purcell, A.H. (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology*, 27, 189-195
- Moore J. (2002) *Parasites and the behavior of animals*. Oxford University Press.
- Moran N.A. (2002) The ubiquitous and varied role of infection in the lives of animals and plants. *Am Nat*, 160 Suppl 4, S1-8
- Mouritsen K.N. & Poulin R. (2005) Parasites boosts biodiversity and changes animal community structure by trait-mediated indirect effects. *Oikos*, 108, 344-350
- Mouton L., Henri H., Bouletreau M. & Vavre F. (2003) Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Mol Ecol*, 12, 3459-65
- Mouton L., Henri H., Charif D., Bouletreau M. & Vavre F. (2007) Interaction between host genotype and environmental conditions affects bacterial density in *Wolbachia* symbiosis. *Biol Lett*, 3, 210-3
- Nakanishi K., Hoshino M., Nakai M. & Kunimi Y. (2008) Novel RNA sequences associated with late male killing in *Homona magnanima*. *Proc Biol Sci*, 275, 1249-54
- Nordlander G. (1980) Revision of the genus *Leptopilina* Förster, 1869, with notes on the status of some other genera (Hymenoptera, Cynipoidea:Eucoilidae). *Entomologica scandinavica*, 11, 428-453
- O'Neill S.L., Giordano R., Colbert A.M., Karr T.L. & Robertson H.M. (1992) 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 2699-702
- Oliver K.M., Campos J., Moran N.A. & Hunter M.S. (2008) Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proc Biol Sci*, 275, 293-9
- Oliver K.M., Moran N.A. & Hunter M.S. (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102, 12795-800

- Oliver K.M., Russell J.A., Moran N.A. & Hunter M.S. (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 100, 1803-7
- Patot S., Lepetit D., Charif D., Varaldi J., & Fleury F. (2009) Molecular detection, penetrance and transmission of an inherited virus responsible for a behavioral manipulation of an insect parasitoid. *Appl Environ Microbiol* 75, 703-710.
- Perlman S.J., Hunter M.S. & Zchori-Fein E. (2006) The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc Biol Sci*, 273, 2097-106
- Perlman S.J., Kelly S.E. & Hunter M.S. (2008) Population biology of cytoplasmic incompatibility: maintenance and spread of *Cardinium* symbionts in a parasitic wasp. *Genetics*, 178, 1003-11
- Perrot-Minnot M.J. & Cézilly F. (2007) Parasites et comportement. In: *Ecologie et Evolution des systèmes parasités* (ed. Thomas F, Renaud, F. & Guégan, J.F.). De Boeck Université, Bruxelles, Belgium
- Poinsot D., Bourtzis K., Markakis G., Savakis C. & Mercot H. (1998) *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: Host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics*, 150, 227-37
- Prenter J., Macneil C., Dick J.T. & Dunn A.M. (2004) Roles of parasites in animal invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 385-90
- Rebrikov D., Desai S., Kogan Y.N., Thornton A.M. & Diatchenko L. (2002) Subtractive cloning: new genes for studying inflammatory disorders. *Ann Periodontol*, 7, 17-28
- Rebrikov D.V., Britanova O.V., Gurskaya N.G., Lukyanov K.A., Tarabykin V.S. & Lukyanov S.A. (2000) Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res*, 28, E90
- Reynolds K.T. & Hardy I.C.W. (2004) Superparasitism: a non-adaptive strategy? *Trends Ecol Evol*, 19, 347-348
- Richner H. & Tripet F. (1999) Ectoparasitism and the trade-off between current and future reproduction. *Oikos*, 86, 535-538
- Ris N. (2003) Hétérogénéité spatiale, plasticité phénotypique et trade-off environnementaux. Thèse. Université Claude Bernard, Lyon1, Lyon

- Robich R.M., Rinehart J.P., Kitchen L.J. & Denlinger D.L. (2007) Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization. *J Insect Physiol*, 53, 235-45
- Rojtinnakorn J., Hirono I., Itami T., Takahashi Y. & Aoki T. (2002) Gene expression in haemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*, in response to infection with WSSV by EST approach. *Fish Shellfish Immunol*, 13, 69-83
- Rosenheim J.A. (1996) An evolutionary argument for egg limitation. *Evolution*, 50, 2089-2094
- Sachs J.L., Mueller U.G., Wilcox T.P. & Bull J.J. (2004) The evolution of cooperation. *Q. Rev. Biol.*, 79, 135-160
- Santolamazza-Carbone S. & Rivera A.C. (2003) Superparasitism and sex ratio adjustment in a wasp parasitoid: results at variance with local mate competition? *Oecologia (Berlin)*, 136, 365-373
- Scarborough C.L., Ferrari J. & Godfray H.C. (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science*, 310, 1781
- Schall J.J. (1992) Parasite-mediated competition in *Anolis* lizards. *Oecologia*, 92, 58-64
- Schilthuizen M., Nordlander, G., Stouthamer, R., van Alphen, J.J.M. (1998) Morphological and molecular phylogenetics in the genus *Leptopilina* (Hymenoptera : Cynipoidea : Eucoilidae). *Systematic Entomology*, 23, 253-264
- Schilthuizen M. & Stouthamer R. (1997) Horizontal transmission of parthenogenesis-inducing microbes in Trichogramma wasps. *Proc Biol Sci*, 264, 361-6
- Schmidt O., Theopold U. & Strand M. (2001) Innate immunity and its evasion and suppression by hymenopteran endoparasitoids. *Bioessays*, 23, 344-51
- Smith D.C. (1992) The symbiosis condition. *Symbiosis*, 14, 3-15
- Sorci G., Massot M. & Clobert J. (1994) Maternal parasite load increases sprint speed and philopatry in female offspring of the common lizard. *Am Nat*, 144, 153-164
- Stouthamer R., Breeuwer J.A. & Hurst G.D. (1999) *Wolbachia pipiensis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol*, 53, 71-102
- Tain L., Perrot-Minnot M.J. & Cezilly F. (2006) Altered host behaviour and brain serotonergic activity caused by acanthocephalans: evidence for specificity. *Proc Biol Sci*, 273, 3039-45
- Teixeira L., Ferreira A. & Ashburner M. (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*, 6, e2

- Tentcheva D., Gauthier L., Zappulla N., Dainat B., Cousserans F., Colin M.E. & Bergoin M. (2004) Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* mite populations in France. *Appl Environ Microbiol*, 70, 7185-91
- Thomas F., Adamo S. & Moore J. (2005) Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behav Processes*, 68, 185-99
- Thomas F., Renaud, F. & Guégan, J.F. (2007) *Ecologie et Evolution des Systèmes Parasités*. De Boeck Université, Bruxelles, Belgium.
- Thomas F., Schmidt-Rhaesa A., Martin G., Manu C., Durand P. & Renaud F. (2002) Do Hairworms (*Nematomorpha*) manipulate their terrestrial host to seek water ? *Journal of Evolutionary Biology* 15, 356-361
- Thomas M.B. & Blanford S. (2003) Thermal biology in insect-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 18, 344-350
- Thompson J.N. (1988) Variation in interspecific interactions. *Annu Rev Ecol Syst*, 19, 65-87
- Tonganunt M., Nupan B., Saengsakda M., Suklour S., Wanna W., Senapin S., Chotigeat W. & Phongdara A. (2008) The role of Pm-fortilin in protecting shrimp from white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish Shellfish Immunol*, 25, 633-7
- Torchin M.E., Lafferty K.D., Dobson A.P., McKenzie V.J. & Kuris A.M. (2003) Introduced species and their missing parasites. *Nature*, 421, 628-30
- Tsuchida T., Koga R. & Fukatsu T. (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, 303, 1989
- van Alphen J. & Nell H.W. (1982) Superparasitism and host discrimination by *Asobara tabida* (Braconidae: alysiinae), a larval parasitoid of Drosophilidae. *Neth. J. Zool.*, 32, 232-260
- van Alphen J.J. & Visser M.E. (1990) Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annu Rev Entomol*, 35, 59-79
- van Dijken M.J., van Stratum P. & van Alphen J.J.M. (1993) Superparasitism and sex ratio in the solitary parasitoid *Epidinocarsis lopezi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 68, 51-58
- van Lenteren J.C. (1976) Development of host discrimination and the prevention of superparasitism in the parasite *Pseudocoila bochei*. *Neth. J. Zool.* , 26, 1-83
- van Lenteren J.C. (1981) Host discrimination by parasitoids. In: *Semiochemicals, Their Role in Pest Control* (ed. Wiley J), pp. 153-179. Nardlund, D.A., Jones, W.J., Lewis, R.L., New York

- van Lenteren J.C., Ruschioni S., Romani R., van Loon J.J.A., Qiu Y.T., Smid H.T., Isidoro N. & Bin F. (2007) Structure and electrophysiological responses of gustatory organs on the ovipositor of the parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Arthropod structure and development*, 36, 271-276
- Varaldi J. (2003) Rôle des organismes symbiotiques dans l'évolution des stratégies parasitaires des insectes: influence d'un élément infectieux sur le comportement d'un parasitoïde de drosophiles. Thèse. Université Claude Bernard, Lyon 1, Lyon
- Varaldi J., Bouletreau M. & Fleury F. (2005a) Cost induced by viral particles manipulating superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. *Parasitology*, 131, 161-8
- Varaldi J., Fouillet P., Boulétreau M. & Fleury F. (2005b) Superparasitism acceptance and patch-leaving mechanisms in parasitoids: a comparison between two sympatric wasps. *Animal Behaviour*, 69, 1227-1234
- Varaldi J., Fouillet P., Ravallec M., Lopez-Ferber M., Bouletreau M. & Fleury F. (2003) Infectious behavior in a parasitoid. *Science*, 302, 1930
- Varaldi J., Gandon S., Rivero A., Patot S. & Fleury F. (2006a) A Newly Discovered Virus Manipulates Superparasitism Behavior in a Parasitoid Wasp. In: *Insect symbiosis* (ed. Bourtzis KMTA), pp. 119-139. CRC Press
- Varaldi J., Petit S., Bouletreau M. & Fleury F. (2006b) The virus infecting the parasitoid *Leptopilina boulardi* exerts a specific action on superparasitism behaviour. *Parasitology*, 132, 747-56
- Varaldi J., Ravallec M., Labrosse C., Lopez-Ferber M., Bouletreau M. & Fleury F. (2006c) Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Journal of Insect Physiology*, 52, 1202-12
- Vautrin E. (2008) Les infections multiples dans les symbioses insectes / bactéries : évolution intra-hôte et conséquences populationnelles. Thèse. Université Claude Bernard, Lyon1, Lyon
- Vavre F. (2009) Eviter les tricheurs: mode de transmission et stabilité des symbioses. *Biofutur*, 299
- Vavre F., Fleury F., Lepetit D., Fouillet P. & Bouletreau M. (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 1711-23

- Vavre F., Fleury F., Varaldi J., Fouillet P. & Bouletreau M. (2000) Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution Int J Org Evolution*, 54, 191-200
- Vet L.E.M. & Bakker K. (1985) A comparative functional approach to the host detection behavior of parasitic wasps. I- A qualitative study on eight Eucilid species. *Oikos*, 44, 487-984
- Vinson S.B. & Hegazi E.M. (1998) A possible mechanism for the physiological suppression of conspecific eggs and larvae following superparasitism by solitary endoparasitoids. *J Insect Physiol*, 44, 703-712
- Visser M.E. (1993) The effect of competition on oviposition decisions of *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera, Eucilidae). *Animal Behaviour*, 49, 1677-1687
- Visser M.E., van Alphen, J.J.M. & Nell, H.W. (1992) Adaptive superparasitism and patch time allocation in solitary parasitoids: the influence of pre-patch experience. *Behav Ecol Sociobiol*, 31, 163-171
- Wajnberg E. & Ris N. (2007) Parasitisme et lutte biologique. In: *Ecologie et Evolution des Systèmes Parasités* (ed. Thomas F, Guégan, J.F. & Renaud, F.), pp. 257-299. De Boeck Université, Bruxelles
- Wang P. & Heitman J. (2005) The cyclophilins. *Genome Biol*, 6, 226
- Watahi K., Ishii N., Hijikata M., Inoue D., Murata T., Miyanari Y. & Shimotohno K. (2005) Cyclophilin B is a functional regulator of hepatitis C virus RNA polymerase. *Mol Cell*, 19, 111-22
- Werren J.H. (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol*, 42, 587-609
- Werren J.H., Baldo L. & Clark M.E. (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 741-51
- Werren J.H., Zhang W. & Guo L.R. (1995) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci*, 261, 55-63
- Whitfield J.B. (2002) Estimating the age of the polydnavirus/braconid wasp symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7508-13
- Wilkinson D.M. (2001) Horizontally acquired mutualism, an unsolved problem in ecology? *Oikos*, 92, 377-384
- Yan G. & Norman S. (1995) Infection of *Tribolium* beetles with a tapeworm: variation in susceptibility within and between beetle species and among genetic strains. *J Parasitol*, 81, 37-42

- Yang X., Thannhauser T.W., Burrows M., Cox-Foster D., Gildow F.E. & Gray S.M. (2008) Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (luteoviridae). *J Virol*, 82, 291-9
- Zander K., Sherman M.P., Tessmer U., Bruns K., Wray V., Prechtel A.T., Schubert E., Henklein P., Luban J., Neidleman J., Greene W.C. & Schubert U. (2003) Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression. *J Biol Chem*, 278, 43202-13
- Zchori-Fein E., Gottlieb Y., Kelly S.E., Brown J.K., Wilson J.M., Karr T.L. & Hunter M.S. (2001) A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98, 12555-60
- Zchori-Fein E. & Perlman S.J. (2004) Distribution of the bacterial symbiont *Cardinium* in arthropods. *Mol Ecol*, 13, 2009-16
- Zhou W., Rousset F. & O'Neil S. (1998) Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc Biol Sci*, 265, 509-15

Construction de la banque soustraite

I. Matériel biologique

I.1. Lignées de *L. bouhardi*.

Pour construire la banque soustraite, nous avons utilisé les lignées iso-géniques de *L. bouhardi* de référence S_{réf} (phénotype S) et NS_{réf} (phénotype NS) (cf. chapitre I, partie III.2.1). Ces deux lignées partagent le même background génétique et seul leur statut d'infection à LbFV diffèrent.

I.2. Elevage des parasitoïdes.

Dix femelles de chacune des deux lignées S_{réf} et NS_{réf} ont été testées par leur comportement de superparasitisme suivant le protocole standardisé du test comportemental (cf. chapitre I, partie II.2.5) afin de vérifier leur phénotype S ou NS et d'en déduire leur statut d'infection par LbFV. Chacune de ces femelles a ensuite été repiquée dans un tube d'élevage en conditions contrôlées *i.e.* sur 100 hôtes *D. melanogaster*. L'ensemble de ces lignées iso-femelles S_{réf} et NS_{réf} ont été mises en développement en chambre climatisée, à 25°C (LD 12 :12 ; RH=70%).

I.3. Dissections des tissus reproducteurs.

Les appareils reproducteurs (ovaires et glande à venin) ont été disséqués sous une loupe binoculaire dans du liquide physiologique (RINGER) sur des femelles âgées de deux jours ($\pm$ 1 jour). Pour cela, les individus ont préalablement été endormis au froid. Le travail s'est effectué au froid, en conditions RNase Free. Les tissus disséqués ont de suite été plongés dans 250 μ l de tampon RLT+ β -ME afin de préserver l'ARN (kit « RNeasy », Qiagen, France) puis broyés et le lysat a été homogénéisé avec une seringue.

N.B : Nous avons testé le comportement de ponte des sœurs des individus disséqués par test comportemental standard (cf. chapitre I, partie II.2.5) afin de vérifier leur phénotype S ou NS.

I.4. Extraction des ARN totaux.

Les ARN totaux des tissus reproducteurs des femelles *L. boulandi* S_{réf} et NS_{réf} ont été extraits à l'aide du kit « RNeasy Kit » (Qiagen, France) selon les instructions du fabricant. 250 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés au mélange. Après passage sur colonne RNeasy, l'élution finale s'est faite avec 100 µl d'eau ultra-pure.

I.5. Préparation des ARNm.

La préparation des ARNm a été réalisée à l'aide du kit « PolyAtract mRNA Isolation Systems » (Promega, France) selon le protocole « Small-Scale mRNA Isolation : PolyAtract System III ». 3 µl d'une amorce oligo(dT) marquée à la biotine ont été ajoutés à chacun des échantillons d'ARN totaux (S et NS) préalablement chauffés à 65°C. Cette amorce s'hybride à la région polyA présente en 3' des ARNm matures. Les molécules hybrides formées ont ensuite été liées à la streptavidine couplée à des billes magnétiques ce qui permet leur séparation des ARN non messagers. Les ARNm ont ensuite été élués par un total de 250 µl d'eau ultra-pure et précipités par ajout de 4 µl d'une solution de 20X EDTA/glycogène et de 2 vol. d'éthanol absolu (EtOH-100) et 0,5 vol. de NH₄⁺ Acétate (7,5 M).

II. Construction de la banque d'ADNc

La banque soustraite d'ADNc a été construite à l'aide du kit « BD PCR Select cDNA Subtraction » (Clontech, Etats-Unis). Deux modalités de soustraction ont été réalisées : (1) la modalité I par soustraction des ADNc NS_{réf} (*driver*) aux ADNc S_{réf} (*tester*); on sélectionne ainsi les ADNc différenciellement exprimés chez les individus S_{réf}; (2) la modalité NI par soustraction des ADNc S_{réf} (*driver*) aux ADNc NS_{réf} (*tester*); les ADNc différenciellement exprimés chez les individus NS_{réf} sont ainsi mis en évidence à leur tour.

II.1. Synthèse des ADNc.

Les ADNc de chacune des deux modalités I et NI ont été synthétisés à l'aide du kit «BD SMART PCR cDNA Synthesis » (Clontech, USA) selon les instructions du fabricant et selon l'article de Hu & Hirshfield (2005). Pour chacun des échantillons, le premier brin d'ADNc a été synthétisé en mélangeant 3 µl d'ARN polyA⁺ à 1 µl de "SMART II A Oligonucleotide" (12 µM) et 1 µl de "3' SMART CDS Primer II A" (12 µM). Le mélange a été incubé pendant 2 min à 70°C puis 2 µl de "5X First-Strand Buffer", 1 µL de DTT (20 mM), 1 µl de 50X

dNTP (10 mM) et 200 unités de "MMLV PowerScript Reverse Transcriptase" ont été ajoutées. Le mélange a ensuite été incubé 1h à 42°C. 90 µl de TE 10-1 ont été ajoutés au mélange sans être chauffés par la suite. Le premier brin d'ADNc produit a été purifié sur une colonne de silice suivant le protocole du kit « Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System » (Promega, France).

L'amplification des ADNc s'effectue simultanément à la synthèse du second brin (de par les propriétés de "dC Tailing et de Template Switching" de la transcription reverse): 14 µl du premier brin d'ADNc ont été mélangés à 2 µl de 50X dNTP (10 mM), 2µl de 5' PCR Primer II A (12 µM), 10µl de "10X Advantage 2 PCR Buffer" et 2 µl de "50X Advantage 2 Polymerase Mix" dans un volume final de 104 µl. Le programme de PCR effectué a été le suivant : entre 17 et 23 cycles de 15 sec à 95°C, 30 sec à 65°C et 6 min à 68°C. Afin que la proportion initiale de chaque transcrit présent dans l'échantillon soit conservée, la réaction d'amplification est arrêtée en phase exponentielle.

II.2. Digestion enzymatique.

Pour chacune des deux modalités I et NI, les ADNc *tester* et *driver* ont été digérés avec 15 unités d'enzyme de restriction RsaI pendant 4 h à 37°C. Après l'arrêt de la digestion par ajout de 8 µl de EDTA (0,5 M, pH=8,7), les ADNc ont été purifiés par deux passages sur colonne de silice du kit « Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System » (Promega, France), élués à chaque fois avec 50 µl d'eau ultra-pure.

II.3. Ligation des adaptateurs.

L'ADNc *tester* a ensuite été séparé en deux fractions identiques de 2 µl qui ont chacune été liguée avec un adaptateur spécifique, 1 ou 2R, en incubant une nuit à 16°C chaque fraction d'ADNc avec 2 µl de l'adaptateur spécifique (10 µM chacun), 2 µl de "5X Ligation Buffer" et 400 unités de "T4 DNA Ligase" dans un volume final de 10 µl. Ces adaptateurs permettent par la suite d'effectuer une amplification PCR des ADNc d'intérêt grâce à des amorces fixées sur ces adaptateurs.

II.4. Hybridations entre ADNc *driver* et *tester*.

Le principe de la SSH préconise deux hybridations successives des ADNc *driver* et *tester* afin d'isoler les transcrits spécifiques de la population d'ADNc *tester* d'intérêt et de maximiser l'élimination des ADNc communs aux deux modalités.

II.4.1. Première hybridation

La première de ces hybridations a été réalisée en ajoutant 1,5 µl d'ADNc *driver* à 1,5 µl de chaque fraction d'ADNc *tester* (deux fractions liguées à des adaptateurs différents) et 1 µl de "4X Hybridization Buffer". Lors de l'étape de ligation, les ADNc *tester* ont été dilués au 1/6^{ème}. Dans ce mélange, les ADNc *driver* sont en excès par rapport aux ADNc *tester* (ratio 1/30). Les échantillons ont ensuite été dénaturés par action de la chaleur à 98°C pendant 1 min 30 sec puis incubés à 68°C pendant 8 h pour permettre l'hybridation des ADNc simples brins entre eux de manière spécifique. A la suite de cette première hybridation, la population d'ADNc simples brins restante est enrichie en séquences sur-exprimés dans la condition *tester*, les ADNc communs aux populations *driver* et *tester* formant des hybrides.

II.4.2. Seconde hybridation

Lors de la seconde hybridation, les deux échantillons d'ADNc issus de la première hybridation ont été mélangés. 1 µl d'ADNc *driver* dénaturé a été ajouté afin d'enrichir le mélange en séquences différentiellement exprimées. Le mélange a ensuite été incubé une nuit à 68°C sans étape de dénaturation préalable. 200 µl de "Dilution Buffer" y ont été ajoutés et le mélange a été incubé 7 min supplémentaires à 68°C. De nouvelles molécules hybrides ont été formées avec à leurs extrémités, des adaptateurs différents, correspondant aux gènes préférentiellement exprimés dans la condition *tester* d'intérêt.

II.5. Amplification des ADNc préférentiellement exprimés dans la condition d'intérêt.

Les ADNc différentiellement exprimés ont été spécifiquement amplifiés au cours de deux réactions PCR successives. Afin de créer le site du "PCR Primer I", les brins manquants des adaptateurs ont préalablement été complétés par une courte incubation à 75°C.

II.5.1. PCR sélective et suppressive

Au cours de la première amplification PCR, seuls les ADNc doubles brins ayant deux adaptateurs différents à leurs extrémités sont amplifiés de façon exponentielle. Pour cela, 1 µl d'ADNc ont été mélangés à 0,5 µl de "50X Advantage cDNA Polymerase" mix, 1 µl de "PCR Primer I" (10 µM), 0,5 µl de "dNTP mix" (10 mM) et 2,5 µl de "10X Advantage2 PCR Buffer" dans un volume final de 25 µl. Le programme de PCR effectué a été le suivant : 5 min à 75°C puis 27 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec à 66°C et 1 min 30 sec à 72°C.

II.5.2. Traitement à la mung bean nuclease

La mung bean nuclease (MBN) est une enzyme catalysant l'élimination spécifique d'ADN simple brin. Afin d'éliminer les faux-positifs potentiels, les produits PCR issus de la première réaction ont été digérés par la MBN (Promega, France) avec 20 µl de tampon MBN 5X et 10 unités de MBN pour un volume final de 100 µl. Le mélange a été incubé 30 min à 37°C. Après la phase de digestion, le mélange a subi une étape d'extraction par phénol puis les ADN ont été précipités avec 2 vol. d'éthanol absolu (EtOH-100) et de 0,5 vol. NH_4^+ Acétate (7,5 M) pendant 1h à -20°C. Le culot a subi deux lavages successifs avec 1 ml d'éthanol 75% (EtOH-75) et repris dans 17 µl de TE 10-1.

II.5.3. PCR nichée

Afin de réduire encore le bruit de fond et de permettre un enrichissement en séquences ADNc *tester* différentiellement exprimées, une seconde amplification a été réalisée sur les produits PCR issus de la première réaction et digérés par la MBN. 1 µl de ces produits PCR (dilués au 1/10^{ème}) ont été mélangés à 0,5 µl de "50X Advantage cDNA Polymerase mix", 1 µl de chaque "Nested PCR Primer" 1 et 2R (10 µM chacun), 0,5 µl de "dNTP mix" (10 mM) et 2,5 µl de "10X Advantage2 PCR Buffer" dans un volume final de 25 µl. Le programme de PCR effectué a été le suivant : 11 cycles de 10 sec à 94°C, 30 sec à 68°C et 1 min 30 sec à 72°C.

II.6. Mirror Orientation Selection (MOS).

La MOS a été réalisée suivant le protocole de Rebrikov *et al.* (2000). L'adaptateur 1 a été éliminé par digestion enzymatique en mélangeant 5 µl des ADNc soustraits issus de la seconde amplification PCR avec 7,5 unités d'enzyme de restriction XmaI. Après 1 h d'incubation à 37°C, la digestion a été stoppée par ajout de 1 µl de EDTA (200 mM, pH=8,7) et le mélange a été incubé 10 min à 70°C. L'étape d'hybridation s'est faite en mélangeant 1 µl d'ADNc digérés par XmaI à 1 µl de "4X Hybridization Buffer" dans un volume final de 4 µl et en chauffant ce mélange à 98°C pendant 1 min 30 sec puis pendant 12 h à 68°C. Une PCR a ensuite été réalisée à partir des amorces de l'adaptateur 2R afin d'amplifier de façon exponentielle les séquences d'intérêt, dans ce cas, celles ayant l'adaptateur 2R. 1 µl des ADNc issus de l'étape d'hybridation ont été mélangés à 0,5 µl de "50X Advantage cDNA Polymerase mix", 1,5 µl de "Nested PCR Primer" 2R (10 µM), 0,5 µl de "dNTP mix" (10 mM) et 2,5 µl de "10X Advantage2 PCR Buffer" dans un volume final de 25 µl. Le

programme de PCR effectué a été le suivant : entre 26 et 29 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 62°C et 2 min à 72°C.

II.7. Clonage.

Souhaitant construire une banque d'ADNc contenant les séquences sur-exprimées dans la modalité I, la suite des expériences ne s'est déroulée que sur les ADNc de la modalité I (sauf construction des sondes) (cf. figure II.2., p. 32).

Les ADNc soustraits ont été insérés dans un vecteur de clonage PCR2-1 TOPO à l'aide du kit « TOPO TA Cloning » (Invitrogen, Etats-Unis) selon les instructions du fabricant. La ligation a été réalisée en mélangeant 0,5 µl d'ADNc amplifiés avec 1 µl de "TOPO vector", 1 µl de "Salt Solution" dans un volume final de 6 µl. Le mélange a été incubé 30 min à température ambiante.

