HAL
open science

Effet de l'écologie d'un hôte sur l'évolution de son principal parasitoïde

Emilie Dion

To cite this version:

Emilie Dion. Effet de l'écologie d'un hôte sur l'évolution de son principal parasitoïde. Evolution [q-bio.PE]. Agrocampus - Ecole nationale supérieure d'agronomie de rennes, 2011. Français. NNT : . tel-00677607

HAL Id: tel-00677607

https://theses.hal.science/tel-00677607v1

Submitted on 8 Mar 2012

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.

N° Ordre : 2011-13
N° Série : A-68

THESE / AGROCAMPUS-OUEST
Sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne

Pour obtenir le diplôme de :
DOCTEUR DE L'INSTITUT SUPERIEUR DES SCIENCES AGRONOMIQUES, AGRO-ALIMENTAIRES, HORTICOLES ET DU PAYSAGE

Spécialité : Biologie et Agronomie
Ecole Doctorale : VIE-AGRO-SANTE

Présentée par
Emilie DION

EFFET DE L'ECOLOGIE D'UN HÔTE SUR L'EVOLUTION DE SON PRINCIPAL PARASITOÏDE

Préparée au sein de l'équipe 'Biologie et génétique des populations d'insectes'
UMR 1099 INRA-Agrocampus-Ouest-Université de Rennes1 Bio3P

Soutenue le 31 Mai 2011, devant la commission d'examen constituée de :

Xavier FAUVERGUE	CR, INRA-CNRS-Univ. Nice Sophia-Antipolis	Rapporteur
Fabrice VAVRE	DR, CNRS Univ. Claude Bernard-LYON1	Rapporteur
Thierry RIGAUD	DR, CNRS Univ. De Bourgogne-Dijon	Examinateur
Marylène POIRIE	PR, INRA-CNRS-Univ. Nice Sophia-Antipolis	Examinateur
Michel GAUTIER	PR, Agrocampus-Ouest-Rennes	Examinateur
Yannick OUTREMAN	MC, Agrocampus-Ouest-Rennes	Directeur
Jean-Christophe SIMON	DR, INRA-Agrocampus-Ouest-Univ. Rennes1	Directeur

THESE
présentée à AGROCAMPUS-OUEST

Pour obtenir le diplôme de :
Docteur de l'Institut Supérieur des Sciences Agronomiques, Agro-alimentaires, Horticoles et du Paysage

Spécialité : Biologie et Agronomie
Ecole Doctorale : Vie-Agro-Santé

Par
Emilie DION

EFFET DE L'ECOLOGIE D'UN HÔTE SUR L'EVOLUTION DE SON PRINCIPAL PARASITOÏDE

Préparée au sein de l'équipe 'Biologie et génétique des populations d'insectes'
UMR 1099 INRA-Agrocampus-Ouest-Université de rennes1 Bio3P

Mai 2011, devant la commission d'examen constituée de :

Xavier FAUVERGUE	CR, INRA-CNRS-Univ. Nice Sophia-Antipolis	Rapporteur
Fabrice VAVRE	DR, CNRS Univ. Claude Bernard-LYON1	Rapporteur
Thierry RIGAUD	DR, CNRS Univ. De Bourgogne-Dijon	Examinateur
Marylène POIRIE	PR, INRA-CNRS-Univ. Nice Sophia-Antipolis	Examinateur
Michel GAUTIER	PR, Agrocampus-Ouest-Rennes	Examinateur
Yannick OUTREMAN	MC, Agrocampus-Ouest-Rennes	Directeur
Jean-Christophe SIMON	DR, INRA-Agrocampus-Ouest-Univ. Rennes1	Directeur

Merci…

Une thèse implique une succession d'événements majeurs qui bousculent la vie. Vous y avez tous participé, parfois involontairement, parfois de votre plein gré. Vous m'avez soutenue, encouragée, et donnée un bon coup de pied où il faut quand c'était nécessaire. Ce travail ne serait rien sans votre soutien. Alors, quand vient le temps des remerciements, une multitude de noms se bouscule dans ma tête.

Ce travail a été réalisé au sein de l'UMR BiO3P du Rheu, et au laboratoire ESP à Agrocampus Rennes. Je tiens par conséquent à remercier les directeurs successifs de l'UMR, Didier Andrivon et Jean-Christophe Simon, ainsi que Dominique Ombredane, responsable de ESP, qui m'ont accueillie et m'ont permis de bénéficier d'un environnement de travail riche, agréable et dynamique.

J'adresse ensuite mes remerciements à Xavier Fauvergue, Fabrice Vavre, Thierry Rigaud, Marylène Poirié et Michel Gautier qui ont accepté d'être les membres de mon Jury de thèse et d'évaluer ce travail.

Un grand merci également aux membres de mon comité de thèse, Jacques Van Alphen, Eric Petit, Manuel Plantegenest, Marylène Poirié, Yvan Rahbé et Solenn Stoeckel, pour leur précieux conseils et éclaircissement. A chacun des comités, je suis ressortie motivée grâce à vous.

J'adresse à présent mes plus vifs et sincères remerciements à Yannick Outreman et Jean-Christophe Simon, mes directeurs de thèse. Tant du point de vue scientifique que humain, j'ai vraiment apprécié de travailler avec vous durant ces années. Vos grandes qualités m'on amené chaque fois à plus de rigueur et de précision dans mon travail et à construire mon raisonnement. Certes, ce ne fut pas facile tous les jours (surtout quand tu m'as avouée, Yannick, que tu avais aimé le film *Tigre et Dragon* ! Fichtre j'ai du mettre des semaines à m'en remettre…) mais grâce à vous, j'ai beaucoup grandi (et non, pas en taille, Jean-Christophe !) et surtout acquis de l'autonomie.

Je dois un grand remerciement aux étudiantes que j'ai co-encadré : Juliane Casquet, Flore Zélé et Sarah Polin. Sans vous, tout ceci n'existerait pas. J'espère avoir pu répondre présent vous en aviez besoin et vous motiver quand vous ne l'étiez plus. Bon vent à vous les filles !

J'ai eu la chance de côtoyer au quotidien de nombreuses personnes dont l'expérience m'a permis d'élargir mes connaissances et d'améliorer mon travail. Merci donc à :

*Bernard Chaubet, charmeur de guêpes à l'accent chantant (je sais que tu peux les faire voler en rond dans le sens des aiguilles d'une montre à la voix, et que si tu descends d'une octave, alors là elles se mettent à voler dans le sens inverse…). Merci sincèrement pour ton aide aux échantillonnages, aux élevages, à la détermination et pour ta gentillesse.

*Lucie Mieuzet. Merci pour ton aide en sourires sur les expérimentations de biologie moléculaire. Robot, plaques 384, pipette multicanal multidistributrice automatique avec airbags de série, GPS intégré et convecteur temporel... pfff trop facile, grâce a toi ! Au fait, j'ai reçu une nouvelle paire d'amorces à tester... Ne fais pas cette tête là, je suis sûre qu'au bout de la 200ème fois, ça va fonctionner !

*Julie Jaquiery. Tu as illuminé mon chemin en analyse de données de génétique des populations. Merci pour ta patience, surtout quand je débarquais toutes les 10 minutes pour une question stupide *(« bah ouais mais là Fstat, il veut pas ouvrir mon fichier, j'comprends paaaaaas »*).

*Caroline Anselme. « *boah ça fera juste une quinzaine de plaques, je te fais ça en 2 petites heures, entre deux cours ou sinon la nuit prochaine !*». Merci pour ton aide et tout le boulot que tu as abattu concernant le venin. A chacune de nos discussions, j'ai été motivée par ton enthousiasme à toute épreuve et ton dynamisme.

*Marylène Poirié. Merci pour cette collaboration que nous avons pu mettre en place et qui, j'en suis sure, perdurera. Merci aussi pour vos encouragements et votre gentillesse.

*Francisca Zepeda. J'espère que les *Aphidius* chiliens répondront à tes questions. Malgré certaines difficultés de langage parfois, nos discussions m'ont beaucoup encouragée.

*Anne Le Ralec et Manuel Plantegenest, pour toutes nos discussions parasitoïdes et les idées qui en ont émergé.

Je remercie enfin l'ensemble des membres de l'UMR, et de l'équipe insectes en particulier, pour la très bonne ambiance qui y règne. Les pauses café sont célèbres pour leur niveau de réflexion et leur bon goût. Je ne doute pas une seconde que vous perpétuerez la tradition à travers l'humour fin et délicat qui vous caractérise. Je n'oublie pas non plus les membres d'ESP, où l'ambiance est tout aussi conviviale et sympathique (un jour, je les aurai mes poules, Isabelle, un jour…).

J'ai aussi une pensée pour mes voisins de l'équipe ADSL et plus particulièrement Bruno, Géraldine, Patricia, Jean-Marie, Dominique, Anne-Sophie et Régis. Votre gentillesse, votre disponibilité, votre bonne humeur et votre humour ont été de chauds rayons de soleil. Gégé et Patricia, vous avez pris soin de moi avec de la tendresse, vraiment vous êtes des amours.

Je remercie spécialement tous les thésards que j'ai pu côtoyer au cours de ces années, notamment Gaël (incroyable mais néanmoins extraordinaire patron de la basse cour), Morgane, Julie Biloute, Christelle (une petite baguette apéro ce midi, les filles ? Ou une crêperie peut être ?), Aurore (je te passe le relai…), Jean, Virgil, Laure, Aude, Prisca, Céline, Stéphane, Stephaniya, Mamadou, Alexander, Muriel, Melen, Benjamin, Charline…
Je pense aussi à quelques escl… heu… stagiaires, qui sont Pierre et Chloé. Vous êtes mes derniers co-locataires, et vous avez vraiment contribué à rendre plus légère cette période de rédaction difficile. Alors merci pour toutes les batailles de yaourts et les dénonciations abusives. Et puis un conseil : arrêtez donc les bêtises. Intervertir les touches du clavier, ou agrafer tous les documents du bureau en farandole franchement… Vous êtes des petits joueurs !

J'en viens à présent à des remerciements plus personnels car trois ans de thèse, c'est aussi de nombreuses nouvelles amitiés.

Très chers Lucie, Marie, Yann. Je vous salue, ô grands maîtres du jeu. Je n'oublierais pas ces parties endiablées et passionnées de QPUC, toujours dans la convivialité (« *Ben Affleck, Aller Ben Affleck, mais c'est Ben Affleck je te dis, mais merde BEN AFFLECK A LA FIN JE TE DIS QUE C'EST CA ! Et voilà, on a perdu sur la vitesse, grrr super, bravo, à cause de toi on passe 3ème alors qu'on aurait pu être premier, non mais trop nul franchement* !») ou de TLMVPSP, souvent avec enthousiasme (« *Litterature Russe… pfff… bah carré alors…* »). Merci

vraiment à vous trois pour tout ce que nous avons vécu ensemble. Tous nos fous rires, discussions profondes ou complètement superficielles, nos repas animés (souris d'agneau de 7h ou lapin au micro-onde ce midi ?), resterons de supers moments. Ne changez rien les loulous, vous êtes les meilleurs ! J'espère que nous nous reverrons à Poule-au-pot ou à Bourre-la-reine…

Stéphane et Amélie, merci pour votre gentillesse et votre humour. Vous m'avez accueillie à bras ouvert et avec le sourire à chaque fois que j'avais besoin de me plaindre. Je n'oublierai pas les prouesses dont vous êtres capables avec vos petits doigts (jeux vidéos + fondant au chocolat enfin !), et les soirées animées que nous avons passées.

Julie, Mo, Chrichri, nous avons beaucoup partagé, souvent nos déboires. Merci pour vos soutiens sans faille et vos conseils.

Nico, Cécile, Jean-François, votre sympathie qui m'a été très rafraichissante. Merci à vous, et vive les tomates, j'ai envie de dire…

Il y a aussi tous ceux qui m'ont rappelé qu'après le boulot, il y a une vie (si si !).

Je remercie d'abord les Kenshis, les anciens de la promo kyuguillot inclus, pour tout ce que nous avons vécu ensemble. Serge, merci de m'avoir accueillie dans le club. Vous êtes et resterez mon Sensei. Merci à toi Seb pour m'avoir fait aimer le Kendo, et à Fred, Jacques, Eric, et tous les autres pour ces moments géniaux. Un merci particulier à Jenny, pour ces douches torrides oouuuu grrrrr... Grâce à vous tous, j'ai pu assumer mon côté sado-masochiste, car, il faut bien le dire, le Kendo, ce n'est pas pour les fillettes. Merci de m'avoir tirée du bureau pour faire tant de rencontres, et d'avoir accepté mes motivations à pratiquer aléatoires, trop souvent dépendantes des satisfactions ou des déceptions professionnelles.

Quoi qu'il en soit, n'oubliez pas mes amis :

*"Well, that's no ordinary **rabbit**! That's the most foul, cruel, and bad-tempered you ever set eyes on! Look, that **rabbit**'s got a vicious streak a mile wide! It's a killer!"* (Monty Python and the Holy Grail, 1975). Je vous laisse méditer ça, et on en reparlera quand votre Lapin sera 8ème Dan (grade obtenu à l'aide de mon seul talent, et non par l'intervention de je ne sais quel vieux sensei japonais gâteux mais néanmoins alerte, Jacques).

Membres de la SailorProd, je ne vous oublie pas. Tiphaine, Gale, Adi, Marie et les autres, vous avez toujours répondu présents, même lors des phases critiques. Pardon pour mon silence alors que j'étais noyée dans le travail. Mon Titi, tu m'as beaucoup manqué, allons vite réparer ça ! Et gare à toi si tu ne viens pas nous visiter dans le grand nord. Gale, nous venons vous rejoindre, affute Bert, ça va découper du tronc. Tu m'as promis une conversation scabreuse tonitruante dans un resto chic. J'arrive.

Bien évidement, je remercie chaleureusement mes parents, qui m'ont toujours soutenue, confiants et optimistes. Je pense aussi à Chewbacca, Albert, Pouillette, Shiro, Emette, Bruno, Iggy et tous les autres… une caresse, une léchouille et c'est reparti !

Enfin, pour terminer en beauté, mes derniers remerciements vont à Ludo.

Tu as changé ma vie.

Ce manuscrit t'est dédié. Voilà

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE.....1

I. Les interactions interspécifiques..... 3

II. Evolution de l'interaction hôte-parasitoïde..... 3

III. L'impact des interactions sur la coévolution 4

IV. La problématique étudiée 4

V. Organisation du document 5

Chapitre 1. CONTEXTE GENERAL.....7

I. L'importance des interactions dans les processus évolutifs 9

1. Un gigantesque réseau d'interactions 9
   - Classification des relations entre les espèces 9
   - Prédation et parasitisme 9
2. La coévolution des systèmes antagonistes 10
   - Une sélection réciproque 10
   - La coévolution entre un hôte et son parasite 10
   - Des parasites 'tueurs' 11
3. Les insectes parasitoïdes 11
   - La diversité des insectes parasitoïdes 11
   - Les parasitoïdes, parasites ou prédateurs ? 11
   - Des modes de reproduction variés..... 13
   - La coévolution hôte-parasitoïde..... 13

II. Ecologie et évolution des interactions hôtes-parasitoïdes 14

1. Stratégie d'évitement et résistance au parasitisme chez les hôtes..... 14
   - Eviter la rencontre avec le parasitoïde 14
   - Eviter l'attaque du parasitoïde..... 15
   - Les coûts des défenses comportementales 17
   - Les défenses immunitaires des hôtes 17
   - Evolution de la résistance des hôtes..... 18
2. Exploitation de l'hôte par le parasitoïde..... 19
   - Les stratégies d'exploitation des hôtes par les parasitoïdes adultes..... 19
   - Les stratégies d'exploitation des hôtes par la larve parasitoïde..... 21
   - Les facteurs de virulence..... 22
   - Evolution de la virulence des parasitoïdes..... 23

III. Les hôtes et leur réseau d'interactions.....24

1. Interaction de l'hôte avec sa plante..... 24

De la spécialisation alimentaire à la spéciation 24
Conséquences sur les parasitoïdes : la différenciation associée à l'hôte 26
Un exemple célèbre : le complexe *Rhagoletis pomonella-Diachasma alloeum*. 26
2. Interactions de l'hôte avec des symbiotes 27
Définitions 27
Les symbiotes et l'utilisation de la plante par les insectes phytophages 29
Les symbiotes protecteurs 29
Les symbiotes manipulateurs de la reproduction 30
3. Interactions de l'hôte avec des prédateurs 33
Définition de la prédation 33
Prédateur et compétiteur : la prédation intraguilde 33

IV. Conclusion 36

Chapitre 2. LES MODELES BIOLOGIQUES: LE PUCERON DU POIS *ACYRTHOSIPHON PISUM* – LE PARASITOÏDE *APHIDIUS ERVI* 39

I. L'hôte : le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* 41
1. Généralités : classification, répartition et biologie 41
2. Spécialisation alimentaire, génétique et divergences phénotypiques 43
3. Une riche composition endosymbiotique 44
4. Les moyens de défense du puceron du pois contre les parasitoïdes 44
Eviter la rencontre et éviter l'attaque 45
Les défenses immunitaires 45
La résistance conférée par les symbiotes 45

II. Le parasitoïde *Aphidius ervi* 47
1. Classification 47
2. Ecologie et biologie 48
3. Cycle de vie 48
La ponte d'un œuf : l'oviposition 48
Le développement 48
Le stade adulte 50
4. La virulence chez *A. ervi* 50

Chapitre 3. INFLUENCE DE LA SPECIALISATION D'*A. PISUM* SUR LA STRUCTURE DES POPULATIONS DE PARASITOÏDES 53

I. Spécialisation écologique et génétique de l'hôte 55
1. Objectifs 55
2. Approche et méthode générale 56
Plantes hôtes et régions inspectées 56
Choix des marqueurs génétiques et du type d'analyse 56
3. résultats : génétique des populations d'*A. ervi*- Article 1 57

Chapitre 4. INFLUENCES DES SYMBIOTES SUR L'INTERACTION *A. PISUM - A. ERVI* 79

I. . Influences des symbiotes sur les populations de parasitoïdes 81

1. Objectifs 81
2. Approche et méthode générale 81
3. Evolution de la performance des parasitoïdes – Article 2 82
4. Analyse des facteurs de virulence potentiels..... 95
   - Introduction 95
   - Méthodes..... 95
   - Résultats 96
   - Discussion et conclusion..... 96
5. Evolution des propriétés génétiques des populations sélectionnées-Article 3..... 98

II. Influences des symbiotes sur les comportements des hôtes.....118

1. Objectifs 118
2. Approche et méthode générale 119
3. Résultats : Interaction négative entre les comportements défensifs et la résistance apportée par les symbiotes-Article 4 119

Chapitre 5. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 125

I. *Des femelles Aphidius ervi* homozygotes.....128

1. Introduction d'une diploïdisation par *Wolbachia pipentis*? 128
2. Origine des femelles homozygotes 128

II. *Aphidius ervi* une parasitoïde généraliste disperseur 129

1. Absence d'une spécialisation parasitaire..... 129
   - *A. pisum*, un complexe de 11 races d'hôtes..... 129
   - La dispersion et le spectre d'hôte large d'*A. ervi* limite sa spécialisation 130
2. Perspectives : influence des autres espèces d'hôte d'*A. ervi* et évolution d'un parasitoïde spécialiste..... 130
   - Structure des populations de parasitoïdes issues d'espèces d'hôtes différentes 130
   - Evolution d'une espèce spécialiste 131

III. Les symbiotes, un moteur de diversification 132

1. *H. defensa*, moteur de diversification chez les pucerons 132
   - Des comportements défensifs moindres favorisant le symbiote et son porteur 132
   - Les conséquences sur le parasitoïde 133
   - Quel est le rôle des prédateurs 134
2. *H. defensa*, moteur de diversification chez les parasitoïdes..... 134
   - Le potentiel d'adaptation de parasitoïdes à des hôtes résistants 134
   - Des pressions de sélection diffuses dans le milieu naturel..... 135
   - La résistance dans le spectre d'hôte d'*Aphidius ervi*..... 136
   - Les mécanismes de la virulence d'Aphidius ervi 136

IV. *Aphidius ervi,* bon ou mauvais auxiliaire ? 137

V. Conclusion 138

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....141

FIGURES ET TABLEAUX

Liste des figures :

Figure 1.1. Emission de sécrétions corniculaires chez des pucerons attaqués par un parasitoïde ---------- 16

Figure 1.2. Schéma simplifié de la prédation intraguilde ---------- 34

Figure 2.1. Structure génétique des populations de pucerons du pois ---------- 42

Figure 2.2. Représentation schématique des mécanismes de résistance hypothétiques du puceron du pois ---------- 46

Figure 2.3. Indices de détermination morphologiques d'*Aphidius ervi* ---------- 47

Figure 2.4. Cycle biologique d'*Aphidius ervi* ---------- 49

Figure 2.5. Représentation schématique de la physiologie virulence d'*A. ervi* ---------- 51

Figure 4.1. Déroulement d'évolution expérimental ---------- 82

Figure 4.2. Etapes de la dissection des femelles parasitoïdes ---------- 96

Figure 4.3.Expression relative de *CLC11*, *CLC7* et *YL16* ---------- 97

Figure 5.1. Représentation schématique résumant les principales conclusions et perspectives de ce travail de thèse ----------139

Liste des tableaux

Tableau V.1. Informations sur les introductions d'*Aphidius ervi* ----------138

Les figures et tableaux présentés dans les articles ne sont pas décrits dans cette liste.

INTRODUCTION GENERALE

I. Les interactions interspécifiques

Chaque être vivant est confronté au cours de sa vie à de nombreux facteurs environnementaux qui façonnent ses traits d'histoire de vie, comme sa survie ou sa reproduction. Parmi ces facteurs, les espèces partageant son habitat occupent une place déterminante, l'extrême diversité du monde vivant rendant les possibilités d'interactions interspécifiques immenses (Begon *et al.*, 2006 ; Thomas *et al*., 2010). Ainsi, chaque organisme vit en interaction avec une ou plusieurs espèces et est membre d'un réseau complexe d'interactions. La multiplicité des interactions influencent les traits des organismes, exerçant des pressions de sélection sur ses populations. Chaque espèce étant dépendante de la nature et de la diversité des interactions dans lesquelles elle est impliquée, son évolution est en partie liée aux autres espèces avec lesquelles elle interagit (Thompson, 1994).

Plusieurs types de relations entre espèces existent. Le parasitisme, notamment, est une interaction positive pour l'un des acteurs et néfaste pour l'autre car le parasite tire profit et inflige des coûts à son hôte, sans pour autant en provoquer la mort (Barber *et al*., 2000 ; Combes, 2001). Pourtant, certains parasites infligent à leurs hôtes une mort certaine et programmée. Les insectes parasitoïdes sont les dignes représentants de ces parasites 'tueurs'.

II. Evolution de l'interaction hôte-parasitoïde

Les insectes parasitoïdes sont des espèces dont les femelles pondent à l'intérieur ou à la surface de l'hôte (en général, un autre insecte). La larve se développe en se nourrissant des tissus de son hôte, et l'interaction prolongée conduit à la mort de ce dernier. Le cycle des parasitoïdes est donc caractérisé par l'alternance d'une phase libre adulte de recherche et de sélection de l'hôte, et d'une phase de parasitisme obligatoire des stades immatures. Dans une interaction hôte-parasitoïde, les enjeux pour les antagonistes sont capitaux : un parasitoïde a obligatoirement besoin d'un hôte pour la phase immature de son cycle ; pour l'hôte, l'infestation conduit à sa mort. Le parasitoïde adulte doit donc réussir à pondre dans l'hôte et le parasitoïde immature doit surmonter les résistances de cet hôte pour achever son cycle de développement. A l'inverse, l'hôte doit empêcher la femelle parasitoïde de le parasiter, et/ou lutter contre le parasitoïde immature en place s'il veut survivre (Godfray,

1994). L'étude de l'évolution de ce système hôte-parasitoïde est donc étroitement lié à la compréhension des mécanismes de défenses chez l'hôte et de l'évolution des stratégies parasitaires chez les parasitoïdes. Cette interaction entre le plus souvent dans une dynamique coévolutive, où les différentes stratégies d'attaque peuvent être sélectionnés chez le parasitoïde en réponse aux différentes formes de défenses chez l'hôte.

III. L'impact des interactions sur la coévolution

Dans la littérature, les processus de défense de l'hôte et d'attaque du parasitoïde sont très souvent étudiés dans le cadre d'un face à face entre les deux 'partenaires' (e.g. Kraaijeveld *et al*., 1998 ; Kraaijeveld & Godfray, 2009). Cependant, l'hôte d'un parasitoïde est également le maillon d'un réseau d'interactions interspécifiques : il consomme, il est exposé à des compétiteurs, il peut être la proie d'espèces prédatrices ou héberger des microorganismes. Toutes ces interactions interspécifiques gravitant autour de l'hôte vont affecter ses traits et ses populations. Compte tenu de l'intimité particulière qui caractérise l'interaction hôte-parasitoïde, tout facteur écologique influençant les traits de l'hôte influera les aptitudes du parasitoïde. Le réseau d'interactions d'un insecte hôte aurait dès lors des conséquences profondes sur les populations parasitoïdes.

IV. La problématique étudiée

Ce travail de thèse a pour objectif d'identifier comment l'écologie d'une espèce hôte de parasitoïde, à travers ses relations avec d'autres organismes, affecte les traits d'histoire de vie de ses parasitoïdes et le fonctionnement de leurs populations. Deux points ont été étudiés dans cette thèse : l'influence, sur les populations de parasitoïdes, de la relation entre (1) son insecte hôte et les ressources alimentaires de cet hôte et (2) son insecte hôte et les microorganismes qu'abritent cet hôte. Des travaux récents ont montré l'existence de conditions particulières dans lesquelles des populations d'insectes phytophages peuvent diverger en sympatrie (*e.g.* Peccoud *et al*., 2009a). Par le biais d'un processus de spécialisation alimentaire, on assiste à la formation de races d'hôtes qui engendre des divergences génétiques et phénotypiques profondes dans les populations sympatriques (Drès & Mallet, 2002). La symbiose est, en outre, largement répandue chez les insectes et

des études récentes montrent que certains symbiotes peuvent conférer à l'insecte porteur une résistance aux parasitoïdes (Haine, 2008).

Ce travail de thèse propose ainsi dans un premier temps d'identifier les conséquences évolutives et écologiques d'une spécialisation alimentaire chez les insectes phytophages sur les populations de leurs parasitoïdes. Il s'agit de déterminer si la spécialisation alimentaire chez l'hôte n'aurait pas un effet cascade, c'est-à-dire qu'il pourrait générer une spécialisation parasitaire. Dans un second temps, nous étudierons également l'effet de la présence de microorganismes bactériens conférant une résistance aux parasitoïdes à leur porteur sur l'évolution de l'interaction hôte-parasitoïdes. Plus particulièrement, les conséquences de la résistance apportée par ces bactéries symbiotiques sur l'évolution de la virulence et des propriétés génétiques des populations de parasitoïdes ont été étudiées. L'effet de cette résistance conférée par des bactéries sur l'évolution des défenses de l'insecte porteur a également été abordé.

Dans nos expérimentations, l'insecte hôte considéré est le puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum* et sont principal ennemi naturel, le parasitoïde *Aphidius ervi*. Cet aphide est présent sur les légumineuses cultivées (trèfle, luzerne, pois) et sauvages (genêt à balais, lotier, vesce etc.). Il montre une spécialisation alimentaire sur sa plante et présente des populations génétiquement différenciées. *A pisum* est donc structuré en races d'hôtes, (Peccoud *et al*., 2009a). Cette spécialisation écologique s'accompagne de divergences phénotypiques entre les races et de compositions distinctes en symbiotes secondaires (Frantz *et al*., 2009 ; Kunert *et al*., 2010). Certains *A. pisum* peuvent notamment abriter un symbiote secondaire, *Hamiltonella defensa*, lui conférant une résistance à son principal parasitoïde *Aphidius ervi* (Oliver *et al*., 2003).

V. Organisation du document

Le présent manuscrit s'articule autour de 5 chapitres. Dans le premier chapitre, une synthèse bibliographique identifie l'importance des interactions dans les processus évolutifs, et particulièrement chez les insectes parasitoïdes et leurs hôtes. Dans ce chapitre, les différentes stratégies défensives chez les hôtes et les stratégies parasitaires chez les parasitoïdes sont abordées. Nous décrivons également les différentes travaux portant sur

l'effet du réseau d'interactions d'un insecte hôte sur ses parasitoïdes. Cette partie se termine par le positionnement scientifique de la thèse et ses différents objectifs. Le deuxième chapitre présente les espèces étudiées, le puceron du *pois Acyrthosiphon pisum*, et son parasitoïde, *Aphidius ervi*. Le troisième chapitre traite de l'influence de la spécialisation alimentaire du puceron du pois sur le fonctionnement et l'évolution des populations de parasitoïdes. Le quatrième chapitre présente l'influence de la résistance conférée par les symbiotes de l'hôte sur les populations de parasitoïdes et les comportements de défense des hôtes. Tous les résultats des expérimentations sont présentés sous forme d'articles. L'ensemble de nos résultats est ensuite discuté et replacé dans un contexte plus général dans le cinquième chapitre, avant d'aborder les principales perspectives. Cette conclusion identifie l'apport de ces travaux aussi bien sur l'avancement des connaissances scientifiques que sur le plan appliqué.

Chapitre 1

CONTEXTE GENERAL

I. L'importance des interactions dans les processus évolutifs

1. Un gigantesque réseau d'interactions

Classification des relations entre les espèces

Tous les organismes interagissent. Ils peuvent partager un environnement commun, convoiter les mêmes ressources, s'entre-aider ou encore utiliser d'autres espèces comme habitat. Ces interactions sont dépendantes de la grande diversité des formes de vie. Chaque espèce évolue ainsi dans un gigantesque réseau d'interactions. En 1991, Cheng propose une classification des interactions entre espèces selon leurs conséquences sur les organismes impliqués. On y distingue les interactions à effet négatif réciproques (la compétition), les interactions bénéfiques pour l'un et néfastes pour l'autre (la prédation et le parasitisme), les interactions à bénéfice réciproque (le mutualisme) et les interactions bénéfiques pour l'un des acteurs et neutres pour l'autre (le commensalisme et la phorésie). Ces interactions entre espèces peuvent aussi être classées selon leur caractère durable (parasitisme), fugace (prédation), indirect (*e.g.* compétition par exploitation) ou intime (symbioses mutualistes).

Une espèce existe ainsi comme membre d'un cortège, composé de prédateurs, parasites, compétiteurs, ou encore mutualistes. Cette multiplicité de relations, bénéfiques, neutres et néfastes, peut influencer, à des degrés variables, la survie et/ou la reproduction des individus composant l'espèce et, de fait, exercer des pressions sélectives sur ses populations. L'incidence d'un cortège sur la valeur adaptative d'une composante spécifique suggère que la trajectoire évolutive d'une espèce serait en partie liée à son réseau d'interactions, passé et contemporain.

Prédation et parasitisme

L'interaction la plus médiatisée est certainement la prédation. On la retrouve dans de nombreux documentaires animaliers ou livres de vulgarisation. Un premier individu, le prédateur, tue une autre espèce généralement plus petite, sa proie, dans un but alimentaire. Cette interaction revêt un caractère fugace car les prédateurs tuent leur proie immédiatement après l'attaque (Begon *et al*., 2006).

Le parasitisme est moins connu mais beaucoup plus fréquent : c'est le mode de vie le plus répandu dans le monde vivant avec environ 50% des espèces (microorganismes, protozoaires, métazoaires, helminthes, bactéries, virus, champignons, insectes etc....) (Poulin

& Morand, 2000 ; de Meeüs & Renaud, 2002). Le parasite vit à l'intérieur ou à la surface de son hôte, sur lequel il exerce une action néfaste. Le parasite utilise généralement les ressources énergétiques de celui qui l'héberge et, à travers les pathologies ou les dérèglements physiologiques, peut affecter à son profit, la croissance ou la survie de cet hôte. Ce phénomène correspond à une association unilatérale, de longue durée (Combes, 2001).

2. La coévolution des systèmes antagonistes

Une sélection réciproque

Ehrlich et Raven (1964) sont les premiers à utiliser le terme 'coévolution' en étudiant les processus évolutifs qu'entretiennent les insectes phytophages et leurs plantes hôtes. Cette expression 'coévolution' autorise une grande variété d'interprétations et a été utilisée différemment par de nombreux auteurs. De nos jours, on parle de coévolution lorsque les évolutions des espèces en interaction s'influencent réciproquement. Un trait chez une première espèce évolue en réponse au trait d'une seconde, qui lui-même est sélectionné en réponse au trait du premier (Futuyma & Slatkin, 1983).

Toutes les interactions produisent un ensemble complexe au sein duquel chacun des acteurs peut donc affecter les traits des autres. Les espèces qui interagissent exercent des pressions de sélection les unes sur les autres, impliquant des conséquences variables sur leurs valeurs adaptatives. La survie ou la reproduction sont des traits qui peuvent être particulièrement affectés. (Thompson, 1994).

La coévolution entre un hôte et son parasite

Tout parasite doit trouver l'hôte adéquat afin de satisfaire sa demande nutritionnelle, ou il meurt. Cette interaction étant très étroite, le parasite est particulièrement touché par les facteurs influençant la vie des hôtes. C'est principalement aux défenses de leurs hôtes auxquelles les parasites se heurtent. Elles peuvent être comportementales ou physiologiques, comme le système immunitaire des vertébrés, la réponse cellulaire des invertébrés, ou encore les défenses induites chez les plantes (Thompson, 1994 ; Combes, 2001). En réaction, le parasite utilise des stratégies d'attaque lui permettant d'exploiter l'hôte, c'est à dire de s'établir et se maintenir dans cet environnement inhospitalier qu'est son hôte.

Dans cette interaction, les intérêts de chacun divergent donc totalement, impliquant une dynamique évolutive entre les deux acteurs, avec une sélection de stratégies de défenses chez l'hôte (comportement, évitement, résistance…), et différentes stratégies d'attaques chez le parasite (transmission, mécanismes physiologiques…) (Futuyma & Slatkin, 1983). Cette dynamique constante entre les hôtes et les parasites 'enferme' les acteurs dans un cycle d'évolution sans fin. Il s'agit d'une véritable 'guerre' qui se poursuit aussi longtemps que l'un des deux protagonistes ne disparaît pas, donnant lieu à une escalade dans l'invention adaptative (une course aux armements). C'est ce qui est appelé classiquement le principe de la Reine Rouge (Encadré 1).

Des parasites 'tueurs'

Certaines espèces présentent un mode de vie intermédiaire entre le parasite et le prédateur. En principe, un prédateur tue sa proie sitôt qu'il entre en contact avec elle. En revanche, l'hôte survit plus ou moins longtemps à la présence d'un parasite (une large tolérance du parasite par son hôte peut être un gage de réussite parasitaire). Certains parasites ont la particularité de provoquer la mort de leur hôte de manière obligatoire. C'est le cas des insectes qualifiés de parasitoïdes (Godfray, 1994).

3. Les insectes parasitoïdes

La diversité des insectes parasitoïdes

Selon des estimations récentes, les insectes parasitoïdes représentent entre 8 et 20% de l'entomofaune mondiale. La majorité des parasitoïdes sont des hyménoptères ou des diptères (respectivement environ 60 000 et 16 000 espèces décrites) (LaSalle & Gauld, 1992). Certaines espèces font également partie de la famille des coléoptères, lépidoptères, trichoptères, et des strepsiptères (Godfray, 1994). Le nombre d'hôtes pouvant être infestés est variable. Certains parasitoïdes dit généralistes peuvent exploiter plusieurs espèces ; les parasitoïdes dit spécialistes étant des espèces utilisant un nombre très réduite d'hôtes (Stireman *et al*., 2006b).

Les parasitoïdes, parasites ou prédateurs ?

Un insecte parasitoïde diffère d'un parasite dans l'issue de l'interaction avec l'hôte. L'œuf est déposé à l'intérieur d'un hôte (endoparasitoïde) ou à sa surface (ectoparasitoïde)

par une femelle adulte à vie libre, qui le recherche activement comme un prédateur. La larve de parasitoïde se développe aux dépens de son hôte qu'elle finit par tuer. Au terme de son développement, un parasitoïde adulte émerge de son hôte. La valeur adaptative d'un parasitoïde dépendra alors de son succès dans ces phases 'prédatrice' et parasitaire. Les hôtes de parasitoïdes peuvent également être considérés comme intermédiaires entre proie et hôte. Pour éviter d'être tué par un parasitoïde, les hôtes doivent présenter des moyens de défenses classiquement observés chez les espèces proies (éviter d'être attaqué par un prédateur) et chez les espèces hôtes (résister contre le parasite). Cette complexité de l'interaction hôte-parasitoïde implique la nécessité d'une multiplicité d'adaptations pour se défendre d'un parasitoïde ou de contourner les défenses de l'hôte.

ENCADRE 1 – LA THEORIE DE LA REINE ROUGE

Le paléontologue Van Valen a émit l'hypothèse selon laquelle l'adaptation des organismes à l'environnement est remise en question constamment à cause des changements incessants qui le touchent. Selon van Valen (1973), il n'existe pas d'espèces qui auraient plus de chances de réussir que les autres car leur probabilité d'extinction est constante au sein des groupes et indépendante de leur durée de vie. Ce sont les autres espèces qui engendrent ces fluctuations d'environnement, et par les changements évolutifs qu'elles entrainent, exercent de nouvelles pressions de sélection sur les espèces avec lesquelles elles interagissent.

Van Valen propose alors la théorie de la Reine Rouge, métaphore issue du roman de Lewis Caroll *De l'autre côté du miroir* (1872). Alice y est entrainée par la Reine Rouge dans une course effrénée dont elle demande la cause. La reine lui explique alors que le paysage défile, et qu'il faut courir sans cesse pour rester à la même place. Dans cette métaphore, le paysage représente l'environnement subissant des variations incessantes ; la Reine Rouge est l'espèce et la course, l'évolution. Dans un environnement fluctuant (le paysage défilant), l'évolution incessante des espèces leur permet donc d'éviter l'extinction. L'étroitesse des interactions parasitaires et les forces évolutives réciproques importantes qu'elles constituent en font d'excellents candidats pour la théorie de la Reine Rouge.

Comme le parasitoïde doit absolument parasiter son hôte pour assurer une descendance, la stratégie adoptée par une femelle dans la recherche et la sélection des hôtes joue un rôle primordial dans sa réussite parasitaire. Le comportement de l'adulte aura donc une influence directe sur son succès reproducteur. Par conséquent, ces comportements peuvent être fortement influencés par la sélection naturelle. Ces caractéristiques font des parasitoïdes un système particulièrement étudié en biologie évolutive et écologie comportementale (Godfray, 1994 ; Hassell, 2000).

Des modes de reproduction variés

Le déterminisme du sexe est complexe chez ces individus. Selon les espèces, les mâles sont diploïdes (diplo-diploïdie), haploïdes (haplo-diploïdie) ou bien absents (thélotoquie). Chez les diptères, l'individu est issu d'un ovocyte fécondé et possède du matériel génétique paternel et maternel. Comme chez les mammifères, le sexe est déterminé selon les chromosomes sexuels présents, c'est la diplo-diploïdie. Chez les hyménoptères parasitoïdes, le système haplo-diploïde est le plus fréquent. Les mâles sont issus d'ovocytes non fécondés donc haploïdes, et les femelles d'ovocytes fécondés diploïdes. Ce sont les mères qui peuvent choisir le sexe de leur descendant en fécondant, ou non, l'ovocyte au moment de la ponte. Ce mode de reproduction permet une grande flexibilité dans les sex-ratios à l'échelle des populations. Enfin, certaines espèces présentent une reproduction clonale thélytoque : sans accouplement, les mères produisent des œufs diploïdes qui donneront des femelles.

4. La coévolution hôte-parasitoïde

L'antagonisme entre un hôte et son parasitoïde est extrême. Dans cette interaction, les enjeux pour les antagonistes sont capitaux : le parasitoïde a obligatoirement besoin d'un hôte pour compléter la phase immature de son cycle de vie ; pour l'hôte, l'infestation conduit à la mort. Ces partenaires entretenant une interaction particulièrement étroite, cette situation est particulièrement favorable à l'établissement de processus évolutifs réciproques. Tout changement chez le parasitoïde peut entrainer une sélection chez l'hôte. Toute modification des mécanismes d'infestation du parasitoïde (comportement et virulence) aura des conséquences très importantes sur l'organisme l'hôte. Inversement, tout moyen de défense chez l'hôte peut engendrer des pressions de sélection profondes sur

les populations de parasitoïdes. Les stratégies d'évitement et de résistance au parasitisme chez l'hôte ; ainsi que les capacités d'exploitation des parasitoïdes, sont des traits au cœur de la coévolution de ce système.

II. Ecologie et évolution des interactions hôtes-parasitoïdes

1. Stratégies d'évitement et résistance au parasitisme chez les hôtes

Pour contrer leurs ennemis naturels, les organismes ont développé un large panel de moyens défensifs. Les défenses 'induites' apparaissent quand l'ennemi est rencontré, alors que les défenses 'constitutives' sont toujours présentes chez l'individu. Pour se défendre du parasitoïde adulte, l'hôte doit éviter la rencontre de cet ennemi, et en cas de rencontre, éviter l'oviposition. Toutefois, si le parasitoïde parvient à déposer un œuf dans cet hôte, ce dernier peut présenter d'autres moyens de défense pouvant limiter le développement du parasitoïde en place (Gross, 1993).

Eviter la rencontre avec le parasitoïde

Afin d'éviter la rencontre avec la parasitoïde, l'hôte doit être sensible à tout indice environnemental permettant d'estimer le risque local de parasitisme. Chez un hôte de parasitoïde, une estimation à priori de ce risque est possible par la perception de la présence de l'ennemi naturel, indice direct de risque, ou de l'activité de cet antagoniste, indice indirect de risque. Ces indices indirects peuvent informer l'hôte d'une attaque en cours (perception d'un message d'alarme émis par des congénères) ou passée (rencontre de congénères blessés ou tués). La perception de ces indices peut être visuelle, physique ou encore chimique et semble courante chez les victimes d'ennemis naturels (Peacor, 2003).

Pour éviter la détection par le parasitoïde, les hôtes peuvent réduire les indices de leur présence (Vet *et al.*, 1991). Certaines chenilles se déplacent ainsi fréquemment entre des prises de nourritures courtes. Les mouvements vers un nouveau site permettent de diminuer les risques de rencontre avec des prédateurs (Mauricio & Bower, 1990). Concernant les défenses comportementales vis-à-vis des parasitoïdes, les pucerons sont certainement les organismes hôtes les plus étudiés. Lorsqu'ils sont attaqués, ils émettent par leurs cornicules (structures tubulaires se dressant sur la partie postérieure de leur abdomen)

des sécrétions contenant une phéromone d'alarme nommée (E)-β-farnesene (EBF) (Pickett & Griffith, 1980) (Figure 1.1.). Elle est perçue par les autres pucerons présents dont la principale réaction est alors la fuite (par déplacement ou chute) (Goff & Nault, 1974; Mondor *et al*., 2000). Différents facteurs tels que la densité des ennemis naturels, la qualité de la plante hôte ou l'état physiologique du puceron influence la probabilité de fuite (Losey & Denno, 1998a ; 1998b; Villagra *et al*., 2002). Il existe également des variations dans ces comportements selon l'origine et la couleur du clone (Braendle & Weisser, 2001 ; Kunert *et al*., 2010). La perception de cette phéromone peut également entrainer la production croissante de descendants ailés (Sloggett & Weisser, 2002 ; Kunert *et al*., 2005). Les hôtes sont également capables d'estimer le risque local de parasitisme lors de la colonisation d'un nouvel habitat. En présence de traces de parasitisme (par exemple, présence de cadavres imputables aux parasitoïdes), les populations de pucerons se dispersent plus sur les plantes de l'environnement. La 'dilution' de la population dans l'espace pourrait donc réduire la probabilité de perception par l'ennemi et donc, la probabilité de rencontre (Fievet *et al*., 2008). La présence de cadavres dans une colonie de pucerons peut également induire une réduction de leur fuite : les pucerons restent à côté de leurs morts. La motivation des parasitoïdes à rester dans une colonie de pucerons diminuant plus rapidement en présence de ces cadavres, le risque d'être parasité est ainsi diminué. Ainsi, en restant proches des cadavres, les pucerons ont moins de chances d'être attaqué par un parasitoïde (Fievet *et al*., 2009).

Eviter l'attaque du parasitoïde

Chez les espèces hôtes, les stratégies limitant l'attaque du parasitoïde sont classées en 5 catégories (Gross, 1993) : (1) les défenses morphologiques (comme l'épaisseur de la cuticule parfois suffisante pour empêcher l'oviposition du parasitoïde (*e.g.* Gelman *et al*., 2005)), (2) les comportements de fuite afin de s'extraire du danger (*e.g* chutes de la plante, ou déplacements des individus), (3) les comportements agressifs pour déstabiliser ou affecter l'ennemi (*e.g.* mouvements brusques du corps parfois suffisants pour éjecter le parasitoïde), (4) la protection collective (*e.g.* garde des congénères) et (5) la protection interspécifique. L'attaque peut être évitée de manière active ou passive et elle intervient au contact de l'ennemi (Gross, 1993).

Les pucerons en sont de bons exemples car on y retrouve ces 5 catégories de stratégies de défense. Ils développent des défenses individuelles comme des comportements agressifs et/ou des comportements de fuite : l'individu attaqué manifeste des mouvements brusques du corps, donne des coups de patte envers son ennemi ou échappe à l'attaque en fuyant ou en se laissant tomber au sol (Gross, 1993). Chez les quelques espèces aphidiennes eusociales (e.g. Pemphigidés), il existe une caste dite 'soldat'. Ces individus possèdent une morphologie différenciée, des pattes antérieures renforcées et une ou deux cornes sur le front, et patrouillent autour de la colonie et agressant tout ennemi potentiel (Stern *et al.*, 1997 ; Fukatsu *et al.*, 2005). Chez d'autres espèces, la sécurité de la colonie peut être assurée par des fourmis, nourries en échange par les pucerons (Hölldebler & Wilson, 1990). Enfin, un moyen de défense collective des pucerons sont les sécrétions corniculaires. De nature collante, elle peut engluer les organes essentiels du parasitoïde (antenne, ovipositeur) (Figure 1.1.). L'ennemi touché par cette sécrétion doit alors investir beaucoup de temps dans le toilettage de l'organe affecté (Wu *et al*., 2010).

Figure 1.1. Emission de sécrétions corniculaires chez des pucerons attaqués par un parasitoïde (Photo par B. Chaubet)

Les coûts des défenses comportementales

L'efficacité de ces comportements de défense peut être contrebalancée par les coûts qu'ils représentent pour l'hôte. L'allocation énergétique associée à la défense peut être importante et peut s'exprimer sous la forme de compromis entre diverses fonctions (*e.g.* réduction de la fécondité).

L'expression de la défense peut également avoir des coûts indirects comme la modification de la nature des interactions avec les espèces. Ces coûts, dits écologiques, se manifestent à travers l'altération d'une interaction avec un mutualiste ou l'intensification d'une interaction avec un antagoniste (Cipollini *et al*., 2003; Heil & Baldwin*,* 2002). Par exemple, l'augmentation de la résistance aux parasitoïdes des lignées sélectionnées de larves de drosophiles s'accompagne d'une diminution de leurs capacités compétitives (Kraaijeveld & Godfray, 1997).

Chez les pucerons, le comportement de chute s'accompagne d'un risque de dessiccation ou de prédation par des invertébrés terrestres (Roitberg & Myers, 1979 ; Losey & Denno, 1998b). Les comportements induisent aussi des pertes énergétiques ou des réductions du temps alloué à l'activité alimentaire (Nelson, 2007 ; Fievet *et al*., 2008). Chez les aphides, la production de sécrétions corniculaires est coûteuse en énergie, réduisant les réserves lipidiques destinées au développement, à la reproduction ou encore à la dispersion (Dillwith *et al.*, 1993 ; Mondor & Roitberg, 2003 ; Byers, 2005). Les sécrétions corniculaires peuvent également stimuler l'attaque de certains prédateurs ou parasitoïdes (Grasswitz & Paine, 1992 ; Micha & Wyss, 1996 ; Boo *et al*., 1998; Zhu *et al*., 1999 ; Al Abassi *et al*., 2000 ; Outreman *et al*., 2010).

Les défenses immunitaires des hôtes

Pour les hôtes tués ou paralysés de manière permanente au moment de l'oviposition, la prévention de l'attaque du parasitoïde est la défense la plus efficace. En revanche, chez certaines espèces de parasitoïde, l'hôte est maintenu en vie une fois l'oviposition effectuée. Dans ce cas, des défenses physiologiques basées sur l'immunité interviennent.

Les invertébrés ont développé, au cours de l'évolution, un système de défense inné complexe et efficace. Même si ce système se diffère en de nombreux points à celui des vertébrés, il est tout de même qualifié d''immunitaire'. (Vilmos & Kurucz, 1998). Chez les

insectes, les mécanismes de l'immunité sont particulièrement étudiés chez le modèle drosophile (*Drosophila melanogaster*) dans le cadre de l'interaction avec ses parasitoïdes (Carton *et al.*, 2008). Le système immunitaire des insectes repose entièrement sur l'immunité innée et s'appuie sur des réponses à la fois cellulaires et humorales qui s'imbriquent étroitement dans le temps lors de l'activation du système immunitaire (Gillespie *et al*., 1997 ; Nappi & Ottaviani, 2000). Ces réponses sont initiées par la reconnaissance de motifs moléculaires conservés, présents à la surface de tout organisme étranger comme le parasitoïde immature (Hoffmann & Reichhart, 2002 ; Siva-Jothy *et al*., 2005). La forme la plus courante de réponse immunitaire chez les hôtes est l'encapsulation : lorsque des molécules du « non-soi » sur les œufs de parasitoïdes sont détectées, les hémocytes[1] prolifèrent, grandissent, adhèrent les unes aux autres, et s'agrègent autour du corps étranger. Elles forment alors des capsules provoquant l'asphyxie du parasitoïde (Gillespie *et al*., 1997). Chez la drosophile, les observations cytologiques et biochimiques de la réponse initiale montrent clairement que l'œuf est tué très peu de temps après l'oviposition, et ceci bien avant sa complète séquestration par la capsule (Russo *et al*., 2001).

