



HAL
open science

Expression et évolution du phénotype étendu dans une association parasitoïde-virus

Julien Martinez

► **To cite this version:**

Julien Martinez. Expression et évolution du phénotype étendu dans une association parasitoïde-virus. Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT: 2011LYO10329 . tel-00751985

HAL Id: tel-00751985

<https://theses.hal.science/tel-00751985>

Submitted on 14 Nov 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.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

École doctorale : Écologie, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR CNRS 5558

DIPLOME DE DOCTORAT

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 20 décembre 2011 par

Julien MARTINEZ

**Expression et Évolution du phénotype étendu dans
une association parasitoïde-virus**

JURY :

Frédéric Fleury (Université Lyon 1)	Directeur de thèse
Julien Varaldi (Université Lyon 1)	Co-directeur de thèse
Jean-Michel Drezen (Université de Tours)	Rapporteur
Michel Peterschmitt (CIRAD, Montpellier)	Rapporteur
Thierry Rigaud (Université de Bourgogne)	Examineur
Rémy Froissart (CIRAD, Montpellier)	Examineur
Dominique Pontier (Université Lyon 1)	Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie

Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. A. Bonmartin

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en

Directeur : M. le Professeur P. Farge

Biologie Humaine

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De Marchi

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et

Directeur : M. C. Collignon

Sportives

Directeur : M. B. Guiderdoni

Observatoire de Lyon

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. G. Pignault

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. R. Bernard

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Remerciements

Le phénotype d'un individu est le fruit de l'expression de ces gènes mais dépend aussi en grande partie de son environnement et des organismes avec lesquels il interagit. Pour m'être plusieurs fois interrogé sur la façon dont mes gènes m'ont conduit jusqu'ici, j'en ai conclu que mon environnement a très fortement contribué à me faire avancer. Je souhaite ainsi remercier les gens qui m'ont accompagné, de près ou de loin, sur cette route périlleuse qu'est la thèse.

Tout d'abord, je remercie vivement Jean-Michel Drezen, Michel Peterschmitt, Thierry Rigaud, Rémy Froissart et Dominique Pontier pour avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Merci à mes deux directeurs de thèse, Fred et Julien, pour m'avoir encadré et pour la confiance qu'ils m'ont accordé depuis cinq ans déjà. Un grand merci à Julien pour m'avoir proposé un stage dès le Master 1 et m'avoir permis d'intégrer l'équipe « Génétique et Evolution des Interactions Hôtes-Parasites ». Grâce à ce stage, j'ai découvert le monde fascinant des symbiotes manipulateurs, ce qui m'a vraiment conforté dans l'idée de poursuivre mon parcours jusqu'en thèse. Désormais je peux le dire...je suis parasité donc je suis ! Merci également pour m'avoir incité à participer à de nombreux colloques scientifiques, exercice difficile, mais qui m'a fait gagner en confiance. Je remercie Fred pour avoir investi son temps précieux dans l'encadrement de ce travail de thèse. Il n'a pas toujours été facile de se réunir pour faire le point mais je dois dire que les discussions scientifiques que l'on a pu avoir m'ont vraiment permis d'avancer. Merci enfin mes deux directeurs pour leur investissement et leur soutien moral dans le sprint final de la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie toute l'équipe « Génétique et Evolution des Interactions Hôtes-Parasites » pour son accueil, sa bonne humeur et son dynamisme scientifique. Je pense que les cafés « biblio » vont me manquer. Merci aussi à Fabrice avec qui j'ai eu la chance de travailler à l'occasion d'une collaboration. Sa réflexion et sa vision synthétique des choses m'ont beaucoup fait avancer.

Merci à tous mes collègues du LBBE, Lucie, Pierre, Vincent, Anna, Aurélien (alias Bibi), Emilie, Perrine et Sophie, pour ne citer que les plus proches. J'ai vraiment apprécié les moments passés en votre compagnie. Les apéros du jeudi soir vont me manquer !

Enfin, je remercie Vanessa pour son affection, son soutien moral et accessoirement pour avoir été ma technicienne de labo personnelle dans les moments difficiles ! Je te suis vraiment reconnaissant pour ta patience (et il en fallait !) au cours de ces longs mois de travail qui ont souvent pris le pas sur mon temps libre. Merci pour m'avoir convaincu de prendre des vacances et de faire des pauses (je n'y ai pas toujours mis du mien !), sans quoi la fin de thèse aurait été bien plus difficile. Merci pour tous ces bons moments mais aussi pour t'être intéressé à mon travail et pour tous les débats scientifiques sans fin que nous avons pu avoir !