Les ADNc ligués ont ensuite été insérés dans des bactéries chimio-compétentes *Escherichia coli* TOP10 (2 µl de plasmides dans un tube de bactéries compétentes) et ont été incubés 30 min à 4°C avant de subir un choc thermique de 30 sec à 42°C. Après une nuit de culture à 37°C sur milieu sélectif (LB Agar 1, 5% contenant de l'ampicilline (50 µg/ml) et 40 µl de X-Gal (40 mg/ml)), 672 clones positifs (colonies blanches) ont été prélevés et ont (1) soit été mis en culture dans 5 ml de LB liquide contenant de l'ampicilline (100 µg/ml finale) et incubés une nuit à 37°C sous agitation (200 rpm) afin de réaliser par la suite des minipreps ; (2) soit été déposés dans les puits de plaques 96 puits contenant chacun 150 µl de LB liquide contenant de l'ampicilline (100 µg/ml finale) et incubés une nuit à 37°C. 150 µl de LB glycérol 30% ont ensuite été ajoutés dans chacun des puits. Ces stocks glycérolés ont été par la suite utilisés afin d'amplifier par PCR les inserts d'ADNc contenus dans les plasmides.

II.8. Extraction de l'ADN plasmidique (minipreps).

L'ADN plasmidique contenant l'insert d'ADNc à séquencer a été extrait selon le protocole suivant. 3 ml des cultures bactériennes en milieu liquide ont été centrifugées pendant 30 sec à 12 000 g puis le surnageant a été éliminé et les culots bactériens ont été re-suspendus dans 200 µl de solution de resuspension (50 mM de glucose, 10 mM de EDTA, 25 mM de Tris-HCl pH=8). 400 µl de solution de lyse (SDS 1%, NaOH 0,2 N) ont ensuite été ajoutés et le mélange a été agité avec précaution puis incubé 3 min à 4°C avant l'ajout de 300 µl de solution de neutralisation (acétate de potassium 3 M équilibré à pH=8 avec de l'acide acétique glacial) avant une agitation vigoureuse et une incubation de 15 min à 4°C. Les complexes SDS-ADN bactériens formés ont été éliminés par une centrifugation de 15 min à 12 000 g.

650 µl de phénol ont été ajoutés à chacun des lysats bactériens, agités vigoureusement et centrifugés 5 min à 12 000 g. Une fois la phase aqueuse prélevée, 0,7 vol. d'isopropanol ont été ajoutés et incubés 5 min à température ambiante puis centrifugés 15 min à 12 000 g. Les culots d'ADN plasmidiques ont été lavés dans 750 µl d'éthanol 70%. Les plasmides ont enfin été re-suspendus dans 50 µl de TE+RNaseA à 100µg/ml.

II.9. Amplification des inserts d'ADNc par PCR.

Après avoir réussi à mettre au point une amplification des inserts d'ADNc par PCR sur les stocks glycérolés de bactéries, cette technique a été utilisée à la place de l'extraction de l'ADN plasmidique afin de réaliser le criblage différentiel supplémentaire (dot-blot, cf. paragraphe suivant).

Deux protocoles de PCR ont été élaborés avec succès.

(1) Un protocole utilisait les amorces du plasmide (M13 Primer) : à partir de 5 µl de stock glycérolé de colonies de bactéries dilué au 1/2,5 était ajouté 0,15 µl de "Taq polymérase" (5 unités/µl) (EuroBlueTaq, Eurobio, France), 1,5 µl de DMSO (100%), 1,75 µl de "M13 Primer" (10 µM), 0,6 µl de "dNTP mix" (10 mM) et 3 µl de "10X Advantage2 PCR Buffer" dans un volume final de 30 µl. Le programme de PCR effectué a été le suivant : 30 cycles de 30 sec à 95°C, 1 min à 52°C et 1 min 30 sec à 72°C.

(2) Le second protocole utilisait les amorces de la PCR de la MOS (Nested Primer 2R) : à partir de 5 µl de stock glycérolé de colonies de bactéries dilué au 1/2,5 était ajouté 0,15 µl de Taq polymérase (5 unités/µl) (EuroBlueTaq, Eurobio, France), 1,5 µl de DMSO (100%), 3 µl de Nested PCR Primer 2R (10 µM), 0,6 µl de dNTP mix (10 mM) et 3 µl de 10X Advantage2 PCR Buffer dans un volume final de 30 µl. Le programme de PCR effectué a été le suivant : 5 cycles de 1 min à 95°C, 1 min à 62°C et 1 min 30 sec à 72°C, puis 5 cycles de 1 min à 95°C, 1 min à 60°C et 1 min 30 sec à 72°C et enfin 20 cycles de 30 sec à 95°C, 30 sec à 60°C et 1 min 30 sec à 72°C.

III. Elimination des faux positifs par criblage différentiel

Suite à l'obtention de la première banque d'ADNc issue de la soustraction, des clones pris au hasard dans la banque ont été envoyés à séquencer (n=32). On souhaitait ainsi tester globalement la redondance de la banque et s'assurer du bon déroulement du début de

l'expérience. Les séquences obtenues ont révélé une forte homologie avec les séquences d'insectes contenues dans les banques, confirmant le bon déroulement de l'expérience. En outre, ces premiers résultats ne mettaient en évidence aucune redondance, ce qui nous a incité à faire une étape supplémentaire de criblage différentiel par dot-blot.

Plusieurs criblages différentiels ont été réalisés. Les premiers à partir de l'ADN plasmidique, les suivants à partir des produits PCR d'inserts d'ADNc.

III.1. Préparation des dot-blots à partir de la banque d'ADNc.

Chaque échantillon a été déposé en miroir sur deux membranes de nylon N+ Hybond (Amersham, France) découpées au format d'une plaque de 96 puits (7,5×11 cm). Les échantillons d'ADN double brin ont été dénaturés, ceci afin de permettre à la sonde biotinylée de s'hybrider sur ses cibles. Pour cela, 20 µl de plasmides ou 6 µl de produits PCR d'inserts ont en premier lieu été aliquotés en plaque de 96 puits contenant respectivement 30 µl et 22 µl de tampon de dénaturation (0,4 N de NaOH, 10 mM de EDTA). Pendant ce temps, les membranes ont également été traitées afin de lyser les plasmides et de fixer les inserts au support en les plongeant dans un bain de dénaturation (contenant le tampon de dénaturation) pendant 5 min. Elles ont ensuite été déposées sur du papier Wathman imbibé du tampon de dénaturation. 50 µl de tampon de dénaturation ont ensuite été aliquotés dans chacun des 96 puits de l'appareil à dot blot avant l'ajout de 10 µl de plasmides ou produits PCR dénaturés. Après une première aspiration afin de permettre la fixation des inserts à la membrane, un rinçage a été réalisé avec 50 µl de tampon de dénaturation. Une seconde aspiration a eu lieu avant deux bains successifs de la membrane dans une solution de Tris HCl 0,5 M, pH=7,5. Après un rinçage à l'eau ultra pure, les membranes ont été séchées entre deux feuilles de papier absorbant avant de procéder à une fixation de l'ADN à la membrane par établissement de liaisons covalentes ADN/membrane au moyen d'UV (cross-linkage).

III.2. Hybridation dot-blotting.

III.2.1. Préparation des sondes

Les ADNc issus des modalités de soustraction I et NI de la MOS ont servi de sondes pour le criblage différentiel. L'ADN a été dans un premier temps extrait par l'ajout d'une solution de phenol:chloroform:alcool isoamylique (25 : 24 : 1), agité vigoureusement et centrifugé 5 min à 12 000 g. Une fois la phase aqueuse prélevée, 1 vol. d'acétate de potassium (0,3 M) et 2,5 vol. d'éthanol absolu (EtOH-100) ont été ajoutés afin de précipiter l'ADN suivi d'une

incubation de 1 h à -20°C et d'une centrifugation de 15 min à 12 000 g. Les culots ont été lavés dans 1 ml d'éthanol 70% puis repris dans 25 µl de TE 10-1. Afin d'éliminer les adaptateurs issus de l'expérience de soustraction, l'ADN a été digéré avec 25 unités d'enzyme de restriction RsaI pendant 1 h 30 à 37°C. Les produits de digestion ont enfin été purifiés sur colonne.

III.2.2. Marquage des sondes à la digoxygénine

Le marquage des ADNc a été réalisé à l'aide du kit « DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I » (Roche, Allemagne) selon les instructions du fabricant. Après l'ajout de 16 µl d'eau ultra pure, les sondes ont été dénaturées pendant 10 min à 100°C (bain-marie) puis immédiatement placées dans la glace. 4 µl de DIG-High Prime (5 X) ont ensuite été ajoutés aux mélanges d'ADN dénaturés avant une période d'incubation d'une nuit à 37°C. La réaction a été arrêtée avec 2 µl de EDTA (0,2 M, pH=8). Avant l'étape d'hybridation, les sondes ont été diluées dans 200 µl de TE 10-1, dénaturées pendant 10 min à 100°C puis immédiatement placées dans la glace.

III.2.3. Hybridation des dot-blots

Cette étape a été réalisée à l'aide du protocole du kit «NorthernMax[®]-Gly » (Ambion, USA). Les membranes ont été préhybridées pendant 5 h à 42°C dans 7,5 ml de solution ULTRAhyb par membrane (≈1 ml/10 cm²) puis, après ajout des sondes DIG dénaturées, les membranes ont été hybridées pendant une nuit à 42°C.

III.2.4. Lavage des membranes

Le lavage des membranes a été effectué à l'aide du kit « DIG Wash and Block Buffer Set » (Roche, Allemagne). Afin d'éliminer les sondes en excès, les membranes subissent deux rinçages à 58°C, le premier dans la "Low Stringency Wash solution 1" (équivalent du SSC 2X et du SDS 0,1%) pendant 10 min et le second dans la "High Stringency Wash solution 1" (équivalent du SSC 0,1X et du SDS 0,1%) pendant 15 min.

III.3. Détection des clones d'intérêt.

Les membranes ont ensuite été brièvement rincées avec le "Washing buffer". Afin de procéder à la détection immunologique, chaque membrane a été incubée 30 min dans 100 ml de "Blocking Solution" puis 30 min dans 20 ml de "Antibody Solution". Après deux lavages successifs de 15 min chacun dans 100 ml de "Washing Buffer", la membrane a été révélée

dans 20 ml de "Detection Buffer". Dès que les spots sont apparus clairement, la réaction immunologique a été stoppée en immergeant les membranes dans du TE 1-0,5. Dans nos expériences, les temps de révélation furent d'environ 10 min. Souhaitant mettre en évidence les séquences différentiellement exprimées chez les individus infectés, les clones d'intérêt correspondent à ceux présentant un spot visible avec la sonde *forward* (modalité I) mais non ou peu visible avec la sonde *reverse* (modalité NI) (cf. figure II.4. p. 36).

IV. Séquençage des clones

Le séquençage a été réalisé par la société de service Genoscreen (séquenceur 96 capillaires) (Institut Pasteur de Lille, France).

V. Analyses bioinformatiques

Les différentes étapes décrites précédemment ont permis l'obtention de 265 EST ayant ensuite nécessitées une analyse bioinformatique pour obtenir des unigènes et effectuer leur annotation. Le traitement des EST obtenus fut automatisé grâce à un ensemble de programmes dont l'utilisation a été spécialement mise au point dans l'équipe de recherche (D. Charif, ingénieur d'étude, CNRS). Les différentes étapes du traitement et de l'annotation sont présentées dans la figure A.1. Les résultats générés suite à cette analyse sont regroupés dans une base de données et sont accessibles *via* une interface web (<http://mandragore.univ-lyon1.fr/boulardi/Home.php>).

Le traitement des séquences a consisté en la réalisation des étapes suivantes (le numéro des étapes est reporté sur la figure A.1) :

1. Filtrage des bases de mauvaise qualité au sein des séquences avec le programme *Phred*.
2. Recherche des sites de restriction (GTAC) et coupure systématique des séquences chimères.
3. Nettoyage des séquences avec le programme *Seqclean* afin de ne conserver que la séquence codante (CDS) et les parties non traduites (UTR): élimination des contaminants (vecteurs, adaptateurs), des queues polyA, polyT, des séquences de longueur inférieure à 60

pb. Il s'agit alors de rassembler les EST entre elles afin de former des séquences uniques : les unigènes.

4. « Clusterisation » : regroupement des EST (sur la base d'une forte similarité de séquence) en clusters. Les EST sont comparées deux à deux à l'aide du logiciel *MegaBlast* puis regroupées en clusters à l'aide du logiciel *tclust*. Le regroupement en cluster se fait par une approche transitive : si A ressemble à B et B ressemble à C alors A, B et C forment un cluster. Les EST ne présentant pas de similarité avec d'autres EST sont des EST uniques ou singletons.

5. « Contigage » à l'aide du logiciel *cap3*: assemblage des séquences du cluster afin d'obtenir le contig ou « séquence consensus » le plus long possible à partir des fragments chevauchants du cluster. Ici, les séquences formant un cluster sont alignées, les zones de chevauchements sont analysées et, en fonction de la qualité du chevauchement, aboutissent à la création d'un ou plusieurs contig(s).

6. Annotation par *BLAST*: comparaison des contigs et singletons avec les séquences (annotées ou non) déjà présentes dans les banques de données. Pour cela, on procède à une recherche de similarité par *Blast* : 1) *blastx* contre la banque protéique SpTrembl (compare la séquence nucléique traduite dans les six phases de lecture à une banque protéique) et Genbank (traduite dans les six phases de lecture) ; 2) *tblastx* contre les banques UniGene, division arthropodes (compare la séquence nucléique traduite dans les six phases de lecture aux banques nucléiques traduite dans les six phases de lecture) ; 3) lorsqu'aucune similarité n'est trouvée, il est alors réalisé une annotation fonctionnelle avec la recherche de domaines et motifs protéiques présents dans l'unigène à partir d'un *blast* sur la base intégrative InterPro (programme *Interproscan*).

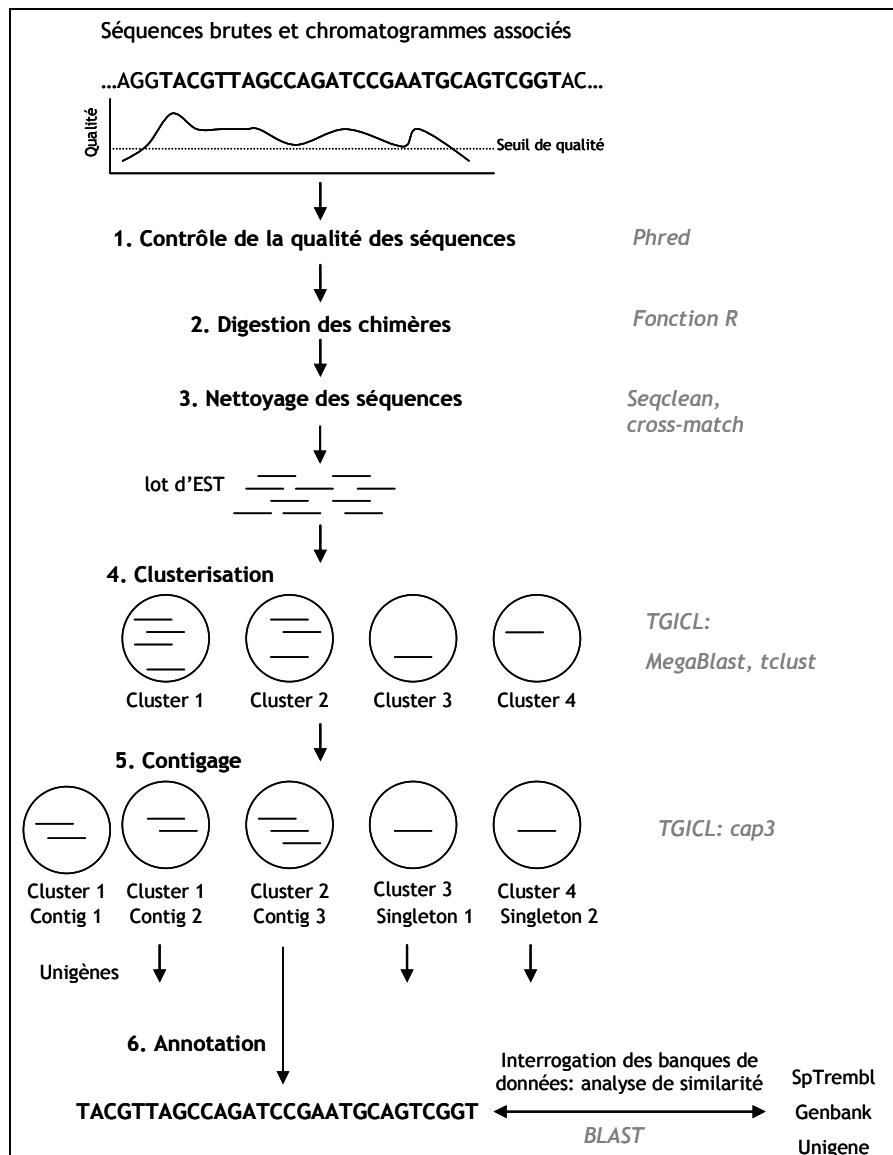


Figure A.1 : Traitement informatique des données de séquences (EST) (d'après Tagu & Moussard, 2003).

Les différentes étapes du traitement des séquences sont détaillées dans la partie V.
Les programmes informatiques utilisés sont notés en gris.

T*ableau récapitulatif des EST des banques soustraites de *Leptopilina bouvardi

Liste des EST composant les banques soustraites *forward*. Il s'agit des séquences sur-exprimées dans la modalité I (infectée par LbFV) par rapport à la modalité NI (non infectée par LbFV).

Nom	Description	Organisme	E-value	Laboratoire	Evrogen
CL12Contig1	phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Herminiimonas arsenicoxydans</i>	3.11e-77	3	0
CL16Contig1	60s acidic ribosomal protein p2	<i>Tribolium castaneum</i>	2.72e-27	3	2
CL19Contig1	cg13148 cg13148-pa	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	0.001	0	5
CL1Contig1	ribosomal protein l27ae	<i>Agriotes lineatus</i>	2.88e-68	34	10
CL23Contig1	ribosomal protein l10e	<i>Apis mellifera</i>	2.05e-119	2	2
CL28Contig1	flagellar motor switch protein	<i>Plasmodium chabaudi</i>	0.07	0	1
CL29Contig1	ribosomal rna small subunit methyltransferase b	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3.60e-86	2	0
CL2Contig1	hypothetical protein [Leptopilina boulardi filamentous virus]	<i>Leptopilina boulardi</i>	2.28e-71	0	22
CL30Contig1	histone h4	<i>Drosophila sechellia</i>	2.62e-39	0	2
CL31Contig1	translationally controlled tumor protein	<i>Drosophila grimshawi</i>	4.28e-66	0	1
CL36Contig1	protein	<i>Schistosoma japonicum</i>	1.22e-12	0	2
CL39Contig1	extracellular solute-binding protein family 3	<i>Ralstonia solanacearum</i>	9.48e-106	2	0
CL3Contig1	histone h2b	<i>Aedes aegypti</i>	5.01e-43	4	15
CL41Contig1	<i>No hit</i>			2	0
CL43Contig1	protein	<i>Nicotiana tabacum</i>	6.28e-24	0	1
CL44Contig1	reverse transcriptase-like protein	<i>Danio rerio</i>	0.75	2	0
CL4Contig1	ribonuclease h1	<i>Pediculus humanus corporis</i>	1.49e-37	0	15
CL50Contig1	chemotaxis response regulator protein-glutamate methylesterase	<i>Yersinia mollaretii</i>	1.069e-84	1	0
CL52Contig1	kelch motif family protein	<i>Paramecium tetraurelia</i>	0.0001	2	0
CL58Contig1	protein kinase domain containing protein	<i>Tetrahymena thermophila</i>	4.07e-23	2	0
CL5Contig1	cg15449 cg15449-pa	<i>Culex quinquefasciatus</i>	1.90e-05	0	14
CL60Contig1	transcription factor protein	<i>Ciona savignyi</i>	4.72e-17	1	0
CL61Contig1	ribosomal protein s2	<i>Nasonia vitripennis</i>	3.09e-77	2	0
CL63Contig1	acidic p0 ribosomal protein	<i>Nasonia vitripennis</i>	1.91e-59	2	0
CL64Contig1	ubiquitin ribosomal protein s27ae fusion protein	<i>Nasonia vitripennis</i>	3.98e-62	1	1
CL66Contig1	translation elongation factor 2	<i>Tribolium castaneum</i>	1.11e-30	1	0
CL68Contig1	polyphosphate kinase	<i>Janthinobacterium sp.</i>	9.91e-52	1	0
CL71Contig1	phytanoyl- dioxygenase	<i>Gemmata obscuriglobus</i>	3.05	2	0
CL72Contig1	adp atp translocase	<i>Nasonia vitripennis</i>	2.45e-45	2	0
CL74Contig1	<i>No hit</i>			1	0
CL77Contig1	protein	<i>Brugia malayi</i>	9.59e-50	0	1
CL79Contig1	double-stranded rna-binding protein zn72d	<i>Nasonia vitripennis</i>	5.10e-58	0	2
CL80Contig1	not2 not3 not5 family protein	<i>Apis mellifera</i>	1.69e-30	0	2

Nom	Description	Organisme	E-value	Laboratoire	Evrogen
CL81Contig1	antioxidant protein	<i>Ralstonia pickettii</i>	1.52e-44	1	0
CL83Contig1	two-component hybrid sensor and regulator	<i>Microscilla marina</i>	0.056	2	0
SSH1-I-B1.27-M13-rev_G08_052_1	eukaryotic translation initiation factor 4a	<i>Apis mellifera</i>	1.84e-102	1	0
SSH1-I-B2.42-M13-rev_B09_077_1	mitochondrial atp synthase b chain	<i>Nasonia vitripennis</i>	9.20e-29	1	0
SSH1-I-B2.9-M13-rev_C07_059_1	ribosomal protein l6	<i>Apis mellifera</i>	5.53e-34	1	0
SSH1-I-FW10_REV_2_1	mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 5b isoform 1	<i>Culex quinquefasciatus</i>	2.80e-17	1	0
SSH1-I-FW11_REV_7_1	uncharacterized protein c4orf27 homolog	<i>Nasonia vitripennis</i>	1.38e-44	1	0
SSH1-I-FW11_T7PROM_3_2	u609_drome ame: full=upf0609 protein cg1218	<i>Nasonia vitripennis</i>	9.73e-42	1	0
SSH1-I-FW12_T7PROM_4_1	arm-1 protein	<i>Apis mellifera</i>	1.06e-14	1	0
SSH1-I-FW13_T7PROM_5_3	fructose- -bisphosphatase	<i>Nasonia vitripennis</i>	6.19e-33	1	0
SSH1-I-FW14_T7PROM_6_1	serine threonine protein kinase	<i>Apis mellifera</i>	1.74e-48	1	0
SSH1-I-FW15_T7PROM_7_2	ribosomal protein s12	<i>Nasonia vitripennis</i>	1.49e-31	1	0
SSH1-I-FW15_T7PROM_7_3	ribosomal protein s12	<i>Apis mellifera</i>	5.14e-27	1	0
SSH1-I-FW17_T7PROM_8_1	melanoma antigen family 2	<i>Apis mellifera</i>	1.97e-29	1	0
SSH1-I-FW19_T7PROM_10_1	ribophorin ii	<i>Nasonia vitripennis</i>	1.35e-81	1	0
SSH1-I-FW1_REV_1_1	40s ribosomal protein s20	<i>Lysiphlebus testaceipes</i>	7.45e-26	1	0
SSH1-I-FW20_REV_3_1	probable arylformamidase	<i>Apis mellifera</i>	5.52e-18	1	0
SSH1-I-FW21_T7PROM_13_2	ribosomal protein l26e	<i>Nasonia vitripennis</i>	6.32e-30	1	0
SSH1-I-FW22_T7PROM_14_1	ribosomal protein s7	<i>Nasonia vitripennis</i>	1.27e-30	1	0
SSH1-I-FW23_T7PROM_15_1	maggie cg14981- isoform a	<i>Nasonia vitripennis</i>	2.59e-07	1	0
SSH1-I-FW24_REV_4_1	ribosomal protein s18	<i>Apis mellifera</i>	1.69e-46	1	0
SSH1-I-FW24_REV_4_2	ribosomal protein s18	<i>Nasonia vitripennis</i>	1.04e-24	1	0
SSH1-I-FW25_T7PROM_17_1	macrophage erythroblast attacher	<i>Apis mellifera</i>	3.13e-77	1	0
SSH1-I-FW26_T7PROM_18_1	pgpd14 protein with at least one ring possible plant origin	<i>Theileria annulata</i>	0.16	1	0
SSH1-I-FW27_T7PROM_19_1	No hit			1	0
SSH1-I-FW27_T7PROM_19_2	isoform a	<i>Drosophila melanogaster</i>	2.58e-07	1	0
SSH1-I-FW27_T7PROM_19_3	No hit			1	0
SSH1-I-FW27_T7PROM_19_4	riken cdna 2810006k23 gene	<i>Apis mellifera</i>	1.57e-20	1	0
SSH1-I-FW28_REV_8_1	40s ribosomal protein sa	<i>Apis mellifera</i>	2.12e-17	1	0
SSH1-I-FW29_T7PROM_21_1	40s ribosomal protein s14	<i>Drosophila persimilis</i>	5.53e-58	1	0
SSH1-I-FW30_REV_5_1	ribosomal protein s13	<i>Epinephelus coioides</i>	4.12e-37	1	0
SSH1-I-FW31_REV_6_1	ribosomal protein l13a	<i>Nasonia vitripennis</i>	6.82e-08	1	0
SSH1-I-FW32_T7PROM_25_1	abc transporter nucleotide binding atpase protein	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	0.036	1	0

Nom	Description	Organisme	E-value	Laboratoire	Evrogen
SSH1-I-FW3_T7PROM_22_1	abc transporter permease protein	<i>Apis mellifera</i>	1.58e-26	1	0
SSH1-I-FW4_T7PROM_26_1	26s proteasome regulatory subunit s3	<i>Nasonia vitripennis</i>	4.25e-18	1	0
SSH1-I-FW5_T7PROM_27_1	No hit			1	0
SSH1-I-FW6_T7PROM_28_1	No hit			1	0
SSH1-I-FW8_T7PROM_30_1	No hit			1	0
SSH1-I-FW9_T7PROM_31_1	isoform a	<i>Apis mellifera</i>	6.43e-75	1	0
SSH1-I-FW-IIF8_T7PROM_3_1	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	<i>Anopheles gambiae</i>	2.56e-31	1	0
SSH1-I-FW-IIF8_T7PROM_3_2	cyclophilin a	<i>Ixodes scapularis</i>	7.96e-41	1	0
SSH1-I-MOS.17-M13-rev_G07_051_2	dna mismatch repair protein	<i>Nasonia vitripennis</i>	4.52e-09	1	0
SSH1-I-MOS.19-M13-rev_A08_064_1	40s ribosomal protein sa	<i>Nasonia vitripennis</i>	2.11e-81	1	0
SSH1-I-MOS.19-M13-rev_A08_064_2	No hit			1	0
SSH1-I-MOS.23-M13-rev_E08_056_1	ribosomal protein s4e	<i>Nasonia vitripennis</i>	9.02e-24	1	0
SSH1-I-MOS.23-M13-rev_E08_056_2	ribosomal protein s4e	<i>Apis mellifera</i>	3.66e-95	1	0
SSH1-I-MOS.24-M13-rev_F08_054_1	hypothetical conjugation protein	<i>Acholeplasma laidlawii</i>	0.62	1	0
SSH1-I-MOS.46-M13-rev_D09_073_1	ribosomal protein l8e	<i>Apis mellifera</i>	3.36e-98	1	0
SSH1-I-MOS.48-M13-rev_F09_069_1	s9 ribosomal protein	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	1.95e-39	1	0
SSH1-I-MOS.48-M13-rev_F09_069_2	s9e ribosomal protein	<i>Apis mellifera</i>	1.16e-47	1	0
SSH1-I-MOS4-B10-M13rev_F08_054_3	40s ribosomal protein s2	<i>Mycetophagus quadripustulatus</i>	9.52e-10	1	0
SSH1-I-MOS4-C3r-T7PROM_A08_064_1	ubx domain protein 2b	<i>Nasonia vitripennis</i>	1.11e-63	1	0
SSH1-I-MOS4-E6-M13rev_C09_075_1	acidic p0 ribosomal protein	<i>Apis mellifera</i>	1.20e-75	1	0
SSH1-I-WGA-B3a-M13rev_A11_095_2	apc family amino acid-polyamine-organocation transporter	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2.36e-32	1	0
SSH1-I-WGA-B3a-M13rev_A11_095_3	apc family amino acid-polyamine-organocation transporter	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.54e-39	1	0
SSH1-I-WGA-B3b-M13rev_B11_093_1	No hit			1	0
SSH1-I-WGA-B3c-M13rev_C11_091_1	No hit			1	0
SSH1-I-WGA-B3d-M13rev_cor_1	No hit			1	0
SSH1-I-WGA-B3d-M13rev_cor_2	No hit			1	0
SSH1-I-WGA-B3d-M13rev_cor_3	No hit			1	0
SSH1-I-WGA-B3f-M13rev_F11_085_1	unnamed protein product [Kluyveromyces lactis]	<i>Kluyveromyces lactis</i>	0.84	1	0
SSH1-I-WGA-B4a-M13rev_G11_083_1	histidyl trna synthetase isoform cra_a	<i>Mus musculus</i>	1.81	1	0
SSH1-I-WGA-B4b-M13rev_D12_090_2	integral membrane protein	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	6.45e-14	1	0
SSH1-I-WGA-B4b-M13rev_D12_090_3	molybdenum cofactor biosynthesis protein c	<i>Burkholderia dolosa</i>	3.66e-17	1	0
SSH1-I-WGA-B6b-M13rev_A12_096_1	type vi secretion vc_a0108 family	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	3.38e-23	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B1-11-T7prom_D01_009_1	secretion protein	<i>Janthinobacterium sp.</i>	1.51e-08	1	0