Un mécanisme universel chez les insectes accompagnant l'encapsulation par les hémocytes est le dépôt de mélanine[2] sur la surface du parasite (Carton *et al.*, 2005). La mélanine est synthétisée via la cascade de la phénoloxydase. La mélanine peut être transportée activement vers la cuticule pour participer à sa sclérotisation. Elle est observée au niveau des lésions ou des capsules hémocytaires et intervient donc dans les processus de coagulation et d'encapsulation (Gillespie *et al*., 1997). Des molécules cytotoxiques et des enzymes sont générées au cours de la mélanogenèse en réponse à l'infection. Ces facteurs peuvent oxyder les lipides membranaires des parasites et bloquer leur déplacement dans les tissus de l'hôte (Kumar *et al*., 2003).

Evolution de la résistance des hôtes

Le parasitisme constitue une forte pression de sélection et induisent l'évolution des mécanismes de résistance chez les hôtes. Le couple hôte drosophile/parasitoïde *Asobara tabida* reste le modèle le plus étudié dans l'évolution de la résistance (Kraaijeveld *et al*., 1998). Plusieurs approches sont utilisées pour étudier l'évolution de la résistance. Elles se

[1] Les hémocytes sont des cellules circulant dans l'hémolymphe des insectes et assurant leur réponse immunitaire cellulaire.
[2] La mélanine est un pigment noir responsable de la coloration des téguments dans le règne animal

basent sur des comparaisons de facteurs physiologiques de la résistance entre différentes lignées ou espèces proches.

Des expérimentations réalisées en conditions contrôlées permettent le suivi des niveaux de résistance des populations d'hôtes soumis à différentes pressions de parasitisme sur plusieurs générations. Une évolution expérimentale des drosophiles soumises à deux parasitoïdes, *A. tabida* et *Leptopilina boulardi* ont notamment été effectuées. Les pourcentages d'encapsulation des populations hôtes ont ainsi pu être augmentées de 0,5% jusqu'à 60% en seulement 5 générations d'hôtes (Kraaijeveld & Godfray, 1997 ; Fellowes *et al*. 1998). Les larves de drosophiles sélectionnées possèdent beaucoup plus d'hémocytes circulant dans l'hémocœle par rapport aux lignées contrôles (sans pression parasitaire) (Kraaijeveld *et al*., 2001).

Les hôtes de parasitoïdes présentent ainsi une diversité de stratégies de défense. Ces défenses sont le plus souvent héritables et peuvent ainsi se propager dans la population hôte induisant de fortes pressions de sélections sur les parasitoïdes. Des stratégies permettant leur contournement peuvent alors être favorablement sélectionnées.

2. Exploitation de l'hôte par le parasitoïde

Le parasitoïde doit prendre plusieurs décisions comportementales pour son approvisionnement en hôtes. Le choix de la stratégie à adopter dans la répartition de son temps de vie et de son stock d'œufs dans son habitat, et le choix de l'individu à parasiter est très important : chacune de ces décisions aura une incidence directe sur la production de descendants. Par conséquent, ces comportements sont sujets à d'importantes pressions de sélection. Les stratégies d'exploitation de l'hôte sont différentes chez le parasitoïde adulte (étape pré-ovipositionnelle) et chez l'individu immature (étape post-ovipositionnelle).

Les stratégies d'exploitation des hôtes par les parasitoïdes adultes

La phase libre des parasitoïdes implique une contrainte biologique forte : la femelle adulte doit activement rechercher et sélectionner les hôtes susceptibles de recevoir ses œufs et d'assurer le développement larvaire. Une femelle parasitoïde ne se trouve pas toujours, à l'émergence, à proximité des hôtes à attaquer. Depuis les années 1930, de nombreuses études ont démontré le rôle important des signes olfactifs, visuels ou

acoustiques dans la détection des hôtes ou de leur habitat (Godfray, 1994). Ces indices sont directs, c'est-à-dire qu'ils sont émis par les hôtes potentiels ; ou bien indirects, c'est-à-dire issus de l'habitat de l'hôte. Certaines plantes attaquées par des phytophages peuvent émettre des signaux moléculaires volatiles qui attirent les ennemis naturels, dont les parasitoïdes (Vinson, 1999 ; Allison & Hare, 2009). Certains hôtes émettent aussi des signaux chimiques ou kairomones, qui attirent les parasitoïdes. Les mécanismes impliqués sont complexes et parfois très spécifiques. Ils sont associés à de fortes pressions de sélection et des mécanismes adaptatifs subtils : un changement simple d'un groupement de la molécule peut entièrement annuler la reconnaissance par la femelle (Godfray, 1994).

La femelle doit s'assurer que l'hôte détecté peut convenir au développement de sa descendance. Il doit s'agir de la bonne espèce, du stade de développement adéquat avec un état physiologique satisfaisant. La femelle examine les caractères externes (forme du corps, couleur, taille) et internes de l'hôte à l'aide de récepteurs situés au niveau des antennes et de l'ovipositeur. La taille de l'hôte est par exemple un facteur important car il reflète de la quantité de ressources disponible pour la larve (Hemerick & Harvey, 1999). Les descendants issus d'hôtes plus petits sont généralement de taille réduite, avec des fécondités et longévités plus faibles (Bernstein *et al*., 2002 ; Rivero & West, 2002 ; Pelosse *et al*., 2007).

Chez les parasitoïdes solitaires, seule une larve peut se développer à l'intérieur d'un hôte. Les femelles utilisent alors un marquage externe et/ou interne à l'hôte pour vérifier s'il n'est pas déjà parasité. Cette capacité discriminatoire existe chez de nombreuses espèces mais le superparasitisme est courant dans la nature (Godfray, 1994). Ce comportement peut lui aussi être adaptatif dans certaines conditions. La tendance à superparasiter augmente lorsque l'habitat présente peu d'hôtes ou que la femelle a une faible espérance de vie (van Alphen & Visser, 1990 ; Plantegenest *et al*., 2004).

La stratégie adoptée par le parasitoïde dans chacune de ses décisions aura une incidence directe sur la production de descendants. L'hypothèse de la sélection naturelle prédit qu'un individu aura le comportement qui lui permet de tirer le meilleur parti des contraintes génétiques et environnementales qui lui sont imposées. Il maximisera ainsi le nombre de copies de ses gènes dans la génération suivante. Ces comportements ne sont que les premières étapes du processus de parasitisme. L'exploitation optimale de l'hôte doit être assurée par la larve qui y est déposée.

Les stratégies d'exploitation des hôtes par la larve parasitoïde

Le parasitoïde immature doit éviter l'encapsulation par les cellules du système immunitaire de l'hôte. Les parasitoïdes peuvent limiter les interactions avec l'immunité de l'hôte par de l'ectoparasitisme ou le développement dans des stades ou tissus non protégés (par exemple, les organes où l'hémocœle ne circule pas). Les Trichogrammes, par exemple, infestent son hôte lépidoptère au stade œuf, stade présentant que de faibles réponses immunitaires (Poirié *et al.*, 2009). Chez de nombreux diptères parasitoïdes, les larves construisent une pellicule protectrice autour de leurs corps (*e.g.* Asgari *et al.*, 1998).

La synchronisation du développement des deux antagonistes est nécessaire pour assurer la survie du parasitoïde. Certains utilisent les hormones de l'hôte pour ajuster leur propre développement. D'autres parasitoïdes perturbent les cycles de développement de leurs hôtes en induisant des mues précoces (ou supplémentaires) ou en le bloquant à un stade immature (Beckage & Gelman, 2004).

Les armes du parasitoïde lui permettant de surmonter le système immunitaire et de réguler le développement de l'hôte sont la virulence et les facteurs de régulation. Dans de nombreuses familles de parasitoïdes (Braconidés, Scelionidés ou encore Trichogrammatidés), la membrane séreuse entourant l'embryon du parasitoïde se décompose pour former des cellules individuelles qui grossissent dans le corps de l'hôte mais ne se multiplient pas. Elles sont nommées tératocytes et on peut en dénombrer de 15 à 800 dans un seul hôte en fonction de l'espèce. Le rôle des tératocytes dans les processus de régulation n'a été étudié que chez un nombre limité d'espèces (en général des Braconidés) (Grimaldi *et al.*, 2006). Plusieurs fonctions ont été proposées. Elles auraient un rôle trophique : elles peuvent être ingérées par le parasitoïde après le prélèvement par ces cellules de substances de l'hémolymphe de l'hôte. Les tératocytes auraient également un rôle important dans la manipulation de la physiologie et de la biochimie de l'hôte pour créer un environnement favorable au développement de la larve. Les tératocytes issus de l'œuf de *Cotesia kariyai* sécrètent une enzyme qui dégrade les corps gras de l'hôte lépidoptère *Pseudaletia separata* permettant à la larve de s'en nourrir (Nakamatsu *et al.,* 2002). Les tératocytes peuvent enfin sécréter des substances qui interférent avec le système immunitaire et participent à l'immunoévasion ou au ralentissement des défenses physiologiques de l'hôte (Beckage & Gelman, 2004 ; Pennachio & Strand, 2006). Par exemple, la cascade de la phénoloxydase

dans l'hémolymphe de l'hôte papillon *Pieris rapae crucivora* est inhibée par l'action des tératocytes du parasitoïde *Cotesia glomerata* (Kitano *et al.*, 1990).

Les facteurs de virulence

Lors de l'oviposition, les femelles injectent des facteurs dits de virulence. Ces molécules sont impliquées dans deux processus : (1) l'évitement, la destruction ou le contournement du système immunitaire de l'hôte ; (2) la régulation à long terme des processus physiologiques de l'hôte dans le but de favoriser le développement du parasitoïde (Thomas *et al*., 2009). Enfin, plusieurs espèces détruisent le système immunitaire de l'hôte grâce aux facteurs de virulence produits par les glandes à venin, les ovaires ou par des glandes du tractus génital et injectés par la femelle lors de l'oviposition (Moreau et Guillot, 2005).

Le venin est probablement l'outil ancestral de lutte des parasitoïdes et les études sur le sujet sont nombreuses : Beckage & Gelman, 2004 ; Pennachio & Strand, 2006 ; Poirié *et al*., 2009…. Selon les espèces, les molécules du venin correspondent à des protéines sécrétées, ou à des associations du parasitoïde avec des polydnavirus (notés PDVs pour *Disperse DNA Viruses*) et des particules d'allure virale (dites VLPs pour Virus-Like Particles) (Dupas *et al*., 1996 ; Drezen *et al*., 2003 ; Labrosse *et al*., 2005).

Les protéines sécrétées peuvent influer directement la cascade de la phénoloxydase et/ou les hémocytes chez l'hôte via des phénomènes d'apoptose ou des altérations morphologiques hémocytaires associées à une incapacité à former une capsule autour de l'œuf parasitoïde (Labrosse *et al*., 2005). La protéine LbGAP par exemple a été isolée du venin du parasitoïde de drosophile *Leptopilina boulardi* et entre dans des cellules spécifiques de l'hôte pour interagir avec deux protéines nécessaires à l'encapsulation. En altérant la morphologie de ces cellules, la LbGAP empêche l'immunité de s'exprimer (Colinet *et al.*, 2008). Certains facteurs du venin ont la capacité de castrer les hôtes. Les ressources allouées à leur reproduction seraient détournées en faveur du développement du parasitoïde. Certaines protéines sécrétées par la larve de parasitoïde en place assurent le transport des acides gras du site de digestion des tissus de l'hôte jusqu'à elle (Falabella *et al*., 2005 ; 2007).

Les PDV (PolyDnaVirus) et VLP (Virus Like Particles) sont parmi les facteurs de virulence les plus originaux, notamment de par leur nature et leur structure protéique organisée. Les polydnavirus constituent le premier exemple de symbiose virus/eucaryote

décrit à ce jour (Espagne *et al.,* 2004) et sont familles spécifiques (Hyménoptères Braconidés et Ichneumonidés). Les VLP possèdent une structure proche des virus mais sont dépourvues en acides nucléiques. La réplication des PDVs ne se fait que dans certains tissus et à des moments précis du développement du parasitoïde immature. Leur action est ciblée, permettant d'ajuster dans le temps et dans l'espace, les besoins de la larve aux fonctions de l'hôte (Pennachio & Strand, 2006). Les virus peuvent également lutter contre le système immunitaire de l'hôte. Par exemple, les molécules émises par le PDV CiV12 de la guêpe parasitoïde *Cotesia inanitus* provoquent une métamorphose précoce et un arrêt de développement au stade prépupal de son hôte papillon *Spodoptera littoralis* (Grossniklaus-Bürgin *et al.,* 1998).

Il semble que l'ADN des PDV se soit intégré dans le génome de l'insecte au cours de l'évolution symbiotique entre ces deux acteurs (Drezen *et al*., 2003; Federici & Bigot, 2003 ; Dupuy *et al*., 2006). Ainsi, les rôles respectifs des différents partenaires dans la synthèse des facteurs de virulence et leur maintien restent difficiles à évaluer. Des études, caractérisant les gènes viraux exprimés durant le parasitisme, sont nécessaires pour comprendre comment leurs produits interfèrent avec la physiologie de l'hôte.

Evolution de la virulence des parasitoïdes

Les parasitoïdes peuvent présenter un spectre d'hôtes plus ou moins large. Il est suggéré que la stratégie de virulence peut conduire à l'évolution de spécificité hôte-parasitoïde. Les espèces koïnobiontes[3] devraient donc posséder une gamme d'hôtes plus réduite que les idiobiontes[4] dans la mesure où elles doivent évoluer pour surmonter les défenses immunitaire de l'organisme infesté. L'évolution des molécules ou l'acquisition de nouveaux facteurs de virulence chez un parasitoïde devrait donc mener à des altérations des spectres d'hôtes. Plusieurs approches sont aujourd'hui utilisées pour répondre à ces questions. Elles sont particulièrement axées sur les mécanismes, et s'attardent peu à l'échelle des populations. Les recherches concernent, par exemple, l'analyse et la comparaison des facteurs de virulence entre espèces et familles plus ou moins proches. Plusieurs études mesurent également les variabilités intraspécifiques de la virulence (Poirié *et al.*, 2009).

[3] Les parasitoïdes koïnobiontes ne tuent pas directement leurs hôtes au moment de l'oviposition, mais ce dernier meurt au cours du développement de l'individu qui le parasite.
[4] La femelle parasitoïde idiobionte tue ou paralyse l'hôte avant d'y pondre son œuf

Ces approches permettent l'analyse des pressions de sélection conduisant à des changements dans l'efficacité ou la spécificité des molécules de la virulence. Une telle variabilité due à des modifications de gènes majeurs n'a été décrite que dans peu d'espèces de parasitoïdes (Dupas *et al.*, 2003 ; Dubuffet *et al.*, 2007). Chez *L. boulardi*, deux « types » de femelles montrent des propriétés de virulence opposées envers les espèces hôtes *Drosophila melanogaster* et *D. yakuba*. Ces femelles diffèrent ainsi dans leurs stratégies de virulence qui semblent corrélée avec les variations dans leurs comportements de choix de l'hôte (Dubuffet *et al.*, 2006 ; Dubuffet *et al.*, 2008). Une telle corrélation entre traits physiologiques et comportementaux est une des conditions requises dans un modèle de spécialisation par changement d'hôte (Poirié *et al.*, 2009).

III. Les hôtes et leur réseau d'interactions

L'hôte d'un parasitoïde se situe dans un réseau d'interactions interspécifiques. Il consomme d'autres espèces, est exposé à des compétiteurs, peut être la proie de plusieurs prédateurs ou peut héberger des microorganismes symbiotiques. Toutes ces interactions vont affecter les traits d'histoire de vie des hôtes et le fonctionnement de leurs populations. Compte tenue de l'intimité particulière entre un parasitoïde et son hôte, tout facteur influençant les caractéristiques de l'hôte influera les aptitudes du parasitoïde. C'est pourquoi, les réseaux d'interactions de l'hôte peuvent modifier le fonctionnement et l'évolution des interactions hôtes-parasitoïdes.

1. Interaction de l'hôte avec sa plante

De la spécialisation alimentaire à la spéciation

De nombreux insectes hôtes de parasitoïdes sont phytophages. Certains utilisent un nombre limité de plantes hôtes sur lesquelles ils effectuent une grande partie de leur cycle biologique (reproduction, site de ponte…) (Feder & Forbes, 2010). Ces phytophages peuvent montrer une forte spécialisation vis-à-vis de leurs plantes hôtes, même lorsqu'elles sont présentes dans un habitat commun (en sympatrie) (Schluter, 2001). De nombreux végétaux présentent des résistances aux phytophages et les herbivores spécialisés sur ces plantes auraient acquis des mécanismes de contournement des résistances permettant leur exploitation (Ridley, 2004). Les phytophages spécialisés ont une forte préférence pour leur

plante hôte, car elle est le plus souvent liée à des meilleures performances par rapport à une plante alternative (Gripenberg *et al*., 2010 ; Scriber, 2010). Comme les individus spécialisés possèdent une valeur sélective supérieure sur leur plante hôte, la sélection naturelle va favoriser le maintien de cette spécialisation.

Les populations de phytophages spécialisées sont dites 'races d'hôtes' ou 'biotypes'. Ce sont des intermédiaires entre des populations polymorphes et des espèces complètement différenciées (Drès & Mallet, 2002). Cette formation de races d'hôtes, par le biais de la spécialisation alimentaire, engendre des divergences génétiques et phénotypiques profondes dans les populations sympatriques du phytophage. La spécialisation peut être favorisée par un accouplement préférentiel entre les individus d'une même race d'hôte, entrainant un isolement reproducteur (*e.g.* Emelianov *et al*., 2003). Les flux géniques entre populations spécialisées sur des plantes hôtes distinctes sont alors contre sélectionnés. La réduction des flux de gènes augmenterait la divergence entre les biotypes qui pourraient, à terme, devenir des espèces différenciées (Schluter, 2001 ; Funk *et al.*, 2002).

Les populations de phytophages spécialisés peuvent en outre posséder des phénotypes différents. Certaines espèces montrent des spécialisations morphologiques associées à la spécialisation alimentaire. Les populations de *Jadera haematoloma* (Hemiptera : Rhopalidae) sont structurées en races d'hôtes et possèdent des tailles de rostre adaptées aux fruits dont elles se nourrissent (Caroll & Boyd, 1992). Le puceron du pois *A. pisum* est aussi un exemple type de différenciation phénotypique en fonction des races d'hôtes. Ces races diffèrent par leur couleur, mode de reproduction, morphe de dispersion et le phénotype des mâles. Les populations d'*A. pisum* issues du pois (*Pisum sativum*) et de la fève (*Vicia faba*) montrent un investissement fort dans la phase sexuée de leur cycle biologique et produisent majoritairement des mâles ailés et aucun puceron de couleur rose n'a encore été relevé chez ces biotypes. A l'inverse, les pucerons issus du trèfle (*Trifolium pratense*) se reproduisent majoritairement de manière asexuée et produisent des mâles aptères. Les proportions d'individus roses y sont beaucoup plus importantes (Frantz *et al*., 2009 ; 2010). Ces traits peuvent affecter les flux de gènes et les migrations entre les populations. Des associations spécifiques entres ces traits peuvent fortement réduire, ou faciliter les divergences écologiques et les différenciations génétiques. Par exemple, la reproduction sexuée (et les recombinaisons chromosomiques), ainsi que la production de

mâles ailés favorisent les mélanges de populations. A l'inverse, la reproduction asexuée et les mâles aptères (non dispersants) diminuent les croisements entre populations (Frantz *et al.*, 2009).

Conséquences sur les parasitoïdes : la différenciation associée à l'hôte

Dans une situation de spécialisation alimentaire chez un hôte de parasitoïde, les parasitoïdes font face à des populations hôtes localement très structurées et très hétérogènes (tant d'un point de vue génétique que phénotypique). Cette spécialisation alimentaire des hôtes pourrait avoir des effets sur leurs ennemis naturels : elle pourrait entrainer une spécialisation parasitaire des parasitoïdes. Ce phénomène est appelé 'Effet Cascade' (Stireman *et al.*, 2006a). La spécialisation chez les parasitoïdes implique une forte fidélité à son hôte et une meilleure performance sur cet hôte. Selon Feder et Forbes (2010), ce processus constituerait un important générateur de biodiversité entomophage : la grande diversité des insectes phytophages aurait facilité la diversification de leurs parasitoïdes.

Plusieurs analyses permettent d'illustrer des effets cascades. Des approches fonctionnelles (incluant des études sur le terrain et des expérimentations en laboratoire) démontrent comment l'adaptation et la spécialisation mènent à l'isolement reproducteur et la spéciation (Feder & Forbes, 2010). Le degré de spécialisation des populations peut être notamment évalué par des études de génétique des populations (*e.g*. Stireman *et al*., 2006a ; Kolaczan *et al*., 2009).

Un exemple célèbre : le complexe *Rhagoletis pomonella- Diachasma alloeum*

Rhagoletis pomonella est un diptère nuisible dont les larves se nourrissent de fruits. La plante hôte d'origine de cette mouche est l'aubépine. Cette espèce a été pour la première fois trouvée sur les pommes au 19ème siècle. Depuis, *R. pomonella* exploite plusieurs plantes hôtes : cerises, poires, myrtilles, etc. (Bush, 1969). Les individus trouvés sur les diverses plantes constituent des races de mouche différentes. Les femelles préfèrent pondre leurs œufs dans le fruit où elles ont émergé et l'accouplement se fait préférentiellement sur la plante hôte d'origine (Feder *et al*., 1994 ; Forbes & Feder, 2006). Les individus sont aussi plus attirés par les composés volatils émis par leur fruit d'origine. Les différentes phénologies des plantes hôtes infestées par *R. pomonella* constituent des pressions de sélection sur l'éclosion des œufs et sur la diapause des pupes (Feder *et al*., 2003). Les larves de la pomme se

développent en 40 jours, celles de l'aubépine en 55-60 jours. Cet isolement allochronique accentue l'isolement reproducteur entre les mouches de l'aubépine et des pommes car il rend difficile leur rencontre (Linn *et al.,* 2003 ; Dambroski *et al.*, 2005 ; Dambroski & Feder, 2007). Ainsi, il est admis que les différentes adaptations de la mouche à de nouvelles plantes a généré des barrières écologiques réduisant les flux de gènes entre les races et entrainant un phénomène de spéciation (Filchak *et al*., 2000).

Les mouches *R. pomonella* sont des hôtes de trois espèces de parasitoïdes hyménoptères Braconidés (Rull *et al.*, 2009). Les femelles parasitoïdes de *Diachasma alloeum* examinent la surface des fruits pour détecter la présence d'œufs ou de larves de mouches. Lorsqu'un hôte est trouvé, la femelle procède à l'oviposition au travers du fruit. Cette espèce montre une différenciation génétique et écologique en fonction de la race de *R. pomonella*. Des marqueurs microsatellites séparent les parasitoïdes issus des mouches de l'aubépine de celles des myrtilles (Forbes *et al*., 2009). Tout comme leurs hôtes, les parasitoïdes s'accouplent préférentiellement sur leur fruit d'origine et sont plus attirés par les composés volatils émis par la plante de leur race d'hôte d'origine. Par conséquent, la différenciation des mouches *R. pomonella* aurait entrainé la différenciation de ses parasitoïdes. A terme, une spéciation des mouches, et de leurs parasitoïdes pourrait être envisagée (Forbes *et al*., 2009 ; Feder & Forbes, 2010).

La mise en évidence d'un effet cascade est récente (Stireman *et al*., 2006a) et les exemples sont encore peu nombreux dans la littérature. Ils illustrent le rôle fondamental de la relation entre un hôte et sa plante sur l'évolution des interactions hôte parasitoïde.

2. Interaction de l'hôte avec des symbiotes

Définitions

La symbiose est une association hétérospécifique intime et durable entre deux ou plusieurs organismes. Elle est communément restreinte aux associations à bénéfice mutuel et de type obligatoire ; les symbiotes ne pouvant survivre séparément (Thomas *et al*., 2010). Paradoxalement, certains organismes peuvent être appelés "symbiotes" malgré leur effet néfaste sur l'individu porteur. Le terme "symbiote" peut ainsi apparaître ambigu et la limite entre mutualisme, parasitisme et symbiose parfois très floue. On pourra alors parler de

symbiose mutualiste lorsque l'interaction bénéficie aux deux partenaires, et de symbiose parasitaire lorsque le symbiote tire un bénéfice de l'interaction aux dépens de l'individu qui le porte (Thomas *et al.*, 2009). Les interactions entre le symbiote et son porteur peuvent ainsi se situer sur un continuum entre parasitisme et mutualisme (Haine, 2008). La symbiose est une interaction répandue chez les insectes. Les hôtes de parasitoïdes sont donc susceptibles d'abriter des microorganismes symbiotiques, le plus souvent des virus ou des bactéries (Moran *et al.* 2005 ; Moran, 2006).

Les symbiotes obligatoires sont indispensables à la survie et/ou à la reproduction de l'individu porteur et se transmettent exclusivement verticalement[5]. Ils ont une origine ancienne car ils sont associés à la lignée de l'hôte depuis une longue période évolutive. Ce type d'association reflète une histoire de co-spéciation, souvent dérivée d'une seule origine, correspondant à un évènement d'infection unique par le symbiote (Pontes & Dale, 2006 ; Clark *et al*., 2010). A l'inverse, la présence d'un symbiote facultatif n'est pas considérée essentielle à la survie de l'hôte. Les symbiotes facultatifs sont le plus souvent transmis verticalement. Toutefois, quelques événements de transmission horizontale semblent possibles et permettraient une propagation et un maintien accru dans les populations de leurs hôtes (Moran, 2006).

Les symbiotes peuvent avoir une influence directe ou indirecte sur les insectes qui les abritent (Oliver *et al*., 2010). L'avantage pour l'hôte est l'acquisition rapide d'un ensemble de gènes apporté par l'organisme symbiotique (Nardon & Grenier, 1993 ; Moran *et al*., 2008). Les symbiotes ayant une transmission verticale présentent un taux de transmission intrinsèquement lié à la survie et la reproduction de leurs porteurs (Moran, 2006). Ces organismes symbiotiques devraient ainsi favoriser la fitness du porteur pour assurer leur transmission. Par exemple, ces symbiotes peuvent augmenter la fécondité ou diminuer le taux de mortalité de leurs hôtes. A l'inverse, certains symbiotes ne favorisent pas la fitness des hôtes mais manipulent leur reproduction. En accroissant la production de femelles infectées, ces symbiotes favorisent leur transmission verticale. Même si ces symbiotes induisent des coûts importants à leurs hôtes (Min & Benzer, 1997), la manipulation de la reproduction leur permet une invasion rapide de la population hôte.

[5] Les microorganismes se transmettent **verticalement** des parents à leur descendance et **horizontalement** d'un hôte à un autre.

Les symbiotes et l'utilisation de la plante par les insectes phytophages

De nombreuses études ont mis en évidence l'aide nutritionnelle apportée par des symbiotes à leurs insectes hôtes. Certaines bactéries possèdent des fonctions enzymatiques qui permettent la dégradation de la cellulose par leurs hôtes xylophages (*e.g.* Tokuda & Watanabe, 2007). Des symbiotes obligatoires portent de nombreux gènes de synthèse d'acides aminés essentiels, d'acides gras, de vitamines etc. Ces fonctions sont essentielles au métabolisme de l'insecte porteur (Clark *et al.*, 2010). Les individus peuvent même parfois abriter plusieurs symbiotes obligatoires qui leur fournissent des nutriments complémentaires. Le symbiote *Sulcia muelleri* apporte des acides aminés essentiels et le symbiote *Baumannia cicadellinicola* apporte des vitamines à leur hôte psyllide, *Homalodisca coagulata* (McCutcheon *et al*., 2009).

La co-diversification des symbiotes obligatoires et de leurs hôtes a été plusieurs fois démontrée pour une large variété d'insectes (Moran *et al*., 2008 ; Clark *et al*., 2010 ; Toft & Andersson, 2010). Des mutations dans le génome d'un symbiote peuvent influencer les fonctions métaboliques qui lui sont associées. Ces changements peuvent modifier les aptitudes phénotypiques d'un hôte sur une plante particulière (Moran *et al.*, 2008 ; Clark *et al*., 2010). Clark *et al.* (2000) et Jousselin *et al.* (2009) ont montré par exemple que *Buchnera* et ses pucerons hôtes du genre *Uroleucon* et *Brachycaudus* ont subi une co-diversification et une co-spéciation. A travers leur aide nutritionnelle, les symbiotes peuvent donc entrainer la spécialisation de leurs hôtes, et par conséquent, une spécialisation parasitaires de leurs parasitoïdes (effet cascade de la spécialisation).

Les symbiotes protecteurs

A l'inverse des symbiotes qui se transmettent verticalement, les parasites à transmission horizontale ont tendance à réduire la fitness de leurs hôtes en augmentant leur mortalité (Lively *et al.,* 2005). Dans un hôte, un conflit peut alors apparaître entre les parasites à transmission horizontale et les symbiotes à transmission verticale. La résolution de ce conflit est possible lorsque les symbiotes confèrent une résistance à leur porteur contre les parasites (Jones *et al.,* 2007 ; Haine, 2008).

Les microorganismes peuvent synthétiser une grande variété de composé actifs qui sont utilisés comme des moyens de défense par leurs hôtes. Les symbiotes peuvent apporter une protection à leur porteurs contre des pathogènes, des parasites, ou même des

prédateurs. Parmi les insectes, les symbiotes protecteurs des pucerons sont les plus étudiés et les mieux connus (Oliver *et al*., 2010). Ce sont des symbiotes facultatifs et certains peuvent protéger leur porteur contre des champignons pathogènes. *Regiella insecticola* augmente la survie de son hôte *Acyrthosiphon pisum*, parasité par le champignon *Pandora neoaphidis* et diminue la reproduction de ce pathogène (Ferrari *et al.,* 2004 ; Scarborough *et al.*, 2005). Les symbiotes peuvent également protéger leur porteur contre des insectes parasitoïdes. Deux symbiotes facultatifs, *Serratia symbiotica* et *Hamiltonella defensa*, confèrent une protection à leur puceron hôte, *A. pisum*, contre les hyménoptères parasitoïdes *Aphidius ervi* et *Aphidius eadyi* (Oliver *et al*., 2003; Oliver *et al*., 2006 ; Ferrari *et al*., 2004). Des associations symbiotiques particulières dans un même puceron du pois permettent aussi une résistance accrue aux parasitoïdes (Nyabuga *et al.*, 2010). Chez l'aleurode du tabac *Bemisia tabaci*, une étude met en évidence une protection conférée par la bactérie symbiotique facultative *Rickettsia* contre le parasitoïde *Eretmocerus mundus* (Mahadav *et al*., 2008). Enfin, certains symbiotes produisent des composés toxiques qui protègent leurs hôtes contre les prédateurs. Une bactérie du genre *Pseudomonas* sécrète une toxine nommée *pederin* qui protège des coléoptères du genre *Paederus* de la prédation par des araignées loup (Kellner & Dettner, 1996 ; Kellner, 2002).

Des symbiotes peuvent ainsi conférer une forte résistance à leurs hôtes contre les parasites. Toute résistance de l'hôte constituera une pression de sélection sur les ennemis du porteur. Les micropartenaires peuvent ainsi jouer un rôle important dans les processus coévolutifs entre espèces antagonistes (Haine, 2008).

Les symbiotes manipulateurs de la reproduction

A l'inverse des symbiotes décrits auparavant, les espèces symbiotiques qui manipulent la reproduction favorisent leur expansion au dépend de la fitness de leurs hôtes. *Cardinium* sp. et *Wolbachia pipentis* sont les symbiotes manipulateurs de la reproduction les plus étudiés. Ils sont présents chez de nombreux arthropodes (Stouthamer *et al.*, 1999 ; Hunter *et al.*, 2003 ; Hilgenboecker *et al*., 2008) et sont transmis verticalement. Une bactérie du genre *Rickettsia* peut également manipuler la reproduction de ses hôtes hyménoptères (Giorgini *et al*., 2010). Ces symbiotes provoquent des incompatibilités cytoplasmiques entre des souches d'hôtes d'une même espèce (*e.g.* Fu *et al.*, 2010), des parthénogénèses chez des hôtes à reproduction sexuée (*e.g.* Rodriguero *et al*., 2010), et d'autres mécanismes biaisant

la sex-ratio en faveur des femelles (Stouthamer *et al.*, 1999 ; Hurst & Jiggins, 2000). *Wolbachia sp.*, par exemple, est surtout transmise verticalement mais certains transferts horizontaux sont possibles dans les populations naturelles (majoritairement par les ennemis naturels des hôtes ; Jaenike *et al*., 2007 ; Raychoudhury *et al.*, 2009). La manipulation de la reproduction des hôtes en faveur des femelles permet à ces symbiotes d'envahir rapidement la population hôte.

Ces symbiotes, agissant sur la reproduction, pourraient provoquer l'émergence de nouvelles espèces. Les incompatibilités entre les mâles et les femelles provoquées par *Wolbachia* empêchent les croisements entre individus possédant des souches différentes de symbiotes (*e.g.* Bordenstein & Werren, 2007). Ces incompatibilités peuvent également induire des isolements reproducteurs entre individus d'une même espèce (Vavre *et al*., 2009). A terme, les symbiotes manipulateurs de la reproduction pourraient même provoquer des spéciations (Charlat *et al*., 2003 ; Vavre *et al.,* 2009).

La manipulation de la reproduction par des symbiotes peut également être observée chez de nombreux hyménoptères parasitoïdes. Le mode de reproduction haplo-diploïde des hyménoptères parasitoïdes les rend plus sensibles à la manipulation de la reproduction (Vavre *et al*., 2009). Ces symbiotes sont particulièrement étudiés chez les parasitoïdes de drosophiles (Vavre *et al*., 2009), chez les Ptéromalidae du genre *Nasonia* (Bordenstein & Werren, 2007) et chez les Trichogrammes (Pintureau *et al*., 2002). De nombreuses espèces de parasitoïdes de drosophiles peuvent présenter plusieurs souches de *Wolbachia*. Un seul individu *Asobara tabida* peut, par exemple, abriter trois souches différentes de cette bactérie (Vavre *et al*., 1999). Dans de nombreux cas, la même souche de *Wolbachia* est trouvée chez la drosophile et son parasitoïde (Vavre *et al*., 1999 ; Baldo *et al*., 2006). Ces observations suggèrent que les interactions entre l'hôte et son parasitoïde ont favorisé la transmission horizontale de *Wolbachia* dans les communautés de drosophiles-parasitoïdes. Les *Wolbachia* montrent une importante diversité phénotypique chez les parasitoïdes de drosophiles. Les bactéries peuvent provoquer une incompatibilité cytoplasmique qui, dans sa forme la plus simple, apparait lors des croisements entre mâles infectés et femelles saines (Poinsot *et al*., 2003). Chez *Leptopilina clavipes*, *L. australis* et *Asobara japonica*, *Wolbachia* induit une parthénogenèse (Werren *et al.*, 1995 ; Kremer *et al.*, 2009). La thélytoquie chez *L. clavipes* est produite par diploïdisation des œufs haploïdes. Ce mécanisme intervient durant

l'anaphase de la première mitose somatique et génère des descendants totalement homozygotes (Pannebakker *et al*., 2004). Enfin, *Wolbachia* est impliqué dans l'oogenèse chez *Asobara tabida* (Dedeine *et al*., 2001). Une des souches de *Wolbachia* semble indispensable chez certaines femelles car sa suppression peut réduire la production d'oocytes jusqu'à complète stérilité (Dedeine *et al*., 2001).

Au delà de leur rôle dans la reproduction de leur porteur, ces symbiotes peuvent modifier l'interaction hôte-parasitoïde. La dynamique de cette interaction dépend des effets des symbiotes sur la fitness de l'hôte. Les coûts de l'infection par *Wolbachia*, peuvent se traduire par une diminution de la longévité de la drosophile *D. melanogaster* (Min & Benzer, 1997), modifiant l'interaction avec son parasitoïde (Vavre *et al*., 2009). La parthénogenèse induite peut également avoir des conséquences génétiques importantes sur les hôtes. La duplication des gamètes (mécanisme impliqué dans la parthénogenèse induite par *Wolbachia*), empêche la recombinaison entre génotypes différents. Par conséquent, le manque de variations génétiques, ou l'absence d'élimination des allèles délétères que permet la reproduction sexuée, peut représenter un handicap dans la course aux armements entre l'hôte et le parasitoïde (Vavre *et al.*, 2009). Enfin, ces symbiotes peuvent modifier directement l'immunité de leur porteur : les drosophiles *Drosophila simulans* abritant *Wolbachia* sont moins résistantes aux parasitoïdes (Fytrou *et al.*, 2006).

D'autres effets sur le phénotype des hôtes ont été décrits principalement chez le puceron du pois. Ces modifications sont dues à des symbiotes facultatifs qui peuvent modifier les performances alimentaires des hôtes (Tsuchida *et al*., 2004), leur conférer une tolérance aux hautes températures (Montllor *et al.,* 2002) ou encore provoquer des variations dans leur couleur (Tsuchida *et al*., 2010). L'interaction entre un symbiote et son hôte est particulièrement sujette à évolution. Les symbiotes coévoluent avec leurs hôtes, ou provoquent l'évolution d'individus interagissant avec leurs hôtes. L'influence des symbiotes sur l'interaction entre leurs porteurs et leurs ennemis naturels peut être indirecte, via la favorisation de la fitness de l'hôte ou directe, via une résistance conférée par les symbiotes.

3. Interaction de l'hôte avec des prédateurs

Définition de la prédation

Un prédateur est un individu d'une espèce tuant, dans un but alimentaire, un individu d'une autre espèce généralement plus petite, la proie. Certains prédateurs sont 'spécialistes' comptant une seule espèce de proie. D'autres sont des 'généralistes', comme les coccinelles qui se nourrissent de nombreuses espèces d'hémiptères, coléoptères, hyménoptères, diptères, ou de larves de lépidoptères (Evans, 2009). Lorsqu'un prédateur intervient dans l'interaction hôte-parasitoïde, alors il devient également le prédateur du parasitoïde : le prédateur peut se nourrir de proies parasités par un parasitoïde. Les conséquences sur le parasitoïde sont alors importantes car il entre en compétition avec le prédateur. Sa valeur adaptative ne dépendra donc pas 'seulement' de l'interaction avec son hôte, mais aussi de ses capacités compétitives vis-à-vis du prédateur.

Prédateur et compétiteur : la prédation intraguilde

La compétition interspécifique est une interaction entre espèces partageant une ressource commune. De nombreux compétiteurs sont souvent engagés dans des relations prédateurs-proies. Ce mélange entre compétition et prédation est appelé la prédation intraguilde (Holt & Polis, 1997). La ressource partagée est dite proie 'extraguilde', la proie 'intraguilde' est celle qui est consommée par le prédateur 'intraguilde'. La prédation intraguilde peut être bidirectionnelle (les deux membres de la guilde peuvent être des prédateurs intraguilde), ou unidirectionnelle (la proie intraguilde ne peut être prédateur intraguilde) (Rosenheim *et al*., 1995) (Figure 1.2).

La prédation intraguilde peut être vue comme une force déstabilisante pour les communautés. Théoriquement, il est difficile d'atteindre un équilibre stable entre les trois espèces mises en jeu (Holt & Polis, 1997). Pour atteindre cet équilibre, la proie intraguilde doit être un compétiteur « efficace » dans l'exploitation de la ressource partagée. Si la proie intraguilde est moins compétitive que le prédateur, alors la combinaison de la compétition et de la prédation conduit à l'exclusion de cette espèce 'intermédiaire'. En revanche, si la proie intraguilde est plus compétitive que son prédateur pour l'exploitation de la ressource commune, alors les trois espèces peuvent coexister. Les proies intraguildes étant à la fois compétiteurs, prédateurs et proies, leur valeur sélective n'est pas seulement le fruit de

l'interaction simple avec la proie (ou l'hôte) mais elle est également liée à leurs stratégies d'évitement des prédateurs (Borer *et al*., 2007 ; Vance-Chalcraft *et al*., 2007).

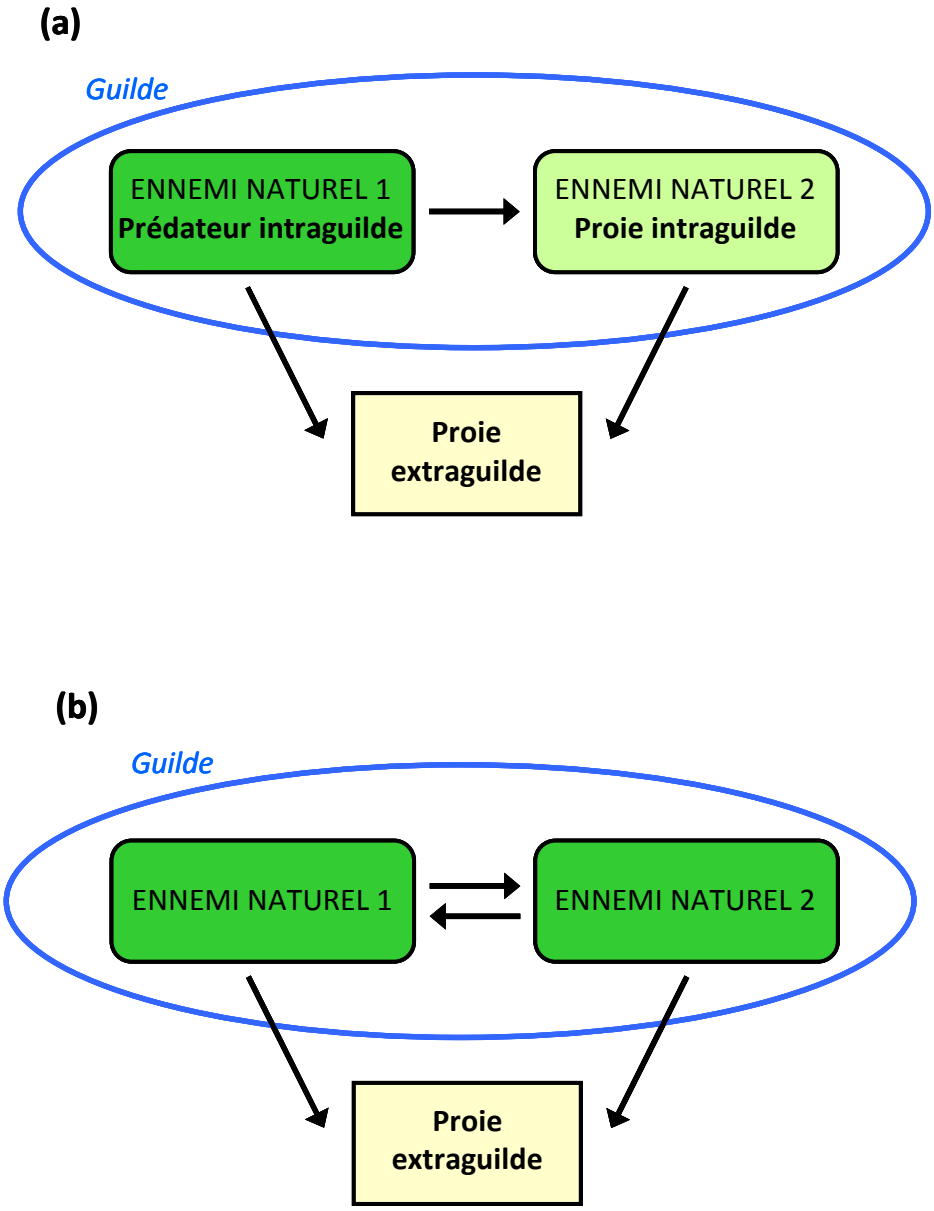

Figure 1.2. Schéma simplifié de prédation intraguilde unidirectionnelle (a) et bidirectionnelle (b). Les flèches représentent les relations de prédation ou de parasitisme.

Certains facteurs peuvent affecter la stabilité du système. La structure de l'habitat peut réduire les rencontres entre les acteurs. Certaines proies profitent par exemple de refuges fournis par l'environnement, diminuant les rencontres avec les prédateurs. Ces refuges réduisent la force des interaction intraguilde, et facilitent la coexistence des espèces (Janssen *et al*., 2007).

La présence d'une seconde ressource (proie ou hôte) peut également modifier les interactions intraguildes. Si le prédateur ou la proie intraguilde peut exploiter cette ressource alternative, alors les pressions associées à la prédation intraguilde sont moins importantes (Holt & Huxel, 2007).

La prédation intraguilde est très répandue notamment au sein des communautés de parasitoïdes (Rosenheim *et al*., 1995 ; Arim & Marquet, 2004). A l'exception des interactions parasitoïde-parasitoïde, la prédation intraguilde est souvent unidirectionnelle. Le prédateur consomme le parasitoïde (proie intraguilde) qui se développe dans son hôte (la proie extraguilde). La prédation intraguilde est ainsi particulièrement étudiée dans le cadre de luttes biologiques contre des ravageurs (Rosenheim *et al.*, 1995 ; Bampfylde & Lewis, 2007).
La consommation du parasitoïde par le prédateur peut avoir un effet important sur l'abondance du ravageur. Si le prédateur consomme exclusivement des proies parasitées, alors, à l'échelle d'une génération, le niveau de contrôle de la population de ravageurs reste similaire à celui atteint avec le parasitoïde seul. A plus long terme, les populations de parasitoïdes sont réduites, car prédatés, entrainant une diminution de la prédation, et une augmentation du nombre de ravageurs (*e.g.* Snyder & Yves, 2001). Par contre, si le prédateur consomme les deux types de proies (parasitées et non parasitées), ou seulement les proies non parasitées, le niveau de contrôle des ravageurs devient supérieur à celui atteint avec le parasitoïde seul.

Plusieurs études ont montré que les parasitoïdes pouvaient détecter des signaux émis par les prédateurs sur la surface des plantes. Ces signaux leur permettraient d'éviter les zones où sont présents ces ennemis, où celles ayant déjà été explorées (*e.g.* Nakashima & Senoo, 2003 ; Nakashima *et al*., 2004). Le parasitoïde *Aphidius colemani* montre des comportements de recherche de son hôte puceron *Myzus persicae* différents selon la présence ou non du prédateur (la punaise *Macrolophus caliginosus*). Lorsque ce dernier est

présent, le parasitoïde quitte la colonie d'hôtes beaucoup plus rapidement. Les mécanismes d'évitement du prédateur aurait ainsi été sélectionnés chez les parasitoïdes (Martinou *et al*., 2009).

IV. Conclusion

Les interactions hôtes-parasitoïdes évoluent sous l'influence d'un grand nombre de facteurs. Cette relation peut mener à une véritable course aux armements. Chacun des acteurs développe un panel de stratégies pour répondre aux pressions de sélection induites par l'antagoniste. Ces stratégies sont comportementales, permettant à l'hôte d'éviter son ennemi et d'éviter le parasitisme, ou au contraire, favorisant l'attaque chez le parasitoïde. Les stratégies impliquées sont également physiologiques, le parasitoïde utilisant des facteurs de virulence pour exploiter son hôte, et l'hôte luttant contre son ennemi immature grâce à son système de résistance. Cependant, les hôtes évoluent dans un réseau complexe d'interactions avec de nombreux autres organismes qui peuvent influencer la relation hôte-parasitoïde.

A ce jour, l'étude des interactions multipartites (plante/symbiote/hôte/prédateur - parasitoïde) est limitée à un nombre réduit de modèles biologiques. La compréhension de leurs mécanismes et de leurs conséquences écologiques et/ou évolutives reste fragmentaire. Comprendre le rôle des plantes hôtes, des symbiotes ou des prédateurs dans le fonctionnement et l'évolution des interactions hôte-parasitoïde reste un défi très important tant au point de vue fondamental que du point de vue appliqué. Cela pourrait permettre de mieux appréhender l'écologie des organismes ayant des pertinences agronomiques et/ou médicales (Thomas *et al.* 2009). Les travaux menés au cours de cette thèse permettent la poursuite et l'élargissement des études sur le rôle de l'environnement biotique d'un hôte sur l'écologie évolutive des interactions hôte-parasitoïde. A la lumière des travaux cités, il apparait que le système puceron-parasitoïde soit d'un intérêt très particulier pour étudier le fonctionnement évolutif des interactions hôte-parasitoïde et l'effet de l'écologie de l'hôte sur l'évolution de ces interactions.

Les modèles biologiques considérés dans les recherches décrites dans ce manuscrit sont le puceron du pois, *Acyrthosiphon pisum,* et son principal parasitoïde hyménoptère, *Aphidius ervi*. Ce puceron est fortement spécialisé à la plante dont il se nourrit, engendrant

la formation de races d'hôte (Peccoud *et al*., 2009a). En conséquence, il existe de fortes divergences génétiques et phénotypiques dans leurs populations sympatriques. Le puceron du pois peut également abriter des symbiotes facultatifs dont certains confèrent au porteur une résistance aux parasitoïdes (Oliver *et al*., 2003). Enfin, le puceron du pois est aussi la proie de nombreux prédateurs. Ce système est par conséquent idéal pour évaluer comment le réseau d'interactions de l'hôte affecte les parasitoïdes. Durant cette thèse, nous avons considéré l'influence de la plante hôte du puceron et des symbiotes qu'il abrite, la prédation intraguilde impliquant ce système ayant déjà été abordée par ailleurs (*e.g.* Snyder & Yves, 2001 ; Nakashima *et al*., 2004 ; Meisner *et al*., 2011).

Chapitre 2

LES MODELES BIOLOGIQUES :

LE PUCERON DU POIS *ACYRTHOSIPHON PISUM*-

LE PARASITOÏDE *APHIDIUS ERVI*

I. L'hôte : le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum*

1. Généralités : classification, répartition et biologie

Le genre *Acyrthosiphon* appartient à la famille des Aphididae, composée de plus de 4000 représentants. Environ 90 espèces du genre sont réparties sur tout le globe, de l'Europe de l'Ouest à l'Asie de l'Est, avec également quelques espèces originaires d'Amérique du Nord. Le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* est présent sur tous les continents (excepté les régions aux températures extrêmes, polaires notamment) (Eastop, 1971).

A. pisum mesure environ 4 mm, sa couleur étant soit verte ou rose. Il est monoécique (c'est-à-dire qu'il effectue tout son cycle biologique sur une seule plante hôte). Ce puceron se caractérise par un polyphénisme de reproduction. Du printemps à l'automne, une vingtaine de générations de parthénogénèse méiotique se succèdent durant lesquelles les femelles vivipares produisent des descendants génétiquement identiques. Cette phase de reproduction asexuée assure une forte croissance des populations aphidiennes. Puis, des femelles parthénogénétiques dites sexupares produisent des femelles et des mâles sexués en réponse aux modifications climatiques et photopériodiques de l'automne (MacKay *et al*., 1987). Après rencontre des individus sexués puis fécondation, les œufs sont pondus et passent l'hiver à l'état de diapause, pour donner naissance à des nouvelles fondatrices au début du printemps (Eastop, 1971).