RÉSUMÉ :

L'expression du phénotype des organismes dépend en partie d'organismes symbiotiques avec qui ils sont en interaction étroite. Selon le mode de transmission du symbiote, ce dernier va être en conflit d'intérêt plus ou moins intense avec l'hôte pour l'expression du phénotype, conduisant parfois le symbiote à évoluer vers la manipulation du phénotype de l'hôte. Nous avons tenté d'identifier différents facteurs génétiques et environnementaux influençant l'expression et l'évolution de la manipulation chez l'insecte parasitoïde de larves de drosophiles, *Leptopilina boulardi*, et son virus manipulateur du comportement, LbFV. Ce virus bénéficie d'une transmission mixte, verticale et horizontale, cette dernière étant favorisée par l'induction de superparasitisme induite par le virus. L'étude de la contribution du génotype du parasitoïde dans l'expression de la manipulation a révélé la présence de gènes de résistance partielle à la manipulation. Le potentiel évolutif de cette résistance a ensuite été évalué par des expériences d'évolution expérimentale. Nous avons également montré que LbFV augmente la virulence du parasitoïde envers les larves de drosophiles, révélant ainsi une évolution vers une forme de mutualisme sur ce trait. Par ailleurs, le travail montre qu'un même parasitoïde peut être non seulement infecté par plusieurs souches du virus LbFV mais également infecté par un virus à ARN, décrit pour la première fois dans cette thèse. La transmission verticale, la prévalence élevée et les forts effets phénotypiques de ce virus soulignent de nouveau l'importance des virus dans l'expression du phénotype en population naturelle.

TITLE : Expression and evolution of the extended phenotype in a parasitoid-virus association

SUMMARY :

The expression of the phenotype of an individual depends partly on the presence of symbiotic organisms with which it engages in intimate interactions. According to the symbiont's mode of transmission, the conflict of interest between the host and its symbiont for the expression of the phenotype can be more or less stronger, sometimes leading to the evolution of manipulation of the host phenotype by the symbiont. We attempted to identify different genetic and environmental factors influencing the expression and the evolution of manipulation in the *Drosophila* parasitoid wasp, *Leptopilina boulardi*, and its behaviour-manipulating virus, LbFV. The virus undergoes both vertical and horizontal transmission, the latter being favoured by the induction of superparasitism behaviour by the virus. The study of the contribution of the parasitoid genotype to the expression of the manipulation revealed a polymorphism in the resistance to the manipulation. The evolutionary potential of this resistance was then investigated using a protocol of experimental evolution. We also demonstrated that LbFV increases the virulence of the parasitoid towards its *Drosophila* host, revealing a form of mutualistic interaction on this trait. Additionally, we showed that an individual parasitoid can be coinfecting by several LbFV strains but also by an RNA virus, described for the first time in this thesis. The vertical transmission, the high prevalence and the strong phenotypic effects of this new virus further highlights the importance of viruses in the expression of the phenotype in natural populations.

DISCIPLINE : Écologie, Évolution

Mots clés : *Leptopilina boulardi*, parasitoïde de drosophile, virus, phénotype étendu, manipulation du comportement, symbiose, interactions hôte-parasite.

Keywords : *Leptopilina boulardi*, *Drosophila* parasitoid, virus, extended phenotype, behavioural manipulation, symbiosis, host-parasite interactions.

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR CNRS 5558
Bâtiment Grégor Mendel, Université Claude Bernard Lyon 1
43 boulevard du 11 novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
I. La symbiose, un continuum de relations.....	2
II. Les symbiotes, une valeur génétique ajoutée dans l'expression du phénotype	3
III. Phénotype étendu : quelle est la contribution relative de l'hôte et du symbiote ? ...	4
IV. Le phénotype étendu : une adaptation au mode de transmission ?	6
Les différents modes de transmission.....	6
La corrélation des fitness ou la lutte pour le phénotype optimal.....	7
V. Quelles sont les réponses de l'hôte à la manipulation ?	9
VI. Quel phénotype étendu en cas d'infections multiples ?	11
Tragédie des biens communs et action collective	11
Infections multiples et mode de transmission.....	13
VII. Phénotype étendu : vers un phénotype multidimensionnel.....	14
Des conflits d'intérêts dans les associations mutualistes.....	14
Des alignements d'intérêts dans les associations parasitaires	14
VIII. L'organisme : une arène de conflit et de coopération	15
Chapitre 1. Présentation de la symbiose <i>Leptopilina bouvardi</i>-LbFV	19
I. Le phénotype étendu chez <i>Leptopilina bouvardi</i>	19
II. Autres caractéristiques biologiques du modèle <i>L. bouvardi</i> -virus.....	25
Structure, réplication et génome des particules virales.....	25
Autres effets phénotypiques de l'infection par LbFV	26
Prévalence de LbFV dans les populations naturelles.....	27
III. Problématique.....	28
IV. Origine des lignées de parasitoïdes