Nom	Description	Organisme	E-value	Laboratoire	Evrogen
SSH1-I-WGA-Mbo-B1-12-T7prom_E01_007_1	kelch-motif containing protein	<i>Burkholderia sp.</i>	0.27	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B1-12-T7prom_E01_007_2	virulence factor mce family protein	<i>Monodelphis domestica</i>	0.074	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B1-1-T7prom_A01_015_1	l-aspartate oxidase	<i>Limnobacter sp.</i>	2.18e-22	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B1-1-T7prom_A01_015_2	l-aspartate oxidase	<i>Limnobacter sp.</i>	2.06e-44	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B1-1-T7prom_A01_015_3	l-aspartate oxidase	<i>Limnobacter sp.</i>	1.45e-50	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B1-5-T3_F04_022_1	phd finger protein	<i>Nasonia vitripennis</i>	5.80e-07	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B1-8-T3_G04_020_1	ribosomal protein l3	<i>Baumannia cicadellincola</i>	1.80	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B2-16-T7prom_G01_003_1	peptidase dimerisation domain protein	<i>Shewanella baltica</i>	0.002	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B2-16-T7prom_G01_003_2	mandelate racemase muconate lactonizing protein	<i>Acidovorax sp.</i>	2.65	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B2-27-T7prom_H01_001_1	predicted protein [Nematostella vectensis]	<i>Nematostella vectensis</i>	2.39	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B2-27-T7prom_H01_001_2	aminobenzoyl-glutamate transporter	<i>Acidaminococcus sp.</i>	0.47	1	0
SSH1-I-WGA-Mbo-B2-28-T7prom_A02_016_2	acid trehalase-like 1	<i>Polaribacter sp.</i>	2.89e-14	1	0
SSH2-I-A01-N1-M13-RP_1	maturase [Polypremum procumbens]	<i>Polypremum procumbens</i>	0.76	0	1
SSH2-I-A01-N2-M13-RP_1	ribosomal protein s17	<i>Nasonia vitripennis</i>	1.68e-46	0	1
SSH2-I-A05-N2-M13-RP_1	hypothetical protein [Plasmodium falciparum 3D7]	<i>Plasmodium falciparum</i>	2.68	0	1
SSH2-I-B08-N3-M13-RP_1	zinc finger protein	<i>Apis mellifera</i>	2.10e-51	0	1
SSH2-I-C01-N2-M13-RP_1	zinc dhhc-type containing 13	<i>Homo sapiens</i>	3.04	0	1
SSH2-I-C03-N5-M13-RP_2	5 - cytosolic iii	<i>Nasonia vitripennis</i>	4.09e-29	0	1
SSH2-I-C04-N3-M13-RP_1	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs like	<i>Bombyx mori</i>	4.85e-24	0	1
SSH2-I-C12-N3-M13-RP_1	adenylosuccinate synthetase	<i>Apis mellifera</i>	2.09e-103	0	1
SSH2-I-C12-N5-M13-RP_1	cdc42 protein	<i>Nasonia vitripennis</i>	4.70e-100	0	1
SSH2-I-D01-N1-M13-RP_1	pyruvate dehydrogenase	<i>Apis mellifera</i>	2.46e-65	0	1
SSH2-I-D01-N2-M13-RP_1	lethal k01209 cg4798- isoform b isoform 1	<i>Apis mellifera</i>	0.12	0	1
SSH2-I-D02-N2-M13-RP_1	40s ribosomal protein s3a	<i>Pteromalus puparum</i>	1.82e-74	0	1
SSH2-I-D07-N2-M13-RP_1	elongation factor 1- oocyte form	<i>Paralichthys olivaceus</i>	1.27e-14	0	1
SSH2-I-D12-N5-M13-RP_1	nf-x1-type zn finger-containing protein	<i>Monodelphis domestica</i>	0.002	0	1
SSH2-I-E04-N1-M13-RP_1	trafficking protein particle complex 2-like	<i>Nasonia vitripennis</i>	1.14e-30	0	1
SSH2-I-E06-N2-M13-RP_1	yippee-like 2	<i>Apis mellifera</i>	2.91e-59	0	1
SSH2-I-E06-N5-M13-RP_1	elongation factor 1 delta	<i>Nasonia vitripennis</i>	1.86e-54	0	1
SSH2-I-E09-N1-M13-RP_1	ip3 receptor calcium ion channel	<i>Tetrahymena thermophila</i>	4.05	0	1
SSH2-I-E09-N1-M13-RP_2	wd repeat-containing protein srw1	<i>Nasonia vitripennis</i>	7.52e-31	0	1
SSH2-I-F01-N2-M13-RP_1	nadh dehydrogenase subunit 4	<i>Pista cristata</i>	8.38	0	1
SSH2-I-F06-N4-M13-RP_1	protease inhibitor epi10 precursor	<i>Pediculus humanus corporis</i>	1.19e-12	0	1

Nom	Description	Organisme	E-value	Laboratoire	Evrogen
SSH2-I-F10-N2-M13-RP_1	No hit			0	1
SSH2-I-G02-N5-M13-RP_2	No hit			0	1
SSH2-I-G08-N1-M13-RP_1	No hit			0	1
SSH2-I-G12-N5-M13-RP_1	No hit			0	1
SSH2-I-H01-N2-M13-RP_2	heat shock protein 70	<i>Macrocentrus cingulum</i>	5.73e-18	0	1
SSH2-I-H01-N2-M13-RP_3	ribosomal protein l10ae	<i>Nasonia vitripennis</i>	3.13e-61	0	1
SSH2-I-H02-N2-M13-RP_2	u4 u6 small nuclear ribonucleoprotein prp31	<i>Apis mellifera</i>	3.44e-15	0	1
SSH2-I-H04-N5-M13-RP_1	surfeit 5	<i>Nasonia vitripennis</i>	6.67e-64	0	1
SSH2-I-H06-N3-M13-RP_1	ankyrin repeat	<i>Wolbachia</i>	1.39e-05	0	1

chapter seven

A newly discovered virus manipulates superparasitism behavior in a parasitoid wasp

Julien Varaldi, Sylvain Gandon, Ana Rivero, Sabine Patot, and Frédéric Fleury

Contents

Introduction.....	119
Superparasitism in parasitoids: an overview.....	120
Superparasitism in <i>Leptopilina boulardi</i>	122
Genetic determinism.....	122
Infectious transmission.....	124
Viral particles.....	124
Hypothetical models for virus transmission.....	125
Vertical transmission efficiency.....	126
Horizontal transmission efficiency.....	127
Prevalence of LbFV in wild populations.....	128
Direct effect of LbFV on <i>L. boulardi</i> physiology and behavior.....	129
Adaptive significance of the behavioral change.....	129
Parasitoid evolution.....	130
Virus Evolution.....	130
Indirect effect of LbFV on parasitoid populations.....	132
Discussion.....	133
Mechanisms for the behavioral alteration.....	133
Effect of LbFV on host-parasitoid interactions.....	134
Circulation of LbFV in the <i>Drosophila</i> -parasitoid community.....	135
Conclusions.....	135
References.....	136

Introduction

Parasitoid insects have extensive and intimate relationships with prokaryotes, and some of these symbiotic relationships probably explain part of their evolutionary success (Whitfield, 2002; Espagne et al., 2004). Parasitoids represent from 10 to 20% of all insect species,

most of them belonging to the highly diversified order Hymenoptera (but not only, Godfray 1994). Parasitoids lay their eggs inside or on the body of other insects and their immature stages then develop as parasites (either ecto or endo parasites), ultimately killing the insect host. Free-living adult females spend most of their time finding suitable hosts (usually immature stages, egg, larvae, or pupae) to lay their eggs. Research within the past 15 years has demonstrated that parasitoid biology could be deeply influenced by symbiotic bacteria, which determine important traits such as the mode of reproduction (Cook and Butcher, 1999). *Wolbachia* and *Cardinium* reverse sexual to asexual reproduction in a number of parasitoid species (thelytoky induction), thus increasing the reproductive potential of the wasps (Stouthamer et al., 1990; Zchori-Fein et al., 2001). The same bacteria also induce cytoplasmic incompatibility with a wide diversity of phenotypic effects due to parasitoid haplo-diploidy (Vavre et al., 2000; Hunter et al., 2003). *Wolbachia* also interferes with egg production in some species (Girin and Boulétreau, 1995), sometimes leading to a total dependence for oogenesis (Dedeine et al., 2001). The host-parasitoid relationship itself is occasionally mediated by bacteria, as shown by a recent study demonstrating that the symbiont *Hamiltonella* confers resistance to the insect host against parasitoid attacks (Oliver et al., 2005). Although symbiotic bacteria infections are widespread in parasitoids, the most outstanding mutualistic relationship in parasitoid involves viral particles. The best-known parasitoid-associated viruses are polydnavirus PDV (Bracoviruses and Ichnoviruses), which replicate in female reproductive organs without any detrimental effects to the wasp. PDV are injected into the parasitoid host during oviposition and alter host physiology, thus allowing parasitoid larvae to circumvent the host immune reaction (Whitfield, 1990; Espagne et al., 2004). This symbiosis arises from a longstanding co-evolution between the ancestral virus and the parasitoid, resulting in a mutualistic obligatory symbiosis. Indeed, these viruses have completely lost their infectious capacity and are only vertically transmitted because of their integration within the wasp genome. The origin of PDV is still debated in light of recent studies, showing that the viral genome contains mainly eukaryotic genes (Espagne et al., 2004). Parasitoids harbor also a wide diversity of "true" viruses (by this, we mean viruses that are potentially infectious) revealing variable effects on the physiology of their parasitoid hosts (Stoltz and Makkay, 2000; Renault et al., 2005). Some of them appear mutualistic because they participate in the suppression of host immune reactions, like PDV (Renault et al., 2003; Stasiak et al., 2005). Other viruses have no or undescribed effects. As an example, filamentous viral particles have been observed in several species of parasitoids (Styer et al., 1987; Krell, 1987; De Buron and Beckage, 1992) but to date there is no data documenting their potential influence on parasitoid biology. Efforts must be made in the future to better characterize these associations in an attempt to fully understand the influence of viruses on parasitoid evolution. The analysis of the genetic determinism of a foraging behavior in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina boulardi* revealed that a vertically transmitted virus forces females to lay more eggs in their host than normally observed, a behavior called superparasitism. This finding shows that "true" viruses could have evolved unexpected effects, broadening the diversity of symbiotic relationships existing between parasitoids and microorganisms.

Superparasitism in parasitoids: an overview

Parasitoid insects are classified in two main groups according to the number of offspring that can successfully develop from a single host. *Gregarious* parasitoids lay a clutch of eggs inside the host, and several or all of the larvae complete their development and emerge as adults, depending on the ratio of clutch size/host size. In *solitary* parasitoids, however, only a single parasitoid larva can develop inside the host. Females are usually able to recognize parasitized from unparasitized hosts (host discrimination) and normally avoid

laying eggs in an already parasitized host. If a solitary female oviposits in a parasitized host, a behavior called *superparasitism*, parasitoid larval competition ends up in the death of all but one larva. Usually the second larva is most likely to be out-competed and its survival depends on the interval between the first and second ovipositions (Van Alphen and Visser, 1990). If a solitary female accepts several times the same host (a behavior called *self-superparasitism*), she will waste some eggs because brothers and sisters will compete for the possession of the host until all but one die. Superparasitism is thus expected to be strongly counter-selected. Superparasitism is, however, a common occurrence both in the laboratory (Bai and Mackauer, 1990; Van Alphen and Visser, 1990; Visser et al., 1992a) and in the field (Janssen, 1989; Santolamazza-Carbone and Cordero-Rivera, 2003; Fleury et al., 2004). Until recently, there were two potential explanations for the persistence of superparasitism in parasitoid populations despite its obvious fitness disadvantages.

Historically, the first proposed explanation considered that superparasitism was due to the inability of the females to discriminate between parasitized and unparasitized hosts (Van Lenteren, 1976). Superparasitism was thus considered as resulting from errors on the part of the ovipositing females. Lately, however, researchers found that the ability to distinguish parasitized from unparasitized hosts is a widespread trait in parasitoids (Van Lenteren, 1981). The possibility that superparasitism could be the consequence of an active adaptive decision of foraging females was then investigated intensely (Van Alphen and Visser, 1990; Visser et al., 1990; Visser et al., 1992a, b, c; Fletcher et al., 1994; Sirot et al., 1997), leading to an alternative explanation. Under this second explanation, superparasitism would be accepted by females when the benefits of superparasitism exceed the cost associated with this behavior, thus considering superparasitism an adaptive strategy. Superparasitism can be associated with a fitness benefit for the female if the probability of the second egg to win the within-host competition is not nil. There is indeed evidence that this is the case, although the probability of emergence of the second egg drops rapidly as the interval between the two ovipositions increases (Visser et al., 1992a; Field et al., 1997). On the other hand, two types of costs are associated with superparasitism. First, superparasitism costs eggs (the eggs laid in a parasitized host instead of in an unparasitized one) and time (the time spent laying an egg in a parasitized host instead of looking for unparasitized hosts; Sirot et al., 1997). The relative importance of these costs depends on whether the fitness of females is mostly limited by the number of eggs available (egg limitation) or by the amount of time available to lay them (time limitation; Rosenheim, 1996).

Models incorporating these different costs and benefits have produced several testable predictions. For example, theory predicts that when the risk of egg limitation is low (a large egg load relative to the number of hosts available) or when the risk of time limitation is high (due to, for example, low life expectancy or high host searching times), females should be less selective in their choice of hosts (Iwasa et al., 1984; Mangel, 1987; Charnov and Stephens, 1988) and thus superparasitize more (Sirot et al., 1997). These predictions have found some experimental support (Visser et al., 1992b, c; Fletcher et al., 1994; Sirot et al., 1997). In addition, models based on game theory have shown that the optimal superparasitism may also depend on the strategies adopted by other parasitoid females. In particular, superparasitism should increase when there are more parasitized hosts in the foraging environment (Visser et al., 1992b; for empirical test, see Visser et al., 1990) — that is to say, when the competition for the hosts increases.

While the adaptive explanation has been prevalent in the past few years, a third explanation for the maintenance of superparasitism in parasitoid populations has appeared recently (Varaldi et al., 2003). In *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Eucoilidae), a solitary and proovigenic parasitoid of *Drosophila* larvae, superparasitism is not determined by the genotype of the parasitoid but rather induced by an infectious element,

identified as a virus. This chapter reviews the experiments that led us to the discovery of this manipulative virus; presents the results derived from a theoretical model, thus allowing one to test the adaptive significance of the behavioral modification; and discusses the new perspectives that this peculiar system offers.

Superparasitism in Leptopilina boulardi

As outlined in the previous section, superparasitism can be adaptive for the parasitoid in competition conditions. The study of superparasitism behavior in *Leptopilina boulardi* revealed a striking pattern. We found that females can accept more than ten times the same host (self-superparasitism), which seems quite difficult to interpret as an adaptive behavior for the parasitoid because all eggs but one — all brothers or sisters — will die. Furthermore, the closely related *Drosophila* parasitoid, *L. heterotoma*, did not show this extreme phenotype (Varaldi et al., 2005b). To understand the adaptive significance of this behavior, we searched for variability in superparasitism to determine the genetic basis of this behavior.

Genetic determinism

Several strains collected in France, Italy, and Portugal were studied in the laboratory. Females were each provided with ten hosts. This represents a considerable limitation for a species that can lay, on average, about 200 eggs during their lifetime. After a standard period of time, the hosts were dissected and the number of parasitoid eggs laid counted. We found clear evidence of variability in self-superparasitism between these strains with one (Madeira, Portugal) never superparasitizing and others superparasitizing to varying degrees. In addition, in one of these strains (Sienna, Italy), we found an extremely high variability in the tendency to superparasitize, although this strain was started with a unique female. From this strain, we thus decided to establish 20 inbred lines with systematic brother-sister crosses for eight generations to obtain "pure strains" (homozygous at >82%). After cycles of inbred crosses, between-line variability was found to be high. We selected one line that almost never superparasitized ("non superparasitizing" line, NS) and one that frequently did it ("superparasitizing" line, S) in order to do experimental crossings. To find out whether differences observed among these lines have a genetic basis, two generations of reciprocal crosses were carried out: the two parental strains were crossed to establish the two F1 hybrids and each F1 hybrid was then crossed with each parental strain, leading to four backcrosses. Crosses revealed a striking transmission of the phenotypes (Figure 7.1): both the F1 and the back-crosses behaved as their maternal ancestors, independently of their nuclear genotype, demonstrating a strict maternal transmission of the behavior (Varaldi et al., 2003). The same result was obtained using distantly related populations showing contrasting superparasitism, confirming that superparasitism behavior is totally independent of the parasitoids' nuclear background. Furthermore, differences observed under self-superparasitism conditions were still observed under conspecific superparasitism conditions (acceptance of hosts parasitized by other females; Varaldi et al., 2003, suppl. mat.): "superparasitizing" females (henceforth S females) always superparasitize more than "non superparasitizing" females (henceforth NS females), whatever the conditions. Note, however, that the NS females show a certain superparasitism tendency under strong competition conditions (Varaldi et al., 2005a), which can probably be accounted for by an adaptive behavioral plasticity (Visser et al., 1992c).

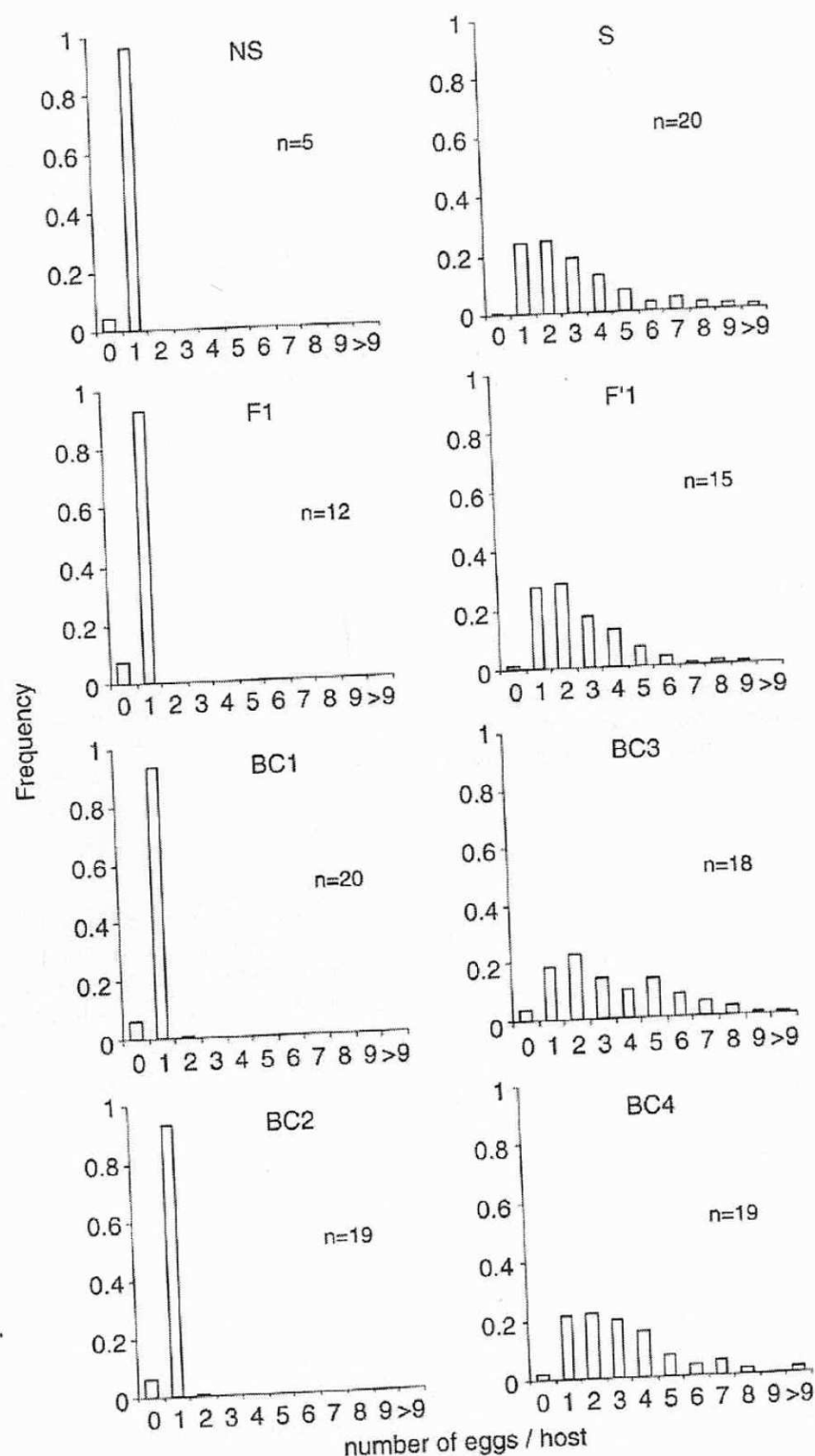


Figure 7.1 Distribution of number of parasitic eggs/host larva in S and NS parental lines, F1, and backcrosses (BC). [(mother $\times$ father); F1: (NS $\times$ S); F'1: (S $\times$ NS); BC1: (NS $\times$ S) $\times$ S; BC2: (NS $\times$ S) $\times$ NS; BC3: (S $\times$ NS) $\times$ NS; BC4: (S $\times$ NS) $\times$ S]. (Adapted from Varaldi, J., Fouillet, P., Ravallec, M., López-Ferber, M., Boulétreau, M., and Fleury, F. (2003). Infectious behavior in a parasitoid. *Science* 302(5652): 1930.)

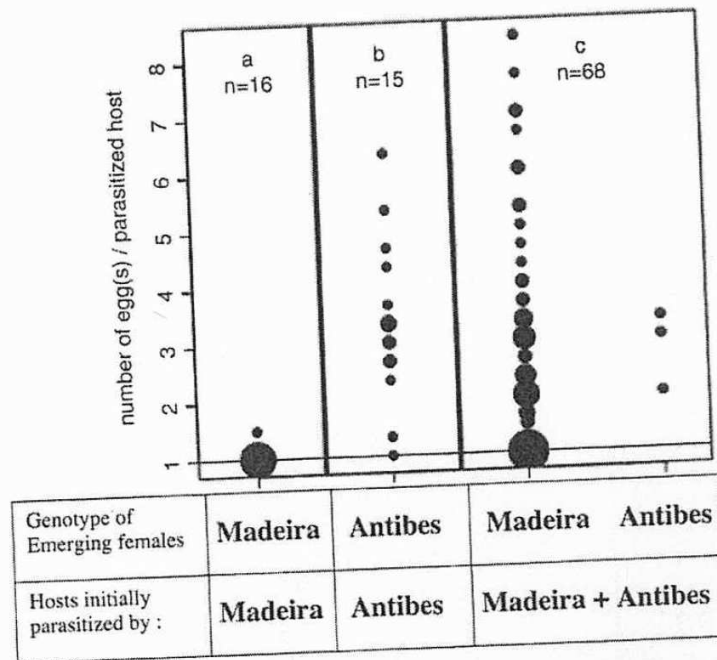


Figure 7.2 Horizontal transmission of superparasitism. Behavior and genotype of females emerging from hosts initially parasitized by Madeira females only (a), Antibes females only (b), or both strains (c). Area of circles is proportional to number of individuals. (Adapted from Varaldi, J., Fouillet, P., Ravallec, M., López-Ferber, M., Boulétreau, M., and Fleury, F. (2003). Infectious behavior in a parasitoid. *Science* 302(5652): 1930.)

Infectious transmission

We further explored if the factor responsible for this difference in superparasitism behavior could also be horizontally transferred from one larva to another during the period of time they coexist within a superparasitized host. For this purpose, we placed S females to oviposit in *Drosophila* larvae that had been previously exposed to NS females. The two strains used (from Antibes, France, and Madeira, Portugal, respectively) can be distinguished by the size of their ITS2 (Second Internal Transcribed Spacer of the ribosomal RNA; see Allemand et al., 2002, for PCR details). At emergence, the female offspring that had won the between-strain competition were individually tested for their behavior and their genotype (Figure 7.2). They were compared to control females emerging from hosts parasitized only by Madeira (NS) females, or only by Antibes (S) females (within-strain competition). All controls behaved as expected: Madeira females never superparasitized (Figure 7.2 a), while Antibes did (Figure 7.2b). Among the winners of the between-strain competition, all Antibes females superparasitized as expected, while 71% (46/65) of Madeira females superparasitized, despite their genotype (Figure 2c). This demonstrates that superparasitism behavior was horizontally transmitted from the Antibes (S) to the Madeira (NS) females during the short time period they coexisted inside the host. This also demonstrates that the superparasitism behavior of the S lines is the result of an infectious extra-chromosomal factor. Newly acquired infections proved stable over generations.

Viral particles

Once we clearly demonstrated that an unknown infectious particle is responsible for the superparasitism tendency of *Leptopilina boulardi*, we set out to determine its nature. Several

potentially infectious elements are known to infect insect parasitoids, the most widely known being *Wolbachia*, a bacterium that can be horizontally transferred under superparasitism conditions in *Trichogramma* species (Huigens et al., 2004). Other bacterial species, however, are also known to modify parasitoid behavior (Zchori-Fein et al., 2001). Thus, we initially set out to test whether the superparasitism phenotype was the work of a bacterium. For this purpose, we tried to cure our S and NS strains with two wide-spectrum antibiotics (rifampicin and tetracycline). We also tried to detect the presence of bacterial genetic material using PCR primers designed to amplify 16S ribosomal DNA of all eubacteria (O'Neill et al., 1992). Neither approach rendered any positive results, leading us to reject bacteria as the agents responsible for the superparasitism modification. Microsporidia were next analyzed as potential candidates because they are maternally transmitted in some insect species (Agnew and Koella, 1999) and they can benefit from horizontal transmission under superparasitism conditions in one parasitoid species (De Almeida et al., 2002). However, no microsporidia was observed after appropriate Giemsa coloration (P. Agnew, personal communication).