Le morphe de dispersion est également un autre exemple de polyphénisme chez les pucerons. Le phénotype de dispersion des femelles parthénogénétiques *d'A. pisum* (ailées et aptères) dépend de la qualité des conditions environnementales. Lorsqu'elles sont favorables, les populations sont principalement composées d'individus aptères. A l'inverse, un environnement hostile provoque une augmentation de la production de descendants ailés. Les principaux facteurs environnementaux ayant un effet sur le morphe de dispersion sont la qualité de la plante hôte (Sutherland, 1969), le niveau de compétition locale (Johnson, 1965) ou encore la présence d'ennemis naturels (Sloggett & Weisser, 2002).

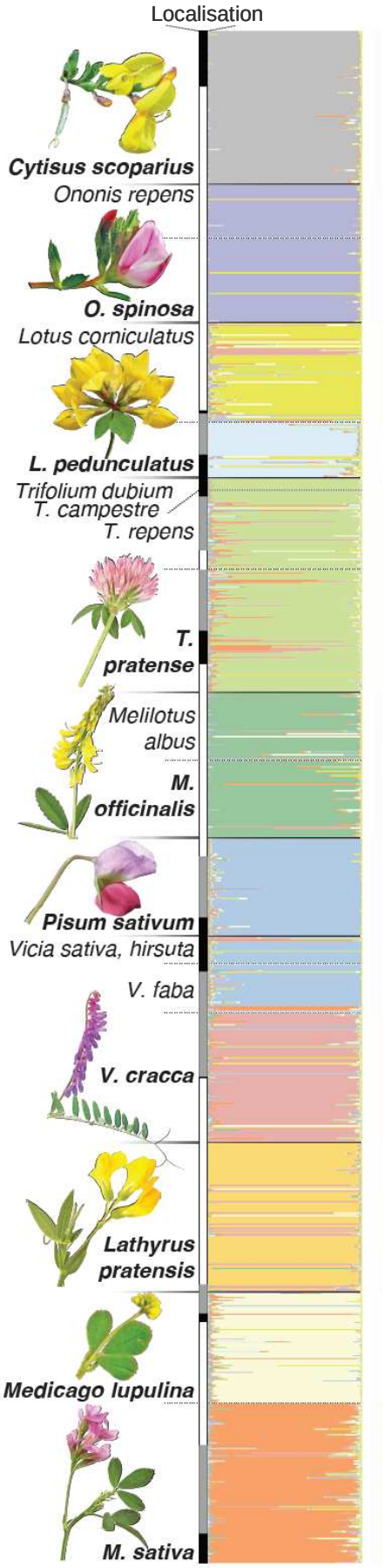

Figure 2.1. Structure génétique des populations de pucerons du pois. Les segments horizontaux représentent 1090 individus (génotypes de 14 microsatellites) et les couleurs représentent la proportion d'appartenance à la population inférée. Les génotypes sont ordonnés par plantes puis par localisation comme indiqué sur la barre verticale à gauche. Blanc : Est de la France, noir : Nord-ouest de la France et gris : Allemagne de l'est (d'après Peccoud *et al.*, 2009a).

Au-delà de ses caractéristiques biologiques et écologiques, le puceron du pois a été choisi comme espèce modèle pour la mise au point et le développement d'outils de génomique (Brisson & Stern, 2006 ; Tagu *et al*., 2008 ; The International Aphid Genomics Consortium, 2010).

2. Spécialisation alimentaire, génétique et divergences phénotypiques

Acyrthosiphon pisum est présent sur une large gamme de plantes hôtes au sein des tribus Trifolieae, Vicieae, Loteae et Genisteae (trèfles, luzernes, mélilots, bugranes, genêts, pois, lotiers etc…). Une cinquantaine de plantes hôtes ont été référencées (Eastop, 1971), et plusieurs centaines d'espèces seraient des hôtes potentiels. *A. pisum* est surtout connu pour être un ravageur de cultures fourragères (van Emden & Harrington, 2007) : ses populations sont très denses dans les parcelles de trèfles (trèfle violet *Trifolium pratense* et trèfle blanc *T. repens*), de luzerne cultivée (*Medicago sativa*), de pois (*Pisum sativum*) et de fève (*Vicia faba*). Piqueurs suceurs, ils se nourrissent uniquement de sève, en plantant leur stylet à travers la paroi végétale.

A ce jour, 11 races d'hôtes fortement différenciées ont été déterminées dans les populations européennes du puceron du pois. Peccoud *et al*. (2009a) montrent que ces races présentent une très forte structuration génétique correspondant à leur plante d'origine, mais indépendante de la localisation géographique (Figure 2.1). Les individus proviennent de plantes cultivées (pois, trèfle violet, fève et luzerne) et sauvages (bugrane, genêt à balai, lotier des marais, mélilot, vesce cracca, luzerne lupuline, lotier corniculé et gesse des prés). *A. pisum* se caractérise également par une spécialisation alimentaire sur 10 des 13 plantes étudiées. Les populations américaines et européennes montrent de meilleures performances en termes de longévité individuelle et de fécondité sur leur plante hôte d'origine (Via, 1991 ; Sandström, 1994 ; Peccoud *et al*., 2009a). En conséquence, l'isolement reproducteur entrainé par la spécialisation alimentaire, a favorisé la réduction des flux de gènes entre races d'*A. pisum*, illustrant un cas de spécialisation écologique en sympatrie.

D'autres différences écologiques et phénotypiques entre populations spécialisées ont également été mises en évidence. C'est le cas du mode reproduction, avec des altérations du cycle « classique » vers une parthénogénèse totale (Frantz *et al.*, 2006), de la couleur ou encore les comportements de défense (Kunert *et al*., 2010).

3. Une riche composition endosymbiotique

Toutes les lignées d'Aphididae présentent une symbiose obligatoire avec la γ-protéobactérie *Buchnera aphidicola*. Cette interaction forte provient d'une infestation ancestrale par une entérobactérie apparentée à la lignée d'*Escherichia coli* il y a 100 à 150 millions d'années (Baumann *et al.*, 1995). Elle est transmise de manière strictement verticale de la mère à la descendance. Incapable de survivre et d'être cultivée hors de son hôte, *Buchnera aphidicola* vit dans les bactériocytes, cellules géantes spécialisées bordant le tube digestif. Elle fournit au puceron des acides aminés essentiels, absents de la sève élaborée (Liadouze *et al*., 1995 ; Douglas, 1998). L'absence de *Buchnera* provoque un retard de croissance, la mort ou la stérilité de son hôte (Ohtaka & Ishikawa, 1991).

Outre ce symbiote primaire, *A. pisum* peut héberger d'autres symbiotes facultatifs, ou secondaires, également hérités par voie maternelle. A ce jour, 7 ont été identifiés, pouvant infecter ou coinfecter le puceron du pois (Frantz *et al.*, 2009 ; Guay *et al*., 2009 ; Tsuchida *et al*., 2010) : *Serratia symbiotica*, *Regiella insecticola*, *Hamiltonella defensa, Spiroplasma sp., Rickettsia sp., PAXS* (« Pea Aphid X-type Symbiont ») et *Ricketsiella sp*. Ces bactéries se situent dans les cellules spécialisées bordant les bactériocytes à *Buchnera* ou dans la cavité générale. La prévalence des symbiotes facultatifs diffère selon les races d'hôte du puceron : *Serratia symbiotica* et *Rickettsia sp* sont fréquents chez les pucerons issus du pois ou de la fève ; *R. insecticola* se trouve préférentiellement chez la race trèfle ; *H. defensa* chez la race luzerne et *Spiroplasma* chez les races trèfle et luzerne (Frantz *et al.,* 2009).

Ces bactéries ont des effets majeurs sur le phénotype de leurs porteurs. Elles peuvent modifier leurs performances alimentaires (Tsuchida *et al*., 2004), leur conférer une tolérance aux hautes températures (Montllor *et al.,* 2002), provoquer des variations dans leur couleur (Tsuchida *et al*., 2010), ou encore les protéger contre certains ennemis naturels (Oliver *et al*., 2003 ; Scarborough *et al*., 2005). Du fait de sa récente découverte, les effets de PAXS restent encore inconnus (Guay *et al*., 2009 ;).

4. Les moyens de défense du puceron du pois contre les parasitoïdes

Plusieurs espèces de parasitoïdes utilisent *A. pisum* comme hôte. Parmi les Aphidiinae, on note *Aphidius ervi, Aphidius avenae, Aphidius eadyi, Aphidius smithi*, *Aphidius urticae*, *Aphidius picipes*, *Ephedrus plagiator* ou encore *Praon barbatum*. *A. ervi*, *A. avenae* et

E. plagiator sont des espèces bien représentées dans l'ouest de la France (Starý 1974 ; 1988). Pour éviter de succomber au parasitisme de leurs parasitoïdes, les pucerons présentent des moyens de défense permettant d'éviter la rencontre, d'éviter l'attaque en cas de rencontre du parasitoïde ou encore de résister au parasitoïde immature en place.

Eviter la rencontre et éviter l'attaque

A la vue de l'ennemi ou d'un congénère attaqué, le puceron du pois peut utiliser plusieurs stratégies. Les défenses comportementales des pucerons étant décrites dans le chapitre 1. II. 1., elles ne seront donc pas détaillées ici.

Les défenses immunitaires

Alors que les défenses comportementales interviennent pour éviter le parasitisme, des formes de résistance contre le parasitoïde immature en place existent également chez le puceron du pois. Plusieurs études permettent de mettre en évidence une variation de la résistance au parasitisme chez différents clones d'*A. pisum* (Henter, 1995; Henter & Via, 1995). Toutefois, la résistance au parasitoïde chez les pucerons reste faiblement documentée car elle est peu observée. L'encapsulation, réponse immunitaire classique des insectes contre les parasitoïdes, n'a jamais été signalé chez le puceron du pois (Gerardo *et al.*, 2010). Certains événements de mélanisation suivant le parasitisme ont été suggérés (Altincicek *et al*., 2008) mais le système de résistance d'*A. pisum* semble limité car dépourvu de certains gènes essentiels aux mécanismes classiques de résistance chez les insectes (Gerardo *et al.,* 2010).

La résistance conférée par des symbiotes

La résistance conférée par des symbiotes à leurs porteurs est un phénomène relativement inédit. Parmi les insectes, les symbiotes présents chez les pucerons sont les plus étudiés. Le puceron du pois possédant un système immunitaire limité, leur principale protection contre les parasitoïdes est donc apportée par les symbiotes (Oliver *et al*., 2010).

La bactérie *Hamiltonella defensa* fourni à *A. pisum* une protection aux parasitoïdes *A. ervi* et *A. eadyi*, pouvant entrainer un niveau de résistance très élevé chez certains clones (Oliver *et al.*, 2003 ; 2005 ; Ferrari *et al.*, 2004 ; Bensadia *et al.*, 2006). Cette résistance est liée à la présence de bactériophages nommés 'APSE' (*A. pisum* Secondary Endosymbiont).

Ces virus sont porteurs de gènes homologues à des gènes codant pour des toxines, comme la « Shiga-like toxin », la « cytolethal distending toxin »(CDT) et la « YD-repeat toxins » (Degnan & Moran, 2008 ; Oliver *et al*., 2009). Plus particulièrement, les toxines CDT, décrites chez de nombreux pathogènes, sont des nucléases qui provoquent un arrêt du cycle cellulaire. L'hypothèse admise est que ces toxines provoqueraient un arrêt prématuré du développement du parasitoïde immature (Figure 2.2). Par ailleurs, la variabilité génétique observée dans le génome du phage expliquerait la variation du degré de résistance conférée par *H. defensa* (Degnan & Moran, 2008).

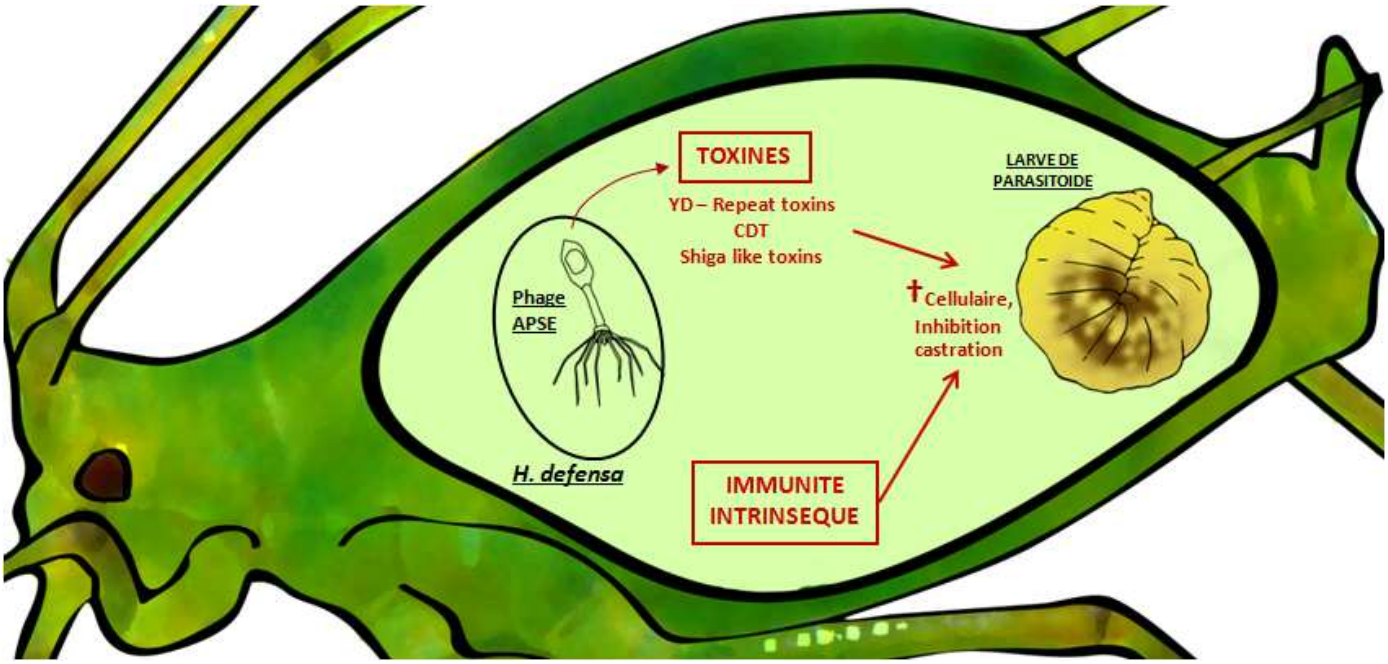

Figure 2.2. Représentation schématique des mécanismes hypothétiques de la résistance du puceron du pois porteur de *Hamiltonella defensa*.

Plusieurs autres facteurs peuvent modifier cette résistance apportée par la bactérie. Des pucerons exposés à des fortes températures perdent la résistance (Bensadia *et al.,* 2006), sauf s'ils sont également infectés par PAXS (Guay *et al*., 2009). D'autres associations symbiotiques permettent également une certaine résistance contre les parasitoïdes, comme la co-infection *H. defensa-Spiroplasma* ou la co-infection *Regiella-Spiroplasma* (Nyabuga *et al.*, 2010). Les interactions mises en jeu dans ce modèle de résistance sont donc particulièrement complexes, puisqu'elle serait le produit d'une relation 'phage-bactérie-puceron-parasitoïde'. Les mécanismes moléculaires associés à cette forme de résistance inédite restent en partie méconnus.

II. Le parasitoïde : *Aphidius ervi*

1. Classification

Les hyménoptères parasitoïdes représentent un groupe d'espèces constituant potentiellement près de 20% des insectes (LaSalle & Gauld, 1992). *Aphidius ervi* est membre de la sous-famille des Aphidiinae (super famille des Ichneumonidae et famille des Braconidae (Hagvar & Hofsvang, 1991)). Cette sous famille utilise exclusivement les pucerons comme hôtes. *Aphidius ervi* se distingue morphologiquement des autres espèces de Braconidae par le nombre de segments antennaires, la forme particulière des nervures alaires et la texture dite « bosselé » de la partie latérale de son pétiole (Starý, 1973 ; Marsh, 1977 ; Pungerl, 1983) (Figure 2.3). Des méthodes d'identification moléculaires par la technique du barcoding permettent également de différencier les espèces d'*Aphidius* (Derocles, communication personnelle).

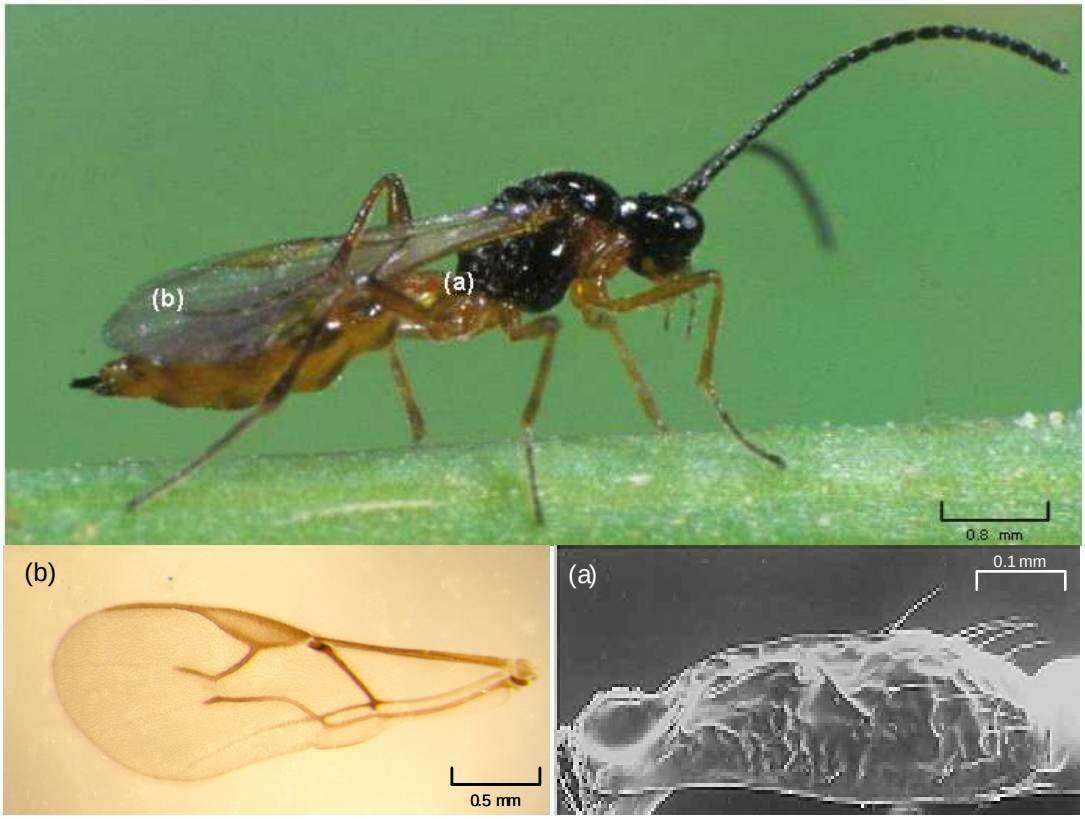

Figure 2.3. Indices de détermination morphologiques d'*Aphidius ervi*.

(a) partie latérale du pétiole à structure « bosselée », (b) Nervures allaires (Photos du parasitoïde et de l'aile par B. Chaubet ; image du pétiole en microscopie électronique à balayage extraite de Takada, 2002).

2. Ecologie et Biologie

A. ervi est un endoparasitoïde koïnobionte solitaire, ce qui signifie que la femelle parasitoïde pond un œuf à l'intérieur de l'hôte (endoparasitoïde), que cet hôte ne permet le développement à terme que d'un seul individu (parasitoïde solitaire) et qu'enfin l'hôte est maintenu en vie tout au long du développement et ne meurt que lors de la nymphose du parasite. Ainsi, si une femelle pond un œuf dans un hôte déjà parasité (pratique appelée le superparasitisme), les individus surnuméraires sont éliminés.

A. ervi est présente un spectre d'hôtes très large : il peut parasiter une vingtaine d'espèces (du genre A*cyrthosiphon* : *A. pisum*, *A. caraganae*, *A. nigripes*…, ou encore le puceron des céréales *Sitobion avenae,* ou le puceron du pêcher *Myzus persicae,* etc.) (Marsh, 1977 ; Starý, 1974). Depuis de nombreuses années, *A. ervi* est un agent de contrôle biologique des populations aphidiennes et a été introduit dans plusieurs pays pour lutter contre ces ravageurs (Angalet & Fuester, 1977 ; Starý, 1993 ; Milne, 1999).

3. Cycle de vie

Le cycle de vie d'*Aphidius ervi* est illustré en Figure 2.4.a.

La ponte d'un œuf : l'oviposition

Accouplée ou vierge, une femelle peut pondre dans un hôte. *A. ervi* est une espèce présentant une parthénogénèse arrhénotoque : les femelles sont issues d'œufs fertilisés (diploïdes) alors que les mâles résultent d'œufs non fécondés (haploïdes). Ce cycle de reproduction 'haplo-diploïde' permet aux femelles de contrôler le sexe de chaque descendant. Après exploration antennaire du puceron, elle courbe son abdomen en-dessous de son thorax et l'allonge entre ses pattes afin d'introduire son ovipositeur dans l'hôte et d'y déposer un œuf (Figure 2.4.a).

Le développement

L'œuf d'*Aphidius ervi* déposé dans l'hémolymphe du puceron est citriforme et mesure environ 90 µm de long. Hydropique, il croit par absorption d'éléments nutritifs provenant de l'hôte au travers de l'enveloppe embryonnaire. Le développement larvaire commence 3 jours environ après l'oviposition, comptant 3 stades successifs durant lesquels le parasitoïde consomme progressivement les tissus internes du puceron.

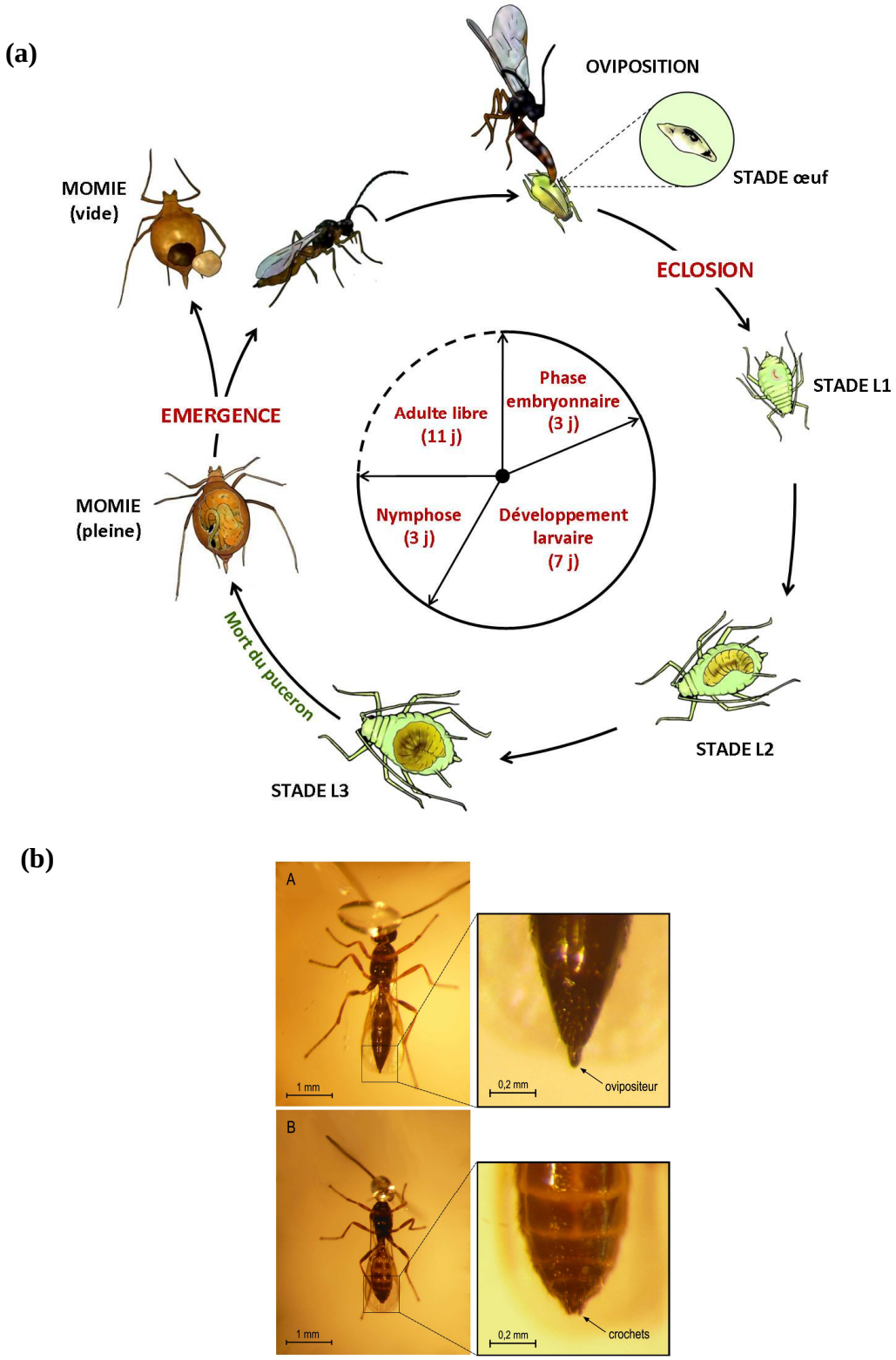

Figure 2.4. Cycle biologique d'*Aphidius ervi*. (a) Etapes du cycle, 'j' représentant le nombre de jours pour un développement à 20°C. (b) Dimorphisme sexuel : photographie face ventrale du stade adulte d'une femelle en A et d'un mâle en B (photos : F. Zélé).

Au terme de cette étape d'environ 10 jours, la larve tisse son cocon à l'intérieur de l'hôte (après l'avoir fixé à sa plante). Lors de la nymphose, seule la cuticule du puceron subsiste, le parasite formant alors une momie. Enfin, à l'issue des 3 jours de stade nymphal, l'imago émerge en pratiquant une ouverture circulaire sur la partie dorsale de la momie. Le cycle complet de l'oviposition à l'émergence de l'adulte dure en moyenne 15 jours à 20°C (Figure 2.4.a) (Hagvar & Hofsvang, 1991).

Le stade adulte

Les mâles ont des antennes plus longues, un abdomen plus arrondi et des ailes plus courtes que les femelles (Figure 2.4.b). Généralement après l'émergence, la femelle ne s'accouple qu'une seule fois. Les spermatozoïdes sont stockés dans la spermathèque, lui permettant de féconder les ovocytes qui sont estimés à environ 300 par femelle. Enfin, l'adulte survit entre 10 et 15 jours à 20°C.

4. La virulence chez *A. ervi*

Les molécules impliquées dans la virulence d'un parasitoïde ont le plus souvent une origine maternelle. Elles sont contenues dans le venin injecté dans le puceron avec l'œuf lors de l'oviposition. Elles provoquent une castration de l'hôte qui peut être totale lorsque le stade L1 est parasité (Digilio *et al.*, 1998 ; Digilio *et al.*, 2000). La γ-glutamyl transpeptidase (γGT) est le facteur responsable de cette castration. Via une altération du métabolisme du glutathion (molécule impliquée dans le maintien cellulaire), il provoque un stress oxydatif qui induirait l'apoptose des cellules à l'apex des ovarioles du puceron du pois (Falabella *et al.*, 2007).

L'effet du venin est parachevé par les tératocytes, cellules dérivant de la membrane séreuse entourant l'œuf du parasitoïde. Alors que le venin agit au niveau de l'ovogenèse, ces cellules provoquent une dégradation des embryons par un mécanisme de digestion (cytolyse) (Falabella *et al.*, 2000). Les tératocytes d'*A. ervi* synthétisent deux molécules principales : une « Fatty acid-binding protein » (FABP) et une énolase. La FABP assurerait le transport dans l'hémolymphe des acides gras générés par la digestion des tissus de l'hôte (Falabella *et al.*, 2005). L'énolase est une enzyme de la glycolyse associée à des pathologies lorsqu'elle est présente dans l'environnement extracellulaire, notamment à la surface des cellules eucaryotes et procaryotes. Localisée à la surface des tératocytes, de la larve

parasitoïde et des embryons du puceron en dégénération, elle jouerait un rôle dans la régulation de la dégradation des tissus de l'hôte par les tératocytes et dans l'immunoévasion du parasitoïde (Falabella *et al.*, 2009) (Figure 2.5.).

L'ensemble des altérations provoquées chez le puceron par les molécules du venin et les tératocytes ont pour effets de détourner les ressources de l'hôte au profit du développement du parasitoïde (Falabella *et al.*, 2000). Les activités cytolytiques des tératocytes sont observées sur des tissus spécifiques et à des temps donnés. Ces contraintes spatiales et temporelles sont essentielles à la survie de l'hôte, car un processus de digestion continu ou brutal pourrait gravement affecter sa physiologie, compromettant le développement progressif du parasitoïde (Pennacchio & Strand, 2006).

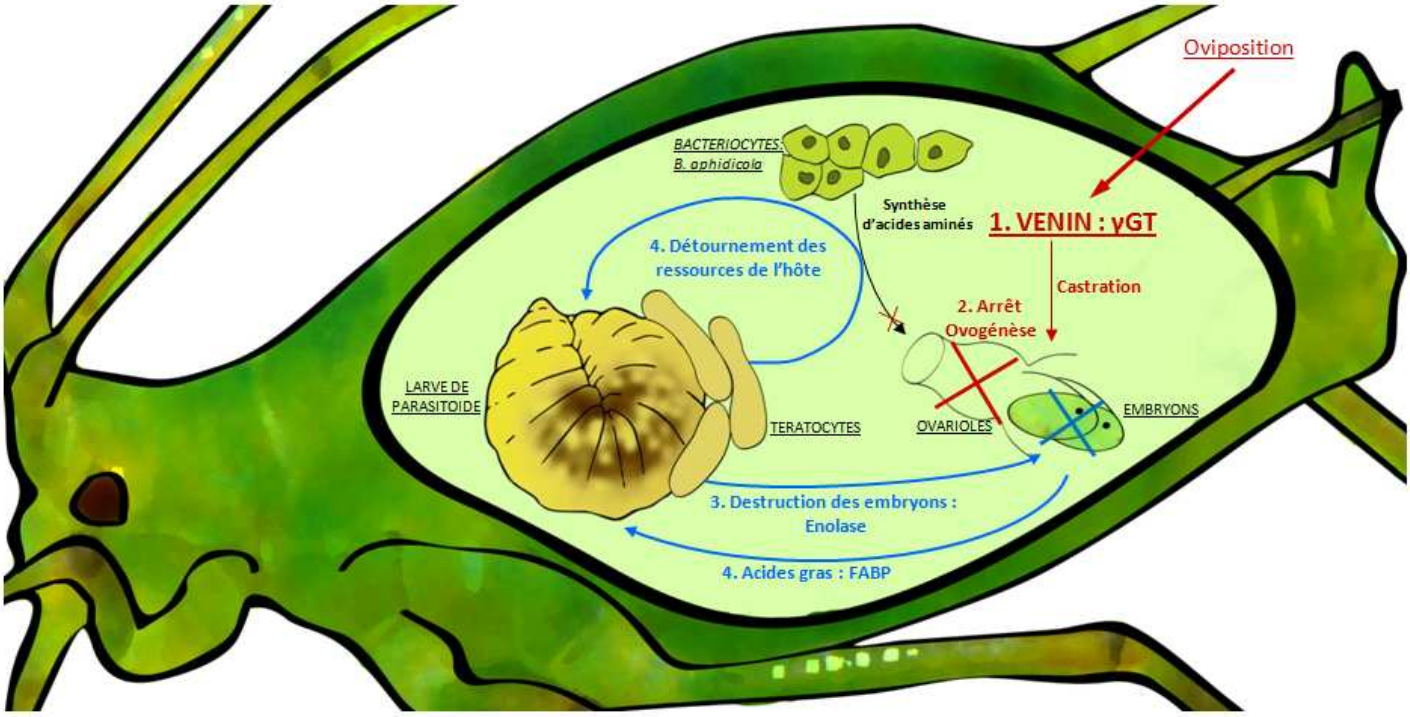

Figure 2.5. Représentation schématique de la physiologie de la virulence d'*A. ervi.* Sont décrits le rôle joué par le venin dans les processus de régulation de l'hôte et les fonctions hypothétiques des molécules émises par les tératocytes (adapté d'après Falabella *et al.*, 2000 ; 2005 ; 2009).

Chapitre 3.

INFLUENCE DE LA SPECIALISATION D'*A. PISUM* SUR LA STRUCTURE DES POPULATIONS DE PARASITOÏDES

I. Spécialisation écologique et génétique de l'hôte

1. Objectifs

Des travaux récents ont montré l'existence de conditions particulières dans lesquelles les populations de phytophages peuvent diverger en sympatrie (*e.g*. Peccoud & Simon, 2010). Dans ces conditions, la sélection naturelle favorise les associations entre des gènes affectant la performance sur une plante hôte et la préférence pour cette plante. Les flux géniques entre populations spécialisées sur des plantes hôtes distinctes sont alors contre sélectionnés. Cette formation de "races d'hôte", par le biais de la spécialisation alimentaire, engendre des divergences génétiques et phénotypiques profondes dans les populations sympatriques du phytophage (Drès & Mallet, 2002).

Le puceron du pois est *A. pisum* est spécialisé sur 11 espèces de plantes comme le pois, le trèfle ou la luzerne et présente des populations génétiquement différenciées. Cette spécialisation alimentaire est à l'origine d'un isolement reproducteur entre les populations. Les individus spécialisés forment alors des races d'hôte (ou biotypes) (Peccoud *et al*., 2009a). Cette spécialisation écologique chez *A. pisum* s'accompagne de divergences phénotypiques. Les lignées issues du pois et de la fèverole investissent fortement dans la reproduction sexuée et produisent plus de mâles ailés que celles du trèfle et de la luzerne, par exemple (Frantz *et al*., 2009). Les comportements de défense contre les ennemis naturels sont aussi différents selon les races (Kunert *et al*., 2010). Les populations spécialisées montrent également des compositions distinctes en symbiotes secondaires (Frantz *et al.*, 2009).

Les parasitoïdes du puceron du pois font alors face à des populations hôtes très structurées et hétérogènes. Etant donnée la relation intime entre le parasitoïde et son hôte, la spécialisation alimentaire d'*A. pisum* pourrait engendrer une structuration génétique des populations sympatriques d'*A. ervi*. Dans ce cas, la spécialisation alimentaire chez le ravageur aurait un effet cascade : elle génèrerait une spécialisation parasitaire chez ses ennemis et limiterait de fait les échanges de parasitoïdes entre les différents compartiments d'un paysage agricole.

Le travail présenté ci-après a pour objectif d'évaluer l'influence de la spécialisation alimentaire du puceron du pois sur la structuration génétique des populations de son parasitoïde *A. ervi*. Nous identifions si ce trait écologique chez *A. pisum* génère une spécialisation parasitaire chez ses parasitoïdes (c'est-à-dire, une race de parasitoïdes par

biotype aphidien). Afin de mieux identifier les sources de différenciation génétique entre populations de parasitoïdes, les propriétés génétiques des populations sympatriques (entre plantes hôtes) et allopatriques (entre sites) sont comparées.

2. Approche et méthode générale

Plantes hôtes et régions inspectées

Deux campagnes d'échantillonnage ont été effectuées d'Avril à Aout 2008 et en Juin 2010 sur deux sites principaux distants de 40 kms : Domagné (Ille-et-Vilaine) et le centre INRA du Rheu (Ille-et-Vilaine). Les deux sites présentaient une large variété de légumineuses cultivées et sauvages. Des échantillonnages ont également été effectués en Suisse (près de Lausanne) et dans l'est de la France (Nancy (Meurthe et Moselle), Mulhouse (Haut Rhin), Châlons-en-Champagne (Marne) et Mirecourt (Vosges)). L'échantillonnage consistait aux prélèvements de pucerons et de momies. Les pucerons étaient maintenus en laboratoire pour recueillir d'éventuelles momies. Les momies récupérées et échantillonnées étaient isolées dans l'attente de l'émergence du parasitoïde. Après la détermination du parasitoïde émergent, les individus ont été placés dans l'éthanol à 95% puis génotypés.

Choix des marqueurs génétiques et du type d'analyse

Notre étude portant sur un grand nombre de populations différentes, il était indispensable de disposer de marqueurs suffisamment polymorphes pour les distinguer. Des marqueurs microsatellites développés et utilisés par Hufbauer *et al*. (2001) pour l'analyse des populations américaines ont donc été considérés. Cependant, le polymorphisme des marqueurs retenus était faible (de 2 allèles pour l'un, à 9 pour le plus polymorphe). Ils présentaient surtout des difficultés d'amplification et de lecture. Par conséquent, de nouveaux marqueurs microsatellites pour *A. ervi* ont été développés. Parmi une quarantaine de marqueurs testés, douze ont été sélectionnés selon leur facilité d'utilisation, leur profil et leur polymorphisme. La localisation génétique de ces marqueurs reste cependant inconnue. Seules les femelles (diploïdes) ont été considérées dans cette étude. Il est à noter que le développement de ces marqueurs a été relativement long, car les quantités d'ADN d'*Aphidius ervi* sont particulièrement faibles et leurs qualités mauvaises, que l'extraction ait été effectuée par la méthode du Salting-out, ou avec un Kit. L'ADN fourni à finalement été extrait à partir d'une dizaine d'individus par tube pour satisfaire les exigences de

l'expérimentation. Pour ces diverses raisons, nous avons accumulé un retard conséquent lors de la thèse.

3. Résultats : génétique des populations d'*A. ervi* – Article 1

Les résultats de cette étude font l'objet d'un article en préparation :

Does high dispersal prevent host-associated differentiation in parasitoid populations of a plant-specialized aphid?

Dion E. ; Simon J-C. & Outreman Y.

Does high dispersal prevent host-associated differentiation in parasitoid populations of a plant-specialized aphid?

Dion E. [1,2], Simon J-C. [1,3] and Outreman Y. [1,4]

[1] *UMR 1099 INRA-Agrocampus Ouest-Université Rennes 1 "Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes", 65, rue de Saint-Brieuc CS 84215, 35042 Rennes Cedex, and BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France.*

[2] *E-mail: emilie.deguydion@gmail.com*

[3] *E-mail: jean-christophe.simon@rennes.inra.fr*

[4] *E-mail: yannick.outreman@rennes.inra.fr*

Corresponding author:

Yannick Outreman

UMR 1099 INRA-Agrocampus Ouest- Université Rennes 1 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes'

65, rue de Saint-Brieuc CS 84215,

35042 Rennes Cedex, France.

Tel.: +33 2 23 48 55 68

Abstract

All organisms interact with a wide range of species, being part of an interaction web which impacts greatly on their evolutionary trajectories. Most insect herbivores have intimate associations with their host plants and frequently exhibit high degrees of host plant specialization. Host races, defined as populations specialized on a restricted number of plants and in partial reproductive isolation, are then reported in many phytophagous insect species. The cascading host-associated differentiation (HAD) hypothesis states that ecological specialization can happen at a higher trophic level, leading to specialization of specialized phytophagous insects' natural enemies. The pea aphid *Acyrthosiphon pisum* encompasses at least eleven conspecific host races specialized on different Legume species, showing divergent genetic patterns. Here we tested for a genetic HAD in populations of *Aphidius ervi*, the main insect parasitoid of the pea aphid, sampled from the red-clover and alfalfa races. *A. ervi* populations were genotyped with newly developed microsatellites markers and their genetic variability and structure assessed. No evidence of HAD in *A. ervi* has been found: populations from clover and alfalfa races were not genetically different, exploiting indifferently these two *A. pisum* races. Additionally, we confirmed the great dispersal potential of this parasitoid species, gene flow between populations occurring at very large distances preventing adaptation to local conditions. Those results are also discussed considering *A. ervi* potential as a biological control agent against aphids.

Keywords: cascading host-associated differentiation, microsatellites, host races, parasitoid, biological control, *Hamiltonella defensa* prevalence

Introduction

Most of the species are part of complex interaction webs, and engaged in mutualistic or antagonistic interactions with others species (Begon *et al*., 2006). All these relationships influence organisms' traits such as survivorship or reproduction, and consequently imply co-evolutionary processes. These interactions between individuals and the environment also affect gene flow between populations that, when strong, can decrease local adaptation and prevent the genetic divergence of local populations. Conversely gene flow may be restricted as well because individuals can show habitat or host fidelity leading to genetically structured population (Fox & Wolf, 2006).

Populations may be genetically distinguished based on sufficient differentiation at neutral genetic markers and reveal differences at ecologically important traits. For example, the interaction between some phytophagous insects and their host plant may lead to gene flow reduction between populations specialized on different plants. These specialized populations possess different genetic and reproduction properties, and are called races, or biotypes. They are genetically structured according to their host plant, and this can even happen in sympatry, leading to reproductively isolated entities undergoing speciation (Schluter, 2001; Drès & Mallet, 2002). The natural enemies of specialized phytophagous insect populations, such as predators or parasites, thus face very structured and heterogeneous local prey/host populations. Because of the intimate interactions between hosts and parasites, the host-associated differentiation (HAD) may cascade across trophic levels, with HAD in herbivorous insects leading in turn to genotypic and phenotypic divergence in parasite populations (Stireman *et al*., 2006).

Insect parasitoids are organisms whose larva develops to the detriment of a single host which is generally killed at interaction's end. They are one of the most common natural enemies used in pest management. Useful auxiliaries would have high dispersal rates compared to their hosts, and especially in heterogeneous environments. For a successful biological control by introduction of auxiliaries, it has been recommended to increase their adaptive potential with high population size expected to harbour greater genetic variability, and less inbreeding depression (Kaweki & Ebert, 2004; Memmott *et al*., 2005; Reed *et al*., 2003; Phillips *et al.*, 2008). Thus, identifying the factors responsible for genetic differentiation in parasitoid populations is also very important in biological control processes; as it may provide important information about populations exhibiting local adaptation to environmental conditions or organisms, and gives clues about the efficiency of the biological control processes (Mills & Kean, 2010). Generalist parasitoids are assumed to exploit a wide

range of host species on which they may show variations in performances. These differences in parasitoid fitnesses according to host species could lead to adaptation of particular genotypes according to host species (Fry, 1996; Vaughn & Antolin, 1998; Antolin *et al*., 2006; Henry *et al*., 2008). Another possible evolutionary interaction may occur between parasitoids and their host including evolved host resistance to parasitoid attacks, and parasitoid virulence overcoming host defences (Green *et al*., 2000). These examples provide strong evidence for the ability of generalist parasitoids to adapt to pest species; with the great phytophagous insects' diversity facilitating their parasitoids diversification (Feder & Forbes, 2010).

Aphidius ervi (Hymenoptera: Braconidae) is a parasitoid attacking different aphid species from Fabaceae or Poaceae plants, but using mainly the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* as host. Genetic analysis and tests of host plant specificity indicate the existence of at least 11 well-distinguished sympatric pea aphid populations associated with different host plants in Western Europe (Peccoud *et al*., 2009a). Furthermore, a high proportion of individuals specialized on alfalfa (*Medicago sativa*) harbour a particular secondary symbiont, called *Hamiltonella defensa* which confers their bearer enhanced resistance to parasitoids (Oliver *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2005; Frantz *et al*., 2009). Several studies have shown the *A. ervi* potential to adapt locally to different aphid species, (*A. pisum* and *A. solani*, see Henry *et al*., 2008; 2010), and also to highly resistant pea aphid populations (Dion *et al*., 2011). An *A. ervi* population of about 1000 individuals originated from France was introduced into North America in 1959 to control the pea aphid (Angalet & Fuester, 1977). In spite of the low number of founders, a mild population bottleneck was recorded when European and American populations were compared (Hufbauer *et al*. 2004), indicating a good potential of *Aphidius ervi* to adapt to different *A. pisum* populations; and more particularly in a biological control context.

The *A. ervi-A. pisum* relashionship represents an interesting system in both fundamental and applied ecology and evolutionary biology. This parasitoid species allows studying the adaptive potential to specialized hosts and is a particularly interesting for biological control of crop pests (Angalet & Fuester, 1977; Henter, 1995). In this study, we examined patterns of genetic variability and structure of *Aphidius ervi* natural populations from various pea aphid host races. More specifically, we tested for the existence of cascading HAD in the parasitoid populations using newly isolated microsatellite loci.

Materials and methods

Biological material

Mummified *Acyrthosiphon pisum* (dead aphids with a parasitoid pupa inside) and aphids were collected on four different plants at six different locations in France and Switzerland from May to August 2008 and in May 2010. These sites were: Le Rheu *(R)* and Domagné *(D)*, situated at the north-west of France, Mulhouse *(M)*, Nancy *(N)*, and Chalons-en-Champagne *(C)*, located at the north-east of France and the last one close to Lausanne (*L*) in Switzerland. All locations are situated at least 40 Km apart from each other. Individuals were collected in fields of alfalfa (*Medicago sativa*), red clover (*Trifolium pratense*), pea (*Pisum sativum*) and lotus (*Lotus corniculatus*). Whenever possible, we sampled places where aphid host plants or crops occurred next to one another, and individuals were collected at a minimum of five meters one to each other. Aphids were maintained on broad bean (*Vicia fabae*) to check their parasitic status. Collected mummies and aphids that mummified were placed in plastic Petri dish until parasitoid emergence (all in climate rooms at 20 ± 1 °C, 70 ± 10 % relative humidity and L:D 16:8 h photoperiod). Adults emerging were taxonomically assigned to species following Eady (1969) and Němec & Starý (1983), but only *A. ervi* and the close species *A. eadyi* were considered. The prevalence of the symbiont *Hamiltonella defensa* was also calculated in aphid populations. The identification of the secondary symbionts harbored by *A. pisum* individuals was based on a polymerase chain reaction assay (PCR) with specific nucleotide primers of the 16S rDNA bacterial sequence. The complete symbiotic detection procedure is detailed in Frantz *et al*. (2009).

Parasitoid DNA extraction, PCR and genotyping

Both *A. ervi* and *A. eadyi* are haplodiploid organisms whereby unfertilized eggs develop as haploid males and fertilized one as diploid females. DNA extractions were carried out from females only, in semideep well trays using the ‘salting out’ procedure (Miller *et al*., 1988). Total DNA was then suspended in a final volume of 50µL of ultrapure water.

The *Aphidius ervi* and *Aphidius eadyi* genotypes were assessed at 12 newly developed microsatellites loci (Table 1.). They were obtained by pyrosequencing of enriched DNA libraries as part of the EcoMicro collaborative project (the complete procedure is detailed in Malausa *et al*., 2011). The selection of sequences for primer design was done with the program QDD (Meglécz *et al*., 2010). We used the M13-tailed primer method (Boutin-Ganache *et al*. 2001) to label amplicons for visualization on the capillary sequencer. Forward primers were 5′-tailed with a 23-basepair M13 sequence. Loci were amplified in a final volume of 10 µL polymerase chain reaction (PCR). The reaction mixture contained 2 µL of

total DNA, 0.25 µM of each primer, 0.2 mM of a four nucleotide mixture, 1.25 mM of MgCl2, 0.25 µM of 1 µL of PCR Buffer (Promega, Madison, USA) and 0.25 U of Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, USA). The M13 primers were5′-fluorescently tagged with HEX, 6-FAM, NED or VIC at 0.25 µM for assessment of allele sizes on a capillary sequencer (describe below). PCR were conducted on S1000 thermal cycler (2008, Bio-Rad Laboratories) using the following cycling conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 minutes, first cycle of DNA amplification (repeated 20 times) with a denaturation step at 94 °C for 20 seconds, hybridization at 55 °C for 20 s, elongation at 72 °C for 30 s; second cycle of M13 amplification with 20 repetitions of the following steps : 94 °C for 20 s, 53 °C for 20 s and 72 °C for 30 s. The PCR ends with a final elongation at 72 °C for 5 min.

Diluted PCR products (1.2 µL on 10 µL water) were added to 10 µL of high-die formamide containing 0.7% of 500 LIZ DNA ladder (Applied Biosystems) and electrophoresis was performed in the capillary sequencer ABI 3730 (Applied Biosystems). Allele calls were automatically assigned by GeneMapper (version 3.7, Applera Corp) and visually checked.

Genetic variability and population differentiation

Because of the low number of parasitoids emerging from lotus and pea aphid populations in each location, the genetic variability was investigated for *A. ervi* from alfalfa and clover only. For every population, and each of the twelve loci, number of alleles, allelic richness, and departure from Hardy-Weinberg Equilibrium (by 5000 permutations of alleles among individuals using the inbreeding coefficient F_{IS} as a test statistic) were assessed using F_{STAT} 2.9.4 (Goudet, 2005a). Observed and expected heterozygosities were calculated for each population separately using the software ARLEQUIN 3.1.5.2 (Excoffier *et al.*, 2005). GENEPOP (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008) was used to test for linkage disequilibrium (LD) using the Markov Chain probability test (parameters set as follows: dememorization = 10,000; number of batches = 1000; iterations per batch = 10,000) for all locus-by-population combinations, and across all populations using Fisher's method. The presence of null alleles was estimated with the software MICRO-CHECKER 2.2.3 (van Oosterhout, 2004). Overall and pairwise F_{ST} values were used to quantify differentiation among populations in allele frequencies and were computed with F_{STAT} 2.9.3.2.

Test of host associated differentiation

As *A. ervi* populations were sampled on four different plants, and in seven different locations, we computed hierarchical F-statistics with the package HIERFSTAT (Goudet, 2005b) implemented in R 2.8.1 (R Development Core Team, 2008). Pea and lotus populations

were considered here as illustrative data only. The overall differentiation of populations was computed at three different levels: among host races ($F_{host\text{-}total}$), among sampling sites within host races ($F_{site\text{-}host}$) and within sites ($F_{individuals\text{-}site}$). The significance of genetic differentiation at each level was tested using 10 000 randomizations (de Meeûs & Goudet, 2007). Pairwise F_{ST} between host-races populations were calculated and tested for significance in ARLEQUIN 3.1.5.2.