The remaining obvious candidates were viral particles. Because searching for viral particles in the whole body of an animal using electron microscopy is a very difficult task (even if *Leptopilina boulardi* is only few millimeter long), we started up by trying to identify which animal tissues showed infectivity. For this purpose, solutions derived from ovaries and poison gland (obtained from either S or NS females) were injected into *Drosophila* larvae parasitized by NS females. The superparasitism phenotype of the emerging (injected) females was then tested. Solutions of both organs dissected from S females proved able to induce the S phenotype on the emerging females, whereas NS injections did not induce any behavioral change (Varaldi et al., in preparation). Electron microscopy investigations of these infected tissues revealed the presence of a long, rod-shaped virus at the basis of oviducts dissected from a superparasitizing female. Virogenic stromae were observed in the nuclei of most cells bordering the lumen of the oviduct, suggesting that virus replication takes place in the nucleus (which makes them likely to be a DNA virus). The mature particles later move from the nucleus to the cytoplasm, where they can reach high densities. Nucleocapsids found in the nuclei are slightly flexous and are often aggregated. The diameter of the nucleocapsid is about 45 nm and its length sometimes exceeds 1 μ m (Figure 7.3). While moving from the nucleus to the cytoplasm, particles probably acquire an envelope (their diameter in the cytoplasm is 60 nm). Because of the long, rod-shaped and slightly flexous capsids, we propose to call them LbFV (for *L. boulardi* filamentous virus), based on the nomenclature used for previously described viruses of parasitoids (Krell, 1987; Styer et al., 1987; Stoltz et al., 1988; Hamm et al., 1990; Bigot et al., 1997; Gothama et al., 1998; Stoltz and Makkay, 2000). Note that for several of these previously described viruses, no effect on their parasitoid host has been described.

Further investigations revealed an almost perfect match between the presence of LbFV virus and the S phenotype (Fisher exact test: $p < 0.001$). No virus was found in females exhibiting the NS phenotype ($n = 11$), whereas viral particles were observed in all females showing the S phenotype but one ($n = 11$), an exception that can result from an inappropriate cutting level during the preparation of the wasp's oviduct (viruses are indeed concentrated in a thin region at the base of the oviduct). No viral particles were ever observed within the eggs. Taken together, these results strongly suggest that the virus is the agent responsible for increased superparasitism tendency in *Leptopilina boulardi*.

Hypothetical models for virus transmission

At present, the mechanisms allowing the virus to colonize new *Leptopilina boulardi* hosts (either through vertical transmission from mother to offspring or through horizontal

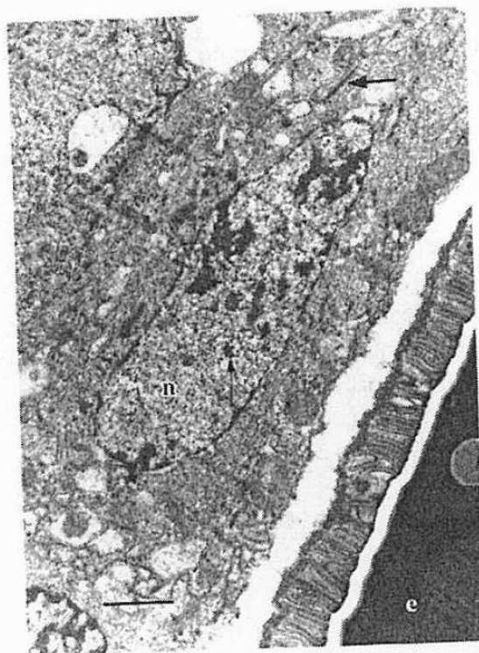


Figure 7.3 Viral particles infecting the parasitoid *Leptopilina boulardi* (superparasitizing strains). Nude nucleocapsids are observed inside the nucleus (thin arrow) and with an envelope in the cytoplasm (large arrow) of cells bordering the lumen of the oviducts. e: egg, n: nucleus. Bar: 1 μ m.

transmission between two unrelated parasitoids) are unknown. However, a number of scenarios can be hypothesized based on the few data available on the efficiency of vertical and horizontal transmission.

Vertical transmission efficiency

The superparasitism behavior of the offspring of ten S females ($n = 9$ or $n = 10$ daughters for each female) was tested under laboratory conditions. Only 4 of 96 offspring females tested showed the typical NS phenotype, which seems to suggest that they were not infected. However, in the following generation, each of these four lines revealed *de novo* the S phenotype, suggesting that their mothers had indeed been infected but that their behavior had not been manipulated. It thus appears that vertical transmission is highly efficient, at least under laboratory conditions. We know, however, that the vertical transmission is not perfect, because the S and NS reference lines were derived from the offspring of a single infected female. Two, not mutually exclusive, mechanisms for vertical transmission are possible: (1) transovarian transmission and (2) pseudo-vertical transmission — the virus is injected in addition to the egg into the host during oviposition and it re-infects the parasitoid larva during consumption of the infected host hemocoel. Although we never found any viral particles in eggs, exhaustive screening of entire eggs using electron microscopy is extremely difficult. Furthermore, it is possible that the virus is present in the eggs without its typical virion structure (e.g., if it is present as an uncapsidated RNA or DNA). Successful contamination obtained via injection experiments on crushed infected tissues, however, clearly indicated that pseudo-vertical transmission is possible. A possible vehicle for transmission of the virus to the offspring is through injection of viruses produced in the poison gland (in parasitoid species, this organ produces venoms that are injected into the host during oviposition, some of them counter-acting the host immune defense; Labrosse et al., 2003).

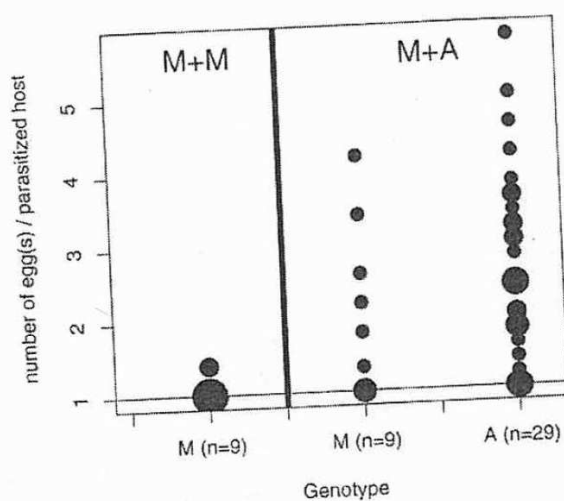


Figure 7.4 Superparasitism and genotype (M/A) of females emerging from hosts parasitized twice by Madeira (M) females (left panel) or by both Madeira and Antibes (A) females (right panel).

Horizontal transmission efficiency

Previous results showed that 71% of Madeira females (NS strain) that developed under competition with Antibes showed the S phenotype due to horizontal transmission of viral particles. However, in this experiment (Varaldi et al., 2003), the precise number of eggs laid by Madeira and Antibes females and the time window between successive ovipositions were not precisely controlled. To obtain a more accurate picture of the rate of horizontal transmission, we carried out the same experiment but this time observing each oviposition under a binocular microscope (females display a typical egg-laying posture and lay a single egg each time). We obtained hosts parasitized by Madeira (NS) and then Antibes (S), and, as a control, hosts parasitized twice by Madeira (by placing females under strong competition with other females for a single host). The time interval between the two successive ovipositions was between 0.5 and 1.5 hours. The superparasitism phenotype of each winning parasitoid, together with its genotype, was scored by behavioral test and molecular markers. We found that five out of nine Madeira females that won the competition for the possession of the host displayed strong superparasitism after having competed with Antibes strain, whereas almost no superparasitism was observed in the Madeira-Madeira modality (Figure 7.4). This confirms the horizontal transmission of the S phenotype and gives a rough estimate of horizontal transmission efficiency of 0.55 ± 0.16 (5/9) when the time interval between ovipositions is approximately 1 hour.

Under the scenario where vertical transmission occurs through re-infection of the developing parasitoid (pseudo-vertical), vertical transmission appears as a special case of horizontal transmission where injection of the egg and viral particles is synchronized, as opposed to "true" horizontal transmission where particles are injected after the future winning-egg is introduced into the host (this delay is noted Δt in Figure 7.5). We hypothesize that desynchronization of these two events (increasing Δt) reduces the efficiency of viral transmission, in accordance with the rough estimates obtained for vertical transmission efficiency (>0.99 under lab conditions, $\Delta t = 0$) and horizontal transmission (0.55, with Δt 1 h).

One question that remains open is whether the virus is able to replicate within the *Drosophila* larva tissues, as has been documented in some other host/parasitoid/virus systems (Stoltz and Faulkner, 1978; Styer et al., 1987; Rabouille et al., 1994; Bigot et al., 1997).

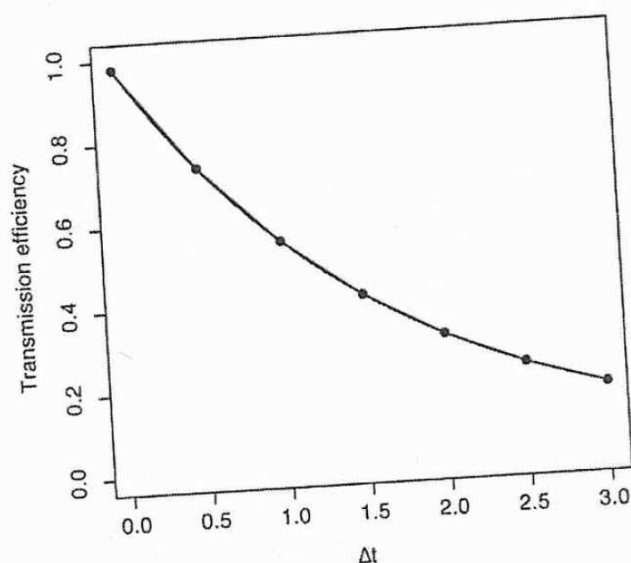


Figure 7.5 Hypothetical model for virus transmission efficiency. Δt represents the elapsed time between the moment at which the egg parasitoid (that will gain possession of the host) is injected into the host and the moment at which the virus is injected into the host. In case of (pseudo)vertical transmission, $\Delta t = 0$ and the efficiency is optimal (although <1).

Prevalence of LbFV in wild populations

To study the prevalence of an element in wild populations, one needs an efficient easy-to-use cheap tool to diagnose the infection. This could be achieved either directly by detecting the presence of the element (i.e., using diagnostic PCR) or indirectly using the symptoms of the infection (in this case, the superparasitism behavior). As we do not yet have tools allowing us to detect directly the presence of the virus (with the exception of transmission electronic microscopy, which cannot be performed on large sample sizes that are required for population studies), we are constrained to using superparasitism behavior as a diagnostic tool. Of course, these estimates should be taken with care in the absence of molecular tools, but we do believe that they give a rough estimate of the real prevalence. Briefly, females from seven populations of *L. bouvardi* captured in southeastern France were used to find isofemale lines (at least 30 per population) reared under controlled conditions in the lab. After one generation in the lab, the superparasitism behavior of two to three female offspring of each isofemale line was tested as before (one female isolated on ten hosts). Based on offspring phenotype, we assigned infection status to each isofemale line. The proportion of isofemale lines showing the typical S phenotype ranges between 0.18 and 1.00 (Patot et al., in preparation). Infection rates thus appear to be, overall, very high and highly variable between populations. The seasonal dynamics of infection were also studied for one location (Gotheron, near Valence, France) from June to September 2003 (Table 7.1). A viral prevalence of 60% in June and 65% in July decreased drastically (to 0%) in August, which was a period of exceptionally hot and dry weather in France (the hottest summer in the past 50 years in France Meteo, France data). Although linking the two events is tempting because many viruses are temperature sensitive, this hypothesis remains to be investigated in the laboratory. As a conclusion, the symptom of LbFV infection (= superparasitism behavior) is very often observed in French natural pupulation, suggesting that the virus is very widespread and quite frequent, at least in this geographical area.

Table 7.1 Estimation of the Prevalence of LbFV Virus in a French Population throughout the Season

	June	July	August	September
Total isofemale lines	27	26	17	34
« S » isofemales lines	16	18	0	13
Prevalence estimation	0.59 ± 0.09	0.69 ± 0.09	0.00	0.38 ± 0.08
NS control	1.03 ± 0.03	1.07 ± 0.06	1.00 ± 0.00	1.02 ± 0.02
	n = 10	n = 10	n = 3	n = 13
S control	3.37 ± 0.30	4.39 ± 0.62	2.52 ± 0.58	2.29 ± 0.39
	n = 9	n = 10	n = 7	n = 9

Note: Gotheron, near Valence 38, France, . throughout the season. Wild-caught females were used to found isofemales. After one generation under laboratory-controlled conditions, the superparasitism phenotype of their offspring was studied. Isofemales lines were then either diagnosed as uninfected if their behavior was not different from NS controls or infected if they displayed the typical S behavior.

Direct effect of LbFV on *L. boulardi* physiology and behavior

The studies carried out on wild-collected individuals indicated that infected and uninfected females coexist in most populations studied. To understand the dynamics of infection, it is thus essential to estimate the costs and potential benefits of viral infection on fitness-related traits. Laboratory experiments showed that viral infection in females induces no cost on adult survival, a low cost on developmental rate (+3%) and adult body size (-2%), and leads to a significant decrease in locomotor activity (Varaldi et al., 2005a). Interestingly, unlike several other maternally inherited symbionts (O'Neill et al., 1997; Vala et al., 2003), LbFV does not manipulate the sex ratio. We also measured egg load, which is a good estimation of the reproductive potential of females because *L. boulardi* is a proovigenic species (no egg production occurs at the adult stage). Infected females had, on average, 11% more eggs than uninfected females. This effect reflects a direct effect of the virus because parasitoid lines used in this experiment share 100% of their genes. This increase in egg load of infected females can then be interpreted as a manipulation of the wasp's resources that favors viral horizontal transmission by enhancing egg-laying opportunities, although alternative explanations (adaptive plastic response of the host or side effect) cannot be ruled out at this stage. Several behavioral components of the wasps (ability of males to locate female pheromones, ability of females to locate host odors, searching paths of females, daily rhythm of locomotor activity) were also studied in relation to the presence of the virus. No change, however, was observed in any of these behaviors. The behavioral effect of this virus seems to be restricted to the manipulation of superparasitism (Varaldi et al., in press).

Adaptive significance of the behavioral change

The vertical transmission of the virus implies that the virus and the parasitoid share some fitness components (they both benefit from female fecundity). It thus remains unclear whether this induced superparasitism behavior is actually adaptive for the virus (Varaldi et al., 2003; Reynolds and Hardy, 2004; Gandon, 2005). To demonstrate the adaptive nature of the alteration of the parasitoid behavior, one must show that a virus increasing superparasitism can invade a virus population that does not alter the behavior of its parasitoid host. That is, one must demonstrate that the evolutionarily stable (ES) superparasitism for the virus is higher than the ES superparasitism for the parasitoid (in the absence of the virus). The following subsection analyzes the evolution of both the parasitoid and the

virus, and shows that, indeed, for a broad range of parameter values, the virus evolves higher superparasitism strategies than its parasitoid host.

Parasitoid evolution

We developed a model that allows one to analyze both the dynamics and the evolution of a population of parasitoids (a proovigenic and solitary species) parasitizing a population of host (Gandon et al., 2006). This model includes the potential benefit of superparasitism (the possibility that parasitoid larvae developing in an already parasitized host can win the within-host competition) and both classical costs of superparasitism (the costs of time and the cost of eggs). This model can be used to predict the fate of a mutant parasitoid with superparasitism strategy s^* appearing in a parasite population dominated by a resident with strategy s , at the epidemiological equilibrium set by the resident (where $[x]$, $[xy]$, and $[y]$ are the equilibrium densities of unparasitized and parasitized host larvae, and adult females, respectively). The direction of evolution, and ultimately the ES superparasitism, depends on the fitness of a rare mutant strategy:

$$w^p[s^*, s] = O^p[s^*, s] E^p[s] \quad (7.1)$$

with

$$O^p[s^*, s] = \frac{b(s^*)([x] + s^* c[xy]) \left(1 - e^{-mE/[b(s^*)([x] + s^* c[xy])]}\right)}{m}$$

$$E^p[s] = \frac{e\phi}{d + e + b(s)sc[y]}$$

The definition of all the parameters appearing in Equation 7.1 are given in Table 7.2 (see also Gandon et al. (in press) for a detailed description of the derivation of Equation 7.2). To get an intuitive understanding of this expression, note that $O^p[s^*, s]$ is the expected number of "successful" ovipositions* during the lifetime of an adult mutant female, and $E^p[s]$ is the probability that the mutant parasitoid females emerge before the death of the host or before being ousted by the larva of the resident strategy after superparasitism. Thus, Equation 7.1 gives the expected number of mutant females produced by a single mutant female during its lifetime. The slope of the above fitness function ($dw^p[s^*, s]/ds^*$) gives the direction of selection on superparasitism and, because $E^p[s]$ does not depend on virus mutant strategy, the following condition must be verified for s^* to be an evolutionary equilibrium: $dO^p[s^*, s]/ds^*|_{s=s^*} = 0$. That is, the ES superparasitism strategy is the one maximizing the expected number of hosts parasitized. Figure 7.6 presents a numerical example showing how the ES parasitoid increases with higher probability of successful superparasitism.

Virus evolution

The model can be used to derive an expression of the fitness of a mutant virus with a strategy σ^* appearing in a population dominated by a resident virus with strategy σ , at the epidemiological equilibrium set by the resident virus and the strategy s adopted by the host (where $[x]$, $[xy]$ and $[xyz]$ are the equilibrium densities of the different types of

* Only ovipositions that manage to win the competition with the resident larva, when there is one, are considered as "successful."

Table 7.2 Main Parameters and Variables of the Model

$[x]$	Density of unparasitized hosts
$[xy]$	Density of hosts parasitized with an uninfected larva
$[xyz]$	Density of hosts parasitized with an infected larva
$[y]$	Total density of uninfected adult parasitoid females
$[yz]$	Total density of infected adult parasitoid females
E	Eggload of parasitoid females (infected or not) at birth
t_1	Handling time (time taken to check the host before oviposition)
t_2	Oviposition time (time taken to lay an egg)
d	Intrinsic death rate of the host
m	Intrinsic death rate of adult parasitoid females
e	Rate of parasitoid emergence
A	Searching efficiency of hosts by parasitoid females
$b(s)$	Rate of oviposition of uninfected parasitoid in unparasitized host (at equilibrium in the absence of the virus):
$\overline{b(s)} = a / \left(1 + a \left(\overline{[x]}(t_1 + t_2) + \overline{[xy]}(t_1 + st_2) \right) \right)$	
$b(\sigma)$	Rate of oviposition of infected parasitoid in unparasitized host (at equilibrium in the presence of the virus):
$\overline{b(\sigma)} = a / \left(1 + a \left(\overline{[x]}(t_1 + t_2) + (\overline{[xy]} + \overline{[xyz]})(t_1 + \sigma t_2) \right) \right)$	
c	Probability of successful superparasitism (when $c = 0$ superparasitism is never successful because the resident larva always wins)
s	Superparasitism (probability of oviposition in an already parasitized host) of uninfected parasitoid females
s	Superparasitism (probability of oviposition in an already parasitized host) of infected parasitoid females
ϕ	Sex ratio (proportion of females) among parasitoid offspring
τ_h	Probability of horizontal transmission of the virus (from an infected larva to a competing uninfected larva)
τ_v	Probability of vertical transmission (from an infected female to its offspring)
ϵ	Probability of horizontal transmission of the virus (superinfection) when two parasitoid larvae infected with different strains are competing within a host

host larvae, and $\overline{[y]}$, $\overline{[yz]}$ are the densities of uninfected and infected adult females, respectively; see table for details):

$$w^v[\sigma^*, \sigma, s] = O^v[\sigma^*, \sigma, s] E^v[\sigma, s] \quad (7.2)$$

with

$$O^v[\sigma^*, \sigma, s] = \frac{\tau_v \overline{b(\sigma^*)} \left(\overline{[x]} + \sigma^* \left(\overline{[xy]}(c + (1-c)\tau_h) + \overline{[xyz]}(c(1-\epsilon) + (1-c)\epsilon) \right) \right)}{m} \left(1 - e^{\frac{-mE}{\overline{b(\sigma^*)}(\overline{[x]} + \sigma^*(\overline{[xy]} + \overline{[xyz]})}} \right)$$

$$E^v[\sigma, s] = \frac{e\phi}{d + e + \left(\overline{sb(s)}\overline{[y]} + \overline{\sigma b(\sigma)}\overline{[yz]}(1 - \tau_v) \right) c(1 - \tau_h)}$$

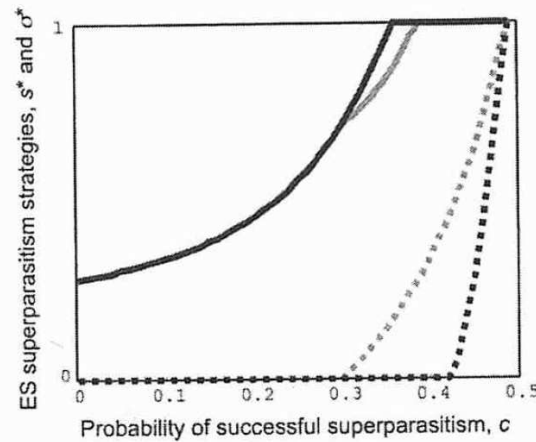


Figure 7.6 Evolutionarily stable (ES) superparasitism strategies of the virus (full lines, σ^*) and the parasitoid (dotted lines, s^*) against the probability of successful superparasitism (c). ES superparasitism strategy represents the rate (probability) of oviposition in an already parasitized host for infected parasitoid females (σ^*) or for uninfected parasitoid females (s^*). c represents the probability that a supernumerary egg outcompetes the resident egg inside a superparasitized host. The gray lines indicate a situation where the parasitoid does not co-evolve with the virus. The black lines indicate the co-evolutionary stable strategies of the virus and the parasitoid, respectively. Parameter values: $N = 100$, $d = e = 0.2$, $m = 0.1$, $a = 0.01$, $t_1 = 0$, $t_2 = 0.1$, $E = 10$, $t_h = 0.75$, $t_v = 0.95$, $\epsilon = 0$ (see Table 7.2 for parameter signification).

Virus fitness is simply the product of the expected number of “successful” ovipositions (with vertical transmission) of a parasitoid female infected by a mutant virus, $O^v[\sigma^*, \sigma, s]$, times the probability of emergence of these infected parasitoid larvae, $E^v[\sigma, s]$ (note the similarity between Equations 7.1 and 7.2). The direction of selection on virus superparasitism is given by the slope of this fitness function ($dO^v[\sigma^*, \sigma, s]/d\sigma^*$) and, because $E^v[\sigma, s]$ does not depend on virus mutant strategy, the following condition must be verified for σ^* to be an evolutionary equilibrium:

$$dO^v[\sigma^*, \sigma, s]/d\sigma^*|_{\sigma=\sigma^*} = 0$$

To understand the differences between virus and parasitoid evolution, one needs to understand the differences between $O^v[s^*, s]$ and $O^v[\sigma^*, \sigma, s]$. In particular, it is important to note that the virus will gain extra routes of transmission via the potential horizontal transmission that may occur between larva infected with the mutant strain and uninfected larva (with probability τ_h) but also between larva infected with the mutant strain and larva infected with a resident virus strain (ϵ). Both these terms increase the potential benefit of superparasitism for the virus. Consequently, the balance between the costs and the benefits will be shifted toward higher superparasitism. Figure 7.6 illustrates that ES superparasitism should be higher for the virus than for the host, thus demonstrating the adaptive value of the behavioral modification from the virus point of view.

Indirect effect of LbFV on parasitoid populations

The above sections focused on the evolution of the parasitoid in the absence of the virus and on the evolution of the virus. However, the presence of the virus can also affect the evolution of the parasitoid. To study this evolution, one must take into account that the

parasitoid may appear in different states (infected or not). Recall that the parasitoid fitness function given in Equation 7.1 was derived for a case where none of the parasitoids are infected. Gandon et al. (2006) derived an expression of the fitness of the parasitoid in infected populations. They showed that the ES superparasitism of the parasitoid is reduced by the presence of the virus. An intuitive explanation for this result is that the presence of the virus induces another cost of superparasitism for the female: the risk of infecting its progeny. Interestingly, one can also study the system when both the host and the parasite are allowed to evolve. Ultimately, as shown in Figure 7.6, this co-evolution results in an increase in the conflict between the host and the virus (Gandon et al., 2006).

The presence of the virus is likely to influence the evolution of parasitoid traits other than superparasitism. For example, in our model we did not allow the parasitoid to resist the behavioral modification imposed by the presence of the virus. We simply assumed that, once infected, the parasitoid is unable to control the modification induced by its pathogen. Conflicts of interest between the parasitoid and the virus may, however, favor the evolution of resistance mechanisms in the former. The presence of the virus may also have an effect on the evolution of two of the key defining life history traits of parasitoids: namely, the evolution of egg load at emergence (ovigeny index, Jervis et al. 2001) and the evolution of the gregarious lifestyle. In proovigenic parasitoids, egg load at emergence controls the strength of egg limitation. As pointed out by Rosenheim (1996), to limit the risk of egg limitation, egg load will evolve as a function of the encounter rate with available hosts. As superparasitism increases the rate of egg laying (females also accept already parasitized hosts), the manipulation may exert a selective pressure for the evolution of higher egg loads. This could either result in an unconditional genetic response of the parasitoid population or in a plastic response (an increase in the egg load only when the host is infected). The evolution of higher egg loads at emergence will be constrained by potential trade-offs with other life history traits, such as egg size and longevity (Rosenheim, 1996). Moreover, the virus itself could also be selected to increase parasitoid egg load, because its transmission (both vertical and horizontal) is conditional on parasitoid oviposition. Here, again, a conflict of interest may arise between the parasitoid and the virus. For example, if there is a negative trade-off between the egg load and egg competitiveness, the optimal number of eggs for the virus may be much higher than for the parasitoid (the virus may sacrifice egg competitiveness to enhance horizontal transmission via additional ovipositions). Interestingly, as mentioned previously, infected *L. boucardi* females carry more eggs than uninfected adults that share the same genetic background (Varaldi et al., 2005a). This result could thus be interpreted as a plastic adaptive response of the parasitoid or as another aspect of virus manipulation. This question clearly deserves further theoretical and empirical developments.

Discussion

Taken together, our results show that *Leptopilina boucardi* females harbor a filamentous virus (that we called LbFV) whose main phenotypic effect is a strong increase in superparasitism tendency. Furthermore, theoretical developments clearly indicate that increasing superparasitism tendency is an adaptive strategy from the virus point of view. As a consequence, the *L. boucardi*/virus system is very likely to be an example of host behavioral manipulation by a virus.

Mechanisms for the behavioral alteration

The specific action of LbFV on superparasitism behavior raises the question of the mechanisms underlying the manipulation process. Little is known about the mechanisms used

by parasites to alter their host behavior, although some data is beginning to come forward, especially for macroparasites (Adamo, 2002; Thomas et al., 2003). In addition, the cytopathological effects of viruses responsible for behavioral disturbance have been studied from a medical perspective in mammals (Tomonaga, 2004). From these studies, it appears that these viruses cause neuronal disturbance in the central nervous system due to cell injury, to modification of the expression of host genes (Solbrig et al., 1996; Kramer et al., 2003) or because of a by-product of the host immune response (which indirectly harms infected cells, Furrer et al., 2001).