To investigate any potential site effect, a locus by locus analysis of molecular variance (AMOVA; Excoffier *et al*., 1992) was performed with ARLEQUIN 3.1.5.2 using the hierarchical model for genotypic data with several groups of populations and no within-individual level. To evaluate the differentiation between sampling site populations, we performed the same hierarchical analyses as described for host biotype populations with the package HIERFSTAT in R, considering the host biotype included in the upper sampling site-level. Pairwise F_{ST} were also calculated and tested for significance in ARLEQUIN.

Genetic structure

In addition to these analyses considering locations or host biotype as *de facto* populations, we estimated the number of clusters represented by the entire data set with the Bayesian statistical approach implemented in the program STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al*. 2000). This method evaluates the most likely structure without any prior information of population membership. Parasitoids from pea and lotus were also added to the samples for this analysis. Ten iterations were performed using a 'burning period' of 50,000 iterations with 50,000 Markov Chain Monte Carlo (MCMC) step, in admixture models with correlated allele frequencies. The analyses were made for a number of cluster K varying from 2 to 20. To identify the most probable number of clusters, we then calculated the logarithm of the mean posterior probability of the data L(K)for each K following Pritchard *et al*. (2000) method, and also computed the 'ΔK' value in respect to K as described in Evanno *et al*. (2005).

Wolbachia pipentis detection

Following genotyping, 35 females were homozygous at all loci. We tested for the presence of the bacteria *Wolbachia pipentis*, which is known to be able to induce male genome diploidization and producing homozygous females in several hymenoptera species (Duron *et al*., 2008; Vavre *et al*., 2009). The infection status of those females was checked by specific PCR with nucleotide primers of the 16S sequence, of the *FtsZ*, *wsp* and *FbpA* genes. Primers were used as previously described in Werren *et al*. (1995) and Kremer *et al*. (2009).

Results

Species diversity and abundance

Adults emerging from collected mummies included either the two *A. pisum* parasitoids *A. ervi* and *Aphidius eadyi*, or hyperparasitoids (parasitoids of parasitoids). *Aphidius ervi* was the most abundant on all host races, ranking from 60 to 100% of the total emerged individuals. *Aphidius eadyi* was represented at a mean of 7% of the total number of emerged individuals (from 0 to 21% according to populations). This species was absent in 6 of the populations studied, mostly on clover. Hyperparasitoids such as some Pteromalidae, or some *Dendrocerus* species were found in all populations. They appear mostly at the beginning of summer. Finally, the prevalence of *H. defensa* in *A. pisum* individuals from alfalfa fields was 66% in average, ranging from 39 to 100% across populations, and was 27% in average, from 10% to 50% in clover populations (Table 2.). Only 5% of the aphid clones sampled on pea harbored the defensive symbiont.

Genetic variability and population differentiation

The 12 *A. ervi* loci were polymorphic in all populations. Allelic richness was similar across populations, varying from 3.94 to 4.39 for the alfalfa population and from 4.03 to 4.17 for clover populations (Table 2). Significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in all populations, caused by a high heterozygote deficiency. Surprisingly, 35 individuals from the various populations showed homozygosity at all loci. Seven of the 12 loci (Ae03, Ae16, Ae20, Ae22, Ae29, Ae33 and Ae39) were suspected to show null alleles after analysis by MICRO-CHECKER. Out of 66 possible locus pairs, 3 pairs showed significant genetic disequilibrium (Ae06 and Ae22; Ae06 and Ae27, Ae27 and Ae32), all implying Ae06 or Ae27. Linkage disequilibrium was observed for all populations, except those from alfalfa fields in Mulhouse and Lausanne; and those from clover fields in Le Rheu and Lausanne. As removing both alleles Ae06 and Ae27 caused little changes in parameter estimates, all loci were kept for genetic structure analyses. The overall F_{ST} were 0.002 for populations, with values ranking from -0.06 to 0.04 when comparing populations by pairs. Permutations gave all the F_{ST} by pair as non significant suggesting a low genetic differentiation between *A. ervi* populations.

Host race and region effects

The genetic variance partitioned among host biotypes and among sampling sites was assessed by the analysis of molecular variance (Table 3.). The within population level explained more than 99% of the variation while variations explained by host biotypes or sampling sites were not significant. This pattern was confirmed by the hierarchical analysis

performed with HIERFSTAT, revealing a non significant genetic variation among host biotypes population with a global $F_{host\text{-}total}$ of 0.0004 (*P value*=0.32), a $F_{site\text{-}host}$ of 0.005 (*P* value=0.155) while there was significant differentiation at the inner most level with $F_{individuals\text{-}site}$ = 0.29 (*P value*<$5E^{-4}$). Pairwise F_{ST} values calculated between *A. ervi* from distinct host biotypes also showed an absence of aphid host associated genetic differentiation (data not showed).

The analysis considering the sampling site as the upper level provided similar results: genetic divergence was not significant between sampling sites neither between host biotypes at a lower level ($F_{site\text{-}total}$=0.001, *Pvalue*=0.25; $F_{host\text{-}site}$=0.004, *Pvalue*=0.08). Pairwise F_{ST} were also all very low and permutation tests gave all them non significant.

Genetic structure

Both Pritchard *et al*. (2000) and Evanno *et al*. (2005) methods gave both K=3 as the most probable number of clusters. For K=3, 40.4% of individuals were assigned to one of the clusters with more than 60% probability, and only 5.3% were assigned with more than 80% probability. These three genetic clusters were associated neither with their host race, nor with the sampling site (Figure 1).

Wolbachia pipentis detection

With the four primer pairs, there were no amplifications of *Wolbachia* in the entire set of females homozygous at all loci.

Discussion

Advances in genetics contributed much to the understanding of the population functioning. Neutral genetic markers are ideal for tracing the movement patterns of organisms, as well as for documenting their ecology, reproduction and evolutionary history (Roderick & Navajas, 2003 ; Gariepy *et al*., 2007; Lozier *et al*., 2008). In particular, microsatellites permit an efficient estimation of genetic variability, structure and movements of the studied species, giving valuable clues regarding the adaptive potential of the populations. The markers we used are new microsatellites designed specifically on *Aphidius ervi* but working as well on the closely related species *Aphidius eadyi*. Markers were all polymorphic, ranging from 7 to 17 alleles per locus for the individuals screened. They completed the variability information given by the microsatellites developed for *A. ervi* by Hufbauer *et al*. (2001). Six loci showed heterozygote deficiency, which seems to be caused by the presence of null alleles; or also by a variety of factors including non-random mating and population subdivision. Homozygote excess has been reported previously for *A. ervi* by Hufbauer *et al*. (2004) and from other

parasitoid hymenoptera (*e.g.* Kankare *et al*., 2005; Nyabuga *et al*., 2010) where it is usually linked to inbreeding events within populations or related to violations of other assumptions inherent in fulfilling Hardy-Weinberg expectations including migration, selection, genetic drift mutations and severe bottlenecks.

Some *A. ervi* populations deviated from genotypic equilibrium. Ignoring selection and mutation, it can be generated by either inbreeding, drift in small populations or by migration between structured populations (Zayed & Packer, 2007). Inbreeding increases homozygosity which reduces the effective recombination rate, and increases genotypic disequilibrium, while drift can create nonrandom associations between alleles at different loci by chance events in small populations, which may persist for long periods when combined with inbreeding (Fox & Wolf, 2006; Zayed & Packer, 2007). Additionally, females showing complete homozygosity influence importantly the populations' genetic diversities, decreasing the observed heterozygosity. It seems unlikely that males (which are haploid) have been integrated accidentally in our analysis because they can be easily differentiated from females. One hypothesis is a production of females by diploidization of unfertilized eggs. This process is generally induced by symbionts that manipulate their host reproduction to enhance their transmission, such as *Cardinium* sp. or *Wolbachia pipentis*. These micro-organisms infect numerous arthropods, and particularly parasitoid species (Stouthamer *et al.*, 1999; Hilgenboecker *et al*., 2008; Giorgini *et al*., 2009). The complete homozygosity of the females observed in our study was not due to *Wolbachia pipentis* as this symbiont has not been detected. Restoration of diploidy without bacterial infection can also happen through several different cytological mechanisms such as gamete duplications (where chromosome sets are all duplicated and one pair randomly become the zygote) or cell fusions (reviewed in Haccou & Schneider, 2004). Another explanation being that some haploid eggs could result in females, such as some *Nasonia vitripennis* strains in which a few unfertilized eggs developed into gynandromorphs (Beukeboom *et al*., 2007). The origin of complete homozygous *A. ervi* females deserves further studies.

Despite the important differentiation between pea aphid-plant biotypes (Peccoud *et al*., 2009a), no evidence of parasitoid differentiation according to host biotype has been found. There is lack of statistic support for the genetic clusters determined, as no individuals are strongly assigned and there is no clear biological interpretation for the assignments. Conclusions about clusters and their correspondences with host biotype or locations should thus be conservative. In any case, genetic differentiation across *A. ervi* is very low or even absent as indicated by non significant F_{ST} values. The molecular analysis of variance as well

does not support a genetic divergence between *A. ervi* populations from alfalfa, pea, clover and lotus. As for other Aphidiinae where no host-associated differentiation was found (Bear *et al*., 2004; Lozier *et al*., 2009), *Aphidius ervi* seems to use indifferently *A. pisum* from any host plants. Here, we were able to analyze *A. ervi* populations from four *A. pisum* host biotypes although 11 pea aphid races have been delineated. The most differentiated aphid races are those from the meadow vetchling *Lathyrus pratensis* and from the spiny restharrow *Ononis spinosa* (Peccoud *et al*., 2009a). Parasitoids are particularly difficult to find on these biotypes because sometimes the plant itself is hardly found, the aphid load is weak, or the parasitism rate is low. Consequently, we can not exclude that a cascading differentiation exists for parasitoid from other biotypes. Additionally, the divergence from last maternal ancestor of these pea aphid biotypes has been estimated between 8,000 and 16,000 years, with a burst of diversification at an estimated 3,600–9,500 years (Peccoud *et al*., 2009b). The recency of this diversification could have let not enough time for parallel parasitoid specialization.

Moreover, parasitoids from alfalfa fields are regularly facing host populations with high prevalence of defensive symbionts. The level of resistance confered by the symbiont varies depending on the *H. defensa* strain, from small reduction in succesfull parasitism to nearly complete protection (Oliver *et al*., 2010). Aphid symbiont-mediated resistance is thus likely to exert strong selective pressures on natural populations of parasitoids because they have a particularly intimate relationship with the hosts (Godfray, 1994). There is genetic variation within American populations of *Aphidius ervi* in the ability to overcome pea aphid resistance, thus an evolutionary response of the parasitoid populations is possible (Henter, 1995; Dion *et al*., 2011). However, despite the large differences in the selective regimes due to the differences in resistance levels, Hufbauer (2001) showed that parasitoid collected from alfalfa and clover fields do not differ in their ability to overcome host resistance. The author suggests thus there is no evidence parasitoids are adapted to aphids from their home crops, or locally adapted to their home fields. We confirm this conclusion as *A. ervi* populations from clover or alfalfa do not differ in their genetic properties. It seems that this selection regime is not enough strong and continuous to reduce gene flow between *A. ervi* populations and to favor their isolation. Moreover, the selection process may be interrupted because *A. ervi* is generalist. Females can oviposit in many aphid species living on a wide range of plants and presenting variable life history traits or levels of resistance (Marsh, 1977; Henry *et al*., 2010). Even if a female encounters an important selective barrier (high symbiont-mediated resistance on some alfalfa aphid populations, for example), the transmission of her genes could ever be ensured by reproducing inside an alternative aphid host species.

More surprisingly is the absence of geographically structured populations. This is a particularly unexpected result given the high spatial scale of this study as parasitoids were sampled from the Western France to Switzerland, with at least 830 Km apart for the most separated sites. Gene flow among *A. ervi* populations therefore appears to be high enough to maintain extensive genetic homogeneity on a large geographical scale, preventing adaptations to local conditions. This points out the substantial dispersal abilities of this species. Measuring movement of small insects is quite difficult, but some indirect evidences suggest that parasitic wasps, especially little species such as *A. ervi*, can disperse through large distances (Godfray, 1994; Milne *et al.*, 1999; Hufbauer, 2001; Langhof *et al.*, 2005). Their important mobility also constrains the evolution of adaptation to pea aphid host races (*e.g.* Strauss, 1997; Storfer & Sih, 1998).

From our study, it seems that *Aphidius ervi* is not specialized on a particular pea aphid biotype and shows high dispersal capacities associated with high genetic variability. Its foraging and mating behaviors, which are important clues for biological control success (Mills & Wajnberg, 2008), are well known (*e. g.* Pennachio *et al*., 1994; Powell *et al*., 1998; Battaglia *et al*., 2002; He & Wang, 2008). Dispersal and genetic diversity are also two factors that may limit the success of a biological control agent. *A. ervi* has already been introduced in several countries such as North America in 1959 against the pea aphid, in Chili in 1976 against *Sitobion avenae* or in Australia between 1978 and 1980 to limit the aphid *Acyrthosiphon kondoï*. The surveys following *A. ervi* releases confirmed the efficiency of this species because of the control of the target pest in the entire environment and throughout the season, and simultaneous control of target and non target pests (Angalet & Fuester, 1977 ; Starý, 1993 ; Milne, 1999). Nowadays, this parasitoid is particularly used in greenhouse pest management (van Emden & Harrington, 2007). Recent research demonstrated the increased capacity of selection lines to parasitize other aphid species; or to overcome host defenses in controlled laboratory experiments (Henry *et al*., 2008; Dion *et al*., 2011). These results provide insight into a novel technique to enhance the quality of biological control agents through selection designs. These experiments may also help in preadapting the parasitoid to the temperatures or to the spatial structure of the intended foraging environment, and, finally, favor the natural enemy efficiency (Henry *et al*., 2010).

Acknowledgments

We acknowledge Bernard Chaubet for help on parasitoid collection and determination, Lucie Mieuzet for supports on molecular experimentations and pea aphid sampling, and Julie

Jaquiery for help on genotyping analysis. Thanks also to Solenn Stoeckel for help with pea aphid collection; and Frédérique Mahéo for symbiont detection. The authors want to thanks Helene Henri and Fabrice Vavre for the interesting discussions about Wolbachia and for generously providing primers for its detection. Microsatellites development was supported by a grant from the French project INRA AIP BioRessources EcoMicro. This study was supported by the French INRA Santé des Plantes et Environnement (SPE) Department and the French 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'.

Literature cited

Angalet, G.W., Fuester, R., 1977. The *Aphidius* parasites of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* in the eastern half of the United-States of America. Annals of the Entomological Society of America 70**,** 87-96.

Antolin, M.F., Bjorksten, T.A., Vaughn, T.T., 2006. Host-related fitness trade-offs in a presumed generalist parasitoid, *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera : Aphidiidae). Ecological Entomology 31**,** 242-254.

Battaglia, D., Isidoro, N., Romani, R., Bin, F., Pennacchio, F., 2002. Mating behaviour of *Aphidius ervi* (Hymenoptera : Braconidae): The role of antennae. European Journal of Entomology 99**,** 451-456.

Baer, C.F., Tripp, D.W., Bjorksten, T.A., Antolin, M.F., 2004. Phylogeography of a parasitoid wasp (*Diaeretiella rapae*): no evidence of host-associated lineages. Molecular Ecology 13**,** 1859-1869.

Begon, M., Townsend, C.R., Harper, J.L., 2006. Ecology. From individuals to ecosystems. Blakwell.

Beukeboom, L.W., Kamping, A., Louter, M., Pijnacker, L.P., Katju, V., Ferree, P.M., Werren, J.H., 2007. Haploid females in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Science 315**,** 206-206.

Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M., Deschepper, C.F., 2001. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. Biotechniques 31**,** 24-+.

de Meeus, T., Goudet, J., 2007. A step-by-step tutorial to use HierFstat to analyse populations hierarchically structured at multiple levels. Infection Genetics and Evolution 7**,** 731-735.

Dion, E., Zélé, F., Simon, J.C., Outreman, Y., 2011. Rapid evolution of parasitoids when faced with the symbiont-mediated resistance of their hosts. Journal of Evolutionary Biology 24, 741-750.

Drès, M., Mallet, J., 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 357**,** 471-492.

Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L.Q., Engelstadter, J., Hurst, G.D., 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. BMC Biology 6.

Eady, E.D., 1969. A new diagnostic character in *Aphidius* (Hymenoptera: Braconidae) of special significance in species on pea aphid. . Proceedings of the Royal Entomological Society of London. Series B 38**,** 165-173.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics 1**,** 47-50.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data. Genetics 131**,** 479-491.

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology 14**,** 2611-2620.

Feder, J.L., Forbes, A.A., 2010. Sequential speciation and the diversity of parasitic insects. Ecological Entomology 35**,** 67-76.

Ferrari, J., Darby, A.C., Daniell, T.J., Godfray, H.C.J., Douglas, A.E., 2004. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. Ecological Entomology 29**,** 60-65.

Fox, C.W., Wolf, J.B., 2006. Evolutionary genetics - Concepts and case studies. Oxford University Press, Inc., Oxford.

Frantz, A., Calcagno, V., Mieuzet, L., Plantegenest, M., Simon, J.C., 2009. Complex trait differentiation between host-populations of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris): implications for the evolution of ecological specialisation. Biological Journal of the Linnean Society 97**,** 718-727.

Fry, J.D., 1996. The evolution of host specialization: Are trade-offs overrated? American Naturalist 148**,** S84-S107.

Gariepy, T.D., Kuhlmann, U., Gillott, C., Erlandson, M., 2007. Parasitoids, predators and PCR: the use of diagnostic molecular markers in biological control of Arthropods. Journal of Applied Entomology 131**,** 225-240.

Giorgini, M., Monti, M.M., Caprio, E., Stouthamer, R., Hunter, M.S., 2009. Feminization and the collapse of haplodiploidy in an asexual parasitoid wasp harboring the bacterial symbiont *Cardinium*. Heredity 102**,** 365-371.

Godfray, H.C.J., 1994. Parasitoids. Behavioural and evolutionary ecology. Princeton University Press, Princeton.

Goudet, J., 2005a. FSTAT (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from http:/www2.unil.ch:popgen:softwares:fstat.htm

Goudet, J., 2005b. HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. Molecular Ecology Notes 5**,** 184-186.

Green, D.M., Kraaijeveld, A.R., Godfray, H.C.J., 2000. Evolutionary interactions between *Drosophila melanogaster* and its parasitoid *Asobara tabida*. Heredity 85**,** 450-458.

Haccou, P., Schneider, M.V., 2004. Modes of reproduction and the accumulation of deleterious mutations with multiplicative fitness effects. Genetics 166**,** 1093-1104.

He, X.Z., Wang, Q., 2008. Reproductive strategies of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae). Biological Control 45**,** 281-287.

Henry, L.M., May, N., Acheampong, S., Gillespie, D.R., Roitberg, B.D., 2010. Host-adapted parasitoids in biological control: Does source matter? Ecological Applications 20**,** 242-250.

Henry, L.M., Roitberg, B.D., Gillespie, D.R., 2008. Host-range evolution in *Aphidius* parasitoids: Fidelity, virulence and fitness trade-offs on an ancestral host. Evolution 62**,** 689-699.

Henter, H.J., 1995. The potential for coevolution in a host-parasitoid system. 2. Genetic variation within a population of wasps in the ability to parasitize an aphid host. Evolution 49**,** 439-445.

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 Microbiology Letters 281**,** 215-220.

Hufbauer, R.A., 2001. Pea aphid-parasitoid interactions: Have parasitoids adapted to differential resistance? Ecology 82**,** 717-725.

Hufbauer, R.A., Bogdanowicz, S.M., Harrison, R.G., 2004. The population genetics of a biological control introduction: mitochondrial DNA and microsatellite variation in native and introduced populations of *Aphidus ervi*, a parisitoid wasp. Molecular Ecology 13**,** 337-348.

Hufbauer, R.A., Bogdanowicz, S.M., Perez, L., Harrison, R.G., 2001. Isolation and characterization of microsatellites in *Aphidius ervi* (Hymenoptera : Braconidae) and their applicability to related species. Molecular Ecology Notes 1**,** 197-199.

Kankare, M., Van Nouhuys, S., Hanski, I., 2005. Genetic divergence among host-specific cryptic species in *Cotesia melitaearum aggregate* (Hymenoptera : Braconidae), parasitoids of checkerspot butterflies. Annals of the Entomological Society of America 98**,** 382-394.

Kawecki, T.J., Ebert, D., 2004. Conceptual issues in local adaptation. Ecology Letters 7**,** 1225-1241.

Kremer, N., Charif, D., Henri, H., Bataille, M., Prevost, G., Kraaijeveld, K., Vavre, F., 2009. A new case of *Wolbachia* dependence in the genus *Asobara*: evidence for parthenogenesis induction in *Asobara japonica*. Heredity 103**,** 248-256.

Langhof, M., Meyhofer, R., Poehling, H.M., Gathmann, A., 2005. Measuring the field dispersal of *Aphidius colemani* (Hymenoptera : Braconidae). Agriculture Ecosystems & Environment 107**,** 137-143.

Lozier, J.D., Roderick, G.K., Mills, N.J., 2008. Evolutionarily significant units in natural enemies: Identifying regional populations of *Aphidius transcaspicus* (Hymenoptera : Braconidae) for use in biological control of mealy plum aphid. Biological Control 46**,** 532-541.

Lozier, J.D., Roderick, G.K., Mills, N.J., 2009. Molecular markers reveal strong geographic, but not host associated, genetic differentiation in *Aphidius transcaspicus*, a parasitoid of the aphid genus *Hyalopterus*. Bulletin of Entomological Research 99**,** 83-96.

Malausa, T., Gilles, A., MeglÉCz, E., Blanquart, H., Duthoy, S., Costedoat, C., Dubut, V., Pech, N., Castagnone-Sereno, P., DÉLye, C., Feau, N., Frey, P., Gauthier, P., Guillemaud, T., Hazard, L., Le Corre, V., Lung-Escarmant, B., MalÉ, P.-J.G., Ferreira, S., Martin, J.-F., 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. Molecular Ecology Resources**.** (doi**:**10.1111/j.1755-0998.2011.02992.x)

Marsh, P.M., 1977. Notes on taxonomy and nomenclature of *Aphidius* species (Hymenoptera Aphidiidae) parasitic on pea aphid in North-America. Entomophaga 22**,** 365-372.

Meglecz, E., Costedoat, C., Dubut, V., Gilles, A., Malausa, T., Pech, N., Martin, J.F., 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. Bioinformatics 26**,** 403-404.

Memmott, J., Craze, P.G., Harman, H.M., Syrett, P., Fowler, S.V., 2005. The effect of propagule size on the invasion of an alien insect. Journal of Animal Ecology 74**,** 50-62.

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16**,** 1215-1215.

Mills, N.J., Kean, J.M., 2010. Behavioral studies, molecular approaches, and modelling: Methodological contributions to biological control success. Biological Control 52**,** 255-262.

Mills, N.J. & Wajnberg, E. 2008. Optimal foraging behavior and efficient biological control methods. In: Wajnberg, E., Berstein, C., van Alphen, J. (Eds) Behavioural ecology of

insect parasitoids - From theoretical approaches to field applications. Blackwell, Oxford.

Milne, W.M., 1999. Evaluation of the establishment of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera : Braconidae) in Lucerne aphid populations in New South Wales. Australian Journal of Entomology 38**,** 145-147.

Němec, V., Starý, P., 1983. Elpho-morph differentiation in *Aphidius ervi* Hal. biotype on *Microlophium carnosum* (Bckt.) related to parasitization on *Acyrthosiphon pisum* (Harr.) (Hym., Aphidiidae). . Zeitschrift für Angewandte Entomologie 95**,** 524-530.

Nyabuga, F.N., Loxdale, H.D., Heckel, D.G., Weisser, W.W., 2010. Spatial population dynamics of a specialist aphid parasitoid, *Lysiphlebus hirticornis* Mackauer (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae): evidence for philopatry and restricted dispersal. Heredity 105**,** 433-442.

Oliver, K.M., Degnan, P.H., Burke, G.R., Moran, N.A., 2010. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. Annual Review of Entomology 55**,** 247-266.

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 of the United States of America 102**,** 12795-12800.

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 of the United States of America 100**,** 1803-1807.

Peccoud, J., Ollivier, A., Plantegenest, M., Simon, J.C., 2009a. A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106**,** 7495-7500.

Peccoud, J., Simon, J.C., McLaughlin, H.J., Moran, N.A., 2009b. Post-Pleistocene radiation of the pea aphid complex revealed by rapidly evolving endosymbionts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106**,** 16315-16320.

Pennacchio, F., Digilio, M.C., Tremblay, E., Tranfaglia, A., 1994. Host recognition and acceptance behaviour in two aphid parasitoid species: *Aphidius ervi* and *Aphidius microlophii* (Hymenoptera: Braconidae). Bulletin of Entomological Research 84**,** 57-64.

Phillips, C.B., Baird, D.B., Iline, II, McNeill, M.R., Proffitt, J.R., Goldson, S.L., Kean, J.M., 2008. East meets west: adaptive evolution of an insect introduced for biological control. Journal of Applied Ecology 45**,** 948-956.

Powell, W., Pennacchio, F., Poppy, G.M., Tremblay, E., 1998. Strategies involved in the location of hosts by the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). Biological Control 11**,** 104-112.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155**,** 945-959.

R Development Core Team, 2008. R: a language and environment for statistical computing R Fundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Raymond, M., Rousset, F., 1995. GENEPOP (version-1.2) - Population genetics software for exact test and ecumenicism. Journal of Heredity 86**,** 248-249.

Reed, D.H., Lowe, E.H., Briscoe, D.A., Frankham, R., 2003. Fitness and adaptation in a novel environment: Effect of inbreeding, prior environment, and lineage. Evolution 57**,** 1822-1828.

Roderick, G.K., Navajas, M., 2003. Genes in new environments: Genetics and evolution in biological control. Nature Reviews Genetics 4**,** 889-899.

Rousset, F., 2008. GENEPOP ' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources 8**,** 103-106.

Schluter, D., 2001. Ecology and the origin of species. Trends in Ecology & Evolution 16**,** 372-380.

Starý, P., 1993. The fate of released parasioids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) for biological control of aphids in Chile. Bulletin of Entomological Research 83**,** 633-639.

Stireman, J.O., Nason, J.D., Heard, S.B., Seehawer, J.M., 2006. Cascading host-associated genetic differentiation in parasitoids of phytophagous insects. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 273**,** 523-530.

Storfer, A., Sih, A., 1998. Gene flow and ineffective antipredator behavior in a stream-breeding salamander. Evolution 52**,** 558-565.

Stouthamer, R., Breeuwer, J.A.J., Hurst, G.D.D., 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. Annual Review of Microbiology 53**,** 71-102.

Strauss, S.Y., 1997. Lack of evidence for local adaptation to individual plant clones or site by a mobile specialist herbivore. Oecologia 110**,** 77-85.

van Emden, H.F., Harringhton, R., 2007. Aphids as crop pests. CAB International, Wallingford.

van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4**,** 535-538.

Vaughn, T.T., Antolin, M.F., 1998. Population genetics of an opportunistic parasitoid in an agricultural landscape. Heredity 80**,** 152-162.

Vavre, F., Mouton, L., Pannebakker, B.A., 2009. *Drosophila*-parasitoid communities as model systems for host-*Wolbachia* interactions. Advances in Parasitology 70, 299-331.

Werren, J.H., Zhang, W., Guo, L.R., 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia* - Reproductive parasites of artropods. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 261**,** 55-63.

Zayed, A., Packer, L., 2007. The population genetics of a solitary oligolectic sweat bee, *Lasioglossum* (*Sphecodogastra*) *oenotherae* (Hymenoptera : Halictidae). Heredity 99**,** 397-405.

Tables

Table 1. Characteristics of the microsatellites marker used. *He* = expected heterozygosity; *Ho* = observed heterozygosity (* = heterozygote deficiency). Fluorochromes used for PCR product detection are indicated as Pet (Red), Ned (yellow), Fam (blue) and Vic (green).

Locus name	***Primers***	***Repeat unit***	***Allele range***	***Total allele number***	***He***	***Ho***	***A. eadyi***
Ae01	a: CAGTGGACCACAATCACCTG-Pet b: TCATTGTCGGAATTTTGATGA	ACA	190-220	7	0,784	0,717	yes
Ae03	a: TGAGCAACAATCCGAAACTG-Ned b: CCAATAATATAAGAGAAGCAAACG	TC	140-190	17	0,795	0,666*	yes
Ae06	a: ACCACCACTATCATCAGC-Pet b: AAAGGTGTGATTCCAAAGTG	CAT	210-255	16	0,667	0,608	yes
Ae08	a: TCCTTTGGTAAATGCTTGGA- Fam b: ATAACAGTGGTGTGCCCCTC	TGA	125-170	13	0,858	0,7	yes
Ae16	a: AACGCCGAAATTTTCATTTG-Vic b: CCAGTGGTTTGTAAATTACTTGATG	AAC	290-330	10	0,606	0,474*	yes
Ae20	a: TTGGATCTGCTTGAGGGTCT-Ned b: TCTCCTCTTCTTTCTCTGCTTCA	GAT	110-150	16	0,834	0,560*	yes
Ae22	a: TGTACAAGTGACAGTAGTAACAACAA-Fam b: ATAGCAGGCCAGACAATGCT	TAG	100-145	16	0,866	0,636*	yes
Ae27	a: AGCACCAAATCAAGCAACAGT-Pet b: CTGGTATTGTTGAATTTGAATGA	AAC	190-220	10	0,609	0,571	yes
Ae29	a: TTCGAACATGTCGTGTCCAT-Pet b: CGACTCACACTCACCCTCCT	GA	265-300	15	0,820	0,644*	yes
Ae32	a: GAAAATATAGAGAGGGAGAAAAAGAGAA-Ned b: CCATTCAATGACGATACCCC	AG	155-175	9	0,722	0,672	yes
Ae33	a: TTGCTGTTGTACAATTAGCTGG-Fam b: TCACAAAAATCCATGACTAATAA	GTT	100-145	16	0,812	0,745	yes
Ae38	a: CATCTTCATTATCAACAACAGCA-Fam b: TCAAGAAAATTCAAAAGTATCAAA	TTG	100-130	10	0,702	0,400*	yes

Table 2. Genetic variability for *A. ervi* populations from alfalfa and clover races of *A. pisum*. For each population are given: N, number of individuals collected; Na the number of alleles; AR, the allelic richness; H_O and H_E the observed and expected heterozygosity, and the F_{IS}. Prevalence of *H. defensa* is given in brackets next to each location (NA: Non Available).

Alfalfa	**N**	**Na**	**AR**	**Ho**	**He**	**FIS**
D (57%)	69	9.33	4,00	0.56	0.73	0.44
C (NA)	35	8.17	3.94	0.62	0.71	0.27
M (91%)	13	5.83	4.39	0.56	0.73	0.25
N (45%)	9	6,00	4.19	0.61	0.72	0.37
R (100%)	39	7.83	4.09	0.66	0.74	0.25
L (39%)	5	4.33	4.16	0.61	0.78	0.23
Clover						
D (50%)	105	10.08	4.03	0.56	0.73	0.34
M (40%)	34	8.50	4.06	0.67	0.74	0.31
N (NA)	10	6,00	4.03	0.55	0.73	0.33
R (NA)	25	8.33	4.09	0.64	0.75	0.18
L (10%)	15	6.92	4.17	0.56	0.78	0.35

Table 3 Partitioning of the genetic variance among host biotypes and among sampling sites. For each level, are represented: d.f., the number of freedom degrees; the sum of squares; the variance components explained by the given level; the proportion of variance (in %) explained by the level and the associated *P* value.

Parameter	Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage variation	*P value*
Host biotype	Among alfalfa, clover, lotus and pea	3	18.339	0.003	0.069	*0.174*
	Among sampling sites within host biotypes	13	71.65	0.031	0.685	*0.147*
	Within populations	664	2927.903	4.428	99.246	*0.027*
Location	Among sampling sites	7	40.219	0.0009	0.019	*0.389*
	Among populations within sampling sites	9	49.773	0.0318	0.713	*0.131*
	Within populations	664	2927.903	4.428	99.246	*0.027*

Figures

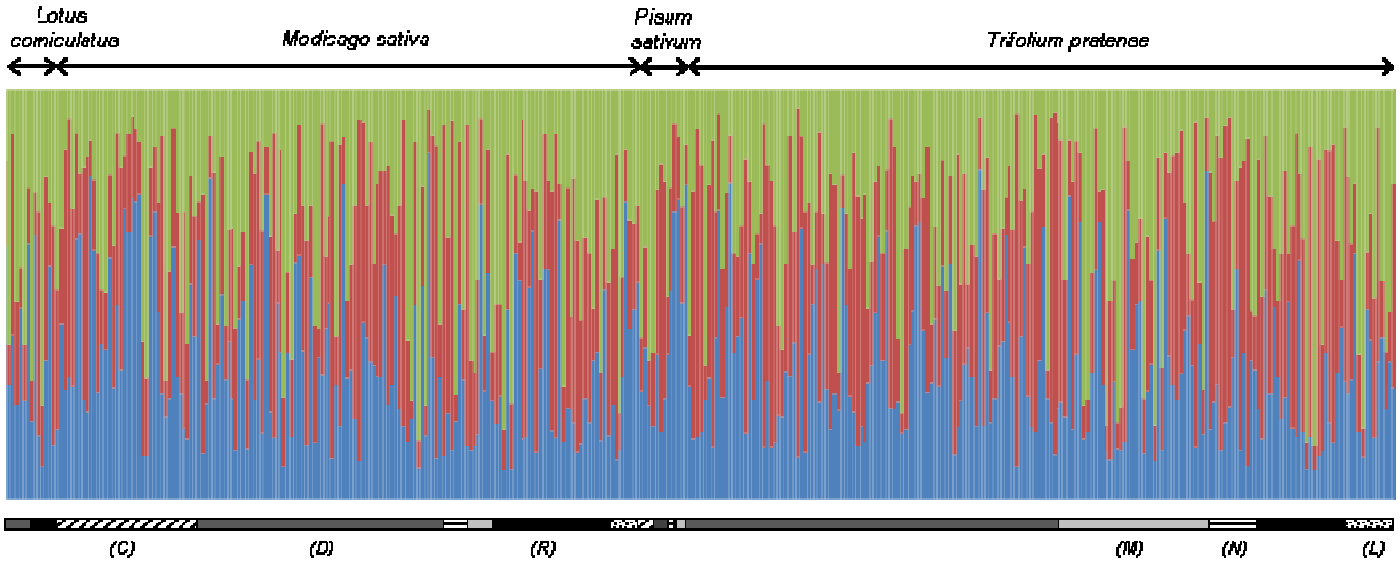

Figure 1. Population structure of *A. ervi*. Vertical bars represent the individuals (genotypes from 12 microsatellites) and colours represent the proportion of assignment to clusters. Genotypes are classified by plants and then by locations (horizontal bars).

Chapitre 4.

INFLUENCES DES SYMBIOTES SUR L'INTERACTION

A. PISUM - A. ERVI

I. Influences des symbiotes sur les populations parasitoïdes

1. Objectifs

Les études concernant la résistance des pucerons aux parasitoïdes conférée par les symbiotes portent majoritairement sur ses mécanismes (*e.g.* Degnan & Moran, 2008 ; Oliver *et al*., 2009). Le puceron du pois possède une résistance innée (résistance cellulaire) à priori limitée (Gerardo *et al.*, 2010) et la résistance aux parasitoïdes est donc principalement liée au symbiote *Hamiltonella defensa* (Oliver *et al*., 2010). Cette forme de résistance peut être particulièrement efficace (Oliver *et al.*, 2003 ; 2005 ; Ferrari *et al.*, 2004 ; Bensadia *et al.*, 2006). Elle est liée à la présence de bactériophages, nommés 'APSE' (*A. pisum* Secondary Endosymbiont), porteurs de gènes homologues à des toxines (Degnan & Moran, 2008 ; Oliver *et al*., 2009 ; 2010) : les toxines sécrétées par le virus APSE provoqueraient un arrêt prématuré du développement du parasitoïde immature. Dans le génome de ce phage, il existe des variabilités génétiques pouvant être à l'origine des variations du degré de résistance conférée par *H. defensa* (Degnan & Moran, 2008).

Cette résistance conférée par les symbiotes exerce une pression de sélection importante sur les populations de parasitoïdes. Les conséquences évolutives d'une telle résistance restent méconnues. Nous avons analysé l'influence de la présence d'*H. defensa* chez le puceron du pois sur l'évolution des populations de son principal parasitoïde. Dans le cadre d'une évolution expérimentale, des parasitoïdes ont été exposés, durant 10 générations, soit à des populations de pucerons porteurs du symbiote ou à des populations de pucerons non porteurs. Nous avons suivi l'évolution de la performance des parasitoïdes (taux de parasitisme) au fil des générations. Nous avons également mesuré les propriétés génétiques des populations de parasitoïdes soumises, ou non, à cette forme de résistance.

2. Approche et méthode générale

Le déroulement de l'expérimentation est schématisé en Figure 4.1.

Au cours des générations, nous avons suivi la performance des parasitoïdes, le niveau d'expression de certains facteurs de virulence présents dans les glandes à venin des femelles, et les propriétés génétiques des populations de parasitoïdes.

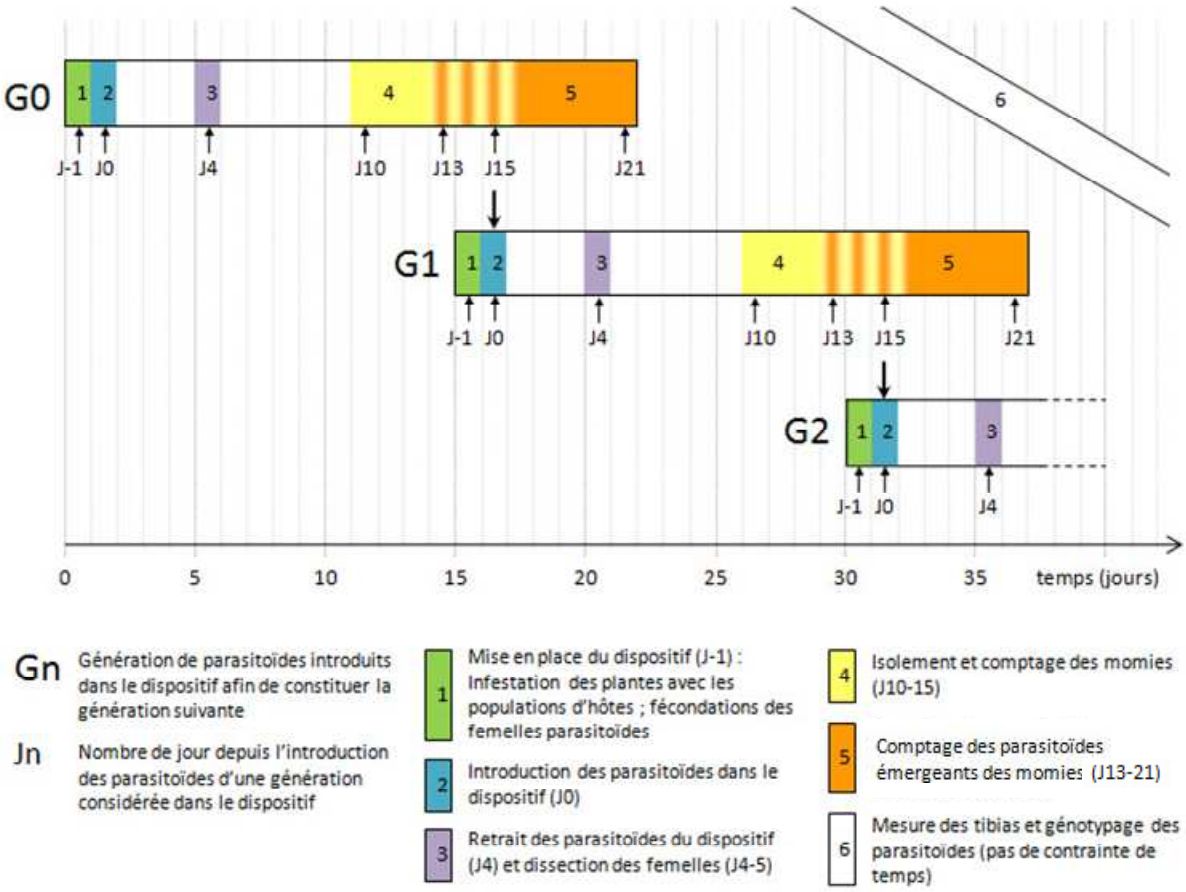

Figure 4. 1. Déroulement de l'évolution expérimentale: les manipulations et mesures effectuées sont représentées dans le temps pour chaque génération de parasitoïde, et ce dans un même traitement (D'après F. Zélé).

L'article 2 présente l'évolution des performances des parasitoïdes au fil de générations. Par une approche transcriptomique, en collaboration avec M. Poirié (DR INRA Sophia-Antipolis), nous avons analysé l'expression de facteurs de virulence potentiels afin d'aborder la question de l'évolution de la virulence dans notre contexte expérimental. L'article 3 présente l'évolution des propriétés génétiques des deux populations de parasitoïdes au cours des générations.

3. Evolution de la performance des parasitoïdes - Article 2.

Cette étude présente les niveaux de résistance de clones aphidiens porteurs d'*H. defensa* et de clones non porteurs. Nous y détaillons l'évolution expérimentale mise en œuvre et caractérisons l'évolution des taux de parasitisme dans les populations de parasitoïdes exposées et non exposées à la résistance. A la fin de l'évolution expérimentale, nous avons mesuré la capacité des deux populations de parasitoïdes à exploiter des

pucerons résistants. Ce travail identifie également des coûts associés à la réponse des parasitoïdes à la résistance liée à *H. defensa*. Cet article a fait l'objet d'une publication dans la revue '*Journal of Evolutionary Biology' :*

Rapid evolution of parasitoids when faced with the symbiont-mediated resistance of their hosts.

Dion E., Zélé F., Simon J.-C. & Outreman Y.

2011 *Journal of Evolutionary Biology* 24: 741-750.

JOURNAL OF Evolutionary Biology

doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02207.x

Rapid evolution of parasitoids when faced with the symbiont-mediated resistance of their hosts

E. DION*, F. ZÉLÉ*†, J.-C. SIMON* & Y. OUTREMAN*

*UMR 1099 INRA-Agrocampus Ouest-Université Rennes 1 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes', Rennes Cedex, Le Rheu Cedex, France

†CNRS UMR 2724 'Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses', IRD, Montpellier, France

Keywords:

Acyrthosiphon pisum;
aphid resistance;
experimental evolution;
parasitoid adaptation;
secondary symbionts.

Abstract

Insects harbour a wild diversity of symbionts that can spread and persist within populations by providing benefits to their host. The pea aphid *Acyrthosiphon pisum* maintains a facultative symbiosis with the bacterium *Hamiltonella defensa*, which provides enhanced resistance against the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. Although the mechanisms associated with this symbiotic-mediated protection have been investigated thoroughly, little is known about its evolutionary effects on parasitoid populations. We used an experimental evolution procedure in which parasitoids were exposed either to highly resistant aphids harbouring the symbiont or to low innate resistant hosts free of *H. defensa*. Parasitoids exposed to *H. defensa* gained virulence over time, reaching the same parasitism rate as those exposed to low aphid innate resistance only. A fitness reduction was associated with this adaptation as the size of parasitoids exposed to *H. defensa* decreased through generations. This study highlighted the considerable role of symbionts in host–parasite co-evolutionary dynamics.

Introduction

There is no species living isolated from other organisms, but they rather establish frequently close associations with other species. Symbiosis is the term coined for a prolonged and intimate relationship between members of different species, in which a 'symbiont' occupies a habitat provided by a 'host' (Begon *et al.*, 2006). Invertebrate species possess an extraordinary diversity of symbiotic microorganisms, especially bacteria (Chaston & Goodrich-Blair, 2010). These symbionts can be classified into two distinct groups according to the level of dependence on the host. Primary symbionts are necessary for host survival and reproduction, whereas secondary (or facultative) symbionts are not essential for their host, although they generally cannot survive outside the host environment.

Secondary symbionts are predominantly vertically transmitted (Oliver *et al.*, 2010), and any effect conferred to the host that increases its survival or reproduction relative to the uninfected congeners may then enhance their spread and persistence within the host population. During the last decades, there has been increasing evidence for effects of secondary symbionts on host phenotypes. These include host reproduction manipulation (e.g. Hurst *et al.*, 1999) and beneficial effects on host fecundity or survival. In the latter case, recent works on diverse invertebrates have revealed in particular that secondary symbionts can protect their hosts against microbial diseases, parasites or predators (e.g. Gil-Turnes *et al.*, 1989; Gil-Turnes & Fenical, 1992; Kellner, 1999; Jaenike *et al.*, 2010).

Among insects, the symbionts of aphids are perhaps the best studied (Oliver *et al.*, 2010). In addition to their essential nutrient-providing symbiont, *Buchnera aphidicola*, aphids may also carry one or more secondary symbionts. These heritable symbionts exert diverse effects on their host. In the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*, symbionts have an impact on the host ecology through a wide range of effects, e.g. host plant utilization (Tsuchida *et al.*, 2004), body colour (Tsuchida *et al.*, 2010), protection against heat stress (Montllor *et al.*, 2002) and enhanced protection against natural enemies (Oliver *et al.*, 2003; Scarborough *et al.*, 2005).

Correspondence: Yannick Outreman, UMR 1099 INRA-Agrocampus Ouest-Université Rennes 1 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes', 65, rue de Saint-Brieuc CS 84215, 35042 Rennes Cedex, BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France.
Tel.: +33 2 23 48 55 68; fax: +33 2 23 48 51 70;
e-mail: yannick.outreman@rennes.inra.fr

Many organisms use aphids as resources, and among them, insect parasitoids (i.e. insects whose larvae develop by feeding on (ectoparasitoids) or within (endoparasitoids) an arthropod host, eventually killing it (Eggleton & Belshaw, 1992)) exert a strong pressure on aphid populations. Parasitism rates can reach 70% (Hufbauer, 2002) but resistance to parasitoids exists in pea aphid populations (Henter & Via, 1995; Hufbauer & Via, 1999; Ferrari *et al.*, 2001). Aphids may counter parasitism with a combination of several mechanisms. They can resist to a parasitoid attack through behavioural defences, but once oviposition has occurred, parasitoid eggs face physiological defences based on host intrinsic immunity and on symbiosis with bacteria (Henter & Via, 1995; Hufbauer & Via, 1999; Le Ralec *et al.*, 2010). Little work has yet been carried out to characterize the pea aphid immune response, but recent studies show that this species is missing several genes central to insect immune functions, conferring consequently only a partial resistance against parasitism (Gerardo *et al.*, 2010). Actually, *A. pisum* largely relies on secondary symbionts as far as protection against parasitoids is concerned. The failure of the parasitoid development is mainly because of the presence of symbiont members of the Enterobacteriaceae, *Serratia symbiotica* and especially *Hamiltonella defensa* (Oliver *et al.*, 2003, 2005; Ferrari *et al.*, 2004). *H. defensa* has been reported to provide protection to *A. pisum* against both *Aphidius ervi* and *Aphidius eadyi* parasitoids (Oliver *et al.*, 2003, 2005; Ferrari *et al.*, 2004; Bensadia *et al.*, 2006), referred to as 'symbiont-mediated resistance' (Oliver *et al.*, 2005). This resistance appears to be largely correlated with the presence of a bacteriophage of *H. defensa*, *A. pisum* secondary endosymbiont (APSE) (Oliver *et al.*, 2009), which encodes toxins that may be responsible for prematurely arresting the development of parasitoid larvae (Degnan & Moran, 2008; Oliver *et al.*, 2009). The effectiveness and the specificity of the symbiont-mediated resistance have been studied in the pea aphid. For instance, multiple strains of *H. defensa* were subsequently examined in a common aphid genotypic background, and all conferred partial protection against *A. ervi* (Oliver *et al.*, 2005). Additionally, similar levels of resistance were found for a single strain of *H. defensa* established in multiple *A. pisum* clonal backgrounds. These empirical studies corroborate the role of this symbiont in protection against parasitoids.

Although major advances have been made on the mechanisms associated with these symbiotic beneficial effects on the infected host, little is known about their evolutionary outcomes on the targeted organisms, the enemies. The frequency of *A. pisum* infected by *H. defensa* varied between aphid populations (Frantz *et al.*, 2009) but an empirical study showed that this frequency increased dramatically after repeated exposure to parasitism by the *A. ervi* parasitoid (Oliver *et al.*, 2008). The level of resistance conferred by the symbiont varies depending on the *H. defensa* strain, from small reduction in succesfull parasitism to nearly complete protection (Oliver *et al.*, 2010). Given these results, aphid symbiont-mediated resistance is likely to exert strong selective pressures on natural populations of parasitoids because they maintain a particularly intimate relationship with the aphids as a single host harbours the parasitoid's offspring until maturity (Godfray, 1994). The intimate nature of this relationship promotes co-evolutionary dynamics, while developing adaptation to counter the combined effect of the aphid intrinsic immunity and the symbiont-mediated resistance.

With the use of an experimental evolution approach under controlled laboratory conditions, we investigated the adaptive potential of the aphid parasitoid *A. ervi* facing either population of aphids harbouring *H. defensa*, combining innate- and symbiont-mediated resistance, or population of aphids without secondary symbiont, presenting only the innate resistance. The possible effects associated with a potential adaptation to exploit highly resistant hosts were also estimated by measuring the size of the parasitoid along the selection process.

Materials and methods

Organisms

Twelve green clones of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae) were chosen for this study (see Table 1). As secondary symbiont community in *A. pisum* strongly depends on the host biotype (Frantz *et al.*, 2009), *A. pisum* clones used in our experiment were chosen among a collection of plant-specialized genotypes with known secondary symbionts (see Frantz *et al.*, 2009; Peccoud *et al.*, 2009 for details on clone collection and symbiotic detection). Four of the 12 clones were free of secondary symbionts (i.e. clones called '*Hamiltonella*-free' clones). Among them, one was originated from alfalfa (*Medicago sativa*), whereas the others came from spiny restharrow (*Onosis spinosa*) and meadow vetchling (*Lathyrus pratensis*). The eight other clones, collected on alfalfa, harboured the secondary symbiont *Hamiltonella defensa* (i.e. clones called '*Hamiltonella*' clones). All aphids were maintained on broad bean plants, *Vicia faba*.

To favour evolutionary responses, genetically diverse starting populations for *Aphidius ervi* parasitoids were used. The initial culture was obtained by sampling about 200 *A. pisum* mummies (i.e. dead aphid containing a parasitoid few days before its emergence) in different alfalfa fields around Rennes (Western France) in November 2008. Adults emerging from these collected mummies were split and maintained in three distinct Plexiglas cages (40 × 30 × 50 cm) containing a high genetic and symbiotic diversity of red and green pea aphids originating from six different alfalfa crops, located in two cities that are 40 km apart from one another. To limit genetic drift in the parasitoid populations, immigration was simulated by regular addition of newly sampled

Table 1 List of the pea aphid clones from various French localities tested in the experiment 1.

Clone	Sampling site	Sampling date	Host plant	*Hamiltonella defensa*
H1	Domagné (West)	2008	*Medicago sativa*	Yes
H2	Domagné	2008	*Medicago sativa*	Yes
H3	Domagné	2008	*Medicago sativa*	Yes
H4	Pacé (West)	2008	*Medicago sativa*	Yes
H5	Pacé	2008	*Medicago sativa*	Yes
H6	Pacé	2008	*Medicago sativa*	Yes
H7	Le Rheu (West)	2008	*Medicago sativa*	Yes
H8	Le Rheu	2008	*Medicago sativa*	Yes
Hf9	Lusignan (Centre)	1987	*Medicago sativa*	No
Hf10	Bugey (East)	2006	*Ononis spinosa*	No
Hf11	Bugey	2006	*Ononis spinosa*	No
Hf12	Le Rheu	2006	*Lathyrus pratensis*	No

individuals or exchanges between the three cages. To obtain parasitoids for experiments, mummies were collected daily from cultures and placed individually in gelatine capsules. Newly emerged females were enclosed in plastic tubes (22 × 1 cm) containing moistened cotton, droplets of honey and one male for mating. Females between 2 and 3 days old were used only once.

All insect rearing and experiments were performed in climate rooms at 20 ± 1 °C, 70 ± 10% relative humidity and L : D 16 : 8 h photoperiod.

Experiment 1: Aphid clone resistance measurement

Experimental set-up

This experiment aimed to evaluate the level of resistance to parasitism in the 12 aphid clones to select clones for the evolution experiment. Their level of parasitism resistance was estimated by using a classical parasitism design (modified from Oliver *et al.*, 2003). Just prior to the experiment, the parasitoid females were allowed to oviposit in a healthy aphid to provide them an oviposition experience. Any female that did not oviposit within the first 5 min was discarded. The female was then introduced in a glass Petri dish containing 15 third-instar aphid larvae of a given clone, placed on a broad bean leaf for an hour. After each oviposition (i.e. the female has stung one aphid individual with its ovipositor), the attacked aphid was removed from the experimental arena and placed on a new broad bean plant. The experiment ended when the parasitoid had attacked 10 aphids successively. During the following days, the number of parasitoids emerging from the 10 attacked aphids was daily counted to determine the effective parasitism rate (i.e. the number of parasitoids emerging from a given host population). Five replicates were carried out for each aphid clone tested.

Statistical analyses

The dependent variable analysed here was the effective parasitism rate, suggesting that the response was binomial (i.e. a parasitoid emerged or not from an aphid). The first analysis aimed to test the effect of the presence of *H. defensa* on effective parasitism rate. In our experimental design, several clones harbouring or not harbouring the secondary symbiont were tested and this was considered as a random independent variable in our statistical modelling. The effects of the high resistance because of *H. defensa* (i.e. a fixed independent variable with two modalities) on the effective parasitism rate was then tested by fitting generalized linear mixed models (GLMM) with binomial errors and a logit-link using the *lme4* package (Bates & Maechler, 2009) in R 2.8.1 (R Development Core Team, 2008). The second analysis consisted of the comparison of the effective parasitism rate between the different clones containing or not the symbiont. For this purpose, the response variable was tested against the aphid clone by using generalized estimation equations (GEE) that considered repeated data (e.g. a female attacking 10 successive aphids), with binomial errors and a logit-link using the *geepack* package (Yan, 2002) in R 2.8.1.

Experiment 2: Experimental evolution of parasitoid populations exposed to symbiont-mediated resistance

Experimental evolution procedure

The experimental evolution procedure is illustrated in Fig. 1. It was performed for 10 parasitoid generations using two selection treatments that were applied in exactly the same way except the presence or absence of the symbiont-mediated resistance in host population. A host population consisted here of a broad bean plant (about 15 cm height) infested with 32 third-instar aphids and covered with cellophane bags to avoid their escape. To reduce the aphid genotype effect, a host population contained either individuals from the four '*Hamiltonella*-free' aphid clones or individuals from four clones chosen among the nine harbouring *H. defensa*. The selection of these '*Hamiltonella*' clones was based on results from experiment 1. In a host population, each clone was equally represented (i.e. eight individuals per clone). For

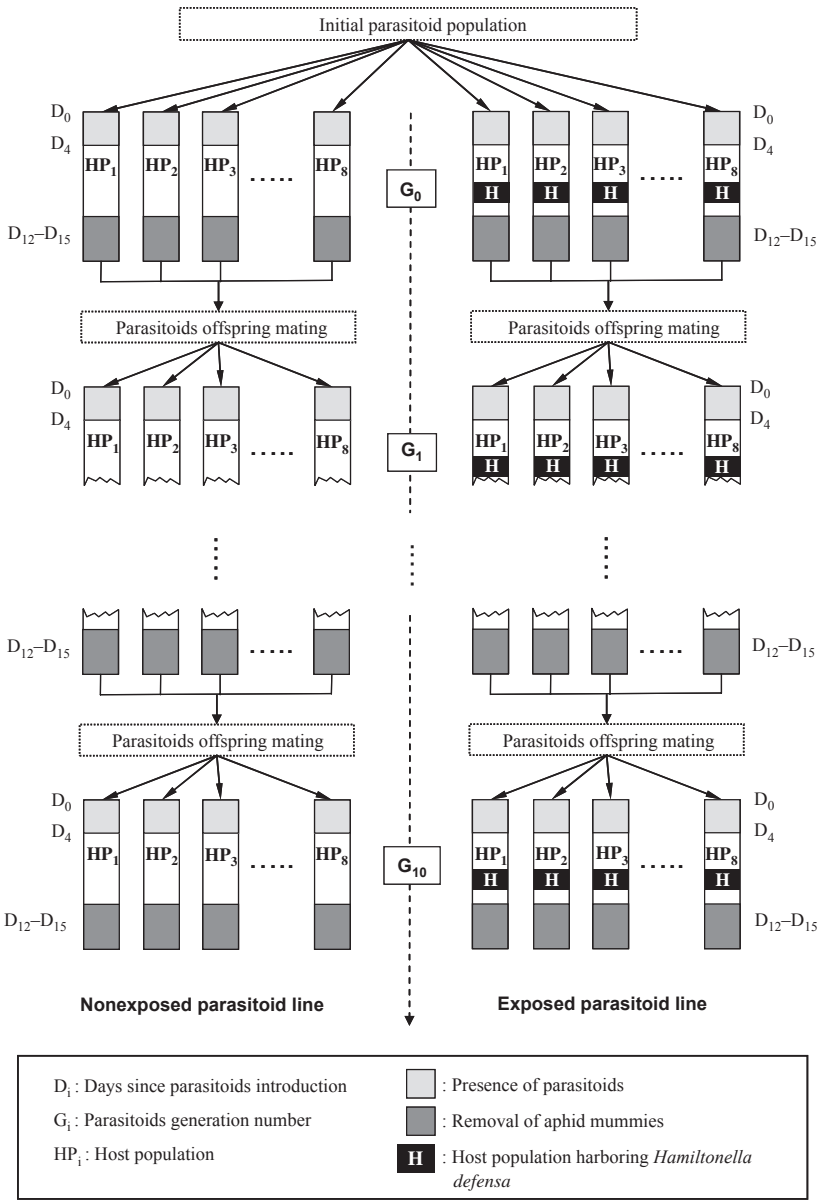

Fig. 1 Experimental evolution design.

each parasitoid generation, eight '*Hamiltonella*-free' and eight '*Hamiltonella*' host populations were similarly constituted and then exposed to parasitoids. Consequently, parasitoids faced fixed host populations over time.

For the initial population of parasitoids used in this experimental evolution design, 150 mummies were randomly extracted from the initial cultures. All emerging females were allowed to mate during 1 day and then split for the two selection treatments: (i) the 'Nonexposed' parasitoid line was exposed to '*Hamiltonella*-free' host populations, meaning the wasps were submitted to a low selection exerted by the aphid intrinsic immune responses; and (ii) the 'Exposed' parasitoid line was exposed to '*Hamiltonella*' host populations exerting a strong selection characterized by the combination of both innate- and symbiont-mediated resistances. The two treatments were both followed during 10 generations.

The experimental evolution procedure consisted in introducing four parasitoid females in each host population. One parasitoid male was also added into the cellophane bag to ensure mating and females fecundation. Parasitoids were allowed to exploit the host population for 4 days. After this delay, they were removed from the design and stored in 95 °C ethanol for subsequent measurements. The host population was then maintained in climate chambers during 20 days and examined daily to record and extract aphid mummies isolated in gelatine capsules. To minimize the loss

of genetic diversity because of inbreeding and reduced population size, all parasitoid males and females emerging from each host population of a selection treatment were pooled together during 1 day and 32 females (i.e. four females for each of the eight host populations) were randomly chosen to constitute the next generation. This experimental procedure was continuously conducted for 10 successive parasitoid generations (from February 2009 to November 2009).

At each parasitoid generation, the following variables were measured, as they provide an approximation of the fitness components (Roitberg *et al.*, 2001): (i) the effective parasitism rate represented by the number of parasitoids emerging upon the overall host population (i.e. this was the number of parasitoids emerging from the 32 aphids) and (ii) the left tibia size of the individuals that had survived, stored in 95 °C ethanol. The potential effects on parasitoid fitness associated with the adaptation to the high level of resistance conferred by secondary symbionts were estimated by measuring the size of parasitoid females. On the basis of previous works (Godfray, 1994; Nicol & Mackauer, 1999; De Conti *et al.*, 2008), this measurement is a good proxy for parasitoids fecundity, as, in Hymenopteran parasitoids, the reproductive fitness in terms of fecundity, parasitism, searching rate and longevity is often positively correlated with the body size (Godfray, 1994; He & Wang, 2006). Left tibia length was measured under a binocular using the Archimède software (Microvision Instruments, 1997–2007, Evry, France, http://www.microvision.fr) on 356 females for five parasitoid generations (G1, G2, G5, G7 and G10).

Statistical analyses

The first set of analyses consisted of testing the effect of the parasitoid generation number and the selection treatment on each dependent variable. In this experimental design, some of the response data were correlated. Concerning the effective parasitism rate, the 32 aphids of one host population were exposed to the same four parasitoid females. These data clusters must be considered as if correlation was not taken into account then the standard errors of the parameter estimations would not be valid (for details, see Liang & Zeger, 1986). The analysis of these dependent variables was then carried out by means of generalized estimating equations (GEE) to estimate parameters for correlated data. The effective parasitism rate was tested against the parasitoid generation (from 0 to 10), the selection treatment ('Nonexposed' vs. 'Exposed' parasitoids line) and the interaction between these two independent variables by GEE assuming a binomial error and a logit-link function using the *geepack* package (Yan, 2002) in R 2.8.1. The effect of the parasitoid generation, the selection treatment and the interaction between these two independent variables on the left tibia length of females was estimated using a standard analysis of variance. For all statistical analyses, the selection treatment was coded as a factor (i.e. a class-independent variable with two levels) and the parasitoid generation as a covariate (i.e. a continuous independent variable).

The second set of analyses consisted of analysing how the difference between the two selection treatments changed with the parasitoid generation number. Pairwise comparison between the 'Nonexposed' and 'Exposed' parasitoid lines was then made at each parasitoid generation with the function '*esticon*' in the '*doBy*' package (Højsgaard, 2009). For each response, graphics representing the difference between the mean of both selection treatments according to the parasitoid generation number were drawn to illustrate how the two parasitoid lines differed in time.

Experiment 3: Assessment of selection efficiency

Experimental procedure

This experiment aimed to assess how the ability of parasitoids to use aphids harbouring *H. defensa* as hosts evolved following experimental evolution. Using the parasitism design of the first experiment, we measured the effective parasitism rate of the offspring of both lines on two '*Hamiltonella*' clones. They were randomly selected among the four clones used in the experiment 2. For each parasitoid line, 10 females were tested on each clone.

Statistical analyses

In this analysis, three parasitoid populations were compared: the initial population before the experimental evolution, the offspring of the 'Nonexposed line' and the offspring of the 'Exposed line' after the experimental evolution. The effective parasitism rate was then tested against the aphid clone (i.e. a class-independent variable with two levels), the parasitoid population (i.e. a class-independent variable with three levels) and the interaction between these two factors by fitting GEE models with binomial errors and a logit-link function.

Results

Experiment 1: Aphid clone resistance measurement

Figure 2 represents the effective parasitism rate measured on the 12 aphid clones tested. The presence of *H. defensa* in aphids strongly reduced the probability of parasitoid emergence (GLMM, $\chi^2_1 = 10.55$, $P < 0.001$). Overall, 143 parasitoids emerged from the 200 '*Hamiltonella*-free' aphids attacked by *A. ervi,* whereas only 33 emerged from the 400 '*Hamiltonella*' aphids exposed to the parasitoid wasp. This confirmed that the presence of *H. defensa* conferred a stronger level of protection against *A. ervi* in this particular set of aphid clones than the single innate resistance. Significant difference in parasitism rates was found between '*Hamiltonella*-free' clones

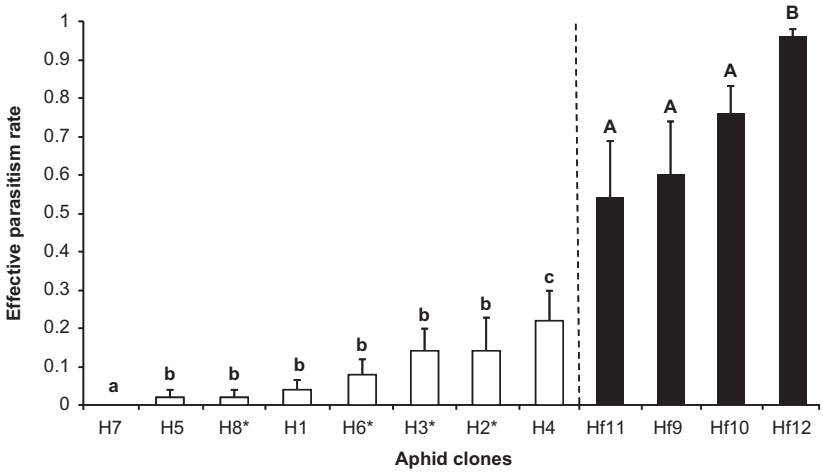

Fig. 2 Effective parasitism rate (mean ± standard error) of *Aphidius ervi* females on aphid clones harbouring (open bars) or not (black bars) *Hamiltonella defensa*. Columns with different letters are significantly different ($P < 0.05$). *Clones harbouring the secondary symbiont selected for the experimental evolution.

(GEE, $\chi^2_3 = 20.40$, $P < 0.001$), and the level of symbiont-mediated resistance varied significantly between aphid clones harbouring the secondary symbiont (GEE, $\chi^2_7 = 70.94$, $P < 0.001$).

For the evolution experiment, aphid clones harbouring *H. defensa* were chosen in such a way that the selection pressure was relatively important, but not too strong to ensure the production of new parasitoid generations. The aphid clones H2, H3, H6 and H8 were then selected to constitute the '*Hamiltonella*' treatment.

Experiment 2: Experimental evolution of parasitoid populations exposed to symbiont-mediated resistance

Effective parasitism rate

The effective parasitism rate in the two treatments is shown in Fig. 3. The proportion of emerged parasitoids from the host population varied from 0.2 to 0.6, and this response fluctuated in the course of the experimental selection producing a high level of variance (Fig. 3a). Neither the parasitoid generation number (GEE: $\chi^2_1 = 3.22$, $P = 0.072$) nor the selection treatment (GEE: $\chi^2_1 = 3.56$, $P = 0.059$) significantly influenced the mean effective parasitism rate. There was, however, a significant interaction between the selection treatment and the generation number (GEE: interaction term, $\chi^2_1 = 7.63$, $P = 0.005$). Parasitoids from 'Exposed' lines produced significantly lower offspring when exposed early to '*Hamiltonella*' host populations compared to parasitoids exposed to '*Hamiltonella*-free' host populations. However, after a few generations, both parasitoid lines produced the same number of offspring in the presence or in the absence of *H. defensa* in host populations. Pairwise comparisons showed that four generations were sufficient to observe similar parasitism performance between 'Exposed' and 'Nonexposed' parasitoid lines (Fig. 3b). This convergence of the parasitism rates was only because of the significant increase in the 'Exposed' line

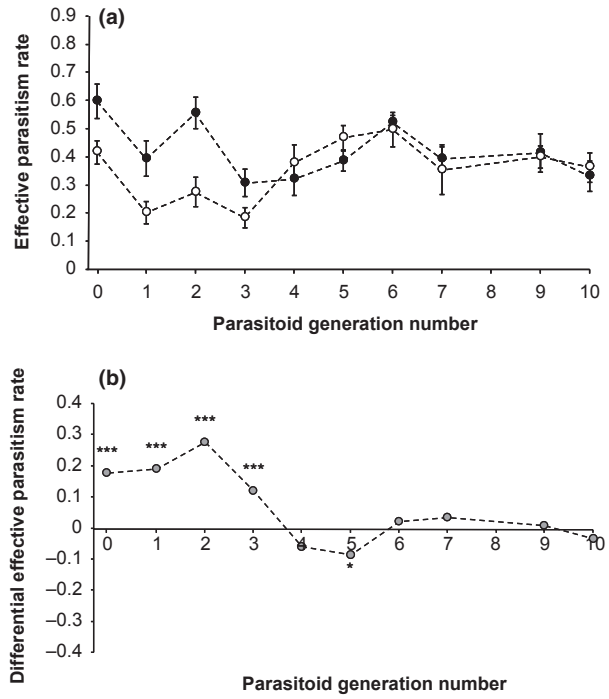

Fig. 3 (a) The effective parasitism rate for each generation (mean ± standard errors) of *Aphidius ervi* females exposed to populations of aphids harbouring (white dots, 'Exposed' parasitoid line) or not (black dots, 'Nonexposed' parasitoid line) *Hamiltonella defensa*. (b) Differential effective parasitism rate between the two selection treatments: mean of the 'Nonexposed' parasitoid line minus the mean of the 'Exposed' parasitoid line. Stars represent significant differences between both treatment means (see Materials and methods) (***$P < 0.001$, **$P < 0.01$ and *$P < 0.05$).

(GEE: $\chi^2_1 = 12.4$, $P < 0.001$), as the parasitism rate in the 'Nonexposed' line was not significantly affected by the generation number (GEE: $\chi^2_1 = 0.307$, $P = 0.58$). It should be noted that the effective parasitism rate of the

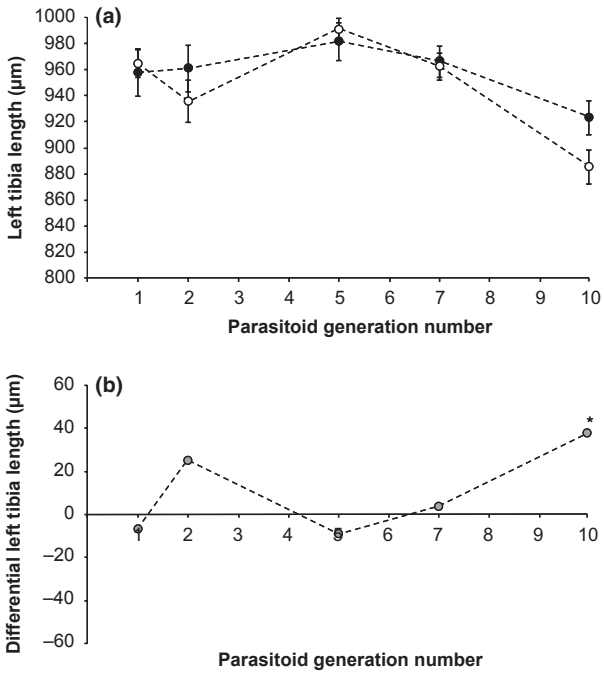

Fig. 4 (a) Length of the left tibia for each generation (mean ± standard errors) of *Aphidius ervi* females exposed to populations of aphids harbouring (white dots, 'Exposed' parasitoid line) or not (black dots, 'Nonexposed' parasitoid line) *Hamiltonella defensa*. (b) Differential parasitoid left tibia length between the two selection treatments: mean of the 'Nonexposed' parasitoid line minus the mean of the 'Exposed' parasitoid line. Stars represent significant differences between both treatment means (see Materials and methods) (***$P < 0.001$, **$P < 0.01$ and *$P < 0.05$).

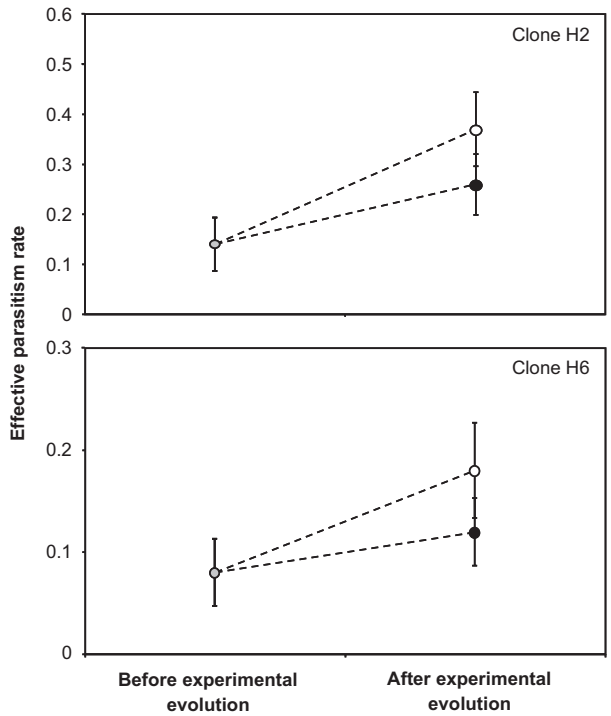

Fig. 5 Effective parasitism rate (mean ± standard errors) of the initial *Aphidius ervi* parasitoid population before the experimental evolution (grey dots), of the 'Nonexposed' parasitoid line (black dots) and of the 'Exposed' parasitoid line (white dots) after the experimental evolution on the two clones H2 and H6 harbouring *Hamiltonella defensa*.

'Exposed' parasitoid line surpassed the 'Nonexposed' one at the fifth generation.

Female size

Overall, parasitoids from 'Exposed' line had similar tibia lengths than those from 'Nonexposed' line (Fig. 4a, GEE: $\chi^2_1 = 1.19$, $P = 0.276$). The body size, however, declined towards the end of the experiment in the two lines (GEE: $\chi^2_1 = 9.51$, $P = 0.002$), and it did not depend on the selection treatment (GEE: interaction term, $\chi^2_1 = 0.25$, $P = 0.618$). The analysis of mean difference between the two selection treatments at each parasitoid generation showed that parasitoids from the 'Exposed' and 'Nonexposed' lines significantly differed in their tibia size after 10 generations of selection (Fig. 4b). After 10 generations, the parasitoids exposed to '*Hamiltonella*' host populations had smaller left tibias compared with parasitoids exposed to '*Hamiltonella*-free' host populations.

Experiment 3: Efficiency of selection to symbiont-mediated resistance

When comparing the effective parasitism rate of parasitoids before and after the experimental evolution on two '*Hamiltonella*' clones, the statistical model indicated a selective response. The 'Exposed' parasitoid line had more parasitoids successfully emerging from '*Hamiltonella*' aphids than both initial parasitoid population and 'Nonexposed' parasitoid line (Fig. 5, GEE: $\chi^2_2 = 6.52$, $P = 0.038$), and this result did not depend on the aphid clone tested (GEE: interaction term, $\chi^2_1 = 0.166$, $P = 0.920$).

Discussion

We used experimental evolution to determine whether there was heritable variation for parasitoid response to high host protection linked to a combination of symbiont- or innate-mediated resistance and whether this response was associated with changes in fitness components. Experimental evolution is particularly suited for the study of adaptation and is also a powerful tool for the detection of fitness trade-offs related to an evolved trait (Fuller *et al.*, 2005). However, a limitation of experimental evolution is that not all biological systems are equally suited to these types of studies as in many host–parasite interactions, one or both of the antagonists cannot be prevented from evolving: the genotype of either host or

parasite cannot be preserved over time (Gaba & Ebert, 2009). In our context, parthenogenetic reproduction of aphids ensured the transmission and the preservation of the same genetic and symbiotic background (Oliver *et al.*, 2010) and *A. ervi* parasitoids faced host population of the same resistance at each generation. Finally, this experimental approach allowed us to select parasitoid adaptation and demonstrated the important role of secondary symbionts in the host–parasite co-evolutionary dynamics.

In this study, measurements of parasitism resistance in the pea aphid clones showed that the presence of *H. defensa* explained most of the variations in parasitoid protection, validating results from earlier studies (for a review, see Le Ralec *et al.*, 2010 and Oliver *et al.*, 2010). Interestingly, the clones infected with the secondary symbiont varied in their degree of resistance. One source of such variations could be the nature of toxins produced by the different type of APSE bacteriophages harboured by *H. defensa* (Degnan & Moran, 2008). Another explanation being that genotype-by-symbiont interactions exist in the pea aphid host. This is in contradiction with Oliver *et al.* (2005) who did not find any interaction between symbiont isolate and genetic background. However, in our study, there were significant variations in the resistance of '*Hamiltonella*-free' clones, suggesting interclonal variations in aphid innate resistance components. This reinforces Vorburger *et al.* (2009) suggestion that aphid parasitoids are confronted with two lines of aphid defences: 'innate defences' and 'acquired defences' provided by secondary symbionts, which likely differ in their effectiveness and specificity. During this first experiment, we had the opportunity to study the evolution of parasitoids facing two types of resistance: (i) a strong selection pressure because of a combination of *Hamiltonella*-mediated resistance and intrinsic immunity and (ii) a low selection pressure exerted only by the aphid immune response.

Interestingly, this study showed how resistance components in insect hosts are potential agents in the selection of their parasitoids through changes in fitness over the course of experimental evolution. From the fifth parasitoid generation, the population fitness of both selection treatments, estimated by the effective parasitism rate, converged. The third experiment confirmed the beneficial effect of the experimental selection on parasitoid population as 'Exposed' parasitoid line was more able to counter the resistance of the aphids harbouring *H. defensa* compared to the initial parasitoid population. Our results provide evidence that mechanisms involved in 'virulence', defined as wasp's ability to develop within host and to emerge from it (Henter, 1995; Antolin *et al.*, 2006), exist in parasitoid populations. Parasitoid virulence is generally mediated by surface attributes of parasitoid eggs and eggs associated with biological materials injected into the host by the wasp (Bensadia *et al.*, 2006). The main bioactive protein isolated from *A. ervi* female venom is called γ-glutamyl transpeptidase (γGT) and triggers the apoptosis of the germaria and ovarioles cells of the pea aphid (Digilio *et al.*, 2000; Falabella *et al.*, 2007). At least two different alleles of the γGT have been identified (C. Anselme, unpublished). The venom effect is completed by two proteins, FABP and ENO, released by the teratocytes (cells derived from the parasitoid egg membrane). All those putative virulence factors may induce host-resource hijacking, favouring the parasitoid development (Falabella *et al.*, 2005, 2009). Consequently, the response of the selected female could rely on a variation in the virulence factors in the initial population, traits under directional selection in our experiment, and transmitted by the females to the next generations. Further molecular analysis is needed to determine the mechanisms associated with this improved virulence, for instance, by comparing the venom composition of the 'Exposed' parasitoid line that responded to the strong selective pressure with 'Nonexposed' parasitoid line that did not respond significantly to the low host resistance.

The possibility that improved virulence is accompanied by some changes in other fitness components is suggested by a decrease in the size of the left tibia in females exposed to the two types of resistance in aphid populations. This proxy for fecundity in hymenopterans (He & Wang, 2006, 2008) decreased in the two treatments at the tenth generation, so noticeable fitness modifications did not occur until parasitoids had spent between 7 and 10 generations on hosts. This delay of the response excludes the influence of a possible variation in nutritional quality between aphids harbouring or not *H. defensa* as the effect on parasitoid size would have appeared at the first generation. The size reduction was much lower in parasitoids exposed to '*Hamiltonella*-free' clones than to '*Hamiltonella*' clones, suggesting a cost for aphid resistance adaptation in parasitoid populations. The existence of such trade-offs supports the notion of a genotypic response of the parasitoids to the selective agent. Trade-offs associated with the improvement in host resistance have been largely described in *Drosophila* (Kraaijeveld *et al.*, 1998; Vijendravarma *et al.*, 2009) and also in aphids (Vorburger *et al.*, 2008), but the costs associated with modifications in virulence of parasitoids are less well documented. The possibility of fitness costs to improved virulence is suggested by our observations but the study of their ecological and evolutionary consequences would be particularly helpful to understand the aphid-parasitoid co-evolutionary processes.

Intense selective pressure resulted in diverse adaptations in parasitoid strategies to successfully infest a host (Poirié *et al.*, 2009). Our experimental evolution provides evidence for rapid evolution in *A. ervi* populations when faced with high aphid resistance and highlights the adaptive potential of parasitoid populations (Kraaijeveld *et al.*, 2001; Henry *et al.*, 2008; Gaba & Ebert, 2009). This experimental work is consistent with previous studies

revealing the potential of *A. ervi* populations showing *H. defensa*/parasitoid genotype specificities in the aphid *Lysiphlebus fabarum*/*A. ervi* system (Vorburger *et al.*, 2009), or populations increasing their performances on particular target host species and becoming locally adapted to their natal host population (Henry *et al.*, 2008, 2010). Henter (1995) also described the genetic adaptive potential of the parasitoid wasp populations. Up to now, 11 pea aphid host plant biotypes have been genetically determined (Peccoud *et al.*, 2009) and these different races differ in their prevalence of secondary symbionts (Frantz *et al.*, 2009). In nature, they may present a spatial heterogeneity in resistance to *A. ervi* in association with the prevalence of symbionts conferring resistance. Consequently, the differential resistance levels may lead to the adaptation of particular *A. ervi* genotypes, promoting local specialization and then diversification in parasitoid populations (Fry, 1996; Laine, 2009). It remains unclear to what extent host resistance may affect the population structure or divergence at the parasitoid level, and it may trigger codivergence in their parasitoids. However, host-associated differentiation in parasitoids is increasingly described (Stireman *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007), giving suggestions regarding the issues of co-evolutionary processes between hosts and parasitoids, and maybe explaining the high richness of the hymenopteran parasitoid group (LaSalle & Gauld, 1992).

Acknowledgments

The authors like to thank Caroline Anselme, Marylène Poirié, Yvan Rahbé and Manuel Plantegenest for all stimulating discussions and suggestions about this work. Thanks also to Jean Peccoud for help with pea aphid collection, Bernard Chaubet for the rearing, Ludovic Guyonvarch for the 'enormous' technical support, Benjamin Agogue and Alan Walton for language corrections. Two anonymous referees are also acknowledged for their constructive comments on an earlier draft. This study was supported by the French INRA Santé des Plantes et Environnement (SPE) Department and the French 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'.

References

Antolin, M.F., Bjorksten, T.A. & Vaughn, T.T. 2006. Host-related fitness trade-offs in a presumed generalist parasitoid, *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Ecol. Entomol.* **31**: 242–254.

Bates, D. & Maechler, M. 2009. lme4: linear mixed-effects models using S4 classes. R Project.

Begon, M., Townsend, C.R. & Harper, J.L. 2006. *Ecology. From Individuals to Ecosystems*, 4th edn. Blackwell Publishing, Malden, MA.

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**: 146–157.

Chaston, J. & Goodrich-Blair, H. 2010. Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**: 41–58.

De Conti, B.F., Bueno, V.H.P. & Sampaio, M.V. 2008. The parasitoid *Praon volucre* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) as a potential biological control agent of the aphid *Uroleucon ambrosiae* (Hemiptera: Aphididae) on lettuce in Brazil. *Eur. J. Entomol.* **105**: 485–487.

Degnan, P.H. & Moran, N.A. 2008. Diverse phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 6782–6791.

Digilio, M.C., Isidoro, N., Tremblay, E. & Pennacchio, F. 2000. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *J. Insect Physiol.* **46**: 1041–1050.

Eggleton, P. & Belshaw, R. 1992. Insect parasitoids: an evolutionary overview. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **337**: 1–20.

Falabella, P., Perugino, G., Caccialupi, P., Riviello, L., Varricchio, P., Tranfaglia, A. *et al.* 2005. A novel fatty acid binding protein produced by teratocytes of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. *Insect Mol. Biol.* **14**: 195–205.

Falabella, P., Riviello, L., Caccialupi, P., Rossodivita, T., Valente, M.T., De Stradis, M.L. *et al.* 2007. A gamma-glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**: 453–465.

Falabella, P., Riviello, L., De Stradis, M.L., Stigliano, C., Varricchio, P., Grimaldi, A. *et al.* 2009. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**: 801–813.

Ferrari, J., Muller, C.B., Kraaijeveld, A.R. & Godfray, H.C.J. 2001. Clonal variation and covariation in aphid resistance to parasitoids and a pathogen. *Evolution* **55**: 1805–1814.

Ferrari, J., Darby, A.C., Daniell, T.J., Godfray, H.C.J. & Douglas, A.E. 2004. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. *Ecol. Entomol.* **29**: 60–65.

Frantz, A., Calcagno, V., Mieuzet, L., Plantegenest, M. & Simon, J.C. 2009. Complex trait differentiation between host-populations of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris): implications for the evolution of ecological specialisation. *Biol. J. Linn. Soc.* **97**: 718–727.

Fry, J.D. 1996. The evolution of host specialization: are trade-offs overrated? *Am. Nat.* **148**: S84–S107.

Fuller, R.C., Baer, C.F. & Travis, J. 2005. How and when selection experiments might actually be useful. *Integr. Comp. Biol.* **45**: 391–404.

Gaba, S. & Ebert, D. 2009. Time-shift experiments as a tool to study antagonistic coevolution. *Trends Ecol. Evol.* **24**: 226–232.

Gerardo, N.M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S.M., De Vos, M. *et al.* 2010. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*. *Genome Biol.* **11**: R21.

Gil-Turnes, M.S. & Fenical, W. 1992. Embryos of *Homarus americanus* are protected by epibiotic bacteria. *Biol. Bull.* **182**: 105–108.

Gil-Turnes, M.S., Hay, M.E. & Fenical, W. 1989. Symbiotic marine bacteria chemically defend crustacean embryos from a pathogenic fungus. *Science* **246**: 116–118.

Godfray, H.C.J. 1994. *Parasitoids. Behavioural and Evolutionary Ecology*. Princeton University Press, Princeton, NJ.

He, X.Z. & Wang, Q. 2006. Asymmetric size effect of sexes on reproductive fitness in an aphid parasitoid *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidiidae). *Biol. Control* **36**: 293–298.

He, X.Z. & Wang, Q. 2008. Reproductive strategies of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera: Aphidiidae). *Biol. Control* **45**: 281–287.

Henry, L.M., Roitberg, B.D. & Gillespie, D.R. 2008. Host-range evolution in *Aphidius* parasitoids: fidelity, virulence and fitness trade-offs on an ancestral host. *Evolution* **62**: 689–699.

Henry, L.M., May, N., Acheampong, S., Gillespie, D.R. & Roitberg, B.D. 2010. Host-adapted parasitoids in biological control: does source matter? *Ecol. Appl.* **20**: 242–250.

Henter, H.J. 1995. The potential for coevolution in a host-parasitoid system. 2. Genetic variation within a population of wasps in the ability to parasitize an aphid host. *Evolution* **49**: 439–445.

Henter, H.J. & Via, S. 1995. The potential for coevolution in a host-parasitoid system.1. Genetic variation within an aphid population in the susceptibility to a parasitic wasp. *Evolution* **49**: 427–438.

Højsgaard, S. 2009. Groupwise computations of summary statistics, general linear contrasts and other utilities. R Project.

Hufbauer, R.A. 2002. Aphid population dynamics: does resistance to parasitism influence population size? *Ecol. Entomol.* **27**: 25–32.

Hufbauer, R.A. & Via, S. 1999. Evolution of an aphid–parasitoid interaction: variation in resistance to parasitism among aphid populations specialized on different plants. *Evolution* **53**: 1435–1445.

Hurst, G.D.D., Bandi, C., Sacchi, L., Cochrane, A.G., Bertrand, D., Karaca, I. *et al.* 1999. *Adonia variegata* (Coleoptera: Coccinellidae) bears maternally inherited Flavobacteria that kill males only. *Parasitology* **118**: 125–134.

Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S.N., Boelio, L.M. & Perlman, S.J. 2010. Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Science* **329**: 212–215.

Kellner, R.L.L. 1999. What is the basis of pederin polymorphism in *Paederus riparius* rove beetles? The endosymbiotic hypothesis. *Entomol. Exp. Appl.* **93**: 41–49.

Kraaijeveld, A.R., Van Alphen, J.J.M. & Godfray, H.C.J. 1998. The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. *Parasitology* **116**: 29–45.

Kraaijeveld, A.R., Hutcheson, K.A., Limentani, E.C. & Godfray, H.C.J. 2001. Costs of counterdefenses to host resistance in a parasitoid of *Drosophila*. *Evolution* **55**: 1815–1821.

Laine, A.L. 2009. Role of coevolution in generating biological diversity: spatially divergent selection trajectories. *J. Exp. Bot.* **60**: 2957–2970.

LaSalle, J. & Gauld, I.D. (eds) 1992. *Hymenoptera and Biodiversity*. C.A.B. International, UK.

Le Ralec, A., Anselme, C., Outreman, Y., Poirié, M., van Baaren, J., Le Lann, C. *et al.* 2010. Evolutionary ecology of the interactions between aphids and their parasitoids. *C. R. Biol.* **333**: 554–565.

Liang, K.Y. & Zeger, S.L. 1986. Longitudinal data-analysis using generalized linear-models. *Biometrika* **73**: 122–131.

Montllor, C.B., Maxmen, A. & Purcell, A.H. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol.* **27**: 189–195.

Nicol, C.M.Y. & Mackauer, M. 1999. The scaling of body size and mass in a host parasitoid association: influence of host species and stage. *Entomol. Exp. Appl.* **90**: 83–92.

Oliver, K.M., Russell, J.A., Moran, N.A. & Hunter, M.S. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**: 1803–1807.

Oliver, K.M., Moran, N.A. & Hunter, M.S. 2005. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **102**: 12795–12800.

Oliver, K.M., Campos, J., Moran, N.A. & Hunter, M.S. 2008. Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **275**: 293–299.

Oliver, K.M., Degnan, P.H., Hunter, M.S. & Moran, N.A. 2009. Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. *Science* **325**: 992–994.

Oliver, K.M., Degnan, P.H., Burke, G.R. & Moran, N.A. 2010. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu. Rev. Entomol.* **55**: 247–266.

Peccoud, J., Simon, J.C., McLaughlin, H.J. & Moran, N.A. 2009. Post-Pleistocene radiation of the pea aphid complex revealed by rapidly evolving endosymbionts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**: 16315–16320.

Poirié, M., Carton, Y. & Dubuffet, A. 2009. Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. *C. R. Biol.* **332**: 311–320.

R Development Core Team. 2008. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Roitberg, B.D., Boivin, G. & Vet, L.E.M. 2001. Fitness, parasitoids, and biological control: an opinion. *Can. Entomol.* **133**: 429–438.

Scarborough, C.L., Ferrari, J. & Godfray, H.C.J. 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* **310**: 1781.

Smith, M.A., Wood, D.M., Janzen, D.H., Hallwachs, W. & Hebert, P.D.N. 2007. DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**: 4967–4972.

Stireman, J.O., Nason, J.D., Heard, S. & Seehawer, J.M. 2006. Cascading host-associated genetic differentiation in parasitoids of phytophagous insects. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **273**: 523–530.

Tsuchida, T., Koga, R. & Fukatsu, T. 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* **303**: 1989.

Tsuchida, T., Koga, R., Horikawa, M., Tsunoda, T., Maoka, T., Matsumoto, S. *et al.* 2010. Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science* **19**: 1102–1104.

Vijendravarma, R.K., Kraaijeveld, A.R. & Godfray, H.C.J. 2009. Experimental evolution shows *Drosophila melanogaster* resistance to a microsporidian pathogen has fitness costs. *Evolution* **63**: 104–114.

Vorburger, C., Gouskov, A. & von Burg, S. 2008. Genetic covariation between effectiveness and cost of defence in aphids. *Biol. Lett.* **4**: 674–676.

Vorburger, C., Sandrock, C., Gouskov, A., Castaneda, L.E. & Ferrari, J. 2009. Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in all-parthenogenetic host–parasitoid interaction. *Evolution* **63**: 1439–1450.

Yan, J. 2002. Geepack: yet another package for generalized estimating equations. *R-News* **2/3**: 12–14.

Received 8 October 2010; revised 17 November 2010; accepted 18 November 2010

4. Analyse des facteurs de virulence potentiels

Introduction

L'identification des facteurs de virulence a été réalisée par Caroline Anselme, à l'époque post-doctorante à l'INRA de Sophia-Antipolis dans l'UMR IBSV dirigée par Marylène Poirié. Une banque d'ADN complémentaires des glandes à venin d'*A ervi* a été séquencée dans le cadre d'un projet Génoscope. Les facteurs de virulence potentiels ont été identifiés sur la base des similarités de séquences ou de fonctions à des facteurs déjà décrits et/ou selon l'abondance des transcrits dans la banque. La confirmation de leur surexpression dans les glandes à venin (par rapport au reste du corps) a été réalisée par RT-PCR quantitative. Neuf gènes candidats, dont deux gènes *γGT* ont été identifiés. Les protéines identifiées auraient des fonctions liées à la castration de l'hôte (γGT) et à l'inhibition du système immunitaire du puceron (autres candidats).

Méthodes

Pou déterminer si la sélection vis-à-vis de la résistance du puceron hôte a un effet au niveau de l'expression des facteurs de virulence des parasitoïdes, nous avons quantifié le taux de transcrits des différents gènes chez les femelles parasitoïdes exposées ou non à la résistance conférée par *H. defensa*. Pour cela, les glandes et le réservoir à venin des femelles ont été disséqués (Figure 4.2.) et l'ARN a été extrait avec le kit RNeasy Plus Micro Kit de Qiagen. Les ARNm ont été rétrotranscrits avec le kit iScript cDNA Synthesis (BioRad). La quantification par PCR quantitative en temps réel a été réalisée avec le système Opticon monitor 2 de BioRad grâce au kit qPCR SYBR MasterMix Plus for SYBR Green I No ROX d'Eurogentec, à l'INRA de Sophia-Antipolis. Des amorces spécifiques des gènes d'intérêt et les conditions optimales de PCR ont été déterminées pour chaque candidat ainsi que pour deux gènes de ménage (*RPL19* et *RPL23*) utilisés pour normaliser les données. Les résultats ont été analysés par la méthode des delta CT à l'aide du logiciel qBase (Hellemans *et al*., 2007).

A l'issue d'une analyse préliminaire sur des échantillons correspondant aux femelles avant l'évolution expérimentale (G_0), et aux femelles des 10ème et 11ème générations exposées ou non à la résistance conférée par le symbiote, trois gènes qui présentaient une variabilité du taux de transcrits ont été sélectionnés pour notre étude. Il s'agit de gènes codant pour un peptide riche en cystéines nommé 'CL11C1' (rôles potentiels : peptide

antimicrobien ou inhibiteur de la mélanisation), et deux protéases à sérine, 'CL7C1' et 'YL16' (inhibiteurs potentiels de la mélanisation).

Nous avons analysé la quantité de transcrits de ces trois gènes dans les glandes des femelles avant à G_0, à G_{25} (après 25 générations de parasitoïdes exposés ou non à *H. defensa*), et sur des femelles d'élevage n'ayant subi aucune manipulation durant les 25 générations.

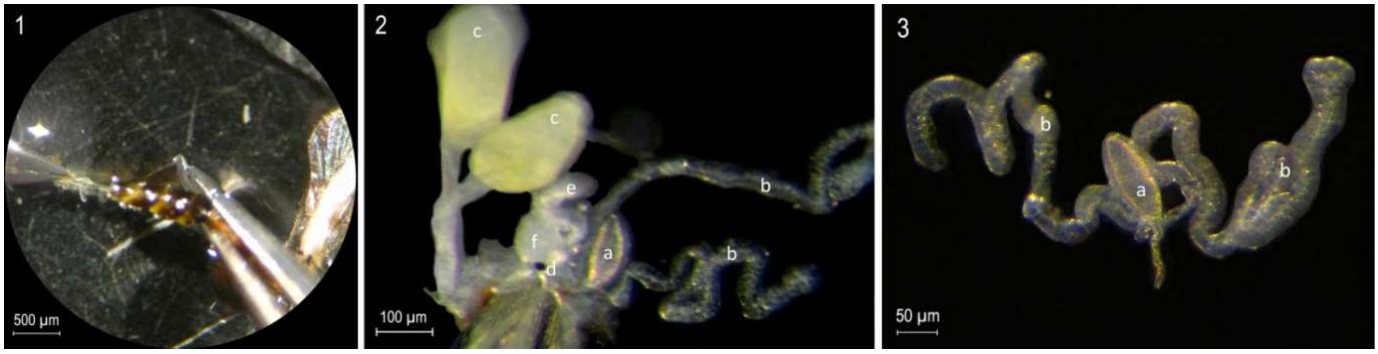

Figure 4. 2. **:** Etapes de la dissection des femelles parasitoïdes. L'appareil reproducteur est d'abord extrait sous loupe binoculaire dans du liquide physiologique de Ringer (1et 2), pour ensuite en isoler le réservoir et la glande à venin (3). Réservoir (a), glandes à venin plurilobées (b), ovaires (c), spermathèque (d), glande de Dufour (e) et ganglion de la chaîne nerveuse (f).

Résultats

La quantité de transcrits de *CL11C1* est beaucoup plus importante dans les glandes des femelles expérimentées de la G_{25} que dans les glandes des femelles des populations d'élevage ou de celles prélevées avant l'évolution expérimentale (G_0). Le taux de transcrits de *CL7C1* est en revanche plus faible en G_{25} dans les deux lignées de femelles par rapport à la G_0. Enfin, le taux de transcrits de *YL16* est plus faible chez les femelles expérimentées de la G_{25}. Il n'y a pas de différence significative entre les taux de transcrits de *CL11C1* et *CL7C1* des femelles exposées et des femelles non exposées au symbiote (Figure 4.3.).

Discussion et conclusion

CL11C1 est le seul gène surexprimé à la 25ème génération de sélection par rapport à la G0. Toutefois, il n'y a pas de différence significative entre les deux traitements, parasitoïdes exposés ou non à *H.defensa*.

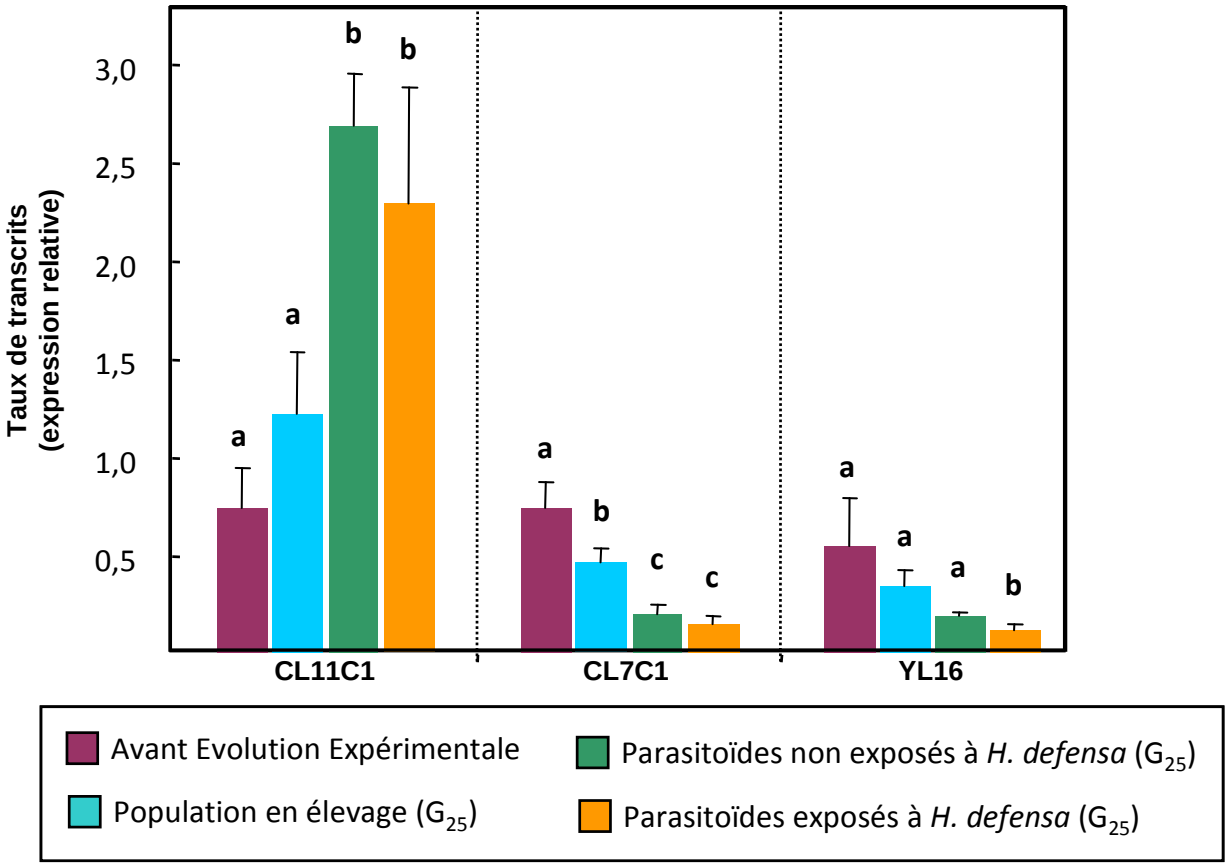

Figure 4.3. Expression relative de *CLC11*, *CLC7* et *YL16*. Les taux de transcrits relatifs sont calculés par rapport au taux de transcrits chez les femelles de la génération 0 (avant sélection expérimentale) choisies comme échantillon de référence (taux de transcrit fixé à 1). Les barres verticales représentent l'erreur standard de la moyenne calculée à partir de trois répétitions biologiques et trois répétitions techniques. Les lettres différentes indiquent des taux d'expression significativement différents à $p<0,05$.