Females *L. boulandi* need to pierce the skin of the host larvae with their ovipositor to detect chemical cues associated with a previous infestation. The superparasitism behavior modification induced by the virus could result from a defect in the way the infected female perceives these cues (a reduction in discrimination abilities). One tentative hypothesis is that the virus injures the cells involved in signal perception (ovipositor sensillae) or disrupt the processing of the nervous signal in direction of the central nervous system. This can be the product of specific cell lysis or of modification of gene expression in the nervous cells.

However, superparasitism behavior could also result from a modification of their acceptance decision after a correct signal perception and integration in the central nervous system. Several theoretical models predict that females should adjust their superparasitism decisions according to the quality of the environment in which they forage (for example, increase superparasitism tendency when travel time between patches is high; Visser et al., 1992c). There is, indeed, some empirical evidence showing that females acquire information on their environment that they use to modulate their superparasitism tendency (Visser et al., 1992b,c). It is therefore possible that the virus modifies the females' superparasitism behavior indirectly by manipulating its perception of the overall quality of the environment.

Furthermore, learning and memorization processes strongly influence the superparasitism decisions of females (Van Lenteren, 1976; Ueno and Tanaka, 1996). Interestingly, in the closely related species *L. heterotoma*, if the first host encountered by a female upon emergence is parasitized, she will readily accept it, thus engaging in superparasitism whereas after an experience with unparasitized hosts, she will start rejecting parasitized hosts (Van Lenteren, 1976). In addition, it has been shown that inducing amnesia in the Ichneumonidae *Pimpla nipponica* results in a strong increase in self-superparasitism (Ueno and Tanaka, 1996). Whatever the significance of such a pattern (adaptive superparasitism or incomplete discrimination ability due to inexperience), it clearly shows that interfering with the learning abilities of females can result in changes in superparasitism decisions. Learning processes can thus be the target of LbFV action.

Effect of LbFV on host-parasitoid interactions

Symbionts can modify the outcome of competition between their eukaryotic hosts by either decreasing or increasing the fitness of infected hosts (Girin and Boulétreau, 1995; Prenter et al., 2004). The results obtained so far on the LbFV/*L. boulandi* system suggest that LbFV belongs to the first category of costly symbiont. Indeed, most fitness traits are slightly reduced for infected females, with the exception of egg load (however, this increase in egg load is possibly another side of the manipulative process). Furthermore, the increase in superparasitism itself is probably detrimental to parasitoid fitness in most ecological conditions because infected females waste time and eggs attacking parasitized hosts (*a fortiori* when these hosts have already been parasitized by the infected female herself). However, the influence of LbFV on the physiological and behavioral processes that are activated during the parasitic phase are almost unknown. For example, does LbFV interfere with the immune response of the *Drosophila* larvae? This question is clearly pertinent because several parasitoid species benefit from host immunodepression caused

by other viral particle injection (polydnavirus that is not infectious (Espagne et al., 2004), as well as other true viruses that show properties required for infectiousness, Renault et al., 2003, 2005). Virus-induced superparasitism leading to a high number of eggs inside the same host could also saturate the host immune response against the parasitoid, and thus could be advantageous for the parasitoid. Furthermore, does the presence of LbFV modify the outcome of superparasitism or multiparasitism (the competition of different parasitoid species within the same host) contests? Here again, experiments are clearly needed and this constitutes a promising field, especially if LbFV is able to replicate inside the *Drosophila* larva. If such replication is shown to take place, we can expect that parasitoid strains or species that have co-evolved with the virus would be able to regulate their replication, whereas other strains would not be able to do so and could potentially die with the host due to excessive viral replication. There is some evidence that the ascovirus DpAV, which usually infects (without negative consequences) the Ichneumonidae *Diadromus pulchellus*, replicates at different rates in the lepidopteran host, depending on the parasitoid species to which it is associated. In its most extreme form (the association with *Itoplectis tunetana*), the ascovirus infection leads to the death of both the host and the parasitoid (Bigot et al., 1997).

Circulation of LbFV in the Drosophila-parasitoid community

The circulation of LbFV between *L. bouhardi* females is, at least partly, understood: infected females transmit the infection to most of their female offspring and can infect the offspring of uninfected females under superparasitism conditions. We have also shown that uninfected females cannot contaminate their ovipositor by stinging *Drosophila* larvae previously parasitized by infected females (Varaldi et al., in press). Thus, the sole evidence for horizontal transmission comes from superparasitism experiments. There are still several unknown aspects of viral transmission, both at the within and the between species scales. First, although males do not transmit infection (Varaldi et al., 2003), it is still not known whether they are infected. If they are, they would constitute an evolutionary dead-end for the virus and some evolutionary consequences could emerge. More importantly, we also do not know whether LbFV can be horizontally transferred to other parasitoid species or even to the *Drosophila* host species. Still, it is clear that LbFV is in frequent contact with *Drosophila* cells (because it is likely to be injected inside the *Drosophila* at each oviposition), as well as with other related or unrelated parasitoid species that attack the same larval hosts (*L. heterotoma* or *Asobara tabida*). Field studies show that there is strong competition for hosts during part of the season, increasing the likelihood of multiparasitism (Fleury et al., 2004). Accordingly, *L. heterotoma* females frequently accept hosts parasitized by *L. bouhardi* (unpublished). Furthermore, there is strong phylogenetic (Vavre et al., 1999) and empirical (Grenier et al., 1998; Huigens et al., 2004) evidence of horizontal transmission of *Wolbachia* in the host/parasitoid community. To date, no obvious effect of multiparasitism has been observed on the superparasitism behavior of emerging *L. heterotoma* with infected *L. bouhardi*. This, however, does not exclude the possibility that horizontal transmission happens because LbFV may infect *L. heterotoma* although it is unable to modify its superparasitism behavior. Clearly, molecular tools are required to fully answer this question. From an evolutionary perspective, an interesting possibility is that LbFV could be derived from a *Drosophila* virus.

Conclusions

Host parasitoid communities hide a very rich micro-community of symbionts: viruses showing different relationships with their hosts (from purely pathogenic to completely

integrated such as polydnavirus, Espagne et al., 2004); bacteria, such as *Wolbachia* or *Bacteroidetes*, able to manipulate the reproduction of their hosts in several ways (Zchori-Fein et al., 2004); and phages whose effect is poorly understood so far (Gavotte et al., 2004). Is there any relationship between the richness of the microbe community and the special functioning of host-parasitoid communities? Although this question is beyond the scope of this chapter, we believe that the intimate and durable relationships existing between hosts and their parasitoids could favor the diversity of symbionts. In any case, it is remarkable that all these micro-partners sometimes coexist in the same individuals; for example, the *Drosophila* parasitoid *Asobara tabida* is naturally infected by three different *Wolbachia* strains, one of them being obligatory for oogenesis (Dedeine et al., 2001), the other two causing cytoplasmic incompatibility (Dedeine et al., 2004), as well as by a phage (Gavotte et al., 2004). Apart from underlining the strong influence of these microbes on their host evolution, this raises the question of the competition between microorganisms. Is there any competition between symbionts and, if so, is it regulated by the host or by the symbionts themselves? It is exciting to notice that among the *Leptopilina* species (all parasitoids of *Drosophila* larvae), all but one appear to be infected with *Wolbachia*. The only exception is *L. boulardi*, which is now known to be infected by a manipulative virus. Future investigations will hopefully help elucidate the significance of this pattern.

References

- Adamo, S. (2002). Modulating the modulators: parasites, neuromodulators and host behavioral change. *Brain, Behavior and Evolution* **60**: 370–377.
- Agnew, P. and Koella, J. (1999). Life history interactions with environmental conditions in a host-parasite relationship and the parasite's mode of transmission. *Evolutionary Ecol.* **13**: 67–89.
- Allemand, R., Lemaître, C., Frey, F., Boulétreau, M., Vavre, F., Nordlander, G., Van Alphen, J.J.M., and Carton, Y. (2002). Phylogeny of the six African *Leptopilina* species (Hymenoptera Figitidae), parasite of *Drosophila* species, with description of three new species. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* **38**: 319–324.
- Bai, B. and Mackauer, M. (1990). Host discrimination by the aphid parasitoid *Aphelinus asychis* (Hymenoptera: Aphelinidae): when superparasitism is not adaptive. *Canad. Entomol.* **122**: 363–372.
- Bigot, Y., Rabouille, A., Hamelin, M., Periquet, G., and Sizaret, P. (1997). Particle and genomic characteristics of a new member of the Ascoviridae: *Diadromus pulchellus* ascovirus. *J. Gen. Virol.* **78**: 1139–1147.
- Charnov, E.L. and Stephens, D.W. (1988). On the evolution of host selection in solitary parasitoids. *Am. Naturalist* **132**: 707–722.
- Cook, J. and Butcher, R. (1999). The transmission and effects of *Wolbachia* bacteria in parasitoids. *Res. Population Ecol.* **41**: 15–28.
- De Almeida, M.A.F., Geden, C.J., Boohene, C.K., Becnel, J.J., and Do Prado, A.P. (2002) Microsporidiosis of *Tachinaephagus zealandicus* Ashmead (Hymenoptera: Encyrtidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**: 527–530.
- De Buron, I. and Beckage, N.E. (1992). Characterization of a polydnavirus (PDV) and Virus-like filamentous particle (VLFP) in the Braconid wasp *Cotesia congregata*. *J. Insect Physiol.* **59**: 315–327.
- Dedeine, F., Vavre, F., Fleury, F., Loppin, B., Hochberg, M., and Boulétreau, M. (2001). Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 6247–6252.
- Dedeine, F., Vavre, F., Shoemaker, D., and Boulétreau, M. (2004). Intra-individual coexistence of a *Wolbachia* strain required for host oogenesis with two strains inducing cytoplasmic incompatibility in the wasp *Asobara tabida*. *Evolution* **58**: 2167–2174.

- Espagne, E., Dupuy, C., Huguet, E., Provost, B., Poirié, M., Periquet, G., Drezen, J., Cattolico, L., and Martins, N. (2004). Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution. *Science* **306**: 286–289.
- Field, S. Keller, M., and Calbert, G. (1997). The pay-off from superparasitism in the egg parasitoid *Trissolcus basalis*, in relation to patch defence. *Ecologic. Entomol.* **22**: 142–149.
- Fletcher, J., Hughes, J., and Harvey, I. (1994). Life expectancy and egg load affect oviposition decisions of a solitary parasitoid. *Proc. R. Soc. London (B)*. **258**: 163–167.
- Fleury, F., Ris, N., Allemand, R., Fouillet, P., Boulétreau, M., and Carton, Y. (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**: 181–194.
- Furrer, E., Bilzer, T., Stitz, L., and Planz, O. (2001). High-dose borna disease virus infection induces a nucleoprotein-specific cytotoxic t-lymphocyte response and prevention of immunopathology. *J. Virol.* **75**: 11700–11708.
- Gandon, S. (2005). Parasitic manipulation: a theoretical framework may help. *Behav. Proc.* **68**: 247–248.
- Gandon, S., Rivero, A., and Varaldi, J. (2006). Superparasitism evolution: adaption or manipulation? *Am. Naturalist* **167**: E1–E22.
- Gavotte, L., Vavre, F., Henri, H., Ravallec, M., Stouthamer, R., and M. Boulétreau. (2004). Diversity, distribution and specificity of WO phage infection in *Wolbachia* of four insect species. *Insect Molec. Biol.* **13**: 147–153.
- Girin, C. and Boulétreau, M. (1995). Microorganism-associated variation in host infestation efficiency in a parasitoid wasp, *Trichogramma bourarachae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae). *Experimentia* **51**: 398–401.
- Godfray H.C.J. (1994) *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press.
- Gothama, A., Sikorowski, P., and McLaughlin, M. (1998). Replication of nonoccluded baculovirus associated with the parasitoid *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae) in *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Control* **12**: 103–110.
- Grenier, S., Pintureau, B., Heddi, A., Lassabliere, F., Jager, C., Louis, C., and Khatchadourian, C. (1998). Successful horizontal transfer of *Wolbachia* symbionts between *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. London (B)* **265**: 1441–1445.
- Hamm, J.J., Styer, E.L., and Lewis, W.J. (1990). Comparative virogenesis of filamentous virus and polydnavirus in the female reproductive tract of *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae). *J. Invertebr. Pathol.* **55**: 357–374.
- Huigens, M., De Almeida, R., Boons, P., Luck, R., and Stouthamer, R. (2004). Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. London (B)* **271**: 509–515.
- Hunter, M., Perlman, S., and Kelly, S. (2003). A bacterial symbiont in the *Bacteroidetes* induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. *Proc. R. Soc. London (B)* **270**: 2185–2190.
- Iwasa, Y., Suzuki, Y., and Matsuda, H. (1984). Theory of oviposition strategy of parasitoids. I. Effect of mortality and limited egg number. *Theoret. Population Biol.* **26**: 205–227.
- Janssen A. (1989). Optimal host selection by *Drosophila* parasitoids in the field. *Functional Ecol.* **3**: 469–479.
- Jervis, M.A., Heimpel, G.E., Ferns, P.N., Harvey, J.A., and Kidd, N.A.C. (2001). Life-history strategies in parasitoid wasps: a comparative analysis of 'ovigeny'. *J. Anim. Ecol.* **70**: 442–458.
- Kramer, M., Roth, F., Coen, D., Zhu, J., Holman, H., Knipe, D., and Cook, W. (2003). Latent herpes simplex virus infection of sensory neurons alters neuronal gene expression. *J. Virol.* **77**: 9533–9541.
- Krell, P.J. (1987) Replication of long virus-like particles in the reproductive tract of the Ichneumonid wasp *Diadegma terebrans*. *J. Gen. Virol.* **68**: 1477–1483.
- Labrosse, C., Dubuffet, A., Drezen, J., Poirie, M., and Carton, Y. (2003). Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. *J. Insect Physiol.* **49**: 513–522.
- Mangel, M. (1987). Oviposition site selection and clutch size in insects. *J. Mathemat. Biol.* **25**: 1–22.

- Oliver, K., Hunter, M., and Moran, N. (2005). Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 12795–12800.
- O'Neill, S., Giordano, R., Colbert, A., Karr, T., and Robertson, H. (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 2699–2702.
- O'Neill, S.L., Hoffmann, A.A., and Werren, J.H. (1997). *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction*. Oxford University Press, Oxford.
- Prenter, J., MacNeil, C., Dick, J., and Dunn, A. (2004). Roles of parasites in animal invasions. *Trends Ecol. Evolut.* **19**: 385–390.
- Rabouille, A., Bigot, Y., Drezen, J., Sizaret, P., Hamelin, M., and Periquet, G. (1994). A member of the reoviridae (DpRV) has a ploidy-specific genomic segment in the wasp *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera). *Virology* **205**: 228–237.
- Renault, S., Bigot, S., Bigot, Y., Lemesle, M., and Sizaret, P. (2003). The cypovirus *Diadromus pulchellus* RV-2 is sporadically associated with the endoparasitoid wasp *D. pulchellus* and modulates the defence mechanisms of pupae of the parasitized leek-month, *Acrolepiopsis assectella*. *J. Gen. Virol.* **84**: 1799–1807.
- Renault, S., Stasiak, K., Bigot, Y., and Federici, B. (2005). Commensal and mutualistic relationships of reoviruses with their parasitoid wasp hosts. *J. Insect Physiol.* **51**: 137–148.
- Reynolds, K. and Hardy, I. (2004). Superparasitism: a non-adaptive strategy? *Trends Ecol. Evolut.* **19**: 347–348.
- Rosenheim, J.A. (1996). An evolutionary argument for egg limitation. *Evolution* **50**: 2089–2094.
- Santolamazza-Carbone, S. and Cordero-Rivera, A. (2003). Egg load and adaptive superparasitism in *Anaphes nitens*, an egg parasitoid of the *Eucalyptus* snout-beetle *Gonipteris scutellatus*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **106**: 127–134.
- Sirois, E., Ploye, H., and Bernstein, C. (1997). State dependent superparasitism in a solitary parasitoid: egg load and survival. *Behav. Ecol.* **8**: 226–232.
- Solbrig, M., Lipkin, W., Koob, G., and Joyce, J. (1996). A neural substrate of hyperactivity in Borna disease: changes in brain dopamine receptors. *Virology* **222**: 332–338.
- Stasiak, K., Renault, S., Bigot, Y., and Federici, B. (2005). Characteristics of pathogenic and mutualistic relationships of ascoviruses in field populations of parasitoid wasps. *J. Insect Physiol.* **51**: 103–115.
- Stoltz, D. and Faulkner, G. (1978). Apparent replication of an unusual virus-like particle in both a parasitoid wasp and its host. *Cdn. J. Microbiol.* **24**: 1509–1514.
- Stoltz, D. and Makkay, A. (2000). Co-replication of a reovirus and a polydnavirus in the Ichneumonid parasitoid *Hyposoter exiguae*. *Virology* **278**: 266–275.
- Stoltz, D., Krell, P., Cook, D., MacKinnon, E., and Lucarotti, C. (1988). An unusual virus from the parasitic wasp *Cotesia melanoscela*. *Virology* **162**: 311–320.
- Stouthamer, R., Luck, R., and Hamilton, W. (1990). Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (hymenoptera/trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 2424–2427.
- Styer, E.L., Hamm, J.J. and Nordlund, D.A. (1987) A new virus associated with parasitoid *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera: Braconidae): replication in Noctuid host larvae. *J. Invertebrate Pathol.* **50**: 302–309.
- Thomas, F., Ulitsky, P., Biron, D., Augier, R., Strambi, C., Cayre, M., Dusticier, N., and Samuel, D. (2003). Biochemical and histological changes in the brain of the cricket *Nemobius sylvestris* infected by the manipulative parasite *Paragordius tricuspidatus* (Nematomorpha). *Int. J. Parasitol.* **33**: 435–443.
- Tomonaga, K. (2004). Virus-induced neurobehavioral disorders: mechanisms and implications. *Trends Molec. Med.* **10**: 71–77.
- Ueno, T. and Tanaka, T. (1996). Self-host discrimination by a parasitic wasp: the role of short-term memory. *Anim. Behav.* **52**: 875–883.
- Vala, F., Van Opijnen, T., Breeuwer, J., and Sabelis, M. (2003). Genetic conflicts over sex ratio: mite–endosymbiont interactions. *Am. Nat.* **161**: 254–266.
- Van Alphen, J. and Visser, M. (1990). Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* **35**: 59–79.

- Van Lenteren, J.C. (1976). The development of host discrimination and the prevention of superparasitism in the parasite *Pseudocoila bochei*. *Neth. J. Zool.* **26**: 1–83.
- Van Lenteren, J.C. (1981). Host discrimination by parasitoids. In *Semiochemicals, Their Role in Pest Control*. Nardlund, D.A., Jones, W.J., and Lewis, R.L., Eds. John Wiley, New York. pp. 153–179.
- Varaldi, J., Fouillet, P., Ravallec, M., López-Ferber, M., Boulétreau, M., and Fleury, F. (2003). Infectious Behavior in a Parasitoid. *Science* **302**: 1930.
- Varaldi, J., Boulétreau, M., and Fleury, F. (2005a). Cost induced by viral particles manipulating superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. *Parasitology* **131**: 161–168.
- Varaldi, J., Fouillet, P., Boulétreau, M., and Fleury, F. (2005b). Superparasitism acceptance and patch-leaving mechanisms in parasitoids: a comparison between two sympatric wasps. *Anim. Behav.* **69**: 1227–1234.
- Varaldi, J., Petit, S., Boulétreau, M., and Fleury, F. The virus infecting the parasitoid *Leptopilina boulardi* exerts a specification or superparasitism behavior. *Parasitology*. (In press).
- Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P., and Boulétreau, M. (1999). Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host–parasitoid associations. *Molec. Biol. Evolut.* **16**: 1711–1723.
- Vavre, F., Fleury, F., Varaldi, J., Fouillet, P., and Boulétreau, M. (2000). Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution* **54**: 191–200.
- Visser, M., Van Alphen, J., and Nell, H. (1990). Adaptive superparasitism and patch time allocation in solitary parasitoids: the influence of the number of parasitoids depleting a patch. *Behaviour* **114**: 21–36.
- Visser, M., Luyckx, B., Nell, H., and Boskamp, G. (1992a). Adaptive superparasitism in solitary parasitoids: marking of parasitized hosts in relation to the pay-off from superparasitism. *Ecolog. Entomol.* **17**: 76–82.
- Visser, M., Van Alphen, J., and Hemerik, L. (1992b). Adaptive superparasitism and patch time allocation in solitary parasitoids: an ESS model. *J. Anim. Ecol.* **61**: 93–101.
- Visser, M., Van Alphen, J., and Nell, H. (1992c). Adaptive superparasitism and patch time allocation in solitary parasitoids: the influence of pre-patch experience. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **31**: 163–171.
- Whitfield, J. (1990). Parasitoids, polydnviruses and endosymbiosis. *Parasitol. Today* **6**: 381–384.
- Whitfield, J. (2002). Estimating the age of the polydnvirus/braconid wasp symbiosis. *Proc. Nl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 7508–7513.
- Zchori-Fein, E., Gottlieb, Y., Kelly, S., Brown, J., Wilson, J., Karr, T., and Hunter, M. (2001). A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proc. Nl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 12555–12560.
- Zchori-Fein, E., Katzir, N., Perlman, S., Kelly, S., and Hunter, M. (2004). Characterization of a *Bacteroidetes* symbiont in *Encarsia* wasps (Hymenoptera: Aphelinidae): Proposal of '*Candidatus Cardinium hertigii*'. *Int. J. Systemat. Evolut. Microbiol.* **54**: 961–968.

Intramitochondrial bacteria in ticks and host-microbe interactions

Claudio Bandi¹, Guido Favia², Nathan Lo³, Luciano Sacchi⁴

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy, ²Dipartimento di Medicina Sperimentale e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Camerino, Camerino, Italy, ³School of Biological Sciences, The University of Sydney, Sydney, New South Wales, Australia, ⁴Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Pavia, 27100 Pavia, Italy

Ticks are amongst the most important vectors of infectious diseases of medical and veterinary importance, being present from tropical to temperate areas and being capable of transmitting viruses, bacteria, protozoa and even nematodes. PCR using universal 16S rRNA primers followed by cloning and sequencing led to detection of a novel alpha-proteobacterium in the hard tick *Ixodes ricinus*, which has recently been named *Midichloria mitochondrii*. Electron microscopy showed that *M. mitochondrii* resides in the mitochondria of infected tick cells. The discovery of a bacterium residing in mitochondria opens the question of whether *Midichloria* causes damage to the host. The damage, if any, is probably not very important. Indeed, the prevalence of *M. mitochondrii* in wild populations of *I. ricinus* is (or is very close to) 100% in females, which suggests that the fitness of infected females is certainly not seriously reduced. However, electron microscopy clearly shows that *M. mitochondrii* leads to the consumption of infected mitochondria. In addition, there is evidence that bacterial load and prevalence decrease along generations in lab colonies of *I. ricinus*. Finally, infection prevalence in adult male ticks collected in the wild is around 50%, with low bacterial load in infected male individuals. The kind of the interaction between *M. mitochondrii* and its host is probably not easy to classify. Low prevalence in males seems to suggest that the bacterium is not useful to individuals of this sex. On the

other hand, males are probably not useful to *Midichloria*, unless a mechanism like cytoplasmic incompatibility is (or has been) involved in ensuring the spreading of this bacterium in the host populations. Female ticks are the way by which *Midichloria* is transmitted to the offspring, and we should thus expect natural selection promoting the capacity of this bacterium to be maintained in females ticks during development and to be efficiently transmitted to the offspring without causing too much damage. In addition to 'not being too harmful' in terms of mitochondrial/cellular damages, it is reasonable to assume that *M. mitochondrii* is in some way actively promoting its maintainance and transmission in females of *I. ricinus*, by being useful to the host female, or by determining some forms of reproductive parasitism.

Behavioural manipulation of insect parasitoids by a maternally inherited virus: ecological consequences and potential applications for biological control

Julien Varaldi, Sabine Patot, Mimoun Maache, David Lepetit, Frédéric Fleury

Laboratoire de Biometrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, 43 Bd 11 novembre 1918 69622 Villeurbanne cedex, France

Facing increased evidences of undesired negative effects of chemical use in insect pest management (resistance, pollutions), it is now necessary to develop biocontrol alternatives. In that respect, the use of insect parasitoids is of peculiar interest since (i) their development always leads to the death of their insect host, (ii) they can display a high degree of host specificity, and (iii) free-living females display complex and efficient host finding behaviors. However, we have recently found that a maternally inherited virus manipulates the host acceptance strategy of a parasitoid species (*Leptopilina boulardi*, Hym. Figitidae), leading to a strong egg wastage and ultimately in a strong reduction of its biocontrol potential (Varaldi et al. 2003, 2006). This effect results from the

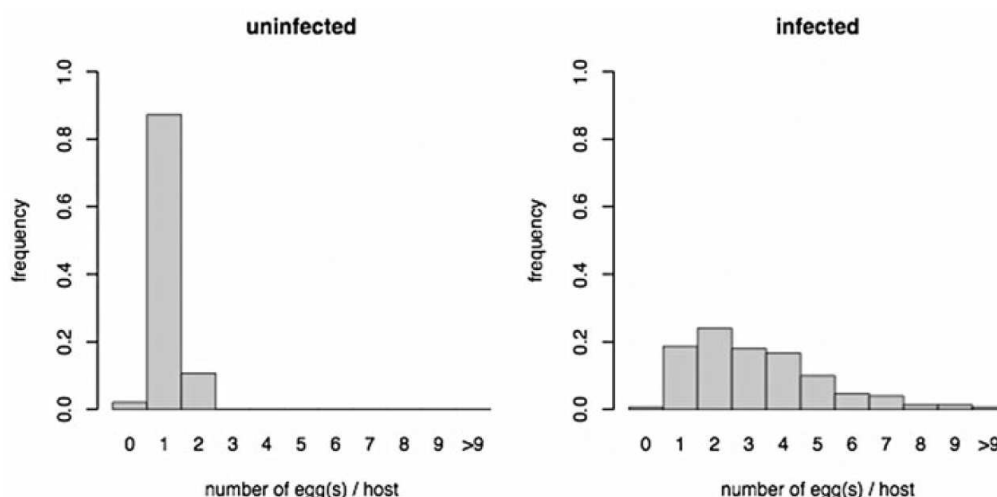


Figure 1. Distribution of number of parasitic eggs/host larva laid by uninfected or infected *L. boulardi* females isolated on 10 hosts (one single female on 10 hosts; n = 10 uninfected and n = 30 infected females tested).

fact that the virus forces infected females to accept to lay eggs in already parasitized hosts (Figure 1). This "superparasitism" behaviour directly benefits to the virus (Gandon et al. 2006) because this situation leads to its horizontal transfer (infectious transmission within superparasitized hosts).

Symbiotic viruses that induce no obvious physiological cost on their parasitoid hosts (Varaldi et al. 2005) have been regularly discovered in parasitoids during the last decades (as examples: Stoltz & Vinson 1977; Barratt et al. 1999; Reineke et al. 2005). Most of them have not been accredited for any phenotypic effect and we can wonder whether these viruses have evolved the same ability to manipulate the behavior of their parasitoid host. Thus, insect parasitoids that are used in pest management programs should be carefully checked for the presence of symbiotic viruses.