Le facteur de cette sélection reste donc inconnu, mais plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

i. Les femelles issues de l'élevage ont été prélevées directement dans la cage alors que les femelles expérimentées ont subi plus de manipulations (prélèvement, isolement). L'expression de *CL11C1* pourrait donc être associée à un stress des femelles dû à cette manipulation.

ii. Les pucerons possèdent une réponse intrinsèque, qu'ils portent ou non le symbiote. *CL11C1* pourrait donc jouer un rôle dans le contournement du système immunitaire de l'hôte.

iii. Au cours de cette expérience, les femelles parasitoïdes sont aussi sélectionnées sur des caractères liés au succès parasitaire, comme la capacité à exploiter leurs hôtes (ex.

via castration). Il est donc possible que *CL11C1* puisse influer sur l'exploitation des ressources de l'hôte.

Aucun gène n'étant surexprimé spécifiquement chez les femelles sélectionnées sur les pucerons très résistants, nos résultats n'ont pas permis d'identifier de facteurs de virulence sélectionnés lors de l'exposition aux pucerons porteurs de *H. defensa*. Des analyses moléculaires supplémentaires et des comparaisons avec des facteurs présents chez une espèce de parasitoïde proche d'*A. ervi* permettront de préciser les fonctions exactes de ces molécules dans l'exploitation de l'hôte.

5. Evolution des propriétés génétiques des populations sélectionnées- Article 3.

Les femelles parasitoïdes issues de l'évolution expérimentale ont été, à chaque génération, conservées afin d'en extraire l'ADN. Nous avons amplifié les marqueurs microsatellites décrits dans le chapitre 3 puis mesuré les variabilités et structures génétiques des populations exposées ou non à la résistance liée au symbiote. Nous avons ainsi comparé les deux populations de parasitoïdes dans le but de détecter les traces de la sélection au niveau génétique.

L'évolution des propriétés génétiques des populations de parasitoïdes issus de l'évolution expérimentale fait l'objet d'un article en préparation :

Effect of symbiont-mediated resistance on population genetics of experimentally selected parasitoids

Dion E., Zélé F., Simon J-C. and Outreman Y.

Effect of symbiont-mediated resistance on population genetics of experimentally selected parasitoids

Dion E.[1, 2], Zélé F.[3], Simon J-C. [1, 4] and Outreman Y. [1,5]

[1] *UMR 1099 INRA-Agrocampus Ouest-Université Rennes 1 "Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes", 65, rue de Saint-Brieuc CS 84215, 35042 Rennes Cedex, and BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France.*

[2] *E-mail: emilie.deguydion@gmail.com*

[3]*CNRS UMR 2724 "Génétique et Evolution des Maladies Infectieuses", IRD, 911 Avenue Agropolis, 34394 Montpellier-France. E-mail: flore.zele@ird.fr*

[4] *E-mail: jean-christophe.simon@rennes.inra.fr*

[5] *E-mail: yannick.outreman@rennes.inra.fr*

Short title: Host symbiont effects on parasitoid population genetics

ABSTRACT

In host-parasite coevolution, defensive traits are selected in host to overcome parasite virulence, and attacks traits in parasite, to exploit the host. For the coevolution to occur, genetic variations are needed in both host and parasite populations for the traits implied. Identifying coevolution consequences on natural parasite population genetic traits is difficult because of the confounding environmental factors influencing the course of the coevolution. We used an experimental evolution procedure in which parasitoids were exposed either to highly resistant pea aphid hosts; resistance due to the presence of the facultative symbiont *Hamiltonella defensa;* or to low innate resistant hosts free of defensive symbiont. We compared the genetic variability and structure of the populations exposed to high-resistant or low-resistant aphids, and throughout generations. Parasitoid exposed to *H. defensa* showed a diminution of their allelic variability over generations. At the end of the selection process, the FST between the two parasitoid populations was high and significant, indicating that parasitoids submitted to the symbiont-mediated resistance gained different genetic properties than those exploiting the low-resistant aphid populations. This study highlighted the genetic potential of parasitoid populations to evolve in controlled environment and even with small population size; giving valuable clues on natural population abilities to evolve when facing high-resistant host species.

Keywords: host-parasitoid coevolution, experimental evolution, symbiont-mediated resistance, microsatellites, genetic variability, genetic structure

INTRODUCTION

Host-parasite coevolution is the reciprocal natural selection on host resistance and parasite infectivity (Thompson, 1994). Models suggest that this form of reciprocal selection may be frequency dependent (Bell & Maynard Smith, 1987) that is, parasites are selected to overcome the resistance of common hosts and reciprocally, hosts are selected to overcome the virulence of common parasites. These evolutionary changes require genetic variations in both host and parasite populations (Woolhouse *et al*., 2002; Gandon *et al*., 2008). Under these conditions, the reciprocal selection may favor specific genetic processes such as selection of particular genes, mutations, or recombination favoring either the parasite fitness or the host one. This process may also be associated to emergence of new alleles increasing the genetic diversity within the population, leading to changes in both host and parasite genotype frequencies in the field (Fox & Wolf, 2006; Gandon *et al*., 2008). Because the forces of natural selection often vary in space, resident genotypes in each deme would have a higher relative fitness in their local habitat, leading to their local adaptation, and to a higher extent, their possible specialization (Kaweki & Ebert, 2004; Laine, 2009).

In various host-parasite associations, the evolution of life history traits and the trade off associated have been studied (*e.g.* Ebert, 2008; Dupas *et al*., 2009). These evolved traits may however be influenced by a multitude of selective processes that are not directly associated to the coevolutionary interaction, including fluctuating environment or interactions with other organisms (Laine, 2009). Therefore, identifying coevolution consequences on phenotypic or genetic traits is difficult and requires complex study designs (*e.g.* long-term analysis, Jokela *et al*., 2009). The experimental evolution is thus an approach increasingly used, where organisms evolve under controlled conditions with few confounding environmental variations, being a powerful tool for the detection of fitness trade-offs related to an evolved trait (Fuller *et al.*, 2005; Gaba & Ebert, 2009). Experimental evolution has been widely used to study host parasite coevolution in microbial host system, focusing on the phenotypical (resistance, virulence, trade offs etc… Lohse *et al*., 2006; Forde *et al*., 2008) and genomic levels (Barrick *et al*., 2009); whereas the genetic properties of antagonist populations have been rarely followed. Several experimental evolution studies also focused on insects; more particularly on host-parasitoid interactions characterized by longer generation time, lower population size and more complex responses than microbes. These experiments usually target the evolution of host resistance and the trade offs associated (*e.g.* Kraaijeveld *et al*., 2001; Vijendravarma *et al*., 2009).

The parasitoid *Aphidius ervi* uses the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* as host, its larva developing by feeding within the host, finally killing it during its developmental period. The parasitoid exerts a high pressure on aphid populations as parasitism rate can reach 70% in some conditions (Hufbauer, 2002). *A. pisum* can resist physiologically to the development of the parasitoid thanks to a combination of its intrinsic immunity and symbiosis with bacteria (Le Ralec *et al*., 2010). However, the pea aphid immune system is a weak barrier conferring only partial resistance to *A. ervi* (Gerardo *et al*., 2010). The failure of the parasitoid development is mainly due to the presence of symbionts members of the Enterobacteriaceae, called *Hamiltonella defensa* (Oliver *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2005 ; Dion *et al*., 2011), protection referred to as 'symbiont-mediated resistance' (Oliver *et al.*, 2005). Aphid symbiont-mediated resistance is likely to exert strong selective pressures on natural populations of parasitoids because parasitoids have a particularly intimate relationship with their hosts as a single host harbors the parasitoid's offspring until maturity (Godfray, 1994). The intimate nature of this relationship promotes coevolutionary dynamics, while developing adaptation to counter the combined effect of the aphid intrinsic immunity and the symbiont-mediated resistance.

The present study aimed to analyze the genetic properties of *A. ervi* parasitoid populations facing hosts with contrasted levels of resistance. By using an experimental evolution, Dion *et al.* (2011) investigated the adaptive potential of *A. ervi* facing either population of aphids harboring *H. defensa*, combining innate and symbiont mediated resistance, and population of hosts without secondary symbiont, presenting only the innate resistance. Parasitoids exposed to *H. defensa* increased their parasitism rate through generations, gaining enhanced virulence over time, reaching the same parasitism rate as those exposed to low aphid innate resistance only. In the present study, we followed the genetic properties of the two parasitoid lines described above, with the use of microsatellite molecular markers. Virulence genes are not know yet in *Aphidius ervi*, so we use neutral markers as they give an objective overview of the population genetic properties. Our objectives were to: (a) evaluate the genetic diversity of the initial parasitoid populations, as the capacity of populations to evolve depends strongly on the genetic variability for the traits responding to the selective pressure, (b) follow the evolution of the genetic variability through the ten parasitoid generations produced and (c) test the influence of the combined intrinsic-*H. defensa* resistance on the possible genetic segregation in parasitoids populations.

MATERIALS AND METHODS

Organisms

We used eight green clones of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae). As secondary symbiont community in *A. pisum* strongly depends on the host biotype (Frantz *et al.*, 2009), clones were chosen amongst a collection of plant specialized genotypes with known secondary symbionts (see Frantz *et al.*, 2009 and Peccoud *et al.*, 2009 for details on clone collection and symbiotic detection). Four of the 8 clones were free of secondary symbionts (i.e., clones called '*Hamiltonella*-free' clones). Among these clones, one was originated from alfalfa *(Medicago sativa)*, while the others came from spiny restharrow (*Onosis spinosa*) and meadow vetchling (*Lathyrus pratensis*). The four other clones, collected on alfalfa harbored the secondary symbiont *Hamiltonella defensa* (i.e., clones called '*Hamiltonella*' clones). All aphids were maintained on broad bean *Vicia faba*.

In order to favor evolutionary responses, genetically diverse starting populations of *Aphidius ervi* parasitoids were used. The initial culture was then obtained by sampling about 200 *A. pisum* mummies (i.e. dead aphid containing a parasitoid few days before its emergence) in different alfalfa fields around Rennes (Western France) in November 2008. Adults emerging from these collected mummies were split and maintained in three distinct Plexiglas cages (40×30×50 cm) containing a high genetic and symbiotic diversity of red and green pea aphids originating from six different alfalfa crops, located in two cities that are 40km apart from one another. To limit genetic drift in the parasitoid populations, immigration was simulated by individual exchanges between the three cages and regular addition of newly sampled parasitoids. For experiments, we collected mummies each day from cultures and placed it individually in gelatine capsules. Newly emerged females were enclosed in plastic tubes (22×1 cm) containing moistened cotton, droplets of honey, with one male for mating. Females between two and three days-old were used and only once.

All experiments and insect rearing were done in climate rooms at 20±1°C, 70±10% relative humidity and L:D 16:8h photoperiod.

Experimental evolution procedure

The experimental evolution was performed for ten parasitoid generations using two selection treatments that were treated in exactly the same way except the presence or absence of the symbiont-mediated resistance in host population. A broad bean plant (about 15 cm height) infested with 32 third-instar aphid individuals constituted the host population. Each

plant was covered with cellophane bags to avoid aphid escape. A host population contained either individuals from the four '*Hamiltonella*-free' aphid clones or individuals from the four clones harboring *H. defensa*, each clone being equally represented (i.e., eight individuals per clone). For each parasitoid generation, eight '*Hamiltonella*-free' and eight '*Hamiltonella*' host populations were similarly constituted and then exposed to parasitoids which faced fixed host populations over time.

From the initial cultures,150 mummies were randomly extracted and constituted the initial population used in this experimental evolution design. All emerging females were allowed to mate during one day and then split for the two selection treatments: (a) the 'Non-exposed' parasitoids line, which is exposed to '*Hamiltonella*-free' host populations. Those parasitoids are thus submitted to a low selection exerted by the aphid intrinsic immune responses; and (b) the 'Exposed' parasitoids line are exposed to '*Hamiltonella*' host populations, which exert a strong selection characterized by the combination of both innate and symbiont-mediated resistances. Both treatments were followed during ten generations.

The experimental evolution procedure consisted in introducing four parasitoid females in each host population. One male was also added into the cellophane bag to ensure female fecundation. Parasitoids were allowed to exploit the host population for four days. After this delay, they were extracted from the design and stocked in 95° ethanol for genetic analyses. The host population was then maintained in climate chambers during 20 days and examined daily to record and extract aphid mummies isolated in gelatine capsules. To minimize loss of genetic diversity due to inbreeding, all parasitoid males and females emerging from each host population of a selection treatment were pooled together during one day and thirty-two females (i.e., four females for each of the eight host populations) were randomly chosen in order to constitute the next generation. This experimental procedure was continuously conducted for ten successive parasitoid generations (from February 2009 to November 2009).

DNA extraction, PCR and genotyping

A. ervi individuals from the following generations from both selection treatments were considered: G0 (the initial parasitoid population), G1, G2, G5, G7 and G10 (the last generation produced). *A. ervi* has a haplodiploid reproduction system where unfertilized eggs develop as haploid males and fertilized one as diploid females. For this study, DNA extraction were carried out from females only, in semi deep well trays using the 'salting out' procedure (Miller *et al.*, 1988). Total DNA was suspended in a final volume of 50µL of ultrapure water. The genotypes were assessed at 11 microsatellites loci. We used the M13-tailed primer

method (Boutin-Ganache *et al.* 2001) to label amplicons for visualization on the capillary sequencer. Forward primers were 5′-tailed with a 23-basepair M13 sequence. Loci were amplified in a final volume of 10 µL polymerase chain reaction (PCR). The reaction mixture contained 2 µL of total DNA, 0.25 µM of each primer, 0.2 mM of a four nucleotide mixture, 1.25 mM of MgCl2, 0.25 µM of 1 µL of PCR Buffer (Promega, Madison, USA) and 0.25 U of Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, USA). The M13 primers were5′-fluorescently tagged with HEX, 6-FAM, NED or VIC at 0.25 µM for assessment of allele sizes on a capillary sequencer (describe below). PCR were conducted on S1000 thermal cycler (2008, Bio-Rad Laboratories) using the following cycling conditions: initial denaturation at 94 °C for 5 minutes, first cycle of DNA amplification (repeated 20 times) with a denaturation step at 94 °C for 20 seconds, hybridization at 55 °C for 20 s, elongation at 72 °C for 30 s; second cycle of M13 amplification with 20 repetitions of the following steps : 94 °C for 20 s, 53 °C for 20 s and 72 °C for 30 s. The PCR ends with a final elongation at 72 °C for 5 min.

Diluted PCR products (1.2 µL on 10 µL water) were added to 10 µL of high-die formamide containing 0.7% of 500 LIZ DNA ladder (Applied Biosystems) and electrophoresis was performed in the capillary sequencer ABI 3730 (Applied Biosystems). Allele calls were automatically assigned by GeneMapper (version 3.7, Applera Corp) and visually checked.

Genetic variability

Individuals from one selection treatment and one generation were considered as a population. Even if the female parasitoids used to launch the experimental evolution came from the same initial population, the G0 ‘Exposed’ and G0 ‘Non-Exposed’ parasitoid individuals were considered as two different populations for the analyses. Genetic variability was investigated for all populations. For each of the twelve loci, and for each population, the gene diversity, allelic richness, observed and expected heterozygosities and departure from Hardy-Weinberg equilibrium were assessed using F_{STAT} 2.9.4 (Goudet, 2005). The presence of null alleles was estimated for each locus with the software MICROCHECKER 2.2.3 (van Oosterhout, 2004).

Population differentiation

F_{ST} values were used to quantify differentiation among populations in allele frequencies. They were computed and tested for significance with F_{STAT} 2.9.4. F_{ST} between the two G0 ‘Exposed’ and ‘Non-Exposed’ lines was also calculated. To investigate the potential effects of the selection treatment and the generation number, a locus by locus analysis of molecular

variance (AMOVA; Excoffier *et al*. 1992) was performed with the software ARLEQUIN 3.1.5.2 (Excoffier *et al*., 2005) using the hierarchical model for genotypic data with several groups of populations and no within-individual level. The generations were considered as within, the treatment being the upper level tested.

RESULTS

Genetic variability

Sample size, allelic richness, observed and expected heterozygosities for each population are presented in Table 1. All microsatellites loci were polymorphic in each of the populations studied. Population sizes ranged from 14 to 25 females according to the success of the genotyping and the number of individuals found at the end of the parasitism step of the experimental evolution. The mean allelic richness is low, ranging from 3.09 to 4.66. The two initial populations at G0 showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, with a deficit in heterozygotes. This deficit can also be seen in the last three 'Exposed' parasitoids from generations G5, G7 and G10, and in all but G5 populations of the 'Non-Exposed' line (Table 1). The analysis performed by MICROCHECKER indicated there are no loci showing evidence for a null allele.

The allelic diversity evolved in different ways according to the analyzed locus (figure 1). In both selection treatments, the loci Ae18, Ae20 and Ae27 presented a decrease in diversity with parasitoid generation number. The diversity was lower at the end of the experimental selection for both loci Ae08 and Ae32 in the 'Exposed' line, and Ae01 and Ae22for 'Non-Exposed' line. Some loci showed similar allelic diversities at both G0 and G10 but high frequency variations among the intermediate generations. Some loci presented also an increase in their diversity, such as Ae22 in the 'Exposed line', and Ae29 in the 'Non-Exposed' line. By combining the allelic richness at each studied locus, the overall diversity decreased over generations, for both selection lines, starting at about 0.67 for both initial populations and ending at 0.61 for the 'Non-Exposed' line and 0.52 for the 'Exposed' line (Figure 2).

Population differentiation

Table 2 presents the pairwise F_{ST} between 'Non-Exposed' and 'Exposed' lines. The initial parasitoid population was split into two populations for the two selection treatments. The G0 'Exposed' and G0 'Non-Exposed' lines were not genetically different, with a non significant

F_{ST} of 0.0059. The two populations diverge from each over since the fifth generation, and, at the end of the selection process, the F_{ST} between the two lines reach the significant value of 0.00945.

F_{ST} between the initial populations and the two selection lines were very variable through generations, increasing or decreasing until G5 with an important modification of the tendency at G7. Overall F_{ST} between the initial population and the selected ones increased through generations (Figure 4), the two lines becoming genetically different from the initial population at G10. The final 'Exposed' line population strongly diverged from the initial population with a F_{ST} reaching 0.0967. At G10, the 'Non-Exposed' line was also genetically different from the initial population, with a F_{ST} of 0.0323. At the end of the experimental evolution, the 'Exposed' parasitoids line genetically differed from the 'Non-Exposed' parasitoids line (Table 2). The F_{ST} value between G0 and G10 is significant for the Exposed line for loci Ae03 and Ae06. The FST between G0 and the G5 non exposed population is also significant. Globally, F_{ST} between populations vary between loci, and there is also important variation between generations for each locus.

The genetic variance partitioned among host treatments ('Exposed' and 'Non-Exposed') and among generations was assessed by the analysis of molecular variance (Table 3.). The treatment and the generations among treatments explained respectively 2.2% and 3.5% of the variations. A significant isolation by selection treatment was found (*P* value=0.022). There were also significant variations between generations inside the treatments (*P* value = 0.036), according to the significant F_{ST} calculated between the concerned populations (Table2).

DISCUSSION

Using an experimental evolution approach, the evolution of genetic properties of populations exposed or not, to high level of host resistance was followed during ten parasitoid generations. During the selection process, females mortality was relatively important. Associated to the loss of data during the genotyping process due to classical technical troubles, this low survival induced low size of studied populations. Despite the limited number of individuals analysed, our study has however showed how the resistance associated to a facultative symbiont may affect the genetic properties of parasitoid populations.

Almost every populations presented a heterozygote deficiency. As the detection of null alleles was unsuccessful, this deficit seems to be due to the initial homozygote excess in both G0 'Exposed' line and G0 'Non-Exposed' line. Despite the high initial number of parasitoids

founders, some genetic drift may have occurred in our rearing conditions before the experimental evolution (Cook, 1993). At G0, the selection lines were founded with 32 parasitoid females randomly chosen in parasitoids rearing. At each generation, all offspring produced by the previous generations were then pooled and 32 females among these offspring were randomly sampled. This experimental set-up allowed maintenance of a relatively high genetic diversity: populations not exposed to the symbiont-mediated resistance would not be expected to exhibit reductions in allelic richness (Nei *et al.*, 1975). There was a differential evolution of the diversity at different loci from both selection lines: the diversity of some loci decreased, while other showed high variations along the parasitoid generation number. For some loci having less efficient amplification than others, the small population size genotyped may have biased the results, leading to stochastic pattern. Globally, in the 'Non-Exposed' line, the mean population allele diversity shows a light decrease through generations. In this line, there is thus no particular allele selected among over, and rare alleles seem to be maintained throughout the selection process. However, the allelic diversity decreases in the 'Exposed' line, from 0.65 in G0 to 0.52 at the 10th generation. Consequently, some loci were more affected by the selective pressure associated with the high level of host resistance. Dion *et al*. (2011) demonstrated that parasitoids from this treatment increased their performance on resistant hosts, adapting to the symbiont-mediated resistance. This further suggests an important influence of the selective regime on the genetic diversity in the 'Exposed' line, where the symbiont-mediated resistance seems to have accelerated the selection of particular allele combinations in parasitoid populations.

The changes in allelic diversity for some loci were consistent with the population segregation observed between the 'Exposed' line and the 'Non-Exposed' line. After 10 generations of experimental evolution, the genetic properties of the two parasitoid lines strongly differed from their own initial populations. Moreover, those two parasitoid populations were genetically very different from each other after the experimental evolution, the selection treatment being the major force acting on the groups' genetic properties. This difference was not associated to the initial population properties because the initial parasitoids populations were genetically identical. Consequently, the two selection lines evolved to gain different genetic properties under the symbiont-mediated resistance pressure. The intrinsic immunity of the pea aphid is limited, providing only a weak protection (Gerardo *et al.*, 2010). The host resistance may lead to a variation from small reduction in successful parasitism to nearly complete protection (Oliver et al., 2010). '*Hamiltonella' A. pisum* clones used here presented a strong resistance against parasitoids (about 90% of parasitism reduction). The

intimate nature of the relationship between *A. pisum* and *A. ervi* may exert strong selective pressure on parasitoid populations, leading to the segregation of the populations that can be detected with neutral markers.

The experimental evolution provided evidence for rapid evolution in *A. ervi* genetic properties when faced with high aphid resistance, and highlighted the genetic adaptive potential of parasitoid populations. The ability of populations to adaptively respond to selective pressure critically depends upon the availability of genetic diversity. *Aphidius ervi* is a parasitoid wasp that has been largely used in biological control, against pest species native to Eurasia that feed on alfalfa, clover and other plants (Angalet & Fuester, 1977; Starý, 1993; Milne, 1999). For a successful struggle against pests, it is commonly suggested to increase the probability of local adaptation by maximising the genetic diversity of natural enemies, minimizing inbreeding and releasing natural enemies with as much as possible an important genetic variation inside the population (Reed *et al*., 2003; Phillips *et al*., 2008). Hufbauer et *al.* (2004) demonstrated that there is significant genetic differentiation between the native European and the introduced American *A. ervi* populations and recent research demonstrated the increased capacity of selection lines to parasitize other aphid species; or to overcome host defenses in controlled laboratory experiments (Henry *et al*., 2008; Dion *et al*., 2011). These results associated to the genetic potential to evolve even with small number of individual available as we demonstrated here, provide encouraging clues regarding the possibility for natural *A. ervi* populations to evolve, and to be a confident candidate for biological control.

The experimental evolution of parasitoids *A. ervi* lead to a selection for females overcoming the high symbiont mediated resistance, with mechanisms involved in ‘virulence’, defined as wasp's ability to develop within host and to emerge from it (Dion *et al*., 2011). All the putative virulence factors may induce host-resource hijacking, favoring the parasitoid development (Falabella *et al.*, 2005; 2009); but precise mechanisms implied in overcoming *Hamiltonella defensa* mediated resistance remain sparse in *Aphidius ervi*. Here, genetic changes and segregation between parasitoid populations were detected with neutral markers. Consequently, a promising approach is to identify alleles of loci subjected to be implied in parasitoid virulence. Mutations in their sequences may allow the identification of potentially selected virulence genes in populations facing high host resistance.

Following genetic traits with experimental evolution framework has been used in only few studies dealing with host parasite coevolution (Schulte *et al*., 2010), or implies microorganisms such as bacteria (Elena & Lenski, 2003; Barrick *et al*., 2009), but these

experiments provide central clues concerning the issues of coevolutionary processes and their mechanisms.

LITERATURE CITED:

Angalet, G.W., Fuester, R., 1977. The *Aphidius* parasites of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* in the eastern half of the United-States of America. Annals of the Entomological Society of America 70**,** 87-96.

Barrick, J.E., Yu, D.S., Yoon, S.H., Jeong, H., Oh, T.K., Schneider, D., Lenski, R.E., Kim, J.F., 2009. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. Nature 461**,** 1243-U1274.

Bell, G., Maynard Smith J., 1987. Short-term selection for recombination among mutually antagonistic species. Nature 328, 66–68.

Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M., Deschepper, C.F., 2001. M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. Biotechniques 31**,** 24-+.

Cook, J.M., 1993. Inbred lines as reservoirs of sex alleles in parasitoid rearing programs. Environmental Entomology 22**,** 1213-1216.

Dion, E., Zélé, F., Simon, J.-C., Outreman, Y., 2011. Rapid evolution of parasitoids when faced with the symbiont-mediated resistance of their hosts. Journal of Evolutionary Biology 24, 741-750.

Dupas, S., Dubuffet, A., Carton, Y., Poirié, M., 2009. Local, Geographic and Phylogenetic Scales of Coevolution in Drosophila-Parasitoid Interactions. Advances in Parasitology, Vol 70, pp. 281-295.

Ebert, D., 2008. Host-parasite coevolution: Insights from the *Daphnia*-parasite model system. Current Opinion in Microbiology 11**,** 290-301.

Elena, S.F., Lenski, R.E., 2003. Evolution experiments with microorganisms: The dynamics and genetic bases of adaptation. Nature Reviews Genetics 4**,** 457-469.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics 1**,** 47-50.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data. Genetics 131**,** 479-491.

Falabella, P., Perugino, G., Caccialupi, P., Riviello, L., Varricchio, P., Tranfaglia, A., Rossi, M., Malva, C., Graziani, F., Moracci, M., Pennacchio, F., 2005. A novel fatty acid binding protein produced by teratocytes of the aphid parasitoid Aphidius ervi. Insect Molecular Biology 14**,** 195-205.

Falabella, P., Riviello, L., De Stradis, M.L., Stigliano, C., Varricchio, P., Grimaldi, A., de Eguileor, M., Graziani, F., Gigliotti, S., Pennacchio, F., 2009. Aphidius ervi teratocytes release an extracellular enolase. Insect Biochemistry and Molecular Biology 39**,** 801-813.

Ferrari, J., Darby, A.C., Daniell, T.J., Godfray, H.C.J., Douglas, A.E., 2004. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. Ecological Entomology 29**,** 60-65.

Forde, S.E., Thompson, J.N., Holt, R.D., Bohannan, B.J.M., 2008. Coevolution drives temporal changes in fitness and diversity across environments in a bacteria-bacteriophage interaction. Evolution 62**,** 1830-1839.

Fox, C.W., Wolf, J.B., 2006. Evolutionary genetics - Concepts and case studies. Oxford University Press, Inc., Oxford.

Frantz, A., Calcagno, V., Mieuzet, L., Plantegenest, M., Simon, J.C., 2009. Complex trait differentiation between host-populations of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris): implications for the evolution of ecological specialisation. Biological Journal of the Linnean Society 97**,** 718-727.

Fuller, R.C., Baer, C.F., Travis, J., 2005. How and when selection experiments might actually be useful. Integrative and Comparative Biology 45**,** 391-404.

Gaba, S., Ebert, D., 2009. Time-shift experiments as a tool to study antagonistic coevolution. Trends in Ecology & Evolution 24**,** 226-232.

Gandon, S., Buckling, A., Decaestecker, E., Day, T., 2008. Host-parasite coevolution and patterns of adaptation across time and space. Journal of Evolutionary Biology 21**,** 1861-1866.

Gerardo, N.M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S.M., De Vos, M., Duncan, E.J., Evans, J.D., Gabaldon, T., Ghanim, M., Heddi, A., Kaloshian, I., Latorre, A., Moya, A., Nakabachi, A., Parker, B.J., Perez-Brocal, V., Pignatelli, M., Rahbe, Y., Ramsey, J.S., Spragg, C.J., Tamames, J., Tamarit, D., Tamborindeguy, C., Vincent-Monegat, C., Vilcinskas, A., 2010. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*. Genome Biology 11.

Godfray, H.C.J., 1994. Parasitoids. Behavioural and evolutionary ecology. Princeton University Press, Princeton.

Goudet, J., 2005. FSTAT (ver. 2.9.4), a program to estimate and test population genetics parameters. Available from http:/www2.unil.ch:popgen:softwares:fstat.htm

Henry, L.M., Roitberg, B.D., Gillespie, D.R., 2008. Host-range evolution in *Aphidius* parasitoids: Fidelity, virulence and fitness trade-offs on an ancestral host. Evolution 62**,** 689-699.

Hufbauer, R.A., 2002. Aphid population dynamics: does resistance to parasitism influence population size? Ecological Entomology 27**,** 25-32.

Hufbauer, R.A., Bogdanowicz, S.M., Harrison, R.G., 2004. The population genetics of a biological control introduction: mitochondrial DNA and microsatellite variation in native and introduced populations of *Aphidus ervi*, a parisitoid wasp. Molecular Ecology 13**,** 337-348.

Jokela, J., Dybdahl, M.F., Lively, C.M., 2009. The Maintenance of Sex, Clonal Dynamics, and Host-Parasite Coevolution in a Mixed Population of Sexual and Asexual Snails. American Naturalist 174**,** S43-S53.

Kawecki, T.J., Ebert, D., 2004. Conceptual issues in local adaptation. Ecology Letters 7**,** 1225-1241.

Kraaijeveld, A.R., Hutcheson, K.A., Limentani, E.C., Godfray, H.C.J., 2001. Costs of counterdefenses to host resistance in a parasitoid of *Drosophila*. Evolution 55**,** 1815-1821.

Laine, A.L., 2009. Role of coevolution in generating biological diversity: spatially divergent selection trajectories. Journal of Experimental Botany 60**,** 2957-2970.

Le Ralec, A., Anselme, C., Outreman, Y., Poirie, M., van Baaren, J., Le Lann, C., van Alphen, J.J.M., 2010. Evolutionary ecology of the interactions between aphids and their parasitoids. Comptes Rendus Biologies 333**,** 554-565.

Lohse, K., Gutierrez, A., Kaltz, O., 2006. Experimental evolution of resistance in *Paramecium caudatum* against the bacterial parasite *Holospora undulata*. Evolution 60**,** 1177-1186.

Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extraction DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research 16**,** 1215-1215.

Milne, W.M., 1999. Evaluation of the establishment of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera : Braconidae) in lucerne aphid populations in New South Wales. Australian Journal of Entomology 38**,** 145-147.

Nei, M., Maruyama, T., Chakraborty, R., 1975. Bottleneck effect and genetic variability in populations. Evolution 29**,** 1-10.

Oliver, K.M., Degnan, P.H., Burke, G.R., Moran, N.A., 2010. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. Annual Review of Entomology 55**,** 247-266.

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 of the United States of America 102**,** 12795-12800.

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 of the United States of America 100**,** 1803-1807.

Peccoud, J., Ollivier, A., Plantegenest, M., Simon, J.C., 2009. A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106**,** 7495-7500.

Phillips, C.B., Baird, D.B., Iline, II, McNeill, M.R., Proffitt, J.R., Goldson, S.L., Kean, J.M., 2008. East meets west: adaptive evolution of an insect introduced for biological control. Journal of Applied Ecology 45**,** 948-956.

Reed, D.H., Lowe, E.H., Briscoe, D.A., Frankham, R., 2003. Fitness and adaptation in a novel environment: Effect of inbreeding, prior environment, and lineage. Evolution 57**,** 1822-1828.

Schulte, R.D., Makus, C., Hasert, B., Michiels, N.K., Schulenburg, H., 2010. Multiple reciprocal adaptations and rapid genetic change upon experimental coevolution of an animal host and its microbial parasite. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107**,** 7359-7364.

Starý, P., 1993. The fate of released parasioids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) for biological control of aphids in Chile. Bulletin of Entomological Research 83**,** 633-639.

Thompson, J. N. 1994. The coevolutionary process. Univ. of Chicago Press, Chicago.

van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4**,** 535-538.

Vijendravarma, R.K., Kraaijeveld, A.R., Godfray, H.C.J., 2009. Experimental evolution shows *Drosophila melanogaster* resistance to a microsporidian pathogen has fitness costs. Evolution 63**,** 104-114.

Woolhouse, M.E.J., Webster, J.P., Domingo, E., Charlesworth, B., Levin, B.R., 2002. Biological and biomedical implications of the co-evolution of pathogens and their hosts. Nature Genetics 32**,** 569-577.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Genetic variability presented for the initial parasitoid population (G0) and the generations G1. G2. G5. G7 and G10 from (A) 'Non-Exposed' line selected and (B) the 'Exposed line'. For each population are given: N. number of individuals; AR. the allelic richness; H_O and H_E the observed and expected heterozygosity and the result of Hardy Weinberg exact test.

(A) 'Non-Exposed' line	***G0***	***G1***	***G2***	***G5***	***G7***	***G10***
N	14	16	16	18	23	25
AR	4.37	3.09	4.66	4.69	4.16	3.98
Ho	0.6	0.67	0.67	0.58	0.56	0.56
He	0.67	0.68	0.67	0.67	0.65	0.61
F_{IS}	0.107	0.039	-0.004	0.142	0.138	0.086
HWE (*P* value)	0.03	0.2379	0.52	0.012	0.001	0.0195

(B) 'Exposed' line	***G0***	***G1***	***G2***	***G5***	***G7***	***G10***
N	15	19	21	14	15	23
AR	3.32	3.52	3.95	3.32	3.12	3.72
Ho	0.54	0.52	0.5	0.52	0.5	0.45
He	0.65	0.62	0.59	0.52	60,00	0.52
F_{IS}	0.160	0.155	0.146	0.003	0.163	0.146
HWE (*P* value)	0.0109	0.0028	0.0013	0.4566	0.005	0.021

Table 2. Pairwise F_{ST} values among the 12 populations arranged by selection treatments and generations (from G0 to G10). * means significant differentiation given by randomization test after strict Bonferroni corrections (Goudet. 2005) for $P<0.05$; 'E line': 'Exposed' parasitoids line; 'NE line': 'Non-Exposed' parasitoids line.

	G0 NE line	**G1 E line**	**G2 E line**	**G5 E line**	**G7 E line**	**G10 E line**
G0 E line	0.0059	0.0109	0.0249	0.0492	0.0211	**0.0967***
G1 NE line	-0.0142	-0.0007	0.0315	0.1025	0.0478	0.017
G2 NE line	0.0148	0.0358	0.0643	0.0526	0.0391	0.0484
G5 NE line	0.0127	0.0369	0.0697	**0.0681***	**0.0533***	**0.0714***
G7 NE line	0.0141	0.027	**0.0458***	**0.0625***	0.0617	**0.0832***
G10 NE line	**0.0323***	0.0467	**0.0461***	**0.0755***	0.0681	**0.0945***

Table 3. AMOVA analysis partitioning the genetic variance among selection treatments and the generation number. For each level. are represented: d.f.. the number of degrees of freedom; the sum of squares; the variance components explained by the given level; the proportion of variance in percentage explained by the given level and the associated *P* value.

Source of variation	**d.f.**	**Sum of squares**	**Variance components**	**Percentage variation**	**P value**
Among treatments	1	23.492	0.07909	2.20465	0.022
Among generations within treatments	5	74.143	0.12543	3.49627	0.036
within generations	219	1309.886	3.38296	94.29908	0.057

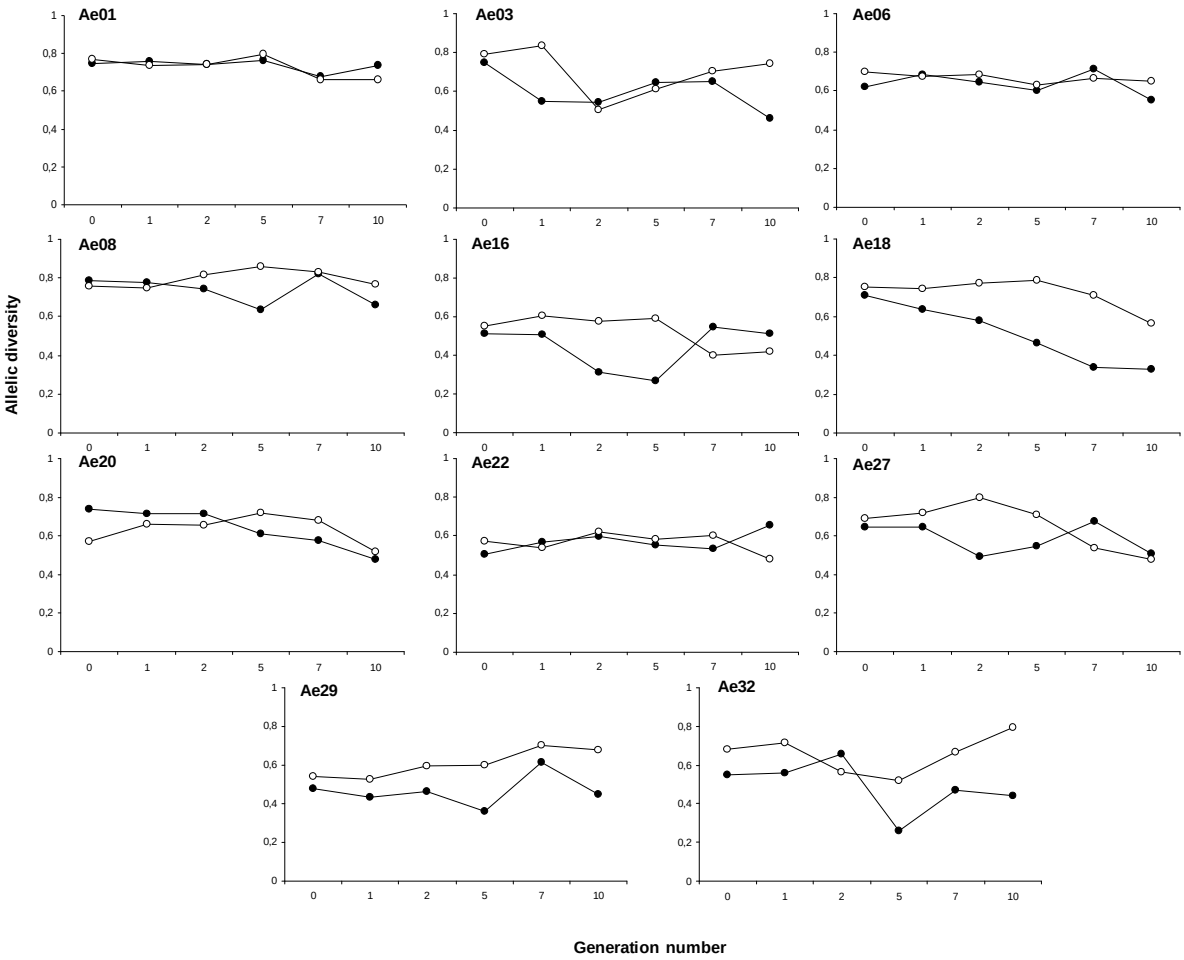

Figure 1. Generational trajectories of the allelic diversity for each analyzed locus, for the 'Non-Exposed' line (open dots) and the 'Exposed' line (black dots).

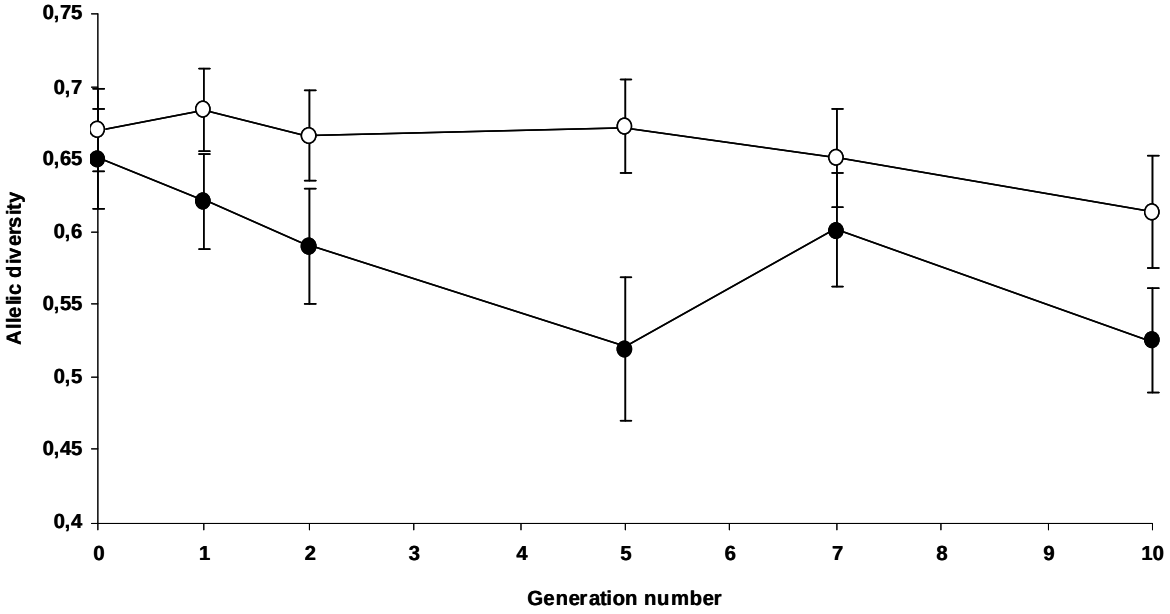

Figure 2. Generational trajectories of the mean allelic diversity for the 'Non-Exposed' line (open dots) and the 'Exposed' line (black dots). Vertical bars represent standard errors.

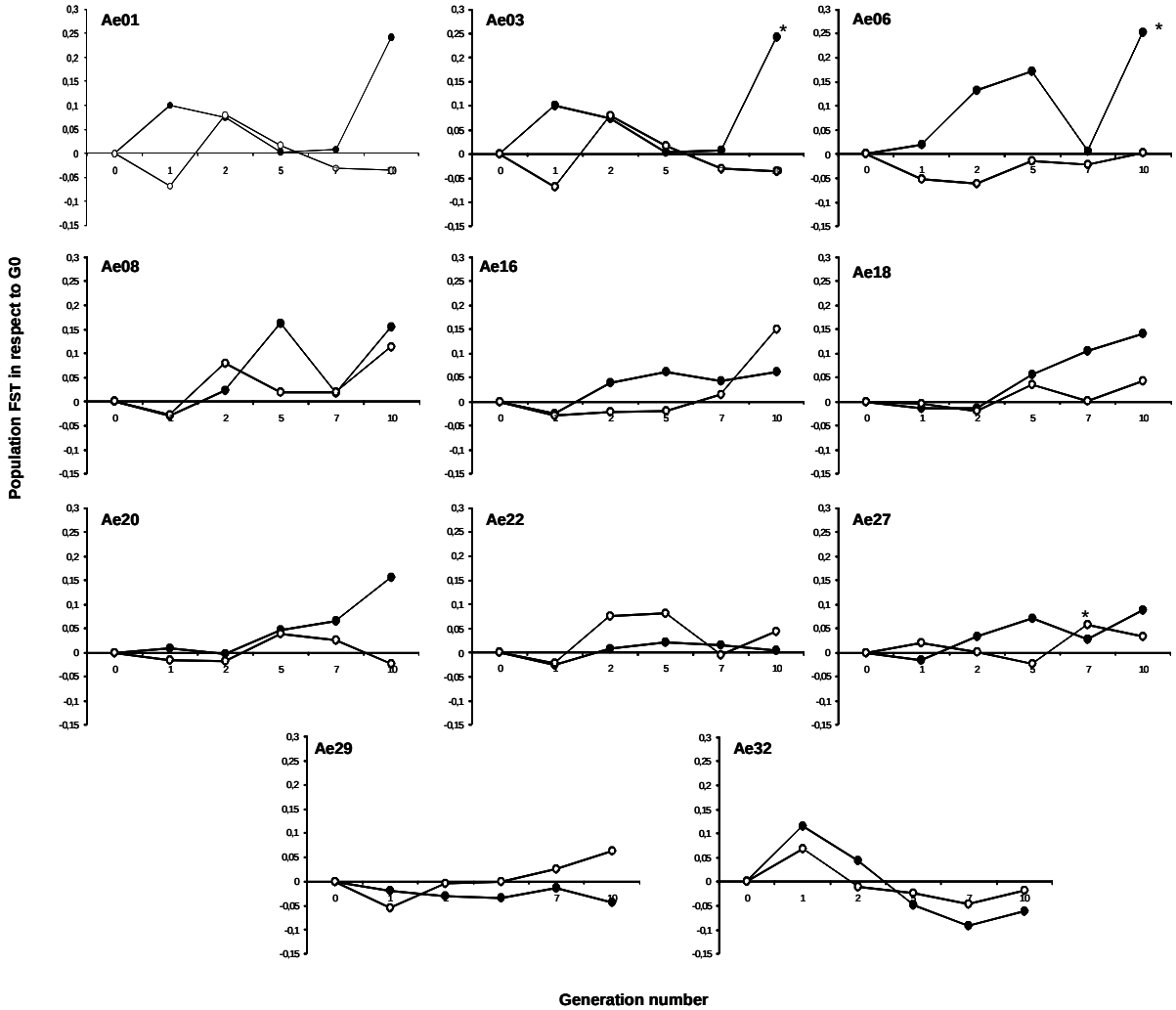

Figure 3. Generational trajectories of the population differentiation given by pairwise F_{ST}. between the initial population and the 'Non-Exposed' line (open dots) or the 'Exposed' line (black dots), for each locus. * means significant differentiation between the given population and the initial one (G0) given by randomization test for $P<0.05$.

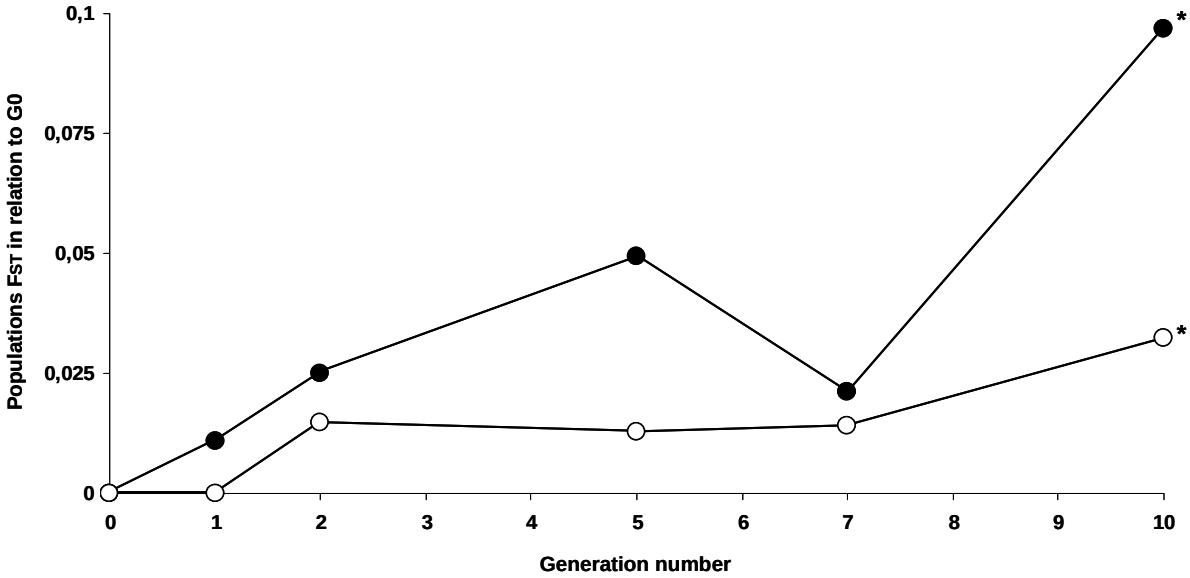

Figure 4. Generational trajectories of the population differentiations given by pairwise F_{ST} between the initial parasitoids population (G0) and the 'Exposed' (black dots) or 'Non-Exposed' (open dots) parasitoids line. * means significant differentiation between the noted population and G0. given by randomization test for P<0.05.

II. Influence des symbiotes sur les comportements des hôtes

1. Objectifs

Pour éviter le parasitisme, une espèce hôte peut présenter des moyens de défenses morphologiques, comportementaux, ou physiologiques (Hammill *et al.*, 2010). Ces moyens sont l'objet de nombreuses études mais la question de leurs interactions reste encore ouverte. Des individus peuvent utiliser simultanément les défenses comportementales et physiologiques bénéficiant ainsi d'une résistance efficace contre l'ennemi (*e.g.* Mikolajewski *et al*., 2010). Au contraire, d'autres individus n'expriment qu'un seul moyen de défense, et font ainsi l'économie du second (compensation de moyens défensifs) (*e.g.* DeWitt *et al*. 1999).

Les pucerons du pois possèdent plusieurs stratégies de défenses lorsqu'ils sont attaqués par des ennemis naturels (Le Ralec *et al*., 2010). *A. pisum* peut résister contre le parasitoïde adulte par des réactions comportementales, et contre le parasitoïde immature grâce à *H. defensa*. Les défenses comportementales permettent au puceron d'éviter la rencontre avec l'ennemi, ou d'éviter l'oviposition (Losey & Denno, 1998a ; Braendle & Visser, 2001). *H. defensa* semble constituer le principal moyen de défense des pucerons contre le parasitoïde immature et peut parfois apporter une protection quasiment complète contre le parasitisme (Oliver *et al.*, 2010). Cependant, les moyens de défense induisent des coûts. Les stratégies d'évitement du parasitoïde peuvent entraîner une réduction de la fécondité et de la survie du puceron (Losey & Denno, 1998b ; Nelson, 2007 ; Fievet *et al*., 2008). Les pucerons porteurs du symbiote peuvent également présenter une fécondité et une longévité moindres (J-C. Simon, communication personnelle). Les individus abritant *H. defensa* qui manifesteraient des comportements défensifs 'subiraient' les coûts associés aux deux moyens de défenses, réduisant considérablement leur valeur sélective. Une interaction négative entre les défenses comportementales et la résistance conférée par le symbiote peut alors être envisagée : pourquoi éviter le parasitoïde lorsqu'on est résistant ?