References

- Barratt, B.I.P., Evans, A.A., Stoltz, D.B., Vinson, S.B., Easingwood, R. (1999) Virus-like particles in the ovaries of *Microctonus aethiopoides* Loeb (Hymenoptera: Braconidae), a parasitoid of adult weevils (Coleoptera: Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.* 73, 182–188.
- Gandon, S., Rivero, A. & Varaldi, J. (2006) Superparasitism evolution: adaptation or manipulation? *The American Naturalist* 167, E1–E22.
- Reineke, A. Asgari, S. (2005) Presence of a novel small RNA-containing virus in a laboratory culture of the endoparasitic wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Physiology* 51, 127–135.
- Stoltz, D. & Vinson, S.B. (1977.) Baculovirus-like particles in the reproductive tracts of female parasitoid wasps II: the genus *Apanteles*. *Canadian Journal of Microbiology* 23, 28–37.
- Varaldi J., Ravallec M., Labrosse C., Lopez-Ferber M., Boulétreau M., Fleury F. (2006) Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Journal of Insect Physiology* 52, 1202–1212.
- Varaldi, J., Boulétreau, M., & Fleury, F. (2005) Cost induced by viral particles manipulating superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. *Parasitology* 131, 161–168.
- Varaldi J., Fouillet P., Ravallec M., López-Ferber M., Boulétreau M. & Fleury F. (2003). Infectious behavior in a parasitoid. *Science* 302, 1930.

KEY WORDS: parasitoid, superparasitism, virus

Email: varaldi@biomserv.univ-lyon1.fr

Insect parasitoids: From basic research to applications

Use of *Trichogramma* in plant protection: achievement, challenge and opportunity

Zhenying Wang, Kanglai He, Shuxiong Bai

State Key Laboratory for the Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China

Trichogramma egg parasitoids, one of the most important biological control agents, have been widely used in augmentative

biological control of a variety of agricultural and forest pests in many regions of the world. Major contributions to the release of *Trichogramma* for biological control of lepidopteran pests have been made in the last three decades. Commercial facilities and insectaries for mass rearing with factitious hosts have been constructed in many countries. Selection of factitious hosts is based on the simplicity of their mass production, mechanization of rearing processes, *Trichogramma* spp. and cost of production. Mainly four factitious host egg species of Lepidoptera have been used for *Trichogramma* mass production: three small egg species, Angoumois grain moth, *Sitotroga cerealella* (Olivier), Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zeller, rice grain moth, *Corcyra cephalonica* (Stainton); and one large egg species, Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* Guérin-Méneville. Research on *in vitro* rearing of *Trichogramma* has been conducted since the 1970's in many countries. *In vitro* rearing of *Trichogramma* have been successfully achieved for certain *Trichogramma* species, such as *Trichogramma dendrolimi* and *T. chilonis* in China, *T. minimum* and *T. brassicae* in America, *T. dendrolimi* and *T. brassicae* in France, *T. australicum* and *T. pretiosum* in Australia, and *T. gallo* and *T. pretiosum* in Brazil. Artificial diet containing insect cells not the insect haemolymph has been developed for *T. australicum* and *T. pretiosum* in Australia. A computer-controlled machine has been successfully developed in China that automatically produces artificial-host egg cards for mass production. China is the first country successfully to make use of *in vitro* rearing of *Trichogramma* for commercial production and large-scale use in the world. Long-term storage of host eggs and parasitized host eggs have been developed, such as cold storage and artificially-induced diapause techniques, to make the production cost effective while maintaining high quality. A particular problem in the past is that mass rearing may lead to *Trichogramma* adaption for artificial conditions and results in poor field performance. Quality control and technical regulations for *Trichogramma* mass production have been standardized for some *Trichogramma* species using different factitious egg hosts, which have improved quality of the parasitoids. Also, field application techniques have been greatly improved in recent years. The releases are now more convenient and customized to specific environments and crops.

Trichogramma releases, depending on the country and crop, have been combined with low-risk insecticides (chemical, biological and botanical), and other natural enemies. They also have been released in areas with floral plants, food sources that increase the longevity and fecundity of *Trichogramma* and other natural enemies. *Trichogramma* releases have become a very important component of integrated pest management (IPM) in maize, cotton, sugarcane, rice, orchards, vineyards, vegetables, forests, and storage for some of these products where there are lepidopteran pests. These achievements have contributed to their widespread use in augmentative biological control. Inundative releases of *Trichogramma* for control of lepidopteran pests are being studied in more than 50 countries. The former Union of Soviet Socialist Republics (USSR) is ranked the first in application of *Trichogramma* (10 million hectares), followed by China (3 million hectares), Mexico (2.5 million hectares), and South American countries (1.2 million hectares).

In China, as the government pays more attention to agricultural and environmental challenges, the acreage of *Trichogramma* use has increased. For example, *Trichogramma* have been used to

A virus shaping foraging strategy in a *Drosophila* parasitoid

Julien Varaldi¹, Sabine Patot¹, Maxime Nardin¹, Sylvain Gandon²

1: Université de Lyon; Université Lyon 1; CNRS; UMR 5558, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, 43 boulevard du 11 novembre 1918, Villeurbanne F-69622, France.

e-Mail : varaldi@biomserv.univ-lyon1.fr

Tel : 0033 4 72 44 81 01

Fax : 0033 4 72 43 13 88

2 : Centre d'Ecologie Fonctionnelles et Evolutives (CEFE) - UMR 5175. 1919 route de Mende. F-34293 Montpellier cedex 5, France

1.Introduction

2.Transmission of LbFV

3. Adaptive significance of superparasitism alteration: a modelisation approach

4. Effect of LbFV on other phenotypic traits

5. Adaptive significance of the phenotypic alteration induced (apart from superparasitism)

6. Evolution in relation to the frequency of horizontal versus vertical transmission

7. Experimental evolution in relation to transmission type (horizontal or vertical)

8. Other viruses in the *Drosophila*-parasitoid community

9. Conclusion

1.Introduction

During the last decades, it has been discovered that host parasitoid interactions are often directly or indirectly influenced by symbiotic organisms, such as bacteria and viruses. For instance, the symbiotic bacteria *Hamiltonella* infecting aphids confers resistance against parasitoid attack (Oliver *et al.*, 2007; Oliver *et al.*, 2003). Although such phenomenon has not been documented to date in *Drosophila* sp., it surely indicates that symbionts have to be taken into account when studying *Drosophila*-parasitoid interactions. This idea finds further support in the recent literature, since symbiotic *Wolbachia* infecting *Drosophila melanogaster* have been found to confer resistance against viral pathogens. It is worth mentioning that this result has been obtained independently by two research groups (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008). Parasitoids have also evolved intimate associations with symbiotic bacteria (reviewed in chapter X for *Drosophila*-parasitoids) deeply affecting their reproductive behaviour. However, one of the most outstanding mutualistic relationship in parasitoids involves viral particles. Indeed, seven monophyletic subfamilies of Braconidae (the microgastroid complex), and two subfamilies of Ichneumonidae are associated with polydnviruses (PDV), which replicates in females' reproductive organs without any detrimental effects to the wasp (Glatz *et al.*, 2004). PDVs are injected into the parasitoid host during oviposition and alter host physiology thus allowing parasitoid larvae to circumvent the host immune reaction. It is likely that PDV symbiosis have arisen three times independently (giving rise to Bracovirus, Espagne *et al.*, 2004, Ichnovirus and Banchinevirus, Lapointe *et al.*, 2007), afterwards leading to longstanding coevolution between the ancestral viruses and the parasitoids. Nowadays, all wasp species of these groups have obligate associations with PDVs. PDVs have completely lost their infectious capacity and are only vertically transmitted as an autosomal locus because of their integration within the wasp genome. The origin of PDV is still under debate, but the ancestral bracovirus has been recently identified as a nudivirus, based on sequence

homology (Bezier *et al.*, 2009). Although PDV have not been found in *Drosophila* parasitoids, some proteins showing viral-like structure are also injected into the host haemolymph by *Leptopilina* species (Dupas *et al.*, 1996; Rizki, Rizki, 1990). Although they do not contain DNA (as opposed to PDVs), these virus-like particles (VLPs) also circumvent the host immune reaction and may have a viral evolutionary origin. To understand the origin and mechanisms of virus or VLP incorporation into the wasps genomes, it may be useful to study nowadays infectious viruses that are able to infect parasitoids. In *Leptopilina boulardi*, we have found that some females are infected by an inherited virus that manipulates the behaviour of the wasp (Varaldi *et al.*, 2003; Varaldi *et al.*, 2006b). This virus, called LbFV for *Leptopilina boulardi* Filamentous Virus, forces the infected females to accept to lay their eggs in already parasitized hosts (a behaviour called superparasitism). This behavioural manipulation benefits to the virus spread since superparasitism allows its horizontal transmission (transmission between unrelated parasitoid lineages). The peculiar transmission mode of this virus allows it to maintain and reach high frequencies in natural populations. The present chapter reviews the different features of this parasitoid/virus association.

2.Main effect and transmission of LbFV

As mentioned in previous chapters, all *Drosophila* parasitoids are solitary parasitoids, meaning that one *Drosophila* larva allows the development of a single parasitoid, whatever the number of parasitoid eggs. Females are usually able to recognize parasitized from unparasitized hosts (host discrimination) and normally avoid laying eggs in already parasitized host. If a female oviposits in a parasitized host, a behaviour called *superparasitism*, parasitoid larval competition ends up in the death of all but one larva. Usually the second larva is most likely to be out-competed and its survival depends on the interval between the first and second ovipositions (van Alphen, Visser, 1990). If a parasitoid female accepts several times the same host (a behaviour called self-superparasitism), she will

waste some eggs since brothers and sisters will compete for the possession of the host until all but one die. Superparasitism is thus expected to be strongly counter selected in most ecological conditions. One remarkable feature of *Leptopilina boulardi* was that in some populations, females showed a huge tendency to superparasitize, while in others most females laid only one egg per host. In the related *L. heterotoma*, however, few superparasitism was observed (Varaldi *et al.*, 2005b). In *Leptopilina boulardi*, we were thus able to derive stable “non-superparasitizing” lines (NS) and “superparasitizing” lines (S). From these lines, we studied the genetic determinism. Surprisingly, the variations in the superparasitism phenotype were strictly maternally inherited: whatever the nuclear genotype, females adopted the phenotype of their mother. Furthermore, when both S and NS lines laid their eggs inside the same host, in the case where NS lines won the within-host competition, the emerging (female) offspring did adopt the “superparasitizing” phenotype, despite the NS phenotype of its line of origin (Varaldi *et al.*, 2003)! All is happening as if some unknown infectious element was causing the “superparasitizing” phenotype and was passed from S infected lines to NS uninfected lines during the short time they coexisted inside the *Drosophila* larva. The newly acquired S phenotype was stably transmitted over generations (Varaldi *et al.*, 2006b). The infectious nature of the S-inducing element was further confirmed by injecting solutions derived from S individuals into *Drosophila* larvae parasitized by NS females. Solutions of S females proved able to induce the S phenotype on the emerging parasitoid females (originating from an « NS » line), whereas NS control injections did not induce any behavioural change (Varaldi *et al.*, 2006b). The hypothesis that the causative agent was a bacteria was tested and clearly ruled out using antibiotic treatments (Varaldi *et al.*, 2006b). The nature of the infectious element was finally determined by electron microscopy investigations inside the ovaries of *L. boulardi* females. It was evident that in S lines, a virus was replicating in cells bordering the lumen of the oviduct, contrary to NS females (Varaldi *et*

al., 2003, 2006b). Based on its morphology, the superparasitism-inducing virus was called LbFV. The virus LbFV is thus vertically transmitted through the female line, and also horizontally in conditions of superparasitism.

To date, the precise means of transmissions are not known, but our working hypothesis is that the virus is injected in addition to the egg into the host during oviposition and that it infects the emerging parasitoid during its larval life (during which the parasitoid consumes the infected host haemocoel). If the infected parasitoid develops alone, then vertical transmission occurs (with a very efficient rate, near 100% under lab conditions), while if superparasitism occurs, horizontal transmission may occur. We suspect that the efficiency of the horizontal transmission depends critically on the delay between successive ovipositions : if a S female superparasitizes soon after a NS female has laid her egg, then the efficiency will be high, while if this delay is important the efficiency drops (Varaldi *et al.*, 2006c). Accordingly, when we inject extracts of S ovaries inside *Drosophila* larvae previously parasitized by NS females, the efficiency of the contamination is high if the delay is low (<24h: 44% (n=9)), and drops to zero when we increased the delay (24 to 48 h, 0% (n=17); 48 to 72h: 0% (n=21)).

LbFV has been discovered using electron microscopy and thus we lacked any genomic data. This precludes from identifying its phylogenetic position and from developing molecular tools, such as markers. Since LbFV could be either a DNA or RNA virus, we focused our attention on the identification of viral mRNA (because both viral types should produce mRNAs). We performed a suppressive subtractive hybridization (SSH) between two lines sharing the same genotypic background but differing in their superparasitism behaviour. This work permitted to identify a 809bp mRNA that was S-specific. From this mRNA sequence, we derived a simple PCR test that showed amplification on all 14 independent S lines whereas no amplification was observed for all 11 independent NS lines, starting with DNA extracts as templates (Patot *et al.*, 2009). This perfect correlation between superparasitism phenotype and

PCR-amplification validates the viral origin of this sequence. Furthermore, it shows that LbFV has at least an intermediate DNA step during its replication cycle or that, more likely, LbFV has a DNA genome. This is consistent with the electron microscopy investigations showing apparent viral replication within the nuclei of the cells. This work (Patot *et al.*, 2009) also indicates that the virus reaches very high prevalence in natural populations (around 70% in both sampled populations in the South of France), despite the fact that the penetrance of the extended-phenotype was incomplete (only 80% of the infected females expressed signs of behavioural modification).

3. Adaptive significance of superparasitism alteration: a modelisation approach

The vertical transmission of the virus implies that the virus and the parasitoid share some fitness components (they both benefit from female fecundity). It thus remains unclear whether this induced superparasitism behaviour is actually adaptive for the virus (Varaldi *et al.*, 2003, Tracy Reynolds, Hardy, 2004, Gandon, 2005). To demonstrate the adaptive nature of the alteration of the parasitoid behaviour one must show that a virus increasing superparasitism can invade a virus population that does not alter the behaviour of its parasitoid host. In other words, one must demonstrate that the evolutionarily stable (ES) strategy of superparasitism for the virus is higher than the ES superparasitism for the parasitoid (in the absence of the virus). To address this question, we developed a model that allows to analyse both the dynamics and the evolution of a population of parasitoids (a proovigenic and solitary species) parasitizing a population of hosts (Gandon *et al.*, 2006). This model includes the potential benefit of superparasitism (the possibility that parasitoid larvae developing in an already parasitized host win the within-host competition) and both the classical costs of superparasitism (the costs of time and the cost of eggs). We first used this model in the absence of any virus, to predict the fate of a mutant parasitoid with superparasitism strategy

s^* appearing in a parasitoid population dominated by a resident with strategy s (where s indicates the rate of acceptance of parasitized hosts). As expected, the model predicts that the ES strategy of superparasitism is zero when the probability to win the within-host competition (c) is low but increases with an increase in (c). This further confirmed previous models showing the potential adaptive value of superparasitism under conditions of hosts scarcity (van Alphen, Visser, 1990).

We extended the model to include a virus, based on LbFV biology. When females are infected, it is assumed that the parasitoid behaviour is strictly under the control of the virus. In other words, the rate of acceptance of parasitized hosts of an infected female is no more s (the superparasitism strategy when the female is uninfected), but instead σ which is a feature of the virus. The virus is vertically transmitted with a rate of t_v (<1), and will gain extra routes of transmission via the potential horizontal transmission that may occur between a larva infected with the virus and an uninfected larva (with probability τ_h). To allow direct competition between viral strains, it is assumed that a viral strain can replace another one when they compete inside the same *Drosophila* larva with a probability ε . However, no multi-infections at the adult stage is allowed. The model can be used to derive an expression of the fitness of a mutant virus with a strategy σ^* appearing in a population dominated by a resident virus with strategy σ , at the epidemiological equilibrium set by the resident virus and the strategy s adopted by the host. Note that here, only the virus is allowed to evolve, not the parasitoid (s is fixed). In a first part, we fixed $\varepsilon=0$, ie a viral strain is not able to replace a resident viral strain in competition within *Drosophila* larvae. The results indicate that the ES superparasitism is always higher for the virus than that observed for the host (allowed to evolve to its optimal strategy in the absence of the virus) demonstrating the adaptive value of the behavioural modification from the virus point of view. The virus is always selected to increase the natural superparasitism tendency of the parasitoid. The presence of the virus thus

induces an evolutionary conflict of interest between the parasitoid and the virus on superparasitism behaviour (fig 1a). The intensity of the evolutionary conflict is even increased if both the virus and the parasitoid are allowed to co-evolve: after co-evolution, uninfected females (that are produced even in infected populations, due to imperfect vertical transmission) should less superparasitize than uninfected females that did not co-evolve with the virus (fig 1a). This shows that the presence of the virus in a population should indirectly modify the ESS of a trait for uninfected females. When we allowed direct competition between viral strains within *Drosophila* larvae ($\varepsilon > 0$), we found that the virus is even selected for much higher superparasitism strategies, thus strongly increasing the conflict of interest between the parasitoid and the virus (fig 1b). Coevolution between the virus and the parasitoid further increased the conflict of interest as has been found with $\varepsilon = 0$ (fig 1b). These results clearly show that increasing the superparasitism strategy of the parasitoid is an adaptive strategy from the virus point of view (whatever ε). To say it differently, there is a conflict of interest between the virus and the parasitoid on superparasitism behaviour. However, the intensity of the conflict of interest depends critically on the ability of mutant virus strains to replace resident strains inside *Drosophila* larvae (ε) and also on coevolutionary processes.

4. Effect of LbFV on other phenotypic traits

It may be argued that *L. boucardi* females infected with LbFV adopt an aberrant behaviour without any adaptive significance (neither for the host or for the virus), because the virus disrupts indifferently several cognitive and possibly physiological properties (Poulin, 1995). However, it has been found that LbFV infection has no effect on parasitoid survival of females (but a negative impact on male survival), and only a slight negative impact on size (tibia length is reduced by 2%), and developmental speed (increased by 3% for both sexes). Nevertheless, the overall locomotor activity of infected females is reduced by 45% while no effect was detected on males. Interestingly, we found that egg-load was even increased for

infected females (+11%) compared to uninfected females (Varaldi *et al.*, 2005a). Overall, the effect of LbFV on various traits is relatively moderate (except for locomotor activity) or even positive (egg-load) (table 1). This surprising beneficial effect on egg-load will be discussed in detail in the next section.

The influence of LbFV on several behaviour (apart from superparasitism) has also been investigated (Varaldi *et al.*, 2006a). The behavioural components studied included sexual communication, circadian rhythms, ability of females to detect odours of hosts, and trajectometric parameters of foraging females. None of these behavioural repertoires seemed to be perturbed by LbFV infection, demonstrating a specific action of LbFV on superparasitism behaviour (table 1).

How does the virus manage to have such a specific action? *L. boulardi* females need to pierce the skin of the host larvae with their ovipositor to detect chemical cues associated with a previous infestation. In effect, the ovipositor of parasitoids bears chemoreceptors that are probably (all or some of them) involved in host discrimination. Their distribution and putative function has been investigated in great details on the related species *Leptopilina heterotoma* (van Lenteren *et al.*, 2007). This species also needs to pierce the skin of the host to detect the presence of a previous infestation. The authors found seven chemoreceptors at the tip of the ovipositor that come into contact with the *Drosophila* haemolymph during host probing. One single chemoreceptor was found on the unpaired valve, and three on each paired valve. Each chemoreceptor is innervated with six neurons. One tempting hypothesis would be that LbFV injures these neurons involved in the transmission of the nervous flux, either through cell lysis or through manipulation of gene expression. However, based on the work done in *L. heterotoma* (van Lenteren *et al.*, 2007), it is unlikely that the gustatory receptor situated on the unpaired valve is the target of LbFV action since electrophysiological investigations suggest that it is not involved in host discrimination. The perception of previous infestations is thus

probably assured by some or all of the remaining six chemoreceptors present on the paired valve, and LbFV may interfere with some of them.

In addition to discriminating between parasitized and unparasitized hosts, female parasitoids usually make selective host choices when several potential related host species are available in the environment. The value of these different host species may differ in terms of parasitoid fitness and we expect that female parasitoids discriminate among them by preferentially laying their offspring in the most profitable host species. We would also predict that the virus should not interfere with this decision since both the virus and the parasitoid has interest in developing in a good host. However, the sensory capacities of the ovipositor are also probably involved in this decision process. In order to test (i) whether *L. boulandi* females discriminate between good and bad host species, and (ii) whether LbFV interfere with this ovipositor-based decision, we conducted a choice experiment in which we proposed a mix of *D. melanogaster* and *D. subobscura* to *L. boulandi* females. Both *Drosophila* species can be found in the same microhabitat, although *D. subobscura* is less frugivorous than *D. melanogaster*. While *D. melanogaster* offers a very good host for the development of *L. boulandi*, *D. subobscura* is reputed to be an unfavourable host (Carton *et al.* 1986). Indeed, based on the protocol described in Varaldi *et al.* (2005a), we estimated the pre-imaginal survival (probability of an egg to reach adulthood) of *L. boulandi* (strain Antibes) as 0.74 +/- 0.09 (mean +/- standard error, n=10) on *D. melanogaster* and only 0.14 +/- 0.09 (n=12) on *D. subobscura* (at 25°C). To test whether *L. boulandi* discriminates between *Drosophila* species and whether LbFV interfere with this decision, we did the following experiment. Isolated *L. boulandi* females (either infected or not, but sharing the same nuclear background as in Varaldi *et al.*, 2005a) were provided with a mix of larvae that hatched from 75 *D. melanogaster* and 75 *D. subobscura* eggs in standard rearing tubes (at 21°C). Because *D. subobscura* eggs needs more time to hatch than *D. melanogaster* and that *D. subobscura*

larvae grow slower than *D. melanogaster*, we used *D. subobscura* eggs collected 24 hours before *D. melanogaster* eggs. Consequently, at the time that we added the parasitoid female within the tube, *D. melanogaster* were 24 hours old (time since eggs were deposited within tubes), whereas *D. subobscura* were 48 hours old. In these conditions, the size of larvae of both species is comparable (Varaldi *et al.*, 2005b). Females were allowed to parasitize the larvae during 24 hours. Starting from the moment at which we added the females in the vials, they were transferred at 24°C (+/-1°C) until the end of the experiment (this temperature was chosen because it was suitable for *D. melanogaster*, low enough for *D. subobscura* and was high enough to prevent the diapause of *L. boucardi*). Sixteen replicates of each test modality were simultaneously conducted, in addition to 12 controls kept without parasitoids that were manipulated exactly in the same way as test tubes. For each of the 44 tubes, we scored the number and identity of the *Drosophila* reaching adulthood, and the number of emerging *L. boucardi* in test tubes.

The choice of each female was indirectly measured by first calculating the parasitoid induced mortality on each *Drosophila* species which is a measure of the attack rate (a). Indeed, neither *D. subobscura* nor this strain of *D. melanogaster* are able to get rid of parasitoids by mounting an efficient immune reaction, thus the parasitoid induced mortality is a good estimation of the proportion of *Drosophila* sp. that have been attacked and parasitized (in accordance with this hypothesis, we found no capsule on all emerging adult *Drosophila*). Attack rate was then defined for each *Drosophila* sp. as :

$a_{mel} = (\text{mean number of } D. melanogaster \text{ in controls} - \text{number of } D. melanogaster \text{ in test tube } i) / \text{mean number of } D. melanogaster \text{ in controls}$

$a_{sub} = (\text{mean number of } D. subobscura \text{ in controls} - \text{number of } D. subobscura \text{ in test tube } i) / \text{mean number of } D. subobscura \text{ in controls}$

Based on this, we derived a choice index calculated for each female. There was a slight

difference in the survival of *D. melanogaster* and *D. subobscura*, since a mean of 58.72 *D. melanogaster* emerged from the controls (without parasitoid) versus 45.45 *D. subobscura* (out of 75 eggs initially deposited). We made the assumption that the mortality occurred before *Drosophila* eggs were exposed to the wasps (considering that the mortality occurred after the exposition to the wasp gave very similar results). Thus in each test tubes, we estimated that the parasitoid female was provided approximately $58.72+45.45=104.17$ *Drosophila* larvae, including 56% ($58.72/104.17$) *D. melanogaster*. For each female *i*, we calculated the whole rate of attack of both *Drosophila* species as:

$$a_{\text{global}i} = (a_{\text{mel}i} * 58.72 + a_{\text{sub}i} * 45.45) / 104.18$$

To quantify the choice of each female, we derived an index, using an analogy with the calculation of the linkage disequilibrium in population genetics: on one hand we know the proportion of both *Drosophila* species in tubes (56% *D. melanogaster* 44% *D. subobscura*) and on the other hand, we know for each female *i* the whole attack rate ($a_{\text{global}i}$). Under the hypothesis h_0 that wasp attacks are randomly distributed among *Drosophila* species, then we expect for a female *i*:

$$\text{Proportion of } D. \text{ mel attacked} = 0.56 * a_{\text{global}i}$$

$$\text{Proportion of } D. \text{ mel non attacked} = 0.56 * (1 - a_{\text{global}i})$$

$$\text{Proportion of } D. \text{ sub attacked} = (1 - 0.56) * a_{\text{global}i}$$

$$\text{Proportion of } D. \text{ sub non attacked} = (1 - 0.56) * (1 - a_{\text{global}i})$$

We can then calculate a deviation from this null model by subtracting for instance the proportion of *D. melanogaster* effectively attacked by the wasp in tube *i* with the expected proportion of attacks on *D. melanogaster* under h_0 :

$$c = a_{\text{mel}i} - 0.56 * a_{\text{global}i}$$

If this choice index (c) is positive then the female preferentially attacked *D. melanogaster*, whereas if this is negative, the female preferentially attacked *D. subobscura*. Because the range of variations for this index may vary between females (because their whole attack rates vary), we scaled it to range between -1 and +1 for all females (as is done for the calculation of D' in population genetics) by dividing the choice index by its minimal value (if negative) or maximal value (if positive). Minimal and maximal values can be obtained this way:

$$c_{\min} = \min(0.56, 1 - a_{\text{global}i}) - 0.56 * (1 - a_{\text{global}i})$$

$$c_{\max} = \min(0.56, a_{\text{global}i}) - 0.56 * (a_{\text{global}i})$$

And finally, the scaled choice index can be obtained this way:

$$c^* = c / c_{\min} \text{ if } c < 0$$

$$= c / c_{\max} \text{ if } c > 0$$

This scaled choice index (c*) varies between -1 when the female concentrated to the best her attacks on *D. subobscura*, and +1 when the female concentrated to the best her attacks on *D. melanogaster*, and equals zero when the female do not show any preference.

The survival from egg to adulthood was also estimated for the offspring of each parasitoid female (each test vial):

Offspring survival = number of parasitoid reaching adulthood in tube i / number of *Drosophila* (mel+sub) killed due to parasitism in tube i.