Nous avons donc analysé l'influence du symbiote sur les comportements de défense des pucerons du pois. Nous avons évalué les comportements de défense des pucerons porteurs et non porteurs de *H. defensa.*

2. Approche et méthode générale

Deux expériences ont été menées. Dans la première expérimentation, les pucerons testés étaient issus soit de clones porteurs d'*H. defensa* soit de clones non porteurs (3 clones porteurs et 3 clones non porteurs). Dans la seconde, nous avons considéré 4 clones ayant la particularité de présenter des individus abritant le symbiote facultatif et d'autres dépourvus de ce symbiote. Le principe de l'expérience consistait à introduire un parasitoïde dans une colonie composée de 10 *A. pisum*, porteurs ou non de la bactérie. Le comportement des deux protagonistes était relevé en continu jusqu'au départ du parasitoïde. Plus précisément, nous avons observé les comportements défensifs des pucerons et mesuré le taux de parasitisme efficace : il s'agit du nombre de descendants produits par le parasitoïde divisé par le nombre d'hôtes présents initialement dans la colonie (ici 10).

3. Résultats : Interaction négative entre les comportements défensifs et la résistance apportée par les symbiotes – Article 4.

Les résultats de cette expérimentation ont conduit à la production d'un article accepté pour publication dans la revue *Biology Letters :*

Symbiont infection affects aphid defensive behaviours.

Dion E., Polin S. E., Simon J.-C. & Outreman Y.

2011 *Biology Letters, In Press.*

Downloaded from rsbl.royalsocietypublishing.org on April 13, 2011

biology letters

Symbiont infection affects aphid defensive behaviours

Emilie Dion, Sarah Erika Polin, Jean-Christophe Simon and Yannick Outreman

Biol. Lett. published online 13 April 2011
doi: 10.1098/rsbl.2011.0249

References

This article cites 10 articles, 3 of which can be accessed free
http://rsbl.royalsocietypublishing.org/content/early/2011/04/06/rsbl.2011.0249.full.html#ref-list-1

P<P

Published online 13 April 2011 in advance of the print journal.

Subject collections

Articles on similar topics can be found in the following collections

behaviour (1942 articles)
ecology (2309 articles)
evolution (2606 articles)

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right-hand corner of the article or click **here**

Advance online articles have been peer reviewed and accepted for publication but have not yet appeared in the paper journal (edited, typeset versions may be posted when available prior to final publication). Advance online articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Advance online articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

To subscribe to *Biol. Lett.* go to: **http://rsbl.royalsocietypublishing.org/subscriptions**

This journal is © 2011 The Royal Society

Downloaded from rsbl.royalsocietypublishing.org on April 13, 2011

biology letters
Evolutionary biology

Biol. Lett.
doi:10.1098/rsbl.2011.0249
Published online

Symbiont infection affects aphid defensive behaviours

Emilie Dion, Sarah Erika Polin, Jean-Christophe Simon and Yannick Outreman*

[1]*UMR 1099 INRA-Agrocampus Ouest-Université Rennes 1 'Biologie des Organismes et des Populations appliquée à la Protection des Plantes', 65 rue de Saint-Brieuc CS 84215, 35042, Rennes Cedex, and BP 35327, 35653 Le Rheu Cedex, France*
**Author for correspondence* (*yannick.outreman@rennes.inra.fr*).

Aphids harbour both an obligate bacterial symbiont, *Buchnera aphidicola*, and a wide range of facultative ones. Facultative symbionts can modify morphological, developmental and physiological host traits that favour their spread within aphid populations. We experimentally investigated the idea that symbionts may also modify aphid behavioural traits to enhance their transmission. Aphids exhibit many behavioural defences against enemies. Despite their benefits, these behaviours have some associated costs leading to reduction in aphid reproduction. Some aphid individuals harbour a facultative symbiont *Hamiltonella defensa* that provides protection against parasitoids. By analysing aphid behaviours in the presence of parasitoids, we showed that aphids infected with *H. defensa* exhibited reduced aggressiveness and escape reactions compared with uninfected aphids. The aphid and the symbiont have both benefited from these behavioural changes: both partners reduced the fitness decrements associated with the behavioural defences. Such symbiont-induced changes of behavioural defences may have consequences for coevolutionary processes between host organisms and their enemies.

Keywords: *Acyrthosiphon pisum*; defensive behaviours; symbiont infection; *Hamiltonella defensa*; symbiont-mediated phenotype

1. INTRODUCTION

An extraordinary number of arthropods harbour various types of vertically transmitted symbionts. Among insects, symbionts of aphids are perhaps the best studied [1]. In addition to their essential nutrient-providing symbiont *Buchnera aphidicola*, many aphid species also carry one or a few facultative bacterial symbionts. These symbionts may exert diverse effects on their host, such as plant adaptation, heat tolerance or parasite resistance (reviewed in [1]). Most of these effects are beneficial for the host, thus favouring the spread and the persistence of symbionts within aphid populations. In various mutualistic associations, such evidence of symbiont effects concerns morphological, developmental and physiological host traits but rarely behavioural ones [2].

Recent studies on facultative symbionts concern *Hamiltonella defensa*, a γ-proteobacterium that provides parasitoid protection to the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* [3]. Pea aphids also present a large repertoire of defensive strategies, including morphological, social, chemical and behavioural defences [4]. Most prevalent, however, are defensive behaviours like aggressiveness towards the enemy, or escape reactions [5]. These behaviours are beneficial, because they reduce an aphid's risk of being attacked. However, this benefit is balanced by costs, such as loss of feeding opportunities or lower survival rates, leading to fitness decrements (e.g. [6,7]). This balance between costs and benefits associated with defensive behaviours induces variation for these traits in aphid populations [8].

Here, we investigated the possible influence of *H. defensa* on the propensity of aphids to defend themselves against enemies. Because aphids harbouring this symbiont are protected against parasitoids, we hypothesize that behavioural defence pay-offs should be reduced: defensive responses against parasitoids would induce useless fitness decrements in both partners. By contrast, defensive behaviours may be the unique way to avoid parasitism in aphids uninfected with *H. defensa*. Consequently, a reduction in defensive behaviours may be expected in aphids infected with *H. defensa*. To test this possible contribution of symbiosis to defensive behavioural variation in insect populations, we compared the aggressiveness and escape responses of aphids infected or not infected with *H. defensa*.

2. MATERIAL AND METHODS

(a) *Insects*

Pea aphids were collected in 2008 and 2010 around Rennes (Western France) in several alfalfa (*Medicago sativa*) fields since populations specialized on this plant harbour *Hamiltonella defensa* at a high rate [9]. The genotypes and the symbiotic status of the sampled aphids were determined (see [10] and [9] for details on genotyping and symbiont detection, respectively). From these analyses, we selected 10 aphid genotypes infected or not infected with *H. defensa* (table 1). Some genotypes were represented by lineages infected or not infected with *H. defensa* and were considered to have identical genetic backgrounds (i.e. 14 highly polymorphic markers were used for genotyping, a number sufficient to identify clonal copies from distinct genotypes), and just differing by their symbiotic status. The *Aphidius ervi* parasitoids originated from parasitized aphids collected in alfalfa fields around Rennes in 2008. Parasitoids were reared on a culture of *A. pisum* feeding on broad bean (*Vicia faba*). Insects were maintained at 20°C under a long-day regime (16 L : 8 D).

For the experiments, only second and third-instar larvae of *A. pisum* were used. To obtain parasitoid females, parasitized aphids were collected from cultures and placed individually in gelatin capsules. Newly emerged females were enclosed in plastic tubes containing moistened cotton, droplets of honey and one male for mating, and were used once for experiment the day after.

(b) *Experimental set-up*

The experiment aimed to measure the influence of the symbiotic status of aphids on their defensive behaviours. Two experimental series were implemented with exactly the same design. In the first series, we compared the defensive behaviours of three aphid genotypes harbouring *H. defensa* with three genotypes free of facultative symbionts. In the second series, we more precisely analysed the influence of *H. defensa* on defensive behaviours of aphids with identical genetic backgrounds, by considering four genotypes that each presented naturally-co-occurring lineages infected or not infected with *H. defensa* (table 1).

The procedure consisted of introducing one parasitoid female into a cage (20 × 25 × 30 cm) containing one broad bean leaf (10 cm height) infested with 10 genetically and symbiotically identical aphids. Observation began when the wasp landed on the leaf and started searching for aphids and ended when it left the leaf. The insect behaviours were recorded using the event-recorder 'The Observer' (Noldus Information Technology, Wageningen,

Received 4 March 2011
Accepted 25 March 2011

FirstCite e-publishing

This journal is © 2011 The Royal Society

Downloaded from rsbl.royalsocietypublishing.org on April 13, 2011

Table 1. Aphid genotypes information and replicates number.

experimental series	aphid genotypes	*H. defensa* infection status	number of replicates
series 1 distinct genetic background	G1	infected	11
	G2	infected	11
	G3	infected	11
	G4	uninfected	10
	G5	uninfected	11
	G6	uninfected	12
series 2 pairs of lineages with identical genetic background	G7	infected	11
		uninfected	10
	G8	infected	11
		uninfected	10
	G9	infected	10
		uninfected	10
	G10	infected	10
		uninfected	10

The Netherlands). When the parasitoid stopped its searching activity after both locating and contacting with an aphid, the event was regarded as an attack by parasitoid. The outcome of an attack was either the aphid acceptance for oviposition or its rejection. Piercing the aphid skin with the ovipositor was counted as an ovipositor insertion. Conversely, any attack by a parasitoid that did not lead to a stabbing behaviour was counted as a rejection. Here, rejections were owing to aphid aggressive behaviours (i.e. quick motions of legs and/or body repelling the wasp to undertake a stabbing behaviour) or the parasitoid's decision (without aphid aggressive behaviours). As parasitoid attack could elicit the dropping behaviour, the occurrence of this escape reaction was also recorded. Once the parasitoid left the leaf, all aphids were transferred onto a broad bean plant and followed over four weeks in order to measure the parasitism rate (i.e. proportion of aphids parasitized). This procedure was repeated 148 times (table 1).

(c) *Statistical analyses*

The dependent variables analysed were the total number of aphid dropping behaviours, the rate of host rejections owing to aphid aggressiveness, the total number of ovipositor insertions and the parasitism rate. The analyses consisted of testing the effect of the symbiotic status of aphids on each dependent variable. In both experiments, several genotypes were tested and genotype was considered as a random independent variable in our statistical modelling. Generalized linear mixed models (GLMMs) were fitted using the lme4 package [11] in R v. 2.8.1 [12] and by assuming either a Poisson or Binomial error according to the dependent variable and a log- and logit-link function, respectively.

3. RESULTS

(a) *Aphid defensive behaviours*

When faced with parasitoids, the behavioural responses of aphids strongly depended on their symbiotic status. In both experimental series, *A. pisum* individuals infected with *H. defensa* were less defensive than uninfected individuals. The *Hamiltonella*-free individuals dropped off the plant more frequently than the *Hamiltonella*-infected aphids when confronted with parasitoids (figure 1*a*). Once encountered by the enemy, the *Hamiltonella*-free aphids were more aggressive than the *Hamiltonella*-infected ones. Consequently, the rate of rejections owing to aphid aggressiveness was significantly higher in colonies of uninfected individuals (figure 1*b*). Aphids infected with *H. defensa* were more prone to parasitoids and, consequently, ovipositor insertions occurred more frequently in colonies of *H. defensa*-infected hosts (figure 1*c*).

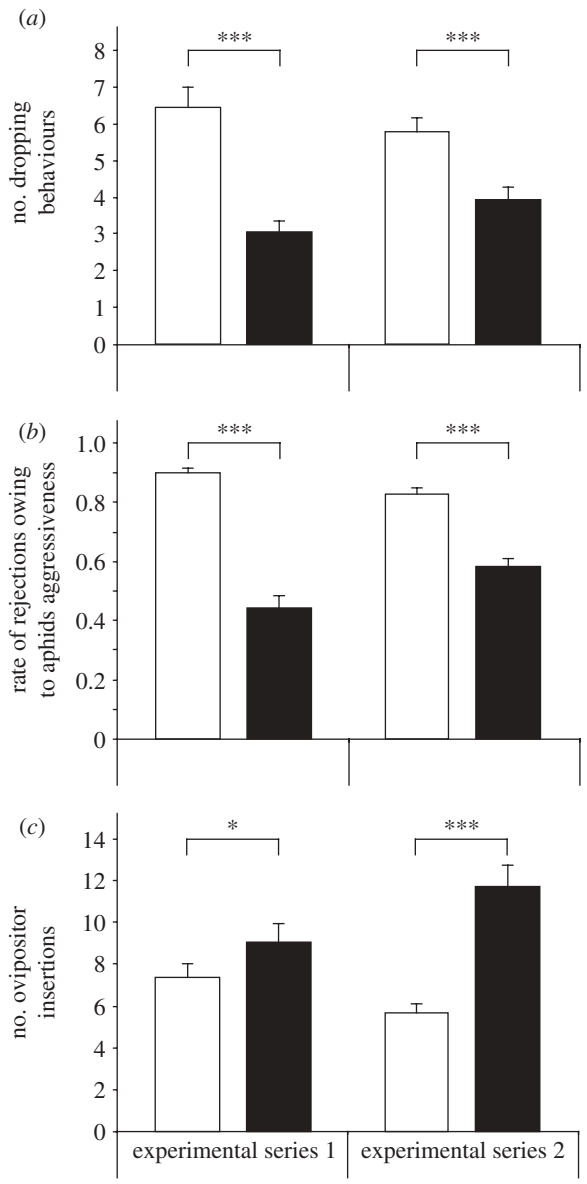

Figure 1. Effects of infection with *H. defensa* on (*a*) the number of *A. pisum* individuals that dropped off the plant during colony exploitation by an *A. ervi* female; (*b*) the rate of *A. ervi* host rejections owing to the aggressiveness of the attacked aphid; and (*c*) the number of *A. ervi* ovipositor insertions during colony exploitation. Black bars, aphids harbouring *H. defensa*; open bars, aphids free of facultative symbionts. See §2 for description of experimental series 1 (distinct genetic background) and experimental series 2 (identical genetic background). The mean and the standard errors are shown. Statistical significance was evaluated by the GLMM (***$p < 0.001$, **$p < 0.01$, *$p < 0.05$ and $^{n.s.}p > 0.05$).

(b) *Parasitism rate*

In the first experimental series, parasitism rates did not differ significantly between *H. defensa*-infected and uninfected aphids. This lack of significance was mainly owing to high parasitism variance among *H. defensa*-infected genotypes: while two *H. defensa*-infected genotypes were strongly resistant (about

Downloaded from rsbl.royalsocietypublishing.org on April 13, 2011

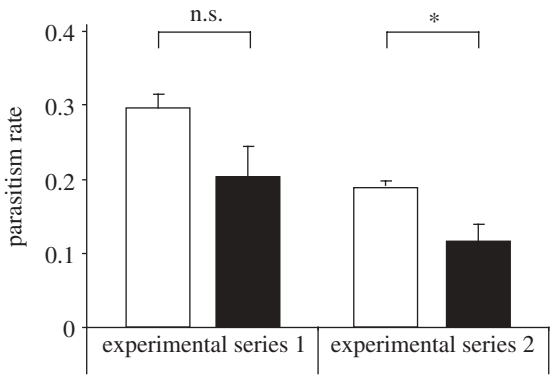

Figure 2. Effect of infection with *H. defensa* on the parasitism rate of *A. ervi* parasitoids after exploiting a colony of 10 aphids. Black bars, aphids harbouring *H. defensa*; open bars, aphids free of facultative symbionts. See §2 for description of experimental series 1 (distinct genetic background) and experimental series 2 (identical genetic background). The mean and the standard errors are shown. Statistical significance was evaluated by the GLMM (***$p < 0.001$, **$p < 0.01$, *$p < 0.05$ and $^{n.s.}p > 0.05$).

10% of parasitism rate), one genotype presented an intermediate level of symbiont-mediated resistance (about 40% of parasitism rate). In the second experimental series, the rate of parasitism was lowest in colonies of *H. defensa*-infected aphids (figure 2).

4. DISCUSSION

Our results indicate that *A. pisum* individuals infected with *H. defensa* dropped off the plant less frequently than uninfected individuals and exhibited a reduced aggressiveness towards the enemy. These results were observed irrespective of aphid genetic backgrounds, supporting the influence of *H. defensa* on aphid behavioural defences. Consequently, we experimentally demonstrated that the presence of defensive symbionts can produce high behavioural variation in their host populations.

We also showed that parasitoids do not benefit from the reduced defensive behaviours in *Hamiltonella*-infected aphids: even if the infected aphids are exposed to parasitoid oviposition more frequently, the symbiont-mediated resistance maintained low parasitism rates. The *H. defensa* infection enables aphids to save costs associated with the defensive behaviours while protecting the aphid against parasitoids. The factor responsible for this symbiont-mediated behavioural variation is obviously unknown. It may be parsimonious to assume that the reduction of defensive behaviours in infected aphids is an adaptive behavioural response of aphids rather than a consequence of behavioural manipulation by the bacterial symbiont. In this evolutionary scenario, uninfected individuals have been selected for efficient behavioural defences, while the selection has been attenuated in infected aphids. We must also consider that the aphid behavioural changes can be a pathological consequence of symbiont infection and are coincidentally beneficial for both partners. Whatever the underlying mechanism of this symbiont-mediated phenotype is, it minimizes the costs associated with defensive behaviours and so favours both host and symbiont.

At first sight, the vertically transmitted symbiont *H. defensa* increases host fitness by conferring resistance to parasitoids and reducing costly defensive behaviours. These beneficial effects on the host increase the spread and the persistence of the facultative symbiont within aphid populations. However, these benefits are strongly dependent on the ecological context. While *H. defensa* confers specific protection against parasitoids, behavioural defences protect aphids against a wider range of natural enemies [5]. The reduction of behavioural defences in infected aphids would then increase their susceptibility against predators and predation may lead to lower prevalence of symbionts in host populations. The interplay between predation and parasitism pressures would certainly have a considerable impact on the persistence of symbionts in natural populations.

5. CONCLUSION

Our experiments identified symbiosis as an important factor generating behavioural variation in host populations. As insect symbionts are extremely common, we suggest that symbiont-induced changes in insect behaviours may have played a key role in the evolution of ecological interactions in many species. Symbionts may promote evolution in insect enemies by changing host defensive strategies like conferring resistance and affecting defensive behaviour expressions.

We thank M. Plantegenest for stimulating discussions, Lucie Mieuzet and Frédérique Mahéo for genotyping and symbiont detection and Benjamin Agogue for language corrections. This work was supported by INRA SPE Department and French 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche'.

1 Oliver, K. M., Degnan, P. H., Burke, G. R. & Moran, N. A. 2010 Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 247–266. (doi:10.1146/annurev-ento-112408-085305)
2 Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Shimada, M. & Fukatsu, T. 2008 Symbiont acquisition alters behaviour of stinkbug nymphs. *Biol. Lett.* **4**, 45–48. (doi:10.1098/rsbl.2007.0510)
3 Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A. & Hunter, M. S. 2003 Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 1803–1807. (doi:10.1073/pnas.0335320100)
4 Francke, D. L., Harmon, J. P., Harvey, C. T. & Ives, A. R. 2008 Pea aphid dropping behavior diminishes foraging efficiency of a predatory ladybeetle. *Entomol. Exp. Appl.* **127**, 118–124. (doi:10.1111/j.1570-7458.2008.00678.x)
5 Gross, P. 1993 Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* **38**, 251–273. (doi:10.1146/annurev.en.38.010193.001343)
6 Nelson, E. H. 2007 Predator avoidance behavior in the pea aphid: costs, frequency, and population consequences. *Oecologia* **151**, 22–32. (doi:10.1007/s00442-006-0573-2)
7 Fievet, V., Lhomme, P. & Outreman, Y. 2008 Predation risk cues associated with killed conspecifics affect the

Downloaded from rsbl.royalsocietypublishing.org on April 13, 2011

behavior and reproduction of prey animals. *Oikos* **117**, 1380–1385. (doi:10.1111/j.2008.0030-1299.16629.x)

8 Losey, J. E. & Denno, R. F. 1998 The escape response of pea aphids to foliar-foraging predators: factors affecting dropping behaviour. *Ecol. Entomol.* **23**, 53–61. (doi:10.1046/j.1365-2311.1998.00102.x)

9 Frantz, A., Calcagno, V., Mieuzet, L., Plantegenest, M. & Simon, J. C. 2009 Complex trait differentiation between host-populations of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris): implications for the evolution of ecological specialisation. *Biol. J. Linn. Soc.* **97**, 718–727. (doi:10.1111/j.1095-8312.2009.01221.x)

10 Peccoud, J., Ollivier, A., Plantegenest, M. & Simon, J. C. 2009 A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **106**, 7495–7500. (doi:10.1073/pnas.0811117106)

11 Bates, D., Maechler, M. & Bolcker, B. 2009 Package lme4: linear mixed-effects models using S4 classes. See http://lme4.r-forge.r-project.org/.

12 R Development Core Team 2008 *R: a language and enviroment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. See http://www.R-project.org.

Chapitre 5

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ces travaux de thèse nous ont permis d'identifier l'effet de l'écologie du puceron du pois, à travers ses relations avec d'autres organismes, sur l'évolution et l'écologie des populations de son principal parasitoïde. Deux relations du réseau d'interactions d'*A. pisum* ont été étudiées : la relation entre ce puceron et sa plante hôte, et l'interaction qu'il entretient, facultativement, avec une bactérie symbiotique. Ainsi, nos objectifs étaient de :

- Mesurer l'influence de la spécialisation alimentaire chez A*. pisum* sur les propriétés génétiques des populations de son parasitoïde *A. ervi*, afin d'identifier un éventuel effet cascade, c'est-à-dire une spécialisation parasitaire chez le parasitoïde générée par la spécialisation alimentaire chez son hôte,
- Analyser l'évolution de la virulence des parasitoïdes et des propriétés génétiques de leurs populations lorsqu'ils sont soumis, durant plusieurs générations, à des hôtes porteurs ou non d'un symbiote conférant une résistance,
- Déterminer l'influence de ce symbiote protecteur sur les comportements de leurs porteurs et les conséquences sur le succès parasitaire des parasitoïdes.

Les approches pluridisciplinaires utilisées au cours de la thèse ont généré des résultats permettant une meilleure compréhension du fonctionnement et de l'évolution des populations d'*A. ervi* et une identification plus précise de ses capacités à limiter les populations de pucerons, ravageurs de cultures. Les conclusions pouvant être tirées de ce travail contribuent à la fois à la connaissance fondamentale et appliquée.

I. Des femelles *Aphidius ervi* homozygotes

1. Induction d'une diploïdisation par *Wolbachia pipentis*?

Nos résultats révèlent un nombre important de femelles homozygotes sur l'ensemble des loci étudiés. Ces parasitoïdes homozygotes étaient présents dans toutes les populations échantillonnées sur les différentes races d'hôtes du puceron, aussi bien dans l'Est que dans l'Ouest de la France.

Les mâles d'*Aphidius ervi* sont haploïdes, donc homozygotes. Il semble peu probable que certains mâles aient été génotypés accidentellement car les mâles et les femelles se distinguent aisément les uns des autres (chapitre 2 II. 3.). Nous avons ainsi émis l'hypothèse que des femelles homozygotes auraient été produites à partir d'une diploïdisation d'œufs non fécondés. C'est un processus généralement induit par des symbiotes manipulant la reproduction de leurs hôtes en faveur des femelles, favorisant ainsi leur transmission et leur maintien dans les populations (Chapitre 1. III. 2.). Ces microorganismes infectent de nombreux arthropodes, et particulièrement des espèces de parasitoïdes (Stouthamer *et al.*, 1999; Hilgenboecker *et al*., 2008; Giorgini *et al*., 2009 ; 2010). *Wolbachia pipientis* a été détectée chez *A. ervi* (Medina *et al.*, 2011). Cependant, aucun des 4 gènes de *Wolbachia* n'a été amplifié chez les femelles homozygotes de nos échantillons.

2. Origine des femelles homozygotes

Wolbachia pipentis n'ayant pas été détectée, il serait intéressant de tester la présence d'autres symbiotes pouvant également induire une diploïdisation des œufs non fécondés. C'est le cas de *Cardinium sp*. (Giorgini *et al*., 2009) ou de *Rickettsia sp.* présents chez *Encarsia hispida* et *Pnigalio soemius* respectivement. La restauration de la diploïdie sans intervention bactérienne peut également se produire par différents mécanismes cytologiques tels que la duplication des gamètes ou la fusion de cellules (Haccou & Schneider, 2004). Beukeboom *et al*. (2007) ont également détecté des souches de *Nasonia vitripennis* présentant des individus au phénotype femelle à partir d'œufs non fécondés.

Quels que soient les mécanismes impliqués, leur présence dans les populations favorise les déficits d'hétérozygotie et donc une réduction de la variabilité génétique. Notons enfin que cet excès de femelles homozygotes a été détecté dans toutes les études de

génétique des populations d'*A. ervi*, indépendamment des marqueurs microsatellites utilisés (Article 1 ; Article 3 ; Hufbauer *et al*., 2004 ; Bilodeau E., communication personnelle).

II. *Aphidius ervi*, un parasitoïde généraliste disperseur

1. Absence d'une spécialisation parasitaire

Bien que les populations de pucerons du pois montrent une forte différenciation génétique et phénotypique selon leur plante hôte (Frantz *et al*., 2009 ; Peccoud *et al.*, 2009a), cette spécialisation écologique n'affecte pas le fonctionnement et l'évolution des populations de son principal parasitoïde. Les femelles d'*A. ervi* issues des races luzerne et trèfle ne sont pas génétiquement différentes. Une spécialisation parasitaire en cascade est donc exclue pour cette espèce. Cette absence de 'HAD' est confirmée par des F_{ST} très faibles entre les populations, et également par des pourcentages de variances génétiques très faiblement expliqués (et non significatifs) par le facteur 'plante hôte' (Article 1).

Un défaut d'observations ou les caractéristiques du système étudié peuvent expliquer cette absence de structuration.

A. pisum, un complexe de 11 races d'hôtes

A. pisum forme un complexe de 11 populations sympatriques très différenciées, comptant 8 races d'hôtes et 3 espèces probables. Cela signifie que nous avons suivi une partie seulement des populations de parasitoïdes de pucerons spécialisés. Les biotypes 'gesse des prés' (*Lathyrus pratensis*), 'bugrane épineuse' (*Ononis spinosa*) et 'genêt à balai' (*Cytisus scoparius*) sont les plus différenciés et sont considérés comme à quasi-complète spéciation (Peccoud *et al*., 2009a). Lors de nos échantillonnages, il paraissait très difficile de constituer des échantillons de taille 'raisonnable' de parasitoïdes issus de pucerons exploitant la bugrane épineuse ou la gesse des prés. Par ailleurs, parmi l'ensemble des momies prélevées sur le genêt à balai, seuls 4 individus parasitoïdes ont émergé. Sur ces trois races d'hôtes, l'effet cascade pourraient être plus probable, engendrant des divergences génétiques plus conséquentes dans les populations d'*A. ervi*.

La dispersion et le spectre d'hôte large d'*A. ervi* limitent sa spécialisation

L'absence de structuration géographique, liée à l'absence de spécialisation parasitaire, serait due aux caractéristiques biologiques et écologiques d'*A. ervi*. D'une part, une distance de plus de 800 km entre les populations de parasitoïdes ne suffit pas à les différencier génétiquement. Ce résultat confirme que cette espèce possède un fort potentiel de dispersion, caractéristique déjà suggérée par plusieurs auteurs (Milne, 1999 ; Hufbauer, 2001). La mobilité de certaines espèces de parasitoïdes permet la colonisation rapide et efficace de nouveaux environnements (*e.g.* Langhof *et al*., 2005 ; Lee *et al.,* 2007) et facilite l'établissement d'auxiliaires utilisés dans le cadre de programmes de lutte biologique (*e.g.* Milne, 1999 ; Ayvaz *et al.,* 2008). Par exemple, *Aphidius ervi* a été introduit sur la côte Est de l'Australie dans les années 1980 pour contrôler le puceron du pois. Il s'est propagé sur plus de 300 Km en un an et est, à présent, présent sur tout le pays (Milne, 1999). Les flux de gènes importants entre populations de parasitoïdes peuvent donc contraindre leur adaptation locale aux hôtes, et empêcher une différenciation en cascade (*e.g.* Baer *et al.*, 2004).

D'autre part, l'émergence des races d'hôtes chez le puceron du pois est un phénomène évolutif relativement récent (Peccoud *et al*., 2009b). Malgré la forte spécialisation des pucerons pour leur plante hôte, des flux de gènes existent toujours entre les races (Peccoud *et al*., 2009a). *Aphidius ervi* exploite donc des populations hôtes structurées mais qui ne constituent pas encore, ou depuis peu, des espèces différenciées. *Aphidius ervi* est par ailleurs une espèce généraliste en Europe, et attaque une large variété de pucerons. Leur spectre d'hôtes est composé d'une vingtaine d'espèces aphidiennes présentes sur différentes familles de plantes sauvages ou cultivées (céréales, pommes de terre, légumineuses, astéracées et poacées sauvages) (Starý, 1974 ; Starý, 1988). Cette caractéristique facilite les flux de gènes de parasitoïdes entre les compartiments d'un paysage.

2. Perspectives : influence des autres espèces d'hôte d'*A. ervi* et évolution d'un parasitoïde spécialiste

Structure des populations de parasitoïde issus d'espèces d'hôtes différentes

Etant un parasitoïde généraliste, *A. ervi* pourrait exploiter différemment d'autres espèces de pucerons présentes sur d'autres plantes hôtes. Si nous avons détecté l'absence

de structuration génétique de ce parasitoïde selon les biotypes *d'A. pisum*, les propriétés génétiques sur les autres espèces de son spectre d'hôtes restent encore inconnues. *Aphidius ervi* montre des préférences pour son hôte d'origine (Pennachio *et al*., 1994), et des études récentes illustrent ses capacités à augmenter ses performances sur une espèce alternative de puceron (espèce différente dont un individu émerge) (Henry *et al*., 2008 ; 2010). Dans les systèmes où les génotypes ont des performances différentes sur des hôtes variables, alors la sélection devrait promouvoir leur ségrégation génétique (Fry, 1996 ; Kaweki, 1998 ; Kaweki & Ebert, 2004). Il semble donc intéressant de comparer les caractéristiques génétiques des populations d'*A. ervi* issues de pucerons des fabacées et de pucerons des céréales.

Evolution d'une espèce spécialiste

Aphidius ervi est généraliste en Europe, ce qui implique un spectre de pucerons hôtes très large. A l'inverse, les *A. ervi* japonais sont spécialisés sur le puceron du pois, manifestant de faibles performances sur d'autres espèces aphidiennes qui sont habituellement parasitées en Europe. Des expériences de croisement entre des populations européennes et japonaises montrent un isolement reproducteur partiel entre les deux souches (Takada & Tada, 2000). La réduction des flux de gènes entre les populations est l'indice d'une sélection divergente et constitue une des premières étapes vers la spécialisation (Schluter, 2001 ; Laine, 2009). Il semble ainsi pertinent d'étudier les caractéristiques génétiques et phénotypiques de ces parasitoïdes japonais et les comparer aux populations européennes. Nous pourrions répondre à des interrogations telles que : quelles sont leurs performances sur les différentes espèces de pucerons ? Quelles performances et préférences possèdent les hybrides ? A quel point les populations japonaises sont-elles génétiquement différenciées des européennes ? Sont-elles capables d'évoluer et de s'adapter à un hôte alternatif ?

En outre, une espèce proche d'*Aphidius ervi*, *Aphidius eadyi* (Hyménoptère, Braconidae) est également d'un intérêt tout particulier car c'est un parasitoïde présent en France possédant un spectre d'hôtes se limitant à deux espèces : *A. pisum* et *Acyrthosiphon caraganae*. Jusqu'à présent, *A. caraganae* n'a jamais été observé dans le bassin rennais (données piège à succion de l'INRA du Rheu). L'étude de ce parasitoïde se justifie particulièrement par sa réponse potentielle en tant que spécialiste aux pressions de sélection imposées par les traits écologiques du puceron du pois. Un parasitoïde spécialiste est plus exposé à la sélection pour une meilleure performance sur son seul hôte. Cela lui

permet d'évoluer plus vite qu'un généraliste qui peut exploiter des hôtes au niveau de résistance différents. La spécialisation parasitaire pourrait alors être favorisée (Kaweki, 1998). De ces conclusions découlent ainsi plusieurs interrogations : existe-t-il une différenciation en cascade, donc une spécialisation, des populations d'*A. eadyi* parasitant une espèce hôte très structurée ? Ces questions sont fondamentales pour identifier les transferts de parasitoïdes dans le paysage et l'évolution de leurs populations selon la dynamique des paysages et les conditions environnementales variables.

Prospecter les cultures céréalières pour échantillonner des *A. ervi* de pucerons des céréales et analyser la structure génétique des populations d'*Aphidius eadyi* étaient des projets initialement prévus dans la thèse. Malheureusement, les faibles prévalences de ces deux parasitoïdes dans les conditions voulues nous ont conduits à concentrer ce travail sur *Aphidius ervi* échantillonnés sur des légumineuses.

III. Les symbiotes, un moteur de diversification

1. *H. defensa*, moteur de diversification chez les pucerons

Des comportements défensifs moindres favorisant le symbiote et son porteur

Pour éviter le parasitisme, *A. pisum* présente des moyens de défenses comportementaux et physiologiques (immunité innée et présence d'un symbiote secondaire). Nous avons mis en évidence une interaction négative entre ces comportements de défense et la résistance apportée par les symbiotes : les pucerons porteurs de *H. defensa* se défendent moins. Les hypothèses pouvant expliquer cette interaction négative sont les suivantes :

i. Contre sélection des pucerons défensifs

Les moyens de défense des pucerons contre les parasitoïdes sont coûteux. Un hôte porteur d'*H. defensa* manifestant des comportements défensifs accumulerait ainsi leurs coûts associés et présenterait une faible valeur sélective. Les génotypes aphidiens cumulant les moyens de défense subiraient donc de fortes pressions de sélection à la défaveur de cette multiplicité de défenses.

ii. Un phénotype étendu des pucerons

Les modifications phénotypiques observées chez les pucerons infectés par la bactérie *H. defensa* pourrait être considérées comme une illustration du concept de phénotype étendu (Dawkins, 1982) : les changements phénotypiques correspondent à l'expression des gènes de la bactérie à travers le phénotype du puceron. Dans ce cas, les gènes de la bactérie seraient responsables de la diminution des réactions défensives de leur porteur, favorisant leur transmission : un puceron manifestant peu de comportements défensifs aura plus de descendants et la bactérie, à transmission verticale, sera alors plus représentée dans la génération suivante.

iii. Un effet pathologique

Les changements phénotypiques chez les pucerons infectés par *H. defensa* peuvent être le fruit de conséquences pathologiques de l'infection bactérienne. La présence de la bactérie pourrait handicaper son puceron porteur, affectant ses capacités motrices ou sa perception de stimuli. La modification comportementale de l'hôte parasité serait alors un simple sous-produit physiologique de l'infection bactérienne, engendrant des comportements 'aberrants', et par conséquent, non issus d'un processus de sélection en faveur de la bactérie (Minchella, 1985).

Quel que soit le mécanisme, évolutif ou physiologique, associé à cette interaction négative entre les deux moyens de défense, elle favorise la valeur sélective de la bactérie comme de son porteur, car elle permet une réduction des coûts associés aux comportements défensifs. Par conséquent, la fécondité du puceron est meilleure, ce qui assure la transmission et la persistance d'*H. defensa* dans la population aphidienne. Oliver *et al*. (2008) ont notamment déterminé que les fréquences d'*A. pisum* infectés par *H.* defensa augmentent de façon spectaculaire après une exposition répétée au parasitisme par *A. ervi*. A l'inverse, les fréquences de pucerons porteurs du symbiote déclinent en absence de l'ennemi naturel. Ces résultats suggèrent un coût probable pour les pucerons à porter le symbiote en absence de parasitisme, confirmant l'utilisation d'un seul des deux moyens de défense par les individus (compensation des moyens défensifs).

Les conséquences sur le parasitoïde

Cette interaction négative entre les deux moyens de défense conduit à une divergence phénotypique dans les populations aphidiennes. Une dispersion et une

répartition différentes des pucerons défensifs dans les habitats peuvent aussi être attendues : les pucerons défensifs auront tendance à être plus dispersés car ils présentent une plus forte tendance à la fuite. Si la résistance liée au symbiote et les défenses comportementales confèrent un niveau de protection similaire (taux de parasitisme équivalent pour les deux types d'hôtes), les conséquences sur l'évolution des populations de parasitoïdes sont en revanche différentes. En réponse aux différentes stratégies de défense des pucerons, des stratégies d'attaques variables peuvent être sélectionnées chez les parasitoïdes. Plusieurs traits peuvent être concernés chez la femelle : la recherche et la détection des hôtes (des pucerons plus dispersés entrainent des concentrations moindres de composés volatiles attirant le parasitoïde ; Powell *et al*., 1998), l'inspection des hôtes avant la piqûre (évaluation des conditions physiologiques et du statut parasitaire des hôtes), ou l'oviposition elle-même.

Quel est le rôle des prédateurs ?

A première vue, la résistance conférée par *Hamiltonella defensa* favorise la valeur adaptative du puceron porteur car elle permet une réduction des coûts associés aux comportements défensifs. Cependant, ces bénéfices dépendent fortement du contexte écologique. Alors que *H. defensa* apporte spécifiquement une protection contre le parasitoïde (Oliver *et al*., 2003), les comportements défensifs protègent les pucerons contre un large éventail d'ennemis naturels (Gross, 1993). Ainsi, la réduction des défenses comportementales chez les *A. pisum* abritant le symbiote pourrait réduire leur potentiel défensif vis-à-vis des prédateurs. Une forte prédation entrainerait une diminution de la prévalence des symbiotes protecteurs dans les populations hôtes. Etudier le comportement des pucerons en présence de prédateurs permettrait d'évaluer l'effet de la modification comportementale liée au symbiote sur la survie des pucerons. Notre hypothèse suppose que la fréquence de la résistance conférée par *H. defensa* dans un habitat particulier serait dépendante de la composition du cortège des ennemis naturels.

2. *H. defensa*, moteur de diversification chez les parasitoïdes

Le potentiel d'adaptation de parasitoïdes à des hôtes résistants

Les populations de parasitoïdes peuvent répondre rapidement à la résistance de leurs hôtes par un accroissement de leurs aptitudes à les exploiter (Article 2). Ce gain de performance peut être associé à la sélection de femelles ayant une composition de venin

particulière ou certains attributs distincts de l'œuf injecté dans l'hôte. Les populations de parasitoïdes possèdent des variabilités génétiques leur permettant d'évoluer et de se structurer, en conditions contrôlées, selon la résistance des hôtes (Article 3) Cette expérimentation met en évidence le potentiel adaptatif des populations de parasitoïdes exposées à de fortes pressions de sélection. Quels que soient les mécanismes sous-jacents, cette réponse des parasitoïdes démontre le rôle considérable des organismes symbiotiques dans l'évolution des interactions antagonistes.

Des pressions de sélection diffuses dans le milieu naturel

L'évolution expérimentale est un outil particulièrement efficace pour évaluer l'adaptation de populations et détecter les compromis évolutifs associés à un trait soumis à sélection (Fry, 2003 ; Gaba & Ebert, 2009). Ce type d'expérimentation permet le contrôle de la force de la sélection, des populations impliquées (nombre de réplicats, taille…), et des facteurs environnementaux (températures…) (Conner, 2003 ; Fuller *et al.*, 2005). Nous avons suivi l'évolution du face à face entre les deux antagonistes seulement, avec des pressions de sélection contrôlées (niveaux de résistance), fortes, et imposées aux populations de parasitoïdes durant un temps précis. La force de sélection est telle que le gain de performance des femelles soumises aux clones résistants est rapide (Article 2), et génère une ségrégation génétique détectée avec des marqueurs neutres (Articles 3). Cependant, l'environnement expérimental utilisé est éloigné des conditions naturelles. Dans la nature, les populations interagissent avec de nombreux facteurs environnementaux, et les pressions de sélection y sont plus diffuses. L'évolution des antagonistes est donc le produit de toutes les interactions qui les touchent (Wolinska & King, 2009). *Hamiltonella defensa* est distribuée différemment dans le paysage selon les races d'hôtes pucerons (Frantz *et al.*, 2009). Les prévalences du symbiote diffèrent même selon l'origine géographique des pucerons (chapitre 3, Article 1). A cela s'ajoutent les différences de comportements défensifs selon les races: les hôtes du trèfle et de la luzerne expriment beaucoup plus de réponses comportementales à la perception de phéromone d'alarme que les biotypes pois (Kunert *et al*., 2010). Les *A. pisum* présentent donc une hétérogénéité spatiale dans leur potentiel défensif vis-à-vis d'*A. ervi*, hétérogénéité liée à la variabilité des prévalences d'*H. defensa* et à la variabilité des comportements défensifs exprimés. Théoriquement, la régionalisation des défenses des hôtes pourrait mener à l'adaptation de génotypes particuliers de parasitoïdes

et de stratégies de virulence différentes (Fry, 1996 ; Laine, 2009 ; Poirié *et al*., 2009, Clark *et al*., 2010). Si des divergences génétiques entre populations sélectionnées ont été observées (Article 3), ce n'est pas le cas pour les populations naturelles (Article 1). La multiplicité et l'hétérogénéité des pressions de sélection dans l'environnement naturel (dues aux prédateurs, aux hôtes, aux hyperparasitoïdes, au climat…) et l'importante mobilité des individus empêche vraisemblablement leur adaptation locale et la divergence selon les niveaux de résistance des hôtes.

La résistance dans le spectre d'hôtes d'*Aphidius ervi*

Dans ce document, nous avons présenté les capacités d'*A. ervi* à évoluer sous la pression d'une forte résistance des hôtes. Si le gain de performance des parasitoïdes est rapide dans des conditions de laboratoire, les divergences génétiques ne sont pas détectées sur des populations naturelles issues du puceron du pois. Il semble donc important d'évaluer les niveaux de résistance des populations hôtes aphidiennes en déterminant la prévalence des symbiotes protecteurs chez les autres espèces hôtes du parasitoïde. Vorburger *et al*. (2008) ont par exemple mis en évidence que l'infection du puceron *M. persicae* par *H. defensa* le protégeait contre *Aphidius colemani*. Il semble probable que le symbiote confère aussi une résistance à cette espèce contre *A. ervi*. Caractériser 'la géographie' de la résistance (par les prévalences des symbiotes) permettrait ainsi d'identifier les forces des pressions de sélection auxquelles sont soumis les parasitoïdes dans les paysages. Cette perspective s'inscrit dans un projet plus global de définition du réseau d'interactions bactériens des pucerons qui est aujourd'hui certainement sous évalué. Selon les bactéries détectées, leurs effets sur les porteurs et les conséquences sur leurs ennemis naturels, nous pourrions comprendre le fonctionnement plus global des communautés de parasitoïdes de pucerons et la manière dont leurs populations peuvent se structurer.

Les mécanismes de la virulence d'*Aphidius ervi*

Comprendre comment les populations de parasitoïdes évoluent, c'est également comprendre les mécanismes sous-jacents. La virulence, c'est-à-dire la capacité de l'individu à se développer dans un hôte et d'y émerger (Henter, 1995 ; Antolin *et al*., 2006), est sélectionnée chez les parasitoïdes soumis à des hôtes résistants. En plus de la γGT déjà connue (Digilio *et al*., 1998 ; Digilio *et al.*, 2000), de nouvelles molécules injectées par les

femelles durant l'oviposition ont été identifiées au cours de cette thèse par Caroline Anselme. Leurs fonctions physiologiques exactes et leur régulation chez *A. ervi* doivent encore être précisées. Certaines ont des rôles éventuels antimicrobiens (Chapitre 4, I. 4.), moyen de lutte potentiel pour les parasitoïdes contre les symbiotes protecteurs. Le fait que nous n'ayons pas détecté de sélection d'un facteur particulier au cours de l'expérience d'évolution expérimentale ne remet pas en question leur implication dans la virulence des femelles. En effet, les molécules émises par les tératocytes jouent également un rôle important dans le succès parasitaire (Falabella *et al.*, 2009). On s'attend donc à une évolution de ces composés, malheureusement non suivis lors de notre expérimentation.

IV. *Aphidius ervi*, bon ou mauvais auxiliaire ?

Les expérimentations développées au cours de la thèse ont permis de caractériser les capacités d'adaptation d'*A. ervi* et évaluer son potentiel à réguler les populations aphidiennes. Les auxiliaires de cultures sont supposés avoir un fort potentiel de parasitisme Nos résultats indiquent que les comportements de défense des pucerons et la résistance apportée par la bactérie limitent significativement l'efficacité parasitaire d'*A. ervi*. Nos expérimentations illustrent toutefois les bonnes capacités de cette espèce à accroître son succès parasitaire face à des populations hôtes résistantes. La variabilité génétique présente dans les populations de parasitoïdes permettrait une adaptation aux populations hôtes locales. Cette capacité adaptative fait d'*Aphidius ervi* un bon auxiliaire potentiel.

Les conditions contrôlées au laboratoire permettent de tester certaines hypothèses et de proposer des mécanismes. Cependant, les prédictions théoriques ne sont pas toujours validées sur le terrain : même si elle possède des capacités d'adaptation, nous avons montré l'absence de spécialisation parasitaire. Ses importantes aptitudes de dispersion et son caractère généraliste lui permettent d'exploiter, à priori, de nombreuses espèces de pucerons sur de longues distances. Les parasitoïdes Aphidiinae ont été beaucoup utilisés en contrôle biologique pour lutter contre les pucerons. Plus particulièrement, *Aphidius ervi* a été introduit dans plusieurs pays pour contrôler les pucerons de légumineuses (*e.g. A. pisum* et *A. kondoï*) et des céréales (*e.g. Sitobion avenae*) (Tableau V. 1). Selon van Emden & Harrington (2007), la présence d'*A. pisum* et d'*A. kondoï* dans un système mixte de cultures a

probablement contribué au succès de la lutte contre les pucerons des céréales au Chili. Le caractère généraliste de cette espèce a ainsi été un atout dans la lutte contre les ravageurs.

Tableau V. 1. Informations sur les introductions d'*Aphidius ervi* (d'après van Emden & Harrington, 2007).

Espèces cibles	Cultures	Origines des parasitoïdes	Pays d'introduction	Années	Etablissement	Références
A. pisum	Luzerne, Pois	Inde, Europe	USA, Canada	1958-1963	oui	Angalet & Fuester, 1977
A. pisum *A. kondoï*	Légumineuses	Europe	Argentine	1972-1978	oui	van Emden & Harrington, 2007
A. kondoï	Luzerne	Europe	Australie, Nouvelle Zélande	1978-1982	oui	Milne, 1999
S. avenae	Céréales	France, Iran	Chili	1976-1982	oui	Starý, 1993

La grande mobilité d'*A. ervi* peut toutefois présenter des désavantages. Si les individus rencontrent un hôte 'incompatible' (trop résistant, individus trop peu nombreux, conditions environnementales difficiles etc…), alors il peut se déplacer aisément et sur des longues distances pour exploiter une autre espèce de puceron. A grande échelle, et dans un système de culture ouvert, l'efficacité d'*A. ervi* en tant qu'auxiliaire semble diminuée lorsque est visée une espèce précise et localement distribuée. Une utilisation en milieu fermé semble donc plus conseillée. C'est d'ailleurs plutôt le cas aujourd'hui car des entreprises présentes aux Etats-Unis, Grande Bretagne, Belgique, Allemagne et Hollande produisent cette espèce en grand nombre, particulièrement pour le contrôle des pucerons sous serre (Takada & Tada, 2000 ; van Emden & Harrington, 2007).

V. Conclusion

Les pucerons présentent des caractéristiques biologiques, écologiques et des interactions avec d'autres organismes qui influencent grandement les traits phénotypiques et génétiques de leurs parasitoïdes. Cette thèse a permis la mise en évidence d'aspects spécifiques de l'interaction *A. pisum-A ervi*, et a ouvert de nombreuses perspectives de recherches permettant d'identifier le fonctionnement des populations de parasitoïdes, en fonction des caractéristiques de leurs hôtes. Les conclusions de ce travail ainsi que perspectives qu'il ouvre sont résumés dans la figure 5.1.