With: number of *Drosophila* (mel+sub) killed due to parasitism in tube i = (mean number of *D. melanogaster* in controls – number of *D. melanogaster* in tube i) + (mean number of *D. subobscura* in controls – number of *D. subobscura* in tube i)

The number of *Drosophila* emerging in each vial is plotted in figure 2a. *D. melanogaster* had

a higher pre-imaginal survival than *D. subobscura* and the parasitoids induced a significant mortality on both *Drosophila* species indicating that both species were attacked by the parasitoids. The results indicate that *D. melanogaster* suffered a higher parasitoid-induced mortality than *D. subobscura*, suggesting a choice in direction of the former. This trend was confirmed by the calculation of the choice index, which was significantly above 0 for both infection status (Student t test respectively 6.52 and 6.13 for uninfected and infected wasps, $df=14$ and $df=15$, both $p<10^{-5}$, see figure 2b). Importantly, the choice indexes obtained for infected or uninfected wasps were very similar ($t=0.62$, $df=29$, $p=0.27$). Firstly, the results show that *L. boulandi* is able to discriminate between both *Drosophila* species. This can be due to the perception at distance of larval kairomones (odours produced by the larva) differences or to contact differences. Since both species were mixed within the tubes, *Drosophila* odours should also mix and it is unlikely that *L. boulandi* was able to use volatile components to discriminate in these conditions. Instead, the females probably used information obtained with their ovipositor, either by probing the medium close to the larvae or directly the larvae. There was a clear choice for *D. melanogaster* which is the most profitable host, suggesting an adaptive value for this trait. This conclusion was further supported by the global positive correlation between the choice index and the offspring larval survival ($F(1,27)=6.91$, $p=0.014$, figure 2c). The correlation was however only significant for uninfected wasps ($F(1,11)=9.68$, $p<0.01$ for uninfected and $F(1,14)=1.35$, $p=0.26$ for infected wasps) but the tendency was the same for both infection status (figure 2c). The more females chose *D. melanogaster*, the higher was their offspring survival. This confirmed previous results showing adaptive host choice obtained on *L. boulandi* or related species (Dubuffet *et al.*, 2006; Pannebakker *et al.*, 2008). Importantly, LbFV did not alter this adaptive host selection decision. This suggest that LbFV specifically impairs perception skills involved in superparasitism avoidance (probably chemoreceptors) without impairing receptors involved in

the discrimination among different host species, which is quite remarkable since both perception skills are probably due to chemoreceptors innervating the ovipositor.

5. Adaptive significance of the phenotypic alteration induced (except superparasitism).

In section 3, we have presented a theoretical approach that shows that the viral-induced modification of superparasitism behaviour is an adaptive trait for the virus. This conclusion is further supported by the fact that no other behavioural component is modified by the virus (table 1), underlying the specificity of the behavioral modification. A conflict of interest arises between the parasitoid and the virus since they are selected for divergent superparasitism strategies. Consequently, both partners are in conflict of interest from an evolutionary point of view. What about other traits ? “Physiology”-related traits appear to be relatively poorly affected by the virus except for locomotor activity which is reduced by 45%. This may result from an energetic cost induced by the replication of the virus, which may reduce the energy available for the insect movement. One surprising result concerns the egg-load. How to explain the observed increase of egg-load in LbFV-infected females ? Is it an adaptation of the parasitoid, in response to virus infection or an adaptation (another way to manipulate the reproductive behaviour of the parasitoid) of the virus to increase its own transmission or is it?

To address this question, we modified the model used to study the evolution and the manipulation of superparasitism (Gandon *et al.* in prep). In this model each parasitoid female is born with a fixed number of eggs and lacks the ability to mature additional oocytes later on (i.e., strictly proovigenic parasitoid). The initial egg load may be modified by the presence of the virus (either caused by a manipulation induced by the virus or by a plastic response of the host) and E_z and E refer to the egg load at emergence of infected and uninfected females, respectively. The evolution of the egg load of proovigenic parasitoid species, like any other life history trait, can be viewed as a resource allocation problem. Producing more eggs will

divert resources from other important life history traits. In our model we consider various trade offs between egg load and the probability of emergence, and adult survival. The evolutionarily stable (ES) resource allocation strategy is the one that balances the benefits and the costs of producing more eggs.

This model can be used to study the evolution of egg load in the absence of a virus manipulating the behaviour of the females. In this simple scenario we recovered the main result of Rosenheim (1996) that the evolutionarily stable egg load increases with the rate of oviposition in order to avoid the risk of egg limitation (i.e. the probability to exhaust its total number of eggs before dying). We can also use this model to consider the situation where a virus manipulating the superparasitism behaviour is present in the population (and has reached an endemic equilibrium). In this case, the parasitoid population becomes heterogeneous. Some individuals are uninfected and have a low probability of superparasitism, while other individuals are infected by the virus and have large probabilities of superparasitism. We use our model to analyse different scenarios depending on the ability of the parasitoid females to adopt plastic strategies with regard to viral infection.

First, we consider that the egg load of the females is only determined by the female but not by the virus. If egg load is allowed to be conditional on the infectious status (ie, two different egg loads may be expressed, depending on whether or not the female is infected), we found that the ES egg load is to increase egg-load when the female is infected. This is due to the fact that infected females lay a higher number of eggs because they also lay eggs in already parasitized hosts (because females infected by the virus are assumed to always superparasitize). They thus have a higher chance of being egg limited (to run out of eggs before dying) than uninfected hosts, and this is why they evolve higher egg loads. Second, if the egg load is assumed to be a fixed strategy (independent on whether or not the female is infected) we found that the evolution of the parasitoid egg load is mainly driven by the

selection acting on infected parasitoids because of the often large prevalence of the virus in the population (due to high rates of vertical and horizontal transmission). As a consequence, the unconditional ES strategy is close to the conditional ES strategy of infected females, and is thus increased by the presence of the virus in the population.

Then we also considered the scenario where the egg load of infected females is actually governed by the virus, not the parasitoid. When the virus is allowed to manipulate parasitoid egg load we find that it always increases the number of eggs above the ES level in the absence of the virus. Thus the fact that infected females of *L. boulardi* tend to have a higher egg load than uninfected females could be explained by two adaptive scenarios. Under the first one, *L. boulardi* females have evolved the ability to increase their egg-load only when they are infected. Indeed, infected wasps have a higher rate of oviposition (and higher risk of egg limitation) than uninfected ones due to the manipulation of superparasitism. It is thus adaptive for infected females to produce more eggs to reduce the risk of egg limitation (increased by superparasitism). This situation thus corresponds to adaptive phenotypic plasticity of the parasitoid. Under the second scenario, this increase of egg load is induced by a manipulation of the virus. For the virus, higher egg load is also adaptive because it offers additional opportunities of vertical and horizontal transmission. This increase in egg load would thus correspond to another side of the manipulation of the parasitoid phenotype by the virus. The only way to distinguish between the two alternatives would require an examination of the mechanism responsible for the shift in egg load. For example, one could demonstrate that it is a conditional response if it was possible to see a change in egg load in exposed-but-not-infected females (see Minchella 1985 for a similar experiment in snails and trematodes).

Interestingly, thus, in contrast with our analysis of the evolution of superparasitism, the analysis of this model does not allow us to determine if the higher egg loads are an evolutionary response of the host or a manipulation by the virus. This results from the fact

that there is no real conflict over the evolution of this trait between the parasitoid and the virus. Given that the virus manipulates the superparasitism of infected females, both partners benefit from increasing the egg load above the level in the absence of the virus. Another consequence of this alignment of interests can be seen when the parasitoid and the virus are allowed to coevolve. The optimal egg load strategies of the virus and of the uninfected females tend to be closer after coevolution. Again, this contrasts with the adaptive dynamics of superparasitism (Gandon *et al.* 2006), where coevolution increases the difference between the virus and the parasitoid strategies (figure 1).

6. Evolution in relation to the frequency of horizontal vs vertical transmission

The mode of transmission of a pathogen has long been recognized as a critical feature to consider in order to understand and predict its evolution (Ewald, 1987). It is clear that for a parasite with strict vertical transmission, host and parasite fitness are strongly correlated and any parasite feature that decrease host fitness will be counter selected. Consequently, vertical transmission is usually associated with low virulence or even mutualism (see however chapter X for the special case of reproductive parasites). However, when a parasite is horizontally transmitted, host and parasite fitness are no more correlated and selection may promote highly virulent parasites, if increased virulence favours transmission. In the LbFV/*L. bouhardi* system, both transmission modes may occur. Furthermore, depending on ecological conditions such as the ratio parasitoids/hosts, the opportunities of horizontal or vertical transmission may vary. Indeed, if this ratio is low (lots of hosts for few parasitoids), then there will be few superparasitism and low horizontal transmission opportunities, whereas if this ratio is high (lots of parasitoids for few hosts), opportunities for horizontal transfer may be high (we will see later that this simple view is partly caricatural). This raises the question of the consequence of such ecological changes on the evolution of LbFV, and in particular on

the evolution of superparasitism behaviour. Based on the model described in section 3 and in (Gandon *et al.*, 2006), we studied the ESS of superparasitism of the manipulating virus, as a function of th , which measures the probability of horizontal transmission between infected and uninfected parasitoids sharing the same host (superparasitism). Note that in the model, we assumed that the outcome of the competition between the resident and the newly arrived parasitoid larva (and their possible viruses associated) is determined very rapidly. Consequently, the model does not keep track of superparasitized hosts because in those hosts, soon after superparasitism, only a single larva (and its possible virus) remains alive. In the model, parasitized hosts thus regroup hosts that have been parasitized once or several times. We identified two situations, depending on the value of ϵ , which measures the probability that a viral strain A replaces a resident viral strain B during the short period where both strains compete within the same superparasitized host (superinfection). Because we do not have any indication to date on the value of ϵ in reality, we derived the ESS of superparasitism for $\epsilon=0$, which corresponds to the case where no superinfection can occur and $\epsilon=0.5$, which correspond to the situation where a supernumerary virus strain can outcompete the resident virus in 50 per cent of the cases.

First, in figure 3, it can be noted that below a certain value of th (0.2), the virus cannot maintain in the wasp population. This is due to the fact that at each generation, infected females produce only 95% infected offspring due to the incomplete vertical transmission. We have clear indications that vertical transmission is very efficient but imperfect (Varaldi *et al.* 2006c). In the absence of horizontal transmission or any fitness advantage to being infected, because uninfected females will obviously produce 100% uninfected females, the frequency of infection in the whole population should decrease by a factor 0.95 from one generation to the next until disappearance. This verbal argument (but see Lipsitch *et al.*, 1995 for a modelisation of this simple problem) shows that without other compensating mechanism the

virus cannot maintain in populations. The mechanism compensating for this incomplete vertical transmission is precisely the horizontal transmission, but in this situation ($th < 0.2$), it is not sufficient to compensate the incomplete vertical transmission and the virus is ousted from the population.

In the simplest situation where $\epsilon = 0$ (no superinfection), increasing the probability of horizontal transfer (starting from 0.20) decreases the ESS of superparasitism for the virus (black line figure 3a). This result may sound counter-intuitive because it means that even if the probability of horizontal transfer is increased, the virus is selected for lower superparasitism, although superparasitism is precisely the mechanism necessary for horizontal transfer. The explanation lies in the fact that an increase in th has important epidemiological consequences. Increasing the probability of horizontal transfer leads to a better diffusion of the virus between unrelated parasitoids and consequently to higher prevalence at the epidemiologic equilibrium (greys shadings in the figure). Furthermore, an increase in the virus prevalence leads to an increase of the aggregation of wasp eggs inside *Drosophila* larvae and thus to a decrease in the proportion of parasitized hosts (with or without virus). Thus, increasing the probability of horizontal transmission has two main consequences. First, it decreases the number of parasitized hosts and thus limits the benefits of superparasitism. Second, it increases the prevalence of the virus among those hosts that are parasitized. This also selects against superparasitism when $\epsilon = 0$ because no horizontal transmission can take place in this situation. Thus both these effects go in the same direction and explain why a small increase in th can lead to a decrease in the ES superparasitism of the virus.

In contrast, if some superinfection is allowed (i.e. $\epsilon > 0$) the pattern can be very different because horizontal transmission can take place even if the parasitoid already present in the host is infected by another strain of the virus. First, all parameter sets led to higher ESS values with $\epsilon = 0.5$ than with $\epsilon = 0$. This result makes sense since with $\epsilon = 0.5$ an already parasitized host

represents a potential wasp to colonize for a mutant virus even if it is already infected by a resident virus (contrary to the case where $\varepsilon=0$). This leads to an increase in the payoff from superparasitism from the virus point of view. This result also confirms that increasing ε also increases the intensity of the conflict of interest between the parasitoid and the virus (see also fig 6c and 6d in Gandon *et al.*, 2006 and figure 1). With $\varepsilon=0.5$, the ESS of superparasitism takes a humped shape, with an increase for low prevalence (or low probability of horizontal transmission) and a subsequent decrease for higher prevalences (high probability of horizontal transmission). The interpretation of this result also implies the correlative change in the viral prevalence. For low probability of horizontal transmission (but >0.2), the virus maintains at relatively low frequency (below 20%), and there is lots of opportunities for horizontal transfer. Conversely to the case where $\varepsilon=0$, increasing the probability of horizontal transmission also increases the opportunities for horizontal transmission even at the epidemiologic equilibrium (where the prevalence reaches its equilibrium value) because one viral strain can replace another one within the host. This selects for higher superparasitism until a critical prevalence value is reached (about 20% with this parameter set) where the environment starts to saturate with the virus (which reduces the proportion of parasitized hosts due to egg aggregation), reducing drastically the opportunities for viral horizontal transfer (at the epidemiologic equilibrium) and also reducing the opportunities for vertical transmission during superparasitism. Consequently, this selects for reduced superparasitism.

When we fixed the probability of horizontal transmission (t_h), and varied the value of t_v (probability of vertical transmission), the interpretation was much simpler (figure 3b). Here again, there was a minimal value for t_v for the virus to maintain in the population (0.65). Above this threshold, the viral prevalence increased monotonously with an increase of t_v . As expected, the ESS for the virus was high when t_v is low and decreased afterwards. This pattern was observed for both situations ($\varepsilon=0$ and $\varepsilon=0.5$). In part 3, we have shown that the

virus is selected for higher ESS values of superparasitism than the parasitoid (except in some peculiar combination of parameter sets, eg $t_v=1$ and $\epsilon=0$). In other words, the virus reduces the fitness of the parasitoid due to the wastage of eggs induced by the manipulation (classical cost of superparasitism). Consequently, increasing t_v also increased the correlation of the fitness of both the virus and the parasitoid, thus reducing the conflict of interest. This selects for a reduction of the ESS of the virus. In the special case where $t_v=1$, the virus is selected to adopt the same strategy as the parasitoid (with this parameter set, the ESS for the parasitoid was to never superparasitize, not shown). However, this is true only with $\epsilon=0$, ie when no superinfection is allowed. With superinfection ($\epsilon=0.5$), the conflict of interest between the virus and the parasitoid still holds.

The model shows three important features of the LbFV/L. *boulardi* system. The first is the importance of epidemiologic feedbacks. It was particularly visible when we varied the probability of horizontal transmission. Indeed the predictions were counter-intuitive due to the indirect effect (i.e. epidemiological effect) of an increase in t_h , through a decrease in the number of parasitized hosts, and an increase in the prevalence of the virus in the parasitoid population. Paradoxically, within a population with high intensity of superparasitism and high viral prevalence, the frequency of horizontal transfer may be lower than within a population with fewer superparasitism but lower viral prevalence. However this conclusion is deeply influenced by the superinfection parameter (ϵ). In this model, we were interested in epidemiologic equilibrium. However, the relative contribution of horizontal and vertical transmission in the course of the invasion process change a lot, with strong contribution of horizontal transmission at the beginning and a reduction with an increase in prevalence. This problem has been addressed in a general context in Lipsitch *et al.*, 1996. Thus, highly manipulative strains are selected for at the beginning of the invasion process and less manipulative at the epidemiologic equilibrium. Another conclusion that can be drawn from

the model, is that the value taken by the superinfection parameter (ϵ) is critical. In both figures 3a and 3b, we found that increasing ϵ strongly increased the ESS of superparasitism and also modified the form of the relation between ESS and th . It is evident that the value of this parameter needs to be estimated in this system in order to predict correctly the ESS in natural populations.

7. Experimental evolution in relation to transmission type (horizontal or vertical)

The previous section showed how transmission type (horizontal or vertical) is a critical point governing the evolution of the virus-induced superparasitism phenotype within natural populations. In this section, we describe an experiment in which we manipulated the transmission of the virus, either forcing it to spread vertically but not horizontally or forcing it to spread exclusively horizontally. Contrary to the model described above, this experiment did not include any epidemiological feed-back but only asked whether changing the transmission mode will select for alternative viral strategies. Our prediction was that forcing the virus to propagate exclusively by vertical means should select for lower superparasitism strategy, whereas forcing horizontal transmission should select for higher superparasitism strategy. In standard rearing conditions, 3 females are used to parasitize about 150 hosts in each vial. In these conditions, moderate superparasitism do occur (Varaldi *et al.*, 2005a). Consequently, when the females are infected, it is likely that both vertical transmission (from mother to offspring) and horizontal transmission occur (horizontal transmission may occur if one viral strain is able to replace one other strain inside the *Drosophila* larva, eg $\epsilon > 0$ in the previous model). However, in standard rearing tubes, if we use only a single female, then only vertical transmission will occur. Conversely, we can provide hosts already parasitized by uninfected females to (superparasitizing) infected females to maximise horizontal transfer. Under this condition, the offspring of uninfected females may become infected at the next generation. In

this species, the reproduction is arrhenotokous parthenogenesis (males are haploid and obtained from unfertilized eggs whereas females are diploid and obtained from fertilized eggs). It is very simple to be sure that *all* transmission events are horizontal, by taking advantage of the fact that unfertilized females will only lay sons whereas fertilized females will lay sons and daughters. Consequently, by exposing hosts first to uninfected and fertilized females and subsequently to virgin infected females, we have the certainty that all infected female offspring is obtained through horizontal transfer. Based on this idea, we did the following experiment using an infected strain originating from Sienna, Italy (described in Varaldi *et al.*, 2003, see table 2). One hundred unparasitized *Drosophila melanogaster* larvae were offered to 3 fertilized infected females in standard rearing tubes. At each generation, three emerging females were randomly selected and allowed to mate and used to maintain the line. Ten independent replicates were done in parallel. At each generation, the superparasitism phenotype of two females emerging from the tubes was tested according to a standard procedure (female isolated on ten *Drosophila melanogaster* larvae, see Varaldi *et al.* 2006b for details). This condition constitutes the control conditions where both vertical and horizontal transmission are likely to occur, because some superparasitism occurs (table 2). A second modality forcing vertical transmission was performed, where single female was provided with 100 unparasitized hosts. To allow a selective process to occur, we did 30 independent tubes, mixed all the emerging offspring (from all 30 tubes) at each generation, and randomly selected 30 (fertilized) females to establish the next generation. The idea was that a virus that induces a low fitness cost and especially that induces few superparasitism will be selected since the infected wasp will not waste its eggs in (self-) superparasitism and will contribute more to the pool of emerging wasps. At each generation, the superparasitism phenotype of one female per line was tested. Finally, we provided 60 hosts already parasitized by an uninfected fertilized female to 10 virgin infected females. In this condition, harsh

superparasitism occurs (table 2), favouring horizontal transfer. To standardize the whole number of *Drosophila* larvae in the tubes for the three modalities (a total of one hundred), we added 40 unparasitized *Drosophila* larvae to the 60 (super)parasitized hosts. From the emerging wasp offspring, two females were used to test their superparasitism phenotype and 10 virgin females were used to continue the protocol (again they were provided 60 hosts already parasitized by an uninfected fertilized female). Eight independent lines were done (horizontal).

The controls (3 fertilized females for 100 hosts) showed the expected superparasitism phenotype with a mean number of eggs per hosts between two and four (figure 4). Also, the horizontal transfers that were expected in the modality “horizontal” were evident, since the mean number of eggs per hosts was 1.54 and 4.63, compared with the phenotype of the uninfected line (mean=1.07, N=5). The superparasitism phenotype was tested in all three modalities (control, strict vertical, strict horizontal) starting from the third generation of selection (from generations 3 to 6). On these data, there was evidence of between-generation variations ($F(3,199)=9.81$, $p<0.0001$), but no evidence of the type of transmission ($F(2,199)=0.27$, $p=0.75$) and no interaction between generation and the type of transmission ($F(6,199)=2.12$, $p=0.052$). As a conclusion, there was no evidence of evolution in this dataset. Several hypothesis can be formulated to explain this absence of response. The first is that the selective differential is not sufficient to observe a change in only 6 generations because of sampling errors. This explanation probably holds for the vertical transmission modality, because only 30 females out of around 180 (each of the 30 tubes produced around 60 females) were randomly selected at each generation to continue the experiment. Consequently, even if a female contributed more than the others to the whole emerging population (because its virus was more benevolent, induced less superparasitism), sampling errors may have cancelled the initial overrepresentation of this peculiar virus strain. However, this explanation is unlikely to

hold for the horizontal transmission modality since at each generation, 10 wasps were randomly selected in a pool of only about 20 emerging females. This low number of emerging females (we recall that only 60 hosts were super-parasitized in this modality) was due to the fact that when strong superparasitism occurs (as it is the case in this modality, see table 2), both the host and the parasitoid incur high risk of dying during the development (Varaldi *et al.*, 2005a). This phenomenon constitutes a potential cost to the spread of highly manipulative strains and may explain part of the absence of response in the horizontal modality. Finally, one trivial hypothesis that may explain the absence of any selective response neither in the vertical nor the horizontal modality is that there was no sufficient genetic variability of the virus at the beginning of the experiment and that mutation alone did not generate enough polymorphism in the course of the experiment.

8. Other viruses in the *Drosophila*-parasitoid community

Due to their very diverse genomic structure (DNA, RNA, single or double stranded) and to their high mutation rates, no simple systematic methods (such as PCR-based) are available to detect the presence of viruses or even to detect all members of a given family. However, several viruses have been regularly discovered in several *Drosophila* species, especially *Drosophila melanogaster*. It is reasonable to think that most of these viruses have been discovered because *D. melanogaster* is a model system since the beginning of the 20th century and has been extensively studied from all aspects of its biology (including immunity). L'Heritier and Teissier (1937) for instance discovered the sigma virus because certain strains showed atypical (virus-induced) CO₂ sensitivity. Recently, molecular techniques have also provided additional means to reveal their presence. For instance, Asling *et al.* (1995) were interested in comparing the transcriptomes of *D. melanogaster* either “uninfected” or “challenged” with a pathogenic bacteria in order to identify immunity-related genes. They did found the induction of an anti-microbial peptide but they also detected an induced-band

presenting sequence similarity with viruses. They were in fact discovering a new ssRNA virus (picorna-like) apparently asymptomatic, called Nora virus (Habayeb *et al.*, 2006). The virus was first detected in a huge quantity of fly stocks, but it was later found that a technical bias led to an overestimation of its prevalence (Habayeb *et al.*, 2007). Table 3 presents a comprehensive list of the identified viruses infecting *Drosophila* species. One striking pattern is that all of them are RNA viruses (or likely to be, when no genomic information are available), although other *Diptera* are infected by DNA viruses (Gratz, 2004). This surprising pattern remains unexplained. Understanding the biological reason for this (if any) may provide exciting insights on the enigmatic observation that the major virus genomic structures are clearly non-uniformly distributed among the main branches of hosts (Koonin *et al.*, 2008). One other feature of *Drosophila* viruses that can be underlined is the diversity of transmission modes with strictly horizontally transmitted viruses (for instance DCV), strictly vertically transmitted viruses (for instance sigma virus) and viruses presenting both transmission modes (virus P and virus A). A remarkable feature of most of these viruses is that they have relatively mild pathologic effects on their hosts. For instance, although DCV virus is highly pathogenic when artificially injected, Thomas (1974) and Gomariz-Zilber & Thomas-Orillard (1993) found that under natural infection routes (larval feeding on contaminated substrat), DCV reduces only slightly the survival of larvae and even induces an increase in the number of ovarioles and on adult longevity. The hereditary virus sigma does not affect fertility, female longevity, but reduces egg viability (Fleuriet 1981a) and overwintering survival probability (Fleuriet 1981b). Sigma virus also induces CO₂ sensitivity ie, *Drosophila* exposed for a while to CO₂ die instead of recovering from sleep. However, the ecological significance of this phenotype is probably negligible since CO₂ concentrations never reach such high concentration in the wild. It provides however a convenient way to identify infected flies, allowing population-level investigations (Bangham *et al.*, 2008a; Bangham *et al.*,

2008b; Carpenter *et al.*, 2007).

A rough estimate of the overall viral prevalence in *Drosophila melanogaster* has been given by Brun & Plus (1980). They found that among 49 populations originating from Europe, Africa, North and South America, 19 populations were infected by at least one virus (39%). More detailed investigations have been done on sigma virus. The hereditary sigma virus showed a frequency of up to 65% in some French populations (Fleuriet, Periquet, 1993), while a recent study revealed that sigma virus was present in 5 populations out of 12 originating from Greece, UK, Polynesia, USA, Kenya, Spain and Austria, with frequencies reaching 15% (Carpenter *et al.*, 2007). These relatively high frequencies make them potential factors influencing the ecology and evolution of their hosts. It is interesting to note that in the aphid *Acirtosiphon pisum* several maternally transmitted bacterial secondary symbionts (facultative endosymbionts) reach high prevalence (but not fixation) in natural populations (Oliver *et al.*, 2006). The ecological factors explaining their distribution has been elusive for a while. However, it has been shown that the secondary symbionts may increase the fitness of their aphid host in certain environments, because they confer resistance against heat stress, resistance to fungal pathogens, adaptation to host plant or protection against parasitoids (*Hamiltonella defensa*). However, they may be costly under alternative environments (Russell, Moran, 2006; Oliver *et al.*, 2007), providing an explanation for their intermediate frequencies. In addition, secondary symbionts may benefit from natural horizontal transfer for instance during copulation (Moran *et al.* 2006), favouring the spread of infection and the occurrence of co-infection. There is evident similarities between both model systems (aphid secondary symbionts and *Drosophila* viruses) and we can ask whether some of these viruses have anything to do with the adaptation of *Drosophila* to their local environment, and especially to the presence of parasitoids. On this scale, it is interesting to note that the protective effect conferred by *Hamiltonella defensa* to its aphid host is probably caused by the

presence of specific toxins encoded by its bacteriophage (Degnan, Moran, 2008).

It is clear that the parasitoids attacking *Drosophila* species have received much less attention than *Drosophila*. To our knowledge, the only virus described to date in *Drosophila* parasitoid is LbFV, apart from virus-like particles (VLPs) that may have a viral evolutionary origin. We argue that this apparent asymmetry between *Drosophila* and their parasitoids is probably a sampling bias, and we suspect that several other parasitoid viruses will be described in the near future. New molecular tools that are now available, especially high throughput sequencing (Marioni *et al.*, 2008; Vera *et al.*, 2008) allowing for metagenomic analysis (Cox-Foster *et al.*, 2007), will provide evidence of new infectious and/or heritable viruses in parasitoids. We can mention that another RNA virus have been fortuitously discovered in the Lepidoptera parasitoid wasp *Venturia canescens*, using transcriptomic analysis exactly the same way as was discovered the *Drosophila* Nora virus (Reineke, Asgari, 2005). Finally it has been recently found that bacterial symbiont can confer protection against virus infection, suggesting possible interactions between virus and bacterial endosymbiont (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008). This result is particularly interesting since the phylogeny of *Leptopilina* species reveals that all *Leptopilina* species are infected by the endosymbiont *Wolbachia* (see chapter X), at the exception of *L. boulardi* where was found the manipulating virus (Allemand *et al.*, 2002).

9-CONCLUSION

Viruses are ubiquitous. The *Drosophila*-parasitoids community is not an exception and several (RNA) viruses infecting *Drosophila* species have been identified and we discovered a probably DNA virus in the parasitoid wasp *Leptopilina*. We suspect that new viruses will be discovered in the near future especially in parasitoids because the sampling effort have been low up to now. Viruses may reach high prevalence in natural populations and are thus

important players in the ecology and evolution of their hosts and on host-parasitoid interactions. Their possible ecological and evolutionary implications is illustrated by the LbFV/parasitoid interaction. Indeed, this virus specifically affects a critical foraging component of the wasp (superparasitism), allowing the virus to be horizontally transferred and to spread within wasp population, reaching high frequencies. The behaviour of most of the females of a population may then be deeply modified. This indirectly selects for different superparasitism strategies in uninfected females (part 3), and also for higher investment in the egg-load of infected females (part 5). Because both the virus and the parasitoid share some fitness components due to vertical transmission, specific parasitoid virus combination may be the target of selection, possibly leading to co-adaptation and evolutionary innovation. From this respect, the discovery of LbFV may provide insights into the symbiogenesis at the origin of polydnviruses that protect parasitoids from the host immune response. Future investigations will target the molecular mechanisms allowing it to maintain in wasp populations (superparasitism manipulation), the genetical response of their hosts and the ecological consequences on interspecific interactions.

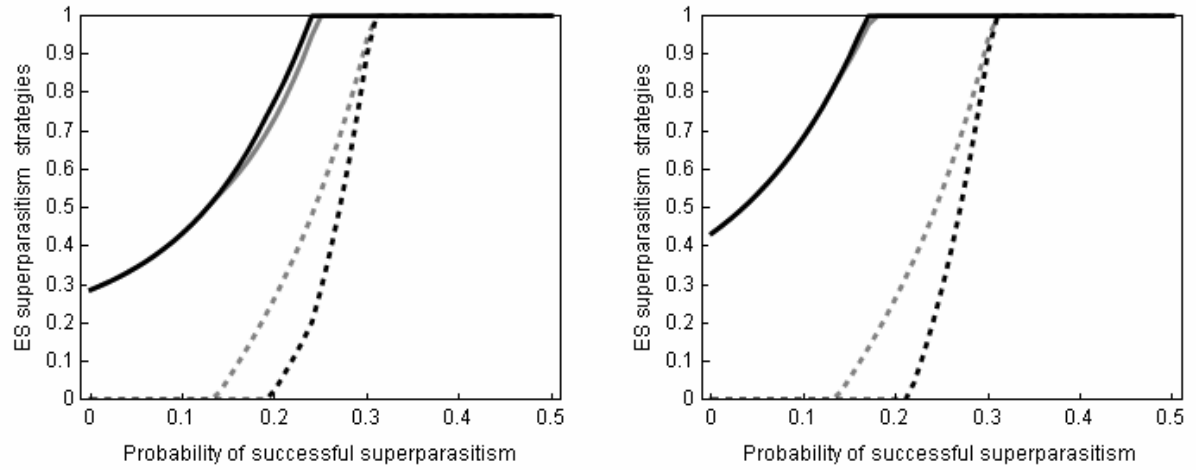


FIGURE 1: Evolutionarily stable superparasitism strategies of the virus (*solid lines*) and the parasitoid (*dotted lines*) versus the probability of successful superparasitism. In (a) $\epsilon=0$, in (b) $\epsilon=0.1$. The gray lines indicate a situation where the parasitoid does not coevolve with the virus. The black lines indicate the coevolutionary stable strategies of the virus and the parasitoid. Parameter values: $d=0.2; e=0.2; m=0.1; t_1=0; t_2=0.1; a=0.01; x_{tot}=100; t_v=0.95; t_h=0.75; e_{max}=15$.

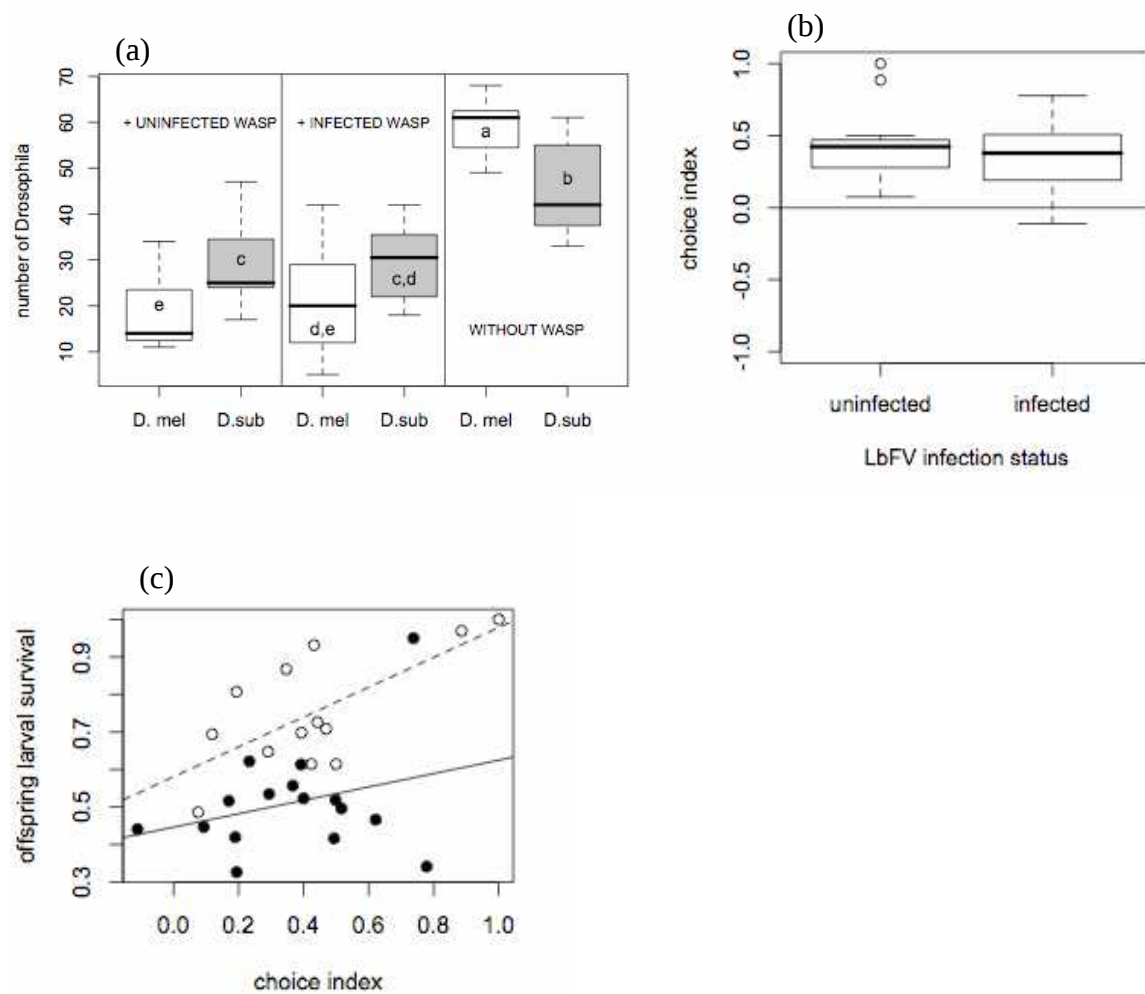


Figure 2 Host choice in *Leptopilina boulardi* and effect of LbFV: (a) Number of *Drosophila* emerging from vials containing initially 75 eggs of *D. melanogaster* and 75 eggs of *D. subobscura*. (b) Choice index: negative values indicate preference for *D. subobscura*, whereas positive values indicate preference for *D. melanogaster* (c) Relation between host choice and offspring survival.

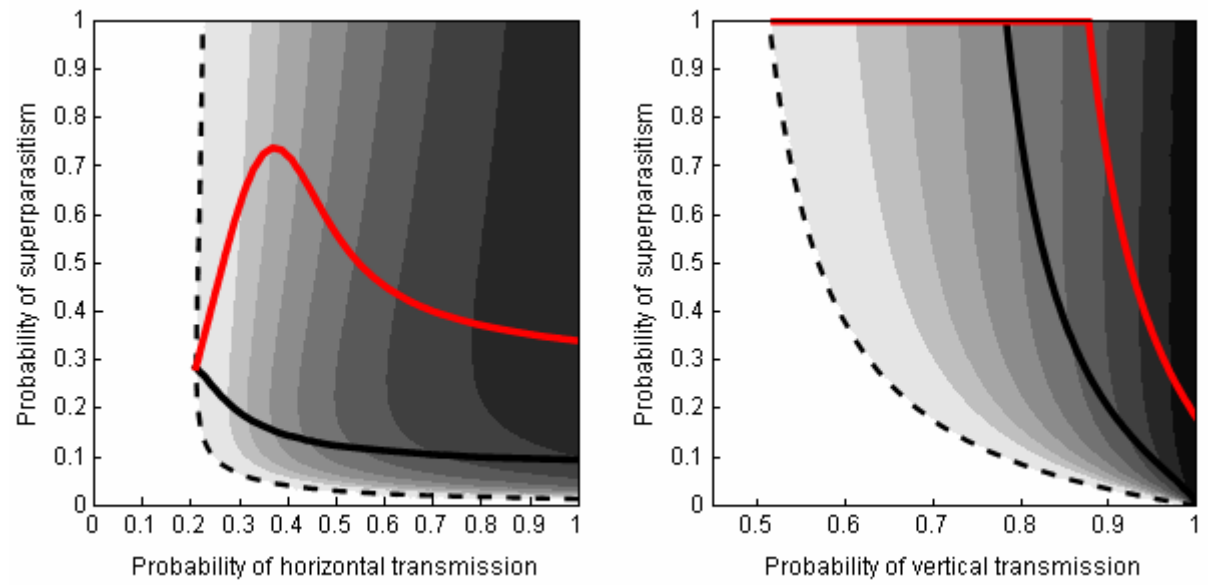


figure 3: (a) ESS of superparasitism for the virus in function of th (b) ESS of superparasitism for the virus in function of tv

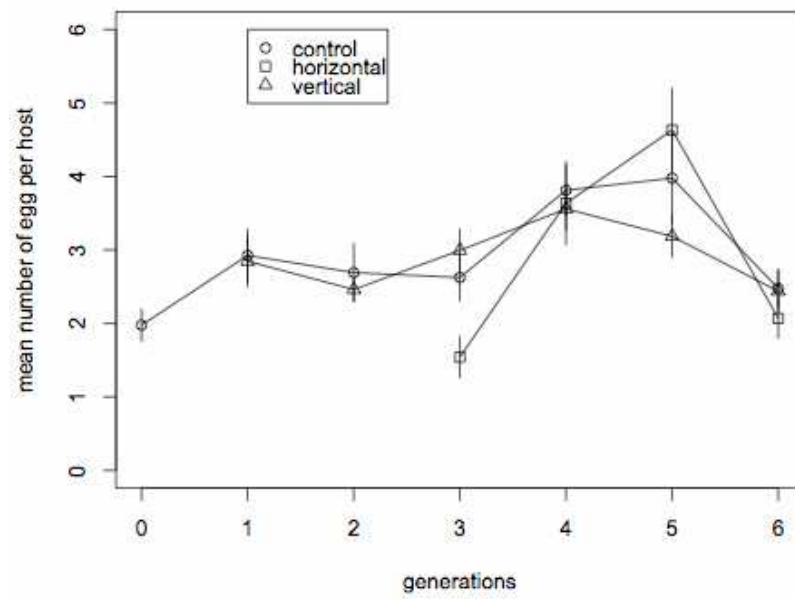


figure 4: Experimental evolution of the intensity of the manipulation induced by LbFV.

	LbFV effect	refs
physiology	survival	0
	size	-2%
	development speed	+3%
	egg-load	+11%
	sex-ratio	0%
	locomotor activity	-45%
behaviour	superparasitism	+++
	circadian rhythm	0%
	perception of host odours by females	0%
	female searching paths	0%
	female inter-specific discrimination	0%
	male detection of pheromones	0%

Table 1 : Effect of LbV on several general traits and behavioural traits. 1: Varaldi *et al.*, 2005a; 2: Varaldi *et al.*, 2006a; 3: Varaldi *et al.*, 2003; 4: this study.

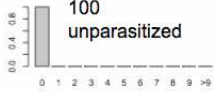
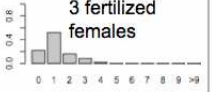
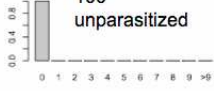
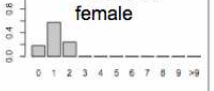
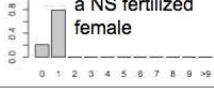
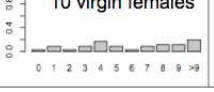
	hosts	wasps	N lines	Tests per line
control	 100 unparasitized	 3 fertilized females	10	2
vertical	 100 unparasitized	 1 fertilized female	30	1
horizontal	 60 parasitized by a NS fertilized female	 10 virgin females	8	2

table 2: Description of the experimental setup. In each cell is indicated the frequency distribution of wasp eggs inside *Drosophila* larvae (left column: before infected wasp(s) were added, right column: after infected wasp(s) were removed).

Table 3: Viruses infecting *Drosophila* species.

1: Landès-Devauchelle *et al.* 1995 ; 2: Shwed *et al.*, 2002; 3: Chung *et al.*, 1996; 4: Johnson, Christian, 1998; 5: Plus *et al.*, 1976; 6: Habayeb *et al.*, 2007; 7: Plus *et al.* 1981 ; 8 : López-Ferber *et al.*, 1989 ; 9 : Fleuriet 1981a ; 10 : Fleuriet 1981b ; 11: Teninges *et al.* 1979 ; 12 : Thomas 1974, 13 : Gomariz-Zilber 1993, 14 : Jousset, Plus, 1975; 15 David & Plus 1971 ; 16: Brun & plus 1980 ; 17: Fleuriet, Periquet, 1993; 18 : Louis *et al.*, 1988

virus	host	genome structure	family	genome sequence	ref genome	H	V	transmission	effects	refs effects	prevalences	ref prev
Sigma	D.melanogaster	ssRNA-	rhabdoviridae	6477bp incomplete (ref genbank X91062)	1	0	1	vertical through male and female gametes (meiotic distorter)	no effect on fertility, female longevity, sexual selection and egg viability; reduced survival of eggs and overwintering survival (and CO2 sensitivity)	9,1	up to 60%	17
DXV	D.melanogaster	dsRNA	birnaviridae	6603bp (in 2 segments, ref genbank NC_004177, NC_004169)	2,3	1	0	horizontal (contact) apparently not vertical	anoxia sensitivity reduction in survival (sometimes asymptomatic)	11	never observed under natural conditions	
virus C	D. melanogaster specific (16)	ssRNA	Dicistroviridae (picornavirus-like superfamily)	9264bp ref genbank NC_001834	4	1	0	horizontal by feeding (adults or larvae)	positive (larval mortality but adults have more ovarioles, developmental duration shorter, females more heavy). Very pathogenic when injected.	12,13, 14	6 populations infected out of 49	16
virus P	D.melanogaster	ssRNA	picornavirus-like superfamily	?	5	1	1	horizontal by contact and ingestion and vertical by young females	fitness reduction (survie, egg-laying)	15	?	
virus A	D. mel but not only (16)	ssRNA	picornavirus-like superfamily	?	5	1	1	horizontal by contact and ingestion and vertical by young females	low pathogeny	5	?	
Nora	D.melanogaster	ssRNA	picornavirus-like superfamily	11908bp ref genbank NC_007919	6	0	1	vertical probably	no signs		?	
reovirus F	D. mel but not only (16)	dsRNA?	reovirus	?	7	1	0	horizontal by contact, apparently not vertical	no signs	16	?	
virus G	D. mel but not only (16)	RNA	?	?		1	0	horizontal by contact, apparently not vertical	no signs	16	?	
DSV	D. simulans	dsRNA	reoviridae	around 8410bp (at least 8 segments)	8	0	1	hereditary mainly maternal	modification of cuticule (bristle) negative effects on fitness	18	?	
Iota virus	D. immigrans	RNA	picornavirus-like superfamily	?		0	1	transovarian	no signs. Induce CO2 sensitivity in D. mel	16	up to 100%	16
RS virus	D.ananassae D. montium	?	?	?				?	?	16	?	

References

- Allemand R, Lemaitre C, Frey F, *et al.* (2002) Phylogeny of six African *Leptopilina* species (Hymenoptera : Cynipoidea, Figitidae), parasitoids of *Drosophila*, with description of three new species. In: *Ann Soc Entomol Fr*, pp. 319-332.
- Asling B, Dushay MS, Hultmark D (1995) Identification of early genes in the *Drosophila* immune response by PCR-based differential display: the Attacin A gene and the evolution of attacin-like proteins. In: *Insect Biochem Mol Biol*, pp. 511-518.
- Bangham J, Kim KW, Webster CL, Jiggins FM (2008a) Genetic variation affecting host-parasite interactions: different genes affect different aspects of sigma virus replication and transmission in *Drosophila melanogaster*. In: *Genetics*, pp. 2191-2199.
- Bangham J, Knott SA, Kim KW, Young RS, Jiggins FM (2008b) Genetic variation affecting host-parasite interactions: major-effect quantitative trait loci affect the transmission of sigma virus in *Drosophila melanogaster*. In: *Mol Ecol*, pp. 10.1111/j.1365-1294X.2008.03873.x.
- Bezier A, Annaheim M, Herbinier J, *et al.* (2009) Polydnaviruses of Braconid Wasps Derive from an Ancestral Nudivirus. In: *Science*, pp. 926-930.
- Brun P, Plus N (1980). The viruses of *Drosophila*, 2d. In: *The Genetics and Biology of Drosophila* (eds Ashburner M, Wright TRF). Academic Press, London.
- Carpenter JA, Obbard DJ, Maside X, Jiggins FM (2007) The recent spread of a vertically transmitted virus through populations of *Drosophila melanogaster*. In: *Mol Ecol*, pp. 3947-3954.
- Chung HK, Kordyban S, Cameron L, Dobos P (1996) Sequence analysis of the bicistronic *Drosophila* X virus genome segment A and its encoded polypeptides. In: *Virology*, pp. 359-368.

- Cox-Foster DL, Conlan S, Holmes EC, *et al.* (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. In: *Science*, pp. 283-287.
- David J & Plus N (1971). Le virus P de la drosophile : comparaison de la longévité et de la fécondité des mouches infectées par injection ou par contamination naturelle. *Ann. Institut Pasteur* 120, 107-119.
- Degnan PH, Moran NA (2008) Diverse phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. In: *Appl Environ Microbiol*, pp. 6782-6791.
- Dubuffet A, Alvarez CI, Drezen JM, Van Alphen JJM, Poirie M (2006) Do parasitoid preferences for different host species match virulence? In: *Physiol Entomol*, pp. 170-177.
- Dupas S, Brehelin M, Frey F, Carton Y (1996) Immune suppressive virus-like particles in a *Drosophila* parasitoid: significance of their intraspecific morphological variations. In: *Parasitology*, pp. 207-212.
- Espagne E, Dupuy C, Huguet E, *et al.* (2004) Genome sequence of a polydnavirus: insights into symbiotic virus evolution. In: *Science*, pp. 286-289.
- Ewald PW (1987) Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. In: *Ann N Y Acad Sci*, pp. 295-306.
- Fleuriet A (1981a) Comparison of various physiological traits in flies (*Drosophila melanogaster*) of wild origin, infected or uninfected by the hereditary rhabdovirus sigma. *Archives of Virology*, 69, 261–272.
- Fleuriet A (1981b) Effect of overwintering on the frequency of flies infected by the rhabdovirus sigma in experimental populations of *Drosophila melanogaster*. *Archives of Virology*, 69, 253–260.
- Fleuriet A, Periquet G (1993) Evolution of the *Drosophila melanogaster* -sigma virus system in natural populations from Languedoc (southern France). In: *Arch Virol*, pp. 131-143.

- Gandon S (2005) Parasitic manipulation: a theoretical framework may help. In: *Behav Processes*, pp. 247-248.
- Gandon S, Rivero A, Varaldi J (2006) Superparasitism evolution: Adaptation or manipulation? In: *Am Nat*, pp. E1-E22.
- Glatz RV, Asgari S, Schmidt O (2004) Evolution of polydnaviruses as insect immune suppressors. In: *Trends Microbiol*, pp. 545-554.
- Gomariz-Zilber E & Thomas-Orillard M (1993). *Drosophila C virus and Drosophila hosts : a good association in various environments. J. Evol. Biol.* 6 : 677-689.
- Gratz NG (2004) Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. In: *Med Vet Entomol*, pp. 215-227.
- Habayeb MS, Ekengren SK, Hultmark D (2006) Nora virus, a persistent virus in *Drosophila*, defines a new picorna-like virus family. In: *J Gen Virol*, pp. 3045-3051.
- Habayeb MS, Ekengren SK, Hultmark D (2007) Nora virus, a persistent virus in *Drosophila*, defines a new picorna-like virus family. In: *J Gen Virol*, p. 3493.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN (2008) *Wolbachia* and virus protection in insects. In: *Science*, p. 702.
- Johnson KN, Christian PD (1998) The novel genome organization of the insect picorna-like virus *Drosophila C virus* suggests this virus belongs to a previously undescribed virus family. In: *J Gen Virol*, pp. 191-203.
- Jousset FX, Plus N (1975) [Study of the vertical transmission and horizontal transmission of "*Drosophila melanogaster* " and "*Drosophila immigrans*" picornavirus (author's transl)]. In: *Ann Microbiol (Paris)*, pp. 231-249.
- Koonin E, Wolf Y, Nagasaki K, Dolja V (2008) The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. In: *Nat Rev Microbiol*, pp. 925-939.

- L'Heritier PH, Teissier G (1937) Une anomalie physiologique héréditaire chez la *Drosophile*.
In: C. R. Acad.Sci. Paris. 206, 1683-1685.
- Landès-Devauchelle *et al.* (1995) Gene 2 of the sigma rhabdovirus genome encodes the P protein, and gene 3 encodes a protein related to the reverse transcriptase of retroelements *Virology*, vol. 213 (2) pp. 300-12
- Lapointe R, Tanaka K, Barney WE, *et al.* (2007) Genomic and morphological features of a banchine polydnavirus: comparison with bracoviruses and ichnoviruses. In: *J Virol*, pp. 6491-6501.
- Lipsitch M, Nowak MA, Ebert D, May RM (1995) The population dynamics of vertically and horizontally transmitted parasites. In: *Proc Biol Sci*, pp. 321-327.
- Lipsitch M, Siller S, Nowak MA (1996) The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. In: *Evolution*, pp. 1729-1741.
- López-Ferber M, Veyrunes JC, Croizier L (1989) *Drosophila* S virus is a member of the Reoviridae family. In: *J Virol*, pp. 1007-1009.
- Louis C, Lopez-Ferber M, Comendador M, *et al.* (1988) *Drosophila* S virus, a hereditary reolike virus, probable agent of the morphological S character in *Drosophila simulans*. In: *J Virol*, pp. 1266-1270.
- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y (2008) RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. In: *Genome Res*, pp. 1509-1517.
- Minchella DJ (1985) Host life history variation in response to parasitism. *Parasitology* 90:205-216.
- Moran NA & Dunbar HE (2006) Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. In: *Proc Natl Acad Sci USA* vol. 103 (34) pp. 12803-6

- Oliver K, Campos J, Moran N, Hunter M (2007) Population dynamics of defensive symbionts in aphids. In: *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, pp. 293-299.
- Oliver KM, Moran NA, Hunter MS (2006) Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. In: *Proc Biol Sci*, pp. 1273-1280.
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 1803-1807.
- Patot S, Lepetit D, Charif D, Varaldi J, Fleury F. Molecular detection, penetrance and transmission of an inherited virus responsible for a behavioral manipulation of an insect parasitoid. *Appl Environ Microbiol* (2009) vol 75, 3, 703-710.
- Pannebakker BA, Garrido NRT, Zwaan BJ, van Alphen JJM (2008) Geographic variation in host-selection behaviour in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina clavipes*. In: *Entomol Exp Appl*, pp. 48-54.
- Plus N, Croizier G, Veyrunes JC, David J (1976) A comparison of buoyant density and polypeptides of *Drosophila* P, C and A viruses. In: *Intervirology*, pp. 346-350.
- Plus, N., Gissman, L., Veyrunes, J. C., Pfister, H. & Gateff, E. (1981) Reoviruses of *Drosophila* and *Ceratitis* populations and of *Drosophila* cell lines : a new genus of the Reoviridae family. *Annales de Virologie* (Institut Pasteur) 132E, 261-270.
- Poulin R (1995) "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. In: *Int J Parasitol*, pp. 1371-1383.
- Reineke A, Asgari S (2005) Presence of a novel small RNA-containing virus in a laboratory culture of the endoparasitic wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). In: *J Insect Physiol*, pp. 127-135.
- Rizki RM, Rizki TM (1990) Parasitoid virus-like particles destroy *Drosophila* cellular immunity. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, pp. 8388-8392.

- Rosenheim, J. A. (1996) An evolutionary argument for egg limitation. In: *Evolution* 50:2089–2094.
- Russell JA, Moran NA (2006) Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. In: *Proc Biol Sci*, pp. 603-610.
- Shwed PS, Dobos P, Cameron LA, Vakharia VN, Duncan R (2002) Birnavirus VP1 proteins form a distinct subgroup of RNA-dependent RNA polymerases lacking a GDD motif. In: *Virology*, pp. 241-250.
- Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M (2008) The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila Drosophila*. In: *PLoS Biol*, pp. 2753-2763.
- Teninges D, Ohanessian A, Richard-Molard C, Contamine D (1979). Isolation and Biological Properties of *Drosophila* X Virus. *J. Gen. Virol.* 42, 241-254
- Thomas M (1974). Contribution à l'étude du déterminisme du nombre d'ovarioles et de quelques autres caractères quantitatifs chez *Drosophila melanogaster* Meigen. Thesis, University Paris VI.
- Tracy Reynolds K, Hardy IC (2004) Superparasitism: a non-adaptive strategy? In: *Trends Ecol Evol (Amst)*, pp. 347-348.
- van Alphen JJ, Visser ME (1990) Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. In: *Annu Rev Entomol*, pp. 59-79.
- van Lenteren JC, Ruschioni S, Romani R, *et al.* (2007) Structure and electrophysiological responses of gustatory organs on the ovipositor of the parasitoid *Leptopilina heterotoma*. In: *Arthropod structure & development*, pp. 271-276.
- Varaldi J, Boulétreau M, Fleury F (2005a) Cost induced by viral particles manipulating superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. In: *Parasitology*, pp. 161-168.

- Varaldi J, Fouillet P, Boulétreau M, Fleury F (2005b) Superparasitism acceptance and patch-leaving mechanisms in parasitoids: a comparison between two sympatric wasps. In: *Anim Behav*, pp. 1227-1234.
- Varaldi J, Fouillet P, Ravallec M, *et al.* (2003) Infectious behavior in a parasitoid. In: *Science*, p. 1930.
- Varaldi J, Petit S, Boulétreau M, Fleury F (2006a) The virus infecting the parasitoid *Leptopilina boulardi* exerts a specific action on superparasitism behaviour. In: *Parasitology*, pp. 747-756.
- Varaldi J, Ravallec M, Labrosse C, *et al.* (2006b) Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. In: *J Insect Physiol*, pp. 1202-1212.
- Varaldi J, Gandon S, Rivero A, Patot S, and Fleury F (2006c) A newly discovered virus manipulates superparasitism behavior in a parasitoid wasp, p. 119–139. In K. Bourtzis and T. A. Miller (ed.), *Insect symbiosis*, vol. 2. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Vera JC, Wheat CW, Fescemyer HW, *et al.* (2008) Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. In: *Mol Ecol*, pp. 1636-1647.