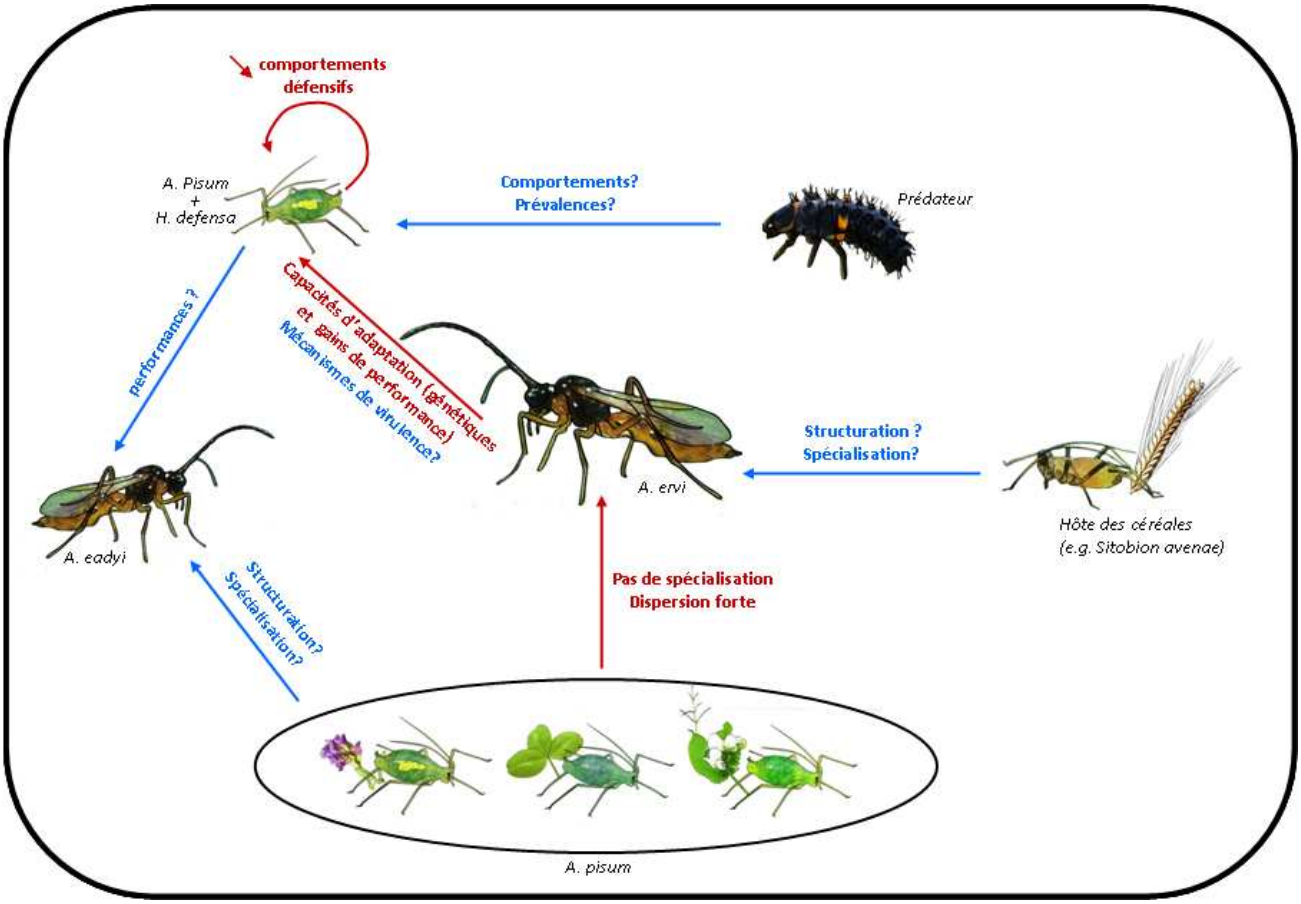

Figure 5.1. Représentation schématique résumant les principales conclusions de ce travail de thèse (en rouge), et ses perspectives (en bleu).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Les références citées dans les articles ne figurent pas dans cette liste.

Al Abassi S, Birkett MA, Pettersson J, Pickett JA, Wadhams LJ, Woodcock CM. 2000. Response of the seven-spot ladybird to an aphid alarm pheromone and an alarm pheromone inhibitor is mediated by paired olfactory cells. Journal of Chemical Ecology 26: 1765-1771.

Allison JD, Hare JD. 2009. Learned and naive natural enemy responses and the interpretation of volatile organic compounds as cues or signals. New Phytologist 184: 768-782.

Altincicek B, Gross J, Vilcinskas A. 2008. Wounding-mediated gene expression and accelerated viviparous reproduction of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum*. Insect Molecular Biology 17: 711-716.

Angalet GW, Fuester R. 1977. The *Aphidius* parasites of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* in the eastern half of the United-States of America. Annals of the Entomological Society of America 70: 87-96.

Antolin MF, Bjorksten TA, Vaughn TT. 2006. Host-related fitness trade-offs in a presumed generalist parasitoid, *Diaeretiella rapae* (Hymenoptera : Aphidiidae). Ecological Entomology 31: 242-254.

Arim M, Marquet PA. 2004. Intraguild predation: a widespread interaction related to species biology. Ecology Letters 7: 557-564.

Asgari S, Theopold U, Wellby C, Schmidt O. 1998. A protein with protective properties against the cellular defense reactions in insects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 3690-3695.

Ayvaz A, Karasu E, Karaborklu S, Yilmaz S. 2008. Dispersal ability and parasitization performance of egg parasitoid *Trichogramma evanescens* westwood (Hymenoptera : Trichogrammatidae) in field and storage conditions. Turkish Journal of Biology 32: 127-133.

Baldo L, Hotopp JCD, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MCJ, Tettelin H, Werren JH. 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. Applied and Environmental Microbiology 72: 7098-7110.

Bampfylde CJ, Lewis MA. 2007. Biological control through intraguild predation: Case studies in pest control, invasive species and range expansion. Bulletin of Mathematical Biology 69: 1031-1066.

Baumann P, Baumann L, Lai CY, Roubakhsh D, Moran NA, Clark MA. 1995. Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera* intracellular symbionts of aphids. Annual Review of Microbiology 49: 55-94.

Baer CF, Tripp DW, Bjorksten TA, Antolin MF. 2004. Phylogeography of a parasitoid wasp (*Diaeretiella rapae*): no evidence of host-associated lineages. Molecular Ecology 13: 1859-1869.

Beckage NE, Gelman DB. 2004. Wasp parasitoid disruption of host development: Implications for new biologically based strategies for insect control. Annual Review of Entomology 49: 299-330.

Begon M, Townsend CR, Harper JL. 2006. Ecology. From individuals to ecosystems: Blakwell Publishing.

Bensadia F, Boudreault S, Guay JF, Michaud D, Cloutier C. 2006. Aphid clonal resistance to a parasitoid fails under heat stress. Journal of Insect Physiology 52: 146-157.

Bernstein C, Heizmann A, Desouhant E. 2002. Intraspecific competition between healthy and parasitised hosts in a host-parasitoid system: consequences for life-history traits. Ecological Entomology 27: 415-423.

Beukeboom LW, Kamping A, Louter M, Pijnacker LP, Katju V, Ferree PM, Werren JH. 2007. Haploid females in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. Science 315: 206-206.

Boo KS, Chung IB, Han KS, Pickett JA, Wadhams LJ. 1998. Response of the lacewing *Chrysopa cognata* to pheromones of its aphid prey. Journal of Chemical Ecology 24: 631-643.

Bordenstein SR, Werren JH. 2007. Bidirectional incompatibility among divergent *Wolbachia* and incompatibility level differences among closely related *Wolbachia* in *Nasonia*. Heredity 99: 278-287.

Borer ET, Briggs CJ, Holt RD. 2007. Predators, parasitoids, and pathogens: A cross-cutting examination of intraguild predation theory. Ecology 88: 2681-2688.

Braendle C, Weisser WW. 2001. Variation in escape behavior of red and green clones of the pea aphid. Journal of Insect Behavior 14: 497-509.

Brisson JA, Stern DL. 2006. The pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*: an emerging genomic model system for ecological, developmental and evolutionary studies. Bioessays 28: 747-755.

Bush GL. 1969. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera:Tephritidae). Evolution 23: 237-251.

Byers JA. 2005. A cost of alarm pheromone production in cotton aphids, *Aphis gossypii*. Naturwissenschaften 92: 69-72.

Carroll SP, Boyd C. 1992. Host race radiation in the soapberry bug - Natural history with the history. Evolution 46: 1052-1069.

Carton Y, Nappi AJ, Poirie M. 2005. Genetics of anti-parasite resistance in invertebrates. Developmental and Comparative Immunology 29: 9-32.

Carton Y, Poirie M, Nappi AJ. 2008. Insect immune resistance to parasitoids. Insect Science 15: 67-87.

Charlat S, Hurst GDD, Mercot H. 2003. Evolutionary consequences of *Wolbachia* infections. Trends in Genetics 19: 217-223.

Cheng TC. 1991. Is parasitism symbiosis? A definition of terms and the evolution of concepts. Oxford: Oxford University Press.

Cipollini D, Purrington CB, Bergelson J. 2003. Costs of induced responses in plants. Basic and Applied Ecology 4: 79-89.

Clark E, Karley A, Hubbard S. 2010. Insect endosymbionts: manipulators of insect herbivore trophic interactions? Protoplasma 244: 25-51.

Clark MA, Moran NA, Baumann P, Wernegreen JJ. 2000. Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. Evolution 54: 517-525.

Colinet D, Schmitz A, Depoix D, Crochart D, Poirié M. 2008. Convergent use of RhoGAP toxins by eukaryotic parasites and bacterial pathogens. PLoS Pathogens 3: e203.

Combes C. 2001. Parasitism. The ecology and evolution of intimate interactions. Chicago: Chicago University Press, USA.

Conner JK. 2003. Artificial selection: a powerful tool for ecologists. Ecology 84: 1650-1660.

Dambroski HR, Feder JL. 2007. Host plant and latitude-related diapause variation in *Rhagoletis pomonella*: a test for multifaceted life history adaptation on different stages of diapause development. Journal of Evolutionary Biology 20: 2101-2112.

Dambroski HR, Linn C, Berlocher SH, Forbes AA, Roelofs W, Feder JL. 2005. The genetic basis for fruit odor discrimination in *Rhagoletis* flies and its significance for sympatric host shifts. Evolution 59: 1953-1964.

Dawkins R. 1982. The extended phenotype. Oxford: Oxford University Press. UK.

Dedeine F, Vavre F, Fleury F, Loppin B, Hochberg ME, Bouletreau M. 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 6247-6252.

de Meeüs T, Renaud F. 2002. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. Trends in Parasitology 18: 247-251.

Degnan PH, Moran NA. 2008. Diverse phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. Applied and Environmental Microbiology 74: 6782-6791.

DeWitt TJ, Sih A, Hucko JA. 1999. Trait compensation and cospecialization in a freshwater snail: size, shape and antipredator behaviour. Animal Behaviour 58: 397-407.

Digilio MC, Isidoro N, Tremblay E, Pennacchio F. 2000. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. Journal of Insect Physiology 46: 1041-1050.

Digilio MC, Pennacchio F, Tremblay E. 1998. Host regulation effects of ovary fluid and venom of *Aphidius ervi* (Hymenoptera : Braconidae). Journal of Insect Physiology 44: 779-784.

Douglas AE. 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. Annual Review of Entomology 43: 17-37.

Drès M, Mallet J. 2002. Host races in plant-feeding insects and their importance in sympatric speciation. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 357: 471-492.

Drezen JM, Provost B, Espagne E, Cattolico L, Dupuy C, Poirie M, Periquet G, Huguet E. 2003. Polydnavirus genome: integrated vs. free virus. Journal of Insect Physiology 49: 407-417.

Dubuffet A, Alvarez CI, Drezen JM, Van Alphen JJM, Poirie M. 2006. Do parasitoid preferences for different host species match virulence? Physiological Entomology 31: 170-177.

Dubuffet A, Doury G, Labrousse C, Drezen JM, Carton Y, Poirie M. 2008. Variation of success of *Leptopilina boulardi* in *Drosophila yakuba*: The mechanisms explored. Developmental and Comparative Immunology 32: 597-602.

Dubuffet A, Dupas S, Frey F, Drezen JM, Poirie M, Carton Y. 2007. Genetic interactions between the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* and its *Drosophila* hosts. Heredity 98: 21-27.

Dupas S, Brehelin M, Frey F, Carton Y. 1996. Immune suppressive virus-like particles in a *Drosophila* parasitoid: Significance of their intraspecific morphological variations. Parasitology 113: 207-212.

Dupas S, Carton Y, Poirié M. 2003. Genetic dimension of the coevolution of virulence-resistance in *Drosophila* - parasitoid wasp relationships. Heredity 90: 84-89.

Dupuy C, Huguet E, Drezen JM. 2006. Unfolding the evolutionary story of polydnaviruses. Virus Research 117: 81-89.

Dillwith JW, Neese PA, Brigham DL. 1993. Lipid biochemistry in aphids. Pages 389-434 in Stanley-Samuelson DW, Nelson DR, eds. Insect lipids: chemistry, biochemistry, and biology. Lincoln: University of Nebraska Press.

Eastop VF. 1971. Keys for the identification of *Acyrthosiphon* (Hemiptera:Aphididae). Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology 26.

Ehrlich PR, Raven PH. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. Evolution 18: 586-608.

Emelianov I, Simpson F, Narang P, Mallet J. 2003. Host choice promotes reproductive isolation between host races of the larch budmoth *Zeiraphera diniana*. Journal of Evolutionary Biology 16: 208-218.

Espagne E, Dupuy C, Huguet E, Cattolico L, Provost B, Martins N, Poirie M, Periquet G, Drezen JM. 2004. Genome sequence of a polydnavirus: Insights into symbiotic virus evolution. Science 306: 286-289.

Evans EW. 2009. Lady beetles as predators of insects other than Hemiptera. Biological Control 51: 255-267.

Falabella P, Perugino G, Caccialupi P, Riviello L, Varrichio P, Trafaglia A, Rossi M, Malva C, Graziani F, Moracci M & Pennachio F. 2005. A novel fatty acid binding protein produced by teratocytes of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*. Insect Molecular Biology 14: 195-205.

Falabella P, Riviello L, Caccialupi P, Rossoditiva T, Valente MT, De Stradis ML, Trafaglia A, Varrichio P, Gigliotti S, Graziani F, Malva C & Pennachio F. 2007. A gamma-glutamyl transpeptidase of *Aphidius ervi* venom induces apoptosis in the ovaries of host aphids. Insect Biochemistry and Molecular Biology 37: 453-465.

Falabella P, Riviello L, De Stradis ML, Stigliano C, Varricchio P, Grimaldi A, de Eguileor M, Graziani F, Gigliotti S, Pennacchio F. 2009. *Aphidius ervi* teratocytes release an extracellular enolase. Insect Biochemistry and Molecular Biology 39: 801-813.

Falabella P, Tremblay E, Pennacchio F. 2000. Host regulation by the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: the role of teratocytes. Entomologia Experimentalis Et Applicata 97: 1-9.

Feder JL, Forbes AA. 2010. Sequential speciation and the diversity of parasitic insects. Ecological Entomology 35: 67-76.

Feder JL, Opp SB, Wlazlo B, Reynolds K, Go W, Spisak S. 1994. Host fidelity in an effective premating barrier between sympatric races of the apple maggot fly. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91: 7990-7994.

Feder JL, Roethele FB, Filchak K, Niedbalski J, Romero-Severson J. 2003. Evidence for inversion polymorphism related to sympatric host race formation in the apple maggot fly, *Rhagoletis pomonella*. Genetics 163: 939-953.

Federici BA, Bigot Y. 2003. Origin and evolution of polydnaviruses by symbiogenesis of insect DNA viruses in endoparasitic wasps. Journal of Insect Physiology 49: 419-432.

Fellowes MDE, Kraaijeveld AR, Godfray HCJ. 1998. Trade-off associated with selection for increased ability to resist parasitoid attack in *Drosophila melanogaster*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 265: 1553-1558.

Ferrari J, Darby AC, Daniell TJ, Godfray HCJ, Douglas AE. 2004. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. Ecological Entomology 29: 60-65.

Fievet V, Lhomme P, Outreman Y. 2008. Predation risk cues associated with killed conspecifics affect the behavior and reproduction of prey animals. Oikos 117: 1380-1385.

Fievet V, Le Guigo P, Casquet J, Poinsot D, Outreman Y. 2009. Living with the dead: when the body count rises, prey stick around. Behavioral Ecology 20: 251-257.

Filchak KE, Roethele JB, Feder JL. 2000. Natural selection and sympatric divergence in the apple maggot *Rhagoletis pomonella*. Nature 407: 739-742.

Forbes AA, Feder JL. 2006. Divergent preferences of *Rhagoletis pomonella* host races for olfactory and visual fruit cues. Entomologia Experimentalis Et Applicata 119: 121-127.

Forbes AA, Powell THQ, Stelinski LL, Smith JJ, Feder JL. 2009. Sequential sympatric speciation across trophic levels. Science 323: 776-779.

Frantz A, Calcagno V, Mieuzet L, Plantegenest M, Simon JC. 2009. Complex trait differentiation between host-populations of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris): implications for the evolution of ecological specialisation. Biological Journal of the Linnean Society 97: 718-727.

Frantz A, Plantegenest M, Mieuzet L, Simon JC. 2006. Ecological specialization correlates with genotypic differentiation in sympatric host-populations of the pea aphid. Journal of Evolutionary Biology 19: 392-401.

Frantz A, Plantegenest M, Simon J-C. 2010. Host races of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* differ in male wing phenotypes. Bulletin of Entomological Research 100: 59-66.

Fry JD. 1996. The evolution of host specialization: Are trade-offs overrated? American Naturalist 148: S84-S107.

Fry JD. 2003. Detecting ecological trade-offs using selection experiments. Ecology 84: 1672-1678.

Fu YQ, Gavotte L, Mercer DR, Dobson SL. 2010. Artificial triple *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* yields a new pattern of unidirectional cytoplasmic incompatibility. Applied and Environmental Microbiology 76: 5887-5891.

Fukatsu T, Sarjiya A, Shibao H. 2005. Soldier caste with morphological and reproductive division in the aphid tribe *Nipponaphidini*. Insectes Sociaux 52: 132-138.

Fuller RC, Baer CF, Travis J. 2005. How and when selection experiments might actually be useful. Integrative and Comparative Biology 45: 391-404.

Funk DJ, Filchak KE, Feder JL. 2002. Herbivorous insects: model systems for the comparative study of speciation ecology. Genetica 116: 251-267.

Futuyma DJ, Slatkin M. 1983. Coevolution. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates Inc.

Fytrou A, Schofield PG, Kraaijeveld AR, Hubbard SF. 2006. *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 273: 791-796.

Gaba S, Ebert D. 2009. Time-shift experiments as a tool to study antagonistic coevolution. Trends in Ecology & Evolution 24: 226-232.

Gelman DB, Gerling D, Blackburn MA. 2005. Host-parasitoid interactions relating to penetration of the whitefly, *Bemisia tabaci*, by the parasitoid wasp, *Eretmocerus mundus*. Journal of Insect Science 5.

Gerardo NM, et al. 2010. Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*. Genome Biology 11.

Gillespie JP, Kanost MR, Trenczek T. 1997. Biological mediators of insect immunity. Annual Review of Entomology 42: 611-643.

Giorgini M, Bernardo U, Monti MM, Nappo AG, Gebiola M. 2010. *Rickettsia* Symbionts Cause Parthenogenetic Reproduction in the Parasitoid Wasp *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). Applied and Environmental Microbiology 76: 2589-2599.

Giorgini M, Monti MM, Caprio E, Stouthamer R, Hunter MS. 2009. Feminization and the collapse of haplodiploidy in an asexual parasitoid wasp harboring the bacterial symbiont *Cardinium*. Heredity 102: 365-371.

Godfray HCJ. 1994. Parasitoids. Behavioural and evolutionary ecology. Princeton: Princeton University Press.

Goff AM, Nault LR. 1974. Aphid cornicle secretions ineffective against attack by parasitoid wasps. Environmental Entomology 3: 565-566.

Grasswitz TR, Paine TD. 1992. Kairomonal effect of an aphid cornicle secretion on *Lysiphlebus testaceipes* (Cression) (Hymenoptera, Aphidiidae). Journal of Insect Behavior 5: 447-457.

Grimaldi A, et al. 2006. Structure and function of the extraembryonic membrane persisting around the larvae of the parasitold *Toxoneuron nigriceps*. Journal of Insect Physiology 52: 870-880.

Gripenberg S, Mayhew PJ, Parnell M, Roslin T. 2010. A meta-analysis of preference-performance relationships in phytophagous insects. Ecology Letters 13: 383-393.

Gross P. 1993. Insect behavioral and morphological defenses against parasitoids. Annual Review of Entomology 38: 251-273.

Grossniklaus-Burgin C, Pfister-Wilhelm R, Meyer V, Treiblmayr K, Lanzrein B. 1998. Physiological and endocrine changes associated with polydnavirus/venom in the parasitoid-host system *Chelonus inanitus Spodoptera littoralis*. Journal of Insect Physiology 44: 305-321.

Guay JF, Boudreault S, Michaud D, Cloutier C. 2009. Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: Role of *Hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. Journal of Insect Physiology 55: 919-926.

Haccou P, Schneider MV. 2004. Modes of reproduction and the accumulation of deleterious mutations with multiplicative fitness effects. Genetics 166: 1093-1104.

Hagvar EB, Hofsvang T. 1991. Aphid parasitoids (Hymenoptera, Aphidiidae) : biology, host selection and use in biological control. Biocontrol news and Information 12: 13-41.

Haine ER. 2008. Symbiont-mediated protection. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 275: 353-361.

Hammill E, Kratina P, Beckerman AP, Anholt BR. 2010. Precise time interactions between behavioural and morphological defences. Oikos 119: 494-499.

Hassell MP. 2000. The spatial and temporal dynamics of host-parasitoid interactions. Oxford: Oxford University Press, UK.

Heil M, Baldwin IT. 2002. Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. Trends in Plant Science 7: 61-67.

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biology 8.

Hemerik L, Harvey JA. 1999. Flexible larval development and the timing of destructive feeding by a solitary endoparasitoid: an optimal foraging problem in evolutionary perspective. Ecological Entomology 24: 308-315.

Henry LM, May N, Acheampong S, Gillespie DR, Roitberg BD. 2010. Host-adapted parasitoids in biological control: Does source matter? Ecological Applications 20: 242-250.

Henry LM, Roitberg BD, Gillespie DR. 2008. Host-range evolution in *Aphidius* parasitoids: Fidelity, virulence and fitness trade-offs on an ancestral host. Evolution 62: 689-699.

Henter HJ. 1995. The potential for coevolution in a host-parasitoid system. 2. Genetic variation within a population of wasps in the ability to parasitize an aphid host. Evolution 49: 439-445.

Henter HJ, Via S. 1995. The potential for coevolution in a host-parasitoid system.1. Genetic variation within an aphid population in the susceptibility to a parasitic wasp Evolution 49: 427-438.

Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? - a statistical analysis of current data. FEMS Microbiology Letters 281: 215-220.

Hoffmann JA, Reichhart JM. 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. Nature Immunology 3: 121-126.

Hölldobler B, Wilson EO. 1990. The ants. Cambridge: Harvard University Press.

Holt RD, Huxel GR. 2007. Alternative prey and the dynamics of intraguild predation: theoretical perspectives. Ecology 88: 2706-2712.

Holt RD, Polis GA. 1997. A theoretical framework for intraguild predation. American Naturalist 149: 745-764.

Hufbauer RA. 2001. Pea aphid-parasitoid interactions: Have parasitoids adapted to differential resistance? Ecology 82: 717-725.

Hufbauer RA, Bogdanowicz SM, Harrison RG. 2004. The population genetics of a biological control introduction: mitochondrial DNA and microsatellie variation in native and introduced populations of *Aphidus ervi*, a parasitoid wasp. Molecular Ecology 13: 337-348.

Hufbauer RA, Bogdanowicz SM, Perez L, Harrison RG. 2001. Isolation and characterization of microsatellites in *Aphidius ervi* (Hymenoptera : Braconidae) and their applicability to related species. Molecular Ecology Notes 1: 197-199.

Hunter MS, Perlman SJ, Kelly SE. 2003. A bacterial symbiont in the Bacteroidetes induces cytoplasmic incompatibility in the parasitoid wasp *Encarsia pergandiella*. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 270: 2185-2190.

Hurst GDD, Jiggins FM. 2000. Male-killing bacteria in insects: Mechanisms, incidence, and implications. Emerging Infectious Diseases 6: 329-336.

Jaenike J, Polak M, Fiskin A, Helou M, Minhas M. 2007. Interspecific transmission of endosymbiotic *Spiroplasma* by mites. Biology Letters 3: 23-25.

Janssen A, Sabelis MW, Magalhães S, Montserrat M, van der Hammen T. 2007. Habitat structure affects intraguild predation. Ecology 88: 2713-2719.

Jones EO, White A, Boots M. 2007. Interference and the persistence of vertically transmitted parasites. Journal of Theoretical Biology 246: 10-17.

Jonhson B. 1965. Wing polymorphism in aphids. II. Interactions between aphids. Entomologia Experimentalis Et Applicata 8: 49-64.

Jousselin E, Desdevises Y, Coeur d'Acier A. 2009. Fine-scale cospeciation between *Brachycaudus* and *Buchnera aphidicola*: bacterial genome helps define species and evolutionary relationships in aphids. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 276: 187-196.

Kawecki TJ. 1998. Red queen meets Santa Rosalia: Arms races and the evolution of host specialization in organisms with parasitic lifestyles. American Naturalist 152: 635-651.

Kawecki TJ, Ebert D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. Ecology Letters 7: 1225-1241.

Kellner RLL. 2002. Molecular identification of an endosymbiotic bacterium associated with pederin biosynthesis in *Paederus sabaeus* (Coleoptera : Staphylinidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 389-395.

Kellner RLL, Dettner K. 1996. Differential efficacy of toxic pederin in deterring potential arthropod predators of *Paederus* (Coleoptera: Staphylinidae) offspring. Oecologia 107: 293-300.

Kitano H, Wago H, Arakawa T. 1990. Possible role of the teratocytes of the gregarious parasitoid, *Cotesia* (= *Apanteles*) *glomerata* in the supression of phenoloxydase activity in the larval host, *Pieris rapae crucivora*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 13: 177-185.

Kolaczan CR, Heard SB, Segraves KA, Althoff DM, Nason JD. 2009. Spatial and genetic structure of host-associated differentiation in the parasitoid *Copidosoma gelechiae*. Journal of Evolutionary Biology 22: 1275-1283.

Kraaijeveld AR, Godfray HCJ. 1997. Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. Nature 389: 278-280.

Kraaijeveld AR, Van Alphen JJM, Godfray HCJ. 1998. The coevolution of host resistance and parasitoid virulence. Parasitology 116: S29-S45.

Kraaijeveld AR, Hutcheson KA, Limentani EC, Godfray HCJ. 2001. Costs of counterdefenses to host resistance in a parasitoid of *Drosophila*. Evolution 55: 1815-1821.

Kraaijeveld AR, Godfray HCJ. 2009. Evolution of host resistance and parasitoid counter-resistance. Pages 257-280. Advances in Parasitology, Vol 70, vol. 70. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.

Kremer N, Charif D, Henri H, Bataille M, Prevost G, Kraaijeveld K, Vavre F. 2009. A new case of *Wolbachia* dependence in the genus *Asobara*: evidence for parthenogenesis induction in *Asobara japonica*. Heredity 103: 248-256.

Kumar S, Christophides GK, Cantera R, Charles B, Han YS, Meister S, Dimopoulos G, Kafatos FC, Barillas-Mury C. 2003. The role of reactive oxygen species on *Plasmodium* melanotic encapsulation in *Anopheles gambiae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 14139-14144.

Kunert G, Belz E, Simon JC, Weisser WW, Outreman Y. 2010. Differences in defensive behaviour between host-adapted races of the pea aphid. Ecological Entomology 35: 147-154.

Kunert G, Otto S, Rose USR, Gershenzon J, Weisser WW. 2005. Alarm pheromone mediates production of winged dispersal morphs in aphids. Ecology Letters 8: 596-603.

Labrosse C, Eslin P, Doury G, Drezen JM, Poirié M. 2005. Haemocyte changes in *D. Melanogaster* in response to long gland components of the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*: a Rho-GAP protein as an important factor. Journal of Insect Physiology 51: 161-170.

Laine AL. 2009. Role of coevolution in generating biological diversity: spatially divergent selection trajectories. Journal of Experimental Botany 60: 2957-2970.

Langhof M, Meyhofer R, Poehling HM, Gathmann A. 2005. Measuring the field dispersal of *Aphidius colemani* (Hymenoptera : Braconidae). Agriculture Ecosystems & Environment 107: 137-143.

LaSalle J, Gauld ID. 1992. Hymenoptera and biodiversity UK: CAB International, UK.

Lee JE, Slabber S, van Vuuren BJ, van Noort S, Chown SL. 2007. Colonisation of sub-Antarctic Marion Island by a non-indigenous aphid parasitoid *Aphidius matricariae* (Hymenoptera, Braconidae). Polar Biology 30: 1195-1201.

Le Ralec A, Anselme C, Outreman Y, Poirie M, van Baaren J, Le Lann C, van Alphen JJM. 2010. Evolutionary ecology of the interactions between aphids and their parasitoids. Comptes Rendus Biologies 333: 554-565.

Liadouze I, Febvay G, Guillaud J, Bonnot G. 1995. Effect of diet on the free amino-acid pools of symbiotic and aposymbiotic pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. Journal of Insect Physiology 41: 33-40.

Linn C, Feder JL, Nojima S, Dambroski HR, Berlocher SH, Roelofs W. 2003. Fruit odor discrimination and sympatric host race formation in *Rhagoletis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 11490-11493.

Lively CM, Clay K, Wade MJ, Fuqua C. 2005. Competitive co-existence of vertically and horizontally transmitted parasites. Evolutionary Ecology Research 7: 1183-1190.

Losey JE, Denno RF. 1998a. The escape response of pea aphids to foliar-foraging predators: factors affecting dropping behaviour. Ecological Entomology 23: 53-61.

Losey JE, Denno RF. 1998b. Interspecific variation in the escape responses of aphids: effect on risk of predation from foliar-foraging and ground-foraging predators. Oecologia 115: 245-252.

Mackay PA. 1987. Production of sexual and asexual morphs and changes in reproductive sequence associated with photoperiod in the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* (Harris). Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie 65: 2602-2606.

Mahadav A, Gerling D, Gottlieb Y, Czosnek H, Ghanim M. 2008. Parasitization by the wasp *Eretmocerus mundus* induces transcription of genes related to immune response and symbiotic bacteria proliferation in the whitefly *Bemisia tabaci*. BMC Genomics 9.

Marsh PM. 1977. Notes on taxonomy and nomenclature of *Aphidius* species (Hymenoptera: Aphidiidae) parasitic in the pea aphid in North America. Entomophaga 22: 365-372.

Martinou AF, Milonas PG, Wright DJ. 2009. Patch residence decisions made by *Aphidius colemani* in the presence of a facultative predator. Biological Control 49: 234-238.

Mauricio R, Bowers MD. 1990. Do caterpillars disperse their damages - Larval foraging behavior of two specialist herbivors, *Euphydrias phaeton* (Nymphalidae) and *Pieris rapae* (Pieridae). Ecological Entomology 15: 153-161.

McCutcheon JP, McDonald BR, Moran NA. 2009. Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 15394-15399.

Medina RF, Nachappa P, Tamborindeguy C. 2011. Differences in bacterial diversity of host-associated populations of *Phylloxera notabilis Pergande* (Hemiptera: Phylloxeridae) in pecan and water hickory. Journal of Evolutionary Biology 24: 761-771.

Meisner M, Harmon JP, Harvey CT, Ives AR. 2011. Intraguild predation on the parasitoid *Aphidius ervi* by the generalist predator *Harmonia axyridis*: the threat and its avoidance. Entomologia Experimentalis Et Applicata.

Micha SG, Wyss U. 1996. Aphid alarm pheromone (E)-β-farnesene: A host finding kairomone for the aphid primary parasitoid *Aphidius uzbekistanicus* (Hymenoptera: Aphidiinae). Chemoecology 7: 132-139.

Mikolajewski DJ, De Block M, Rolff J, Johansson F, Beckerman AP, Stoks R. 2010. Predator-driven trait diversification in a dragonfly genus: covariation in behavioral and morphological anti-predator defense. Evolution 64: 3327-3335.

Milne WM. 1999. Evaluation of the establishment of *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera : Braconidae) in Lucerne aphid populations in New South Wales. Australian Journal of Entomology 38: 145-147.

Min KT, Benzer S. 1997. *Wolbachia*, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 10792-10796.

Minchella D. J. 1985. Host life-history variation in response to parasitism. Parasitology 90: 205-216.

Moreau SJM, Guillot S. 2005. Advances and prospects on biosynthesis, structures and functions of venom proteins from parasitic wasps. Insect Biochemistry and Molecular Biology 35: 1209-122.

Mondor EB, Baird DS, Slessor KN, Roitberg BD. 2000. Ontogeny of alarm pheromone secretion in pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. Journal of Chemical Ecology 26: 2875-2882.

Mondor EB, Roitberg BD. 2003. Age-dependent fitness costs of alarm signaling in aphids. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie 81: 757-762.

Montllor CB, Maxmen A, Purcell AH. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. Ecological Entomology 27: 189-195.

Moran NA. 2006. Symbiosis. Current Biology 16: R866-R871.

Moran NA, Degnan PH, Santos SR, Dunbar HE, Ochman H. 2005. The players in a mutualistic symbiosis: Insects, bacteria, viruses, and virulence genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 16919-16926.

Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. Annual Review of Genetics 42: 165-190.

Nakamatsu Y, Fujii S, Tanaka T. 2002. Larvae of an endoparasitoid, *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae), feed on the host fat body directly in the second stadium with the help of teratocytes. Journal of Insect Physiology 48: 1041-1052.

Nakashima Y, Birkett MA, Pye BJ, Pickett JA, Powell W. 2004. The role of semiochemicals in the avoidance of the seven-spot ladybird, *Coccinella septempunctata*, by the aphid parasitoid, *Aphidius ervi*. Journal of Chemical Ecology 30: 1103-1116.

Nakashima Y, Senoo N. 2003. Avoidance of ladybird trails by an aphid parasitoid *Aphidius ervi*: active period and effects of prior oviposition experience. Entomologia Experimentalis Et Applicata 109: 163-166.

Nappi AJ, Ottaviani E. 2000. Cytotoxicity and cytotoxic molecules in invertebrates. Bioessays 22: 469-480.

Nardon P, Grenier AM. 1993. Symbiosis and evolution. Annales De La Societe Entomologique De France 29: 113-140.

Nelson EH. 2007. Predator avoidance behavior in the pea aphid: costs, frequency, and population consequences. Oecologia 151: 22-32.

Nyabuga FN, Outreman Y, Simon JC, Heckel DG, Weisser WW. 2010. Effects of pea aphid secondary endosymbionts on aphid resistance and development of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: a correlative study. Entomologia Experimentalis Et Applicata 136: 243-253.

Ohtaka C, Ishikawa H. 1991. Effetcs of heat treatment on the symbiotic system of an aphid mycetocyte. Symbiosis 11: 19-30.

Oliver KM, Campos J, Moran NA, Hunter MS. 2008. Population dynamics of defensive symbionts in aphids. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 275: 293-299.

Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran NA. 2010. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. Annual Review of Entomology 55: 247-266.

Oliver KM, Degnan PH, Hunter MS, Moran NA. 2009. Bacteriophages Encode Factors Required for Protection in a Symbiotic Mutualism. Science 325: 992-994.

Oliver KM, Moran NA, Hunter MS. 2005. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102: 12795-12800.

Oliver KM, Moran NA, Hunter MS. 2006. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 273: 1273-1280.

Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 1803-1807.

Outreman Y, Kunert G, Simon JC, Weisser WW. 2010. Ecological costs of alarm signaling in aphids in Kindlmann P, Dixon AFG, Michaud JP, eds. Aphid biodiversity under environmental change: pattern and processes. Dordrecht: Springer.

Pannebakker BA, Pijnacker LP, Zwaan BJ, Beukeboom LW. 2004. Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera : Figitidae). Genome 47: 299-303.

Peacor SD. 2003. Phenotypic modifications to conspecific density arising from predation risk assessment. Oikos 100: 409-415.

Peccoud J, Ollivier A, Plantegenest M, Simon JC. 2009a. A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 7495-7500.

Peccoud J, Simon JC. 2010. The pea aphid complex as a model of ecological speciation. Ecological Entomology 35: 119-130.

Peccoud J, Simon JC, McLaughlin HJ, Moran NA. 2009b. Post-Pleistocene radiation of the pea aphid complex revealed by rapidly evolving endosymbionts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106: 16315-16320.

Pelosse P, Bernstein C, Desouhant E. 2007. Differential energy allocation as an adaptation to different habitats in the parasitic wasp *Venturia canescens*. Evolutionary Ecology 21: 669-685.

Pennacchio F, Digilio MC, Tremblay E, Tranfaglia A. 1994. Host recognition and acceptance behaviour in two aphid parasitoid species: *Aphidius ervi* and *Aphidius microlophii* (Hymenoptera: Braconidae). Bulletin of Entomological Research 84: 57-64.

Pennacchio F, Strand MR. 2006. Evolution of developmental strategies in parasitic hymenoptera. Annual Review of Entomology 51: 233-258.

Pickett JA, Griffiths DC. 1980. Composition of aphid alarm pheromones. Journal of Chemical Ecology 6: 349-360.

Pintureau B, Grenier S, Heddi A, Charles H. 2002. Biodiversity of *Wolbachia* and of their effects in *Trichogramma* (Hymenoptera : Trichogrammatidae). Annales De La Societe Entomologique De France 38: 333-338.

Plantegenest M, Outreman Y, Goubault M, Wajnberg E. 2004. Parasitoids flip a coin before deciding to superparasitize. Journal of Animal Ecology 73: 802-806.

Poinsot D, Charlat S, Mercot H. 2003. On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: confronting the models with the facts. Bioessays 25: 259-265.

Poirie M, Carton Y, Dubuffet A. 2009. Virulence strategies in parasitoid Hymenoptera as an example of adaptive diversity. Comptes Rendus Biologies 332: 311-320.

Pontes MH, Dale C. 2006. Culture and manipulation of insect facultative symbionts. Trends in Microbiology 14: 406-412.

Poulin R, Morand S. 2000. The diversity of parasites. Quarterly Review of Biology 75: 277-293.

Powell W, Pennacchio F, Poppy GM, Tremblay E. 1998. Strategies involved in the location of hosts by the parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Hymenoptera : Braconidae : Aphidiinae). Biological Control 11: 104-112.

Pungerl NB. 1983. Variability in characters commonly used to distinguish *Aphidius* species (Hymenoptera: Aphidiidae). Systematic Entomology 8: 425-430.

Raychoudhury R, Baldo L, Oliveira D, Werren JH. 2009. Modes of acquisition of *Wolbachia*: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the *Nasonia* species complex. Evolution 63: 165-183.

Ridley M. 2004. Evolution, 3rd edition: Blackwell Science Ltd.

Rivero A, West SA. 2002. The physiological cost of being small in a parasitic wasp. Evolutionary Ecology Research 4: 407-420.

Rodriguero MS, Confalonieri VA, Guedes JVC, Lanteri AA. 2010. *Wolbachia* infection in the tribe *Naupactini* (Coleoptera, Curculionidae): association between thelytokous parthenogenesis and infection status. Insect Molecular Biology 19: 631-640.

Roitberg BD, Myers JH. 1979. Behavioural and physiological adaptations of pea aphids (Homo^ptera, Aphididae) to high ground temperatures and predator disturbance. Canadian Entomologist 111: 515-519.

Rosenheim JA, Kaya HK, Ehler LE, Marois JJ, Jaffee BA. 1995. Intraguild predation among biological control agents - Theory and evidence. Biological Control 5: 303-335.

Rull J, Wharton R, Feder JL, Guillen L, Sivinski J, Forbes A, Aluja M. 2009. Latitudinal Variation in Parasitoid Guild Composition and Parasitism Rates of North American Hawthorn Infesting *Rhagoletis*. Environmental Entomology 38: 588-599.

Russo J, Brehelin M, Carton Y. 2001. Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D-melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*. Journal of Insect Physiology 47: 167-172.

Sandström J. 1994. High variation in host adaptation among clones of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum* on peas, *Pisum sativum*. Entomologia Experimentalis Et Applicata 71: 245-256.

Scarborough CL, Ferrari J, Godfray HCJ. 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. Science 310: 1781-1781.

Scriber JM. 2010. Integrating ancient patterns and current dynamics of insect-plant interactions: Taxonomic and geographic variation in herbivore specialization. Insect Science 17: 471-507.

Schluter D. 2001. Ecology and the origin of species. Trends in Ecology & Evolution 16: 372-380.

Siva-Jothy MT, Moret Y, Rolff J. 2005. Insect immunity: An evolutionary ecology perspective. Pages 1-48. Advances in Insect Physiology, Vol 32, vol. 32.

Sloggett JJ, Weisser WW. 2002. Parasitoids induce production of the dispersal morph of the pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. Oikos 98: 323-333.

Snyder WE, Ives AR. 2001. Generalist predators disrupt biological control by a specialist parasitoid. Ecology 82: 705-716.

Starý P. 1973. A review of *Aphidius* species (Hymenoptera: Aphidiidae) of Europe. Annotationes Zoologicae et Botanicae, Bratislava 84: 1-85.

Starý P. 1974. Taxonomy, origin, distribution and host range of *Aphidius* species in relation to biological control of the pea aphid in Europe and North America Zeitschrift für Angewandte Entomologie 77: 141-171.

Starý P. 1988. Aphidiidae. Pages 171-184 in Minks AK, Harrewijn P, eds. Aphids: their biology, natural ennemies and control Amsterdam: Elseiver.

Starý P. 1993. The fate of released parasioids (Hymenoptera, Braconidae, Aphidiinae) for biologival control of aphids in Chile. Bulletin of Entomological Research 83: 633-639.

Stern DL, Whitfield JA, Foster WA. 1997. Behavior and morphology of monomorphic soldiers from the aphid genus *Pseudoregma* (Cerataphidini, Hormaphididae): implications for the evolution of morphological castes in social aphids. Insectes Sociaux 44: 379-392.

Stireman JO, Nason JD, Heard SB, Seehawer JM. 2006a. Cascading host-associated genetic differentiation in parasitoids of phytophagous insects. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences 273: 523-530.

Stireman JO, O'Hara JE, Wood DM. 2006b. Tachinidae: Evolution, behavior, and ecology. Annual Review of Entomology 51: 525-555.

Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD. 1999. *Wolbachia pipientis*: Microbial manipulator of arthropod reproduction. Annual Review of Microbiology 53: 71-102.

Sutherland ORW. 1969. Role of crowding in production of wing forms by two strains of pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*. Journal of Insect Physiology 15: 1385-1410.

Tagu D, Klingler JP, Moya A, Simon JC. 2008. Early progress in aphid genomics and consequences for plant-aphid interactions studies. Molecular Plant-Microbe Interactions 21: 701-708.

Takada H. 2002. Parasitoids (Hymenoptera : Braconidae, Aphidiinae; Aphelinidae) of four principal pest aphids (Homoptera : Aphididae) on greenhouse vegetable crops in Japan. Applied Entomology and Zoology 37: 237-249.

Takada H, Tada E. 2000. A comparison between two strains from Japan and Europe of *Aphidius ervi*. Entomologia Experimentalis Et Applicata 97: 11-20.

The International Aphid Genomics Consortium. 2010. Genome Sequence of the Pea Aphid Acyrthosiphon pisum. PLoS Biology 8.

Thomas F, Guéguan J-F, Renaud F. 2009. Ecology and evolution of parasitism. Oxford: Oxford University Press.

Thomas F, Lefèvre T, Raymond M. 2010. Biologie évolutive. De Boeck, Bruxelles, Belgique.

Thompson JN. 1994. The coevolutionary process. Chicago: The University of Chicago Press, USA.

Toft C, Andersson SGE. 2010. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. Nature Reviews Genetics 11: 465-475.

Tokuda G, Watanabe H. 2007. Hidden cellulases in termites: revision of an old hypothesis. Biology Letters 3: 336-339.

Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T. 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. Science 303: 1989-1989.

Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, Tsunoda T, Maoka T, Matsumoto S, Simon JC, Fukatsu T. 2010. Symbiotic bacterium modifies aphid body color. Science 330: 1102-1104.

van Alphen JJM, Visser ME. 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insects parasitoids. Annual Review of Entomology 35: 59-79.

van Emden HF, Harringhton R. 2007. Aphids as crop pests. Wallingford. UK.

van Valen L. 1973. A new evolutionary law. Evolutionary Theory 1: 1-30.

Vance-Chalcraft HD, Rosenheim JA, Vonesh JR, Osenberg CW, Sih A. 2007. The influence of intragild predation on prey supression and pry release: a meta-analysis. Ecology 88: 2689-2696.

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: 1711-1723.

Vavre F, Mouton L, Pannebakker BA. 2009. *Drosophila*-Parasitoid Communities as Model Systems for Host-*Wolbachia* Interactions. Pages 299-331. Advances in Parasitology, Vol 70, vol. 70.

Vet LEM, Wackers FL, Dicke M. 1991. How to hunt for hiding hosts - the reliability-detectability problem in foraging parasitoids. Netherlands Journal of Zoology 41: 202-213.

Via S. 1991. The genetic structure of host plant adaptation in a spatial patchwork - Demographic variability among reciprocally transplanted pea aphid clones. Evolution 45: 827-852.

Villagra CA, Ramirez CC, Niemeyer HM. 2002. Antipredator responses of aphids to parasitoids change as a function of aphid physiological state. Animal Behaviour 64: 677-683.

Vilmos P, Kurucz E. 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Immunology Letters 62: 59-66.

Vinson SB. 1999. Parasitoid manipulation as a plant defense strategy. Annals of the Entomological Society of America 92: 812-828.

Vorburger C, Gouskov A, von Burg S. 2008. Genetic covariation between effectiveness and cost of defence in aphids. Biology Letters 4: 674-676.

Werren JH, Zhang W, Guo LR. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia* - Reproductive parasites of artropods. Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 261: 55-63.

Wolinska J, King KC. 2009. Environment can alter selection in host-parasite interactions. Trends in Parasitology 25: 236-244.

Wu GM, Boivin G, Brodeur J, Giraldeau LA, Outreman Y. 2010. Altruistic defence behaviours in aphids. Bmc Evolutionary Biology 10.

Zhu JW, Cosse AA, Obrycki JJ, Boo KS, Baker TC. 1999. Olfactory reactions of the twelve-spotted lady beetle, *Coleomegilla maculata* and the green lacewing, *Chrysoperla carnea* to semiochemicals released from their prey and host plant: electroantennogram and behavioral responses. Journal of Chemical Ecology 25: 1163-1177.

Summary

Each living organism is an active actor of a complex interaction web. Interactions between species imply selective pressures on their traits, driving their coevolution dynamics. As in an 'arms race', in host-parasitoid coevolution, host traits implied in resistance are selected, whereas host-exploitation abilities are selected in parasitoids. The host is itself member of other interactions, which may influence its traits, and consequently, impacts on parasitoid fitness. This thesis aimed to evaluate the influence of the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* interactions web on the evolution and ecology of its dominant parasitoid *Aphidius ervi*.

The interaction between the pea aphid and its host plant should impact on parasitoid populations because *A. pisum* populations exhibit host plant specialization, being a complex of genetically and phenotypically distinguished sympatric populations. However, we showed that there is no cascading genetic host-associated differentiation of *A. ervi* populations, in respect with host races. The parasitoids seem to equally exploit aphids from different host plants. As *A. ervi* have great dispersal ability and is a generalist species, gene flows are favoured between landscape compartments.

Additionally*, s*ome pea aphid individuals harbour a facultative symbiont *Hamiltonella defensa* that provides protection against parasitoids. By analysing aphid behaviours in the presence of parasitoids, we showed that hosts infected with *H. defensa* exhibited reduced aggressiveness and escape reactions compared with uninfected aphids. The aphid and the symbiont should both benefit from these behavioural changes: both partners reduced the fitness decrements associated with the behavioural defences.

We conducted also an experimental evolution procedure, selecting *A. ervi* on either high-resistant aphid populations harbouring *H. Defensa,* or low-resistant aphid populations free of *H. defensa*. The parasitoids performance selected on high-resistant host populations increased through generations. During selection process, host resistance induced a diminution of the allelic variability in *A. ervi* selected populations, leading to genetic divergence between populations exposed or not to high-resistant hosts. This experimentation highlighted the genetic and adaptive potential of this parasitoid species when faced with the symbiont mediated resistance of their hosts.

The results of these studies are then discussed in respect to the fundamental and applied fields associated. Perspectives of this work are also given.

Keywords: Parasitoid, host specialisation, symbiont-mediated resistance, behavioural defences, genetic cascading host-associated differentiation, adaptation abilities, experimental evolution, microsatellites

Résumé

Chaque être vivant interagit avec une ou plusieurs espèces et est membre d'un réseau complexe d'interactions qui influencent les traits des individus, exerçant de fait des pressions sélectives sur leurs populations. Chaque espèce étant dépendante de la nature et de la diversité des interactions dans lesquelles elle est impliquée, son évolution est donc en partie liée aux autres espèces avec lesquelles elle interagit. Un hôte et son parasitoïde vivent dans une dynamique coévolutive, prenant part à une véritable 'course aux armements', où les différentes stratégies d'attaque peuvent être sélectionnés chez le parasitoïde en réponse aux différentes formes de défenses chez l'hôte. Ce dernier interagit également avec d'autres organismes qui modifient ses traits, impactant les aptitudes du parasitoïde, perturbant leur dynamique coévolutive. L'objectif de ce travail est ainsi d'identifier l'influence du réseau d'interactions du puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* sur l'évolution et l'écologie des populations de son principal parasitoïde *Aphidius ervi*.

Le puceron du pois est lui-même parasite de sa plante hôte, leur coévolution aboutissant à une spécialisation de cet aphide cette espèce hôte végétale. Les populations de pucerons sont donc structurées en races d'hôtes sympatriques, divergeant génétiquement et phénotypiquement. Notre étude montre une absence de structuration génétique des populations de parasitoïdes selon les races d'hôte. *A. ervi* exploite indifféremment les *A. pisum* issus de différentes plantes hôtes, excluant la présence d'un effet cascade associé à la spécialisation alimentaire chez ce puceron. La dispersion et le caractère généraliste du parasitoïde semblent favoriser les flux de gènes entre les différents éléments d'un paysage agricole.

A. pisum peut également abriter le symbiote *Hamiltonella defensa* qui lui confère une résistance à *A. ervi*. Ces microorganismes symbiotiques induisent une réduction des défenses comportementales chez les pucerons porteurs. Cette diminution de l'expression des comportements défensifs favorise à la fois le puceron et son symbiote car elle réduit les coûts associés à ces comportements.

Enfin, une évolution expérimentale sur des populations de parasitoïdes soumises à des populations d'hôtes portant *H. defensa* (résistantes) ou non (sensibles) montre une adaptation des parasitoïdes soumis aux hôtes résistants. Cette adaptation s'accompagne d'une réduction de la variabilité génétique dans les populations exposées à la résistance. On observe également une divergence génétique entre les populations exposées ou non à la résistance conférée par le symbiote, *H. defensa*. Cette expérimentation met en évidence le potentiel évolutif des populations d'*A. ervi* et donc leurs capacités d'adaptation face à des pucerons résistants.

Les intérêts fondamentaux et appliqués de ces travaux sont discutés et replacés dans un contexte général.

Mots clés : Parasitoïde, spécialisation écologique de l'hôte, symbiote protecteur, défenses comportementales, effet cascade, potentiel évolutif, évolution expérimentale, génétique des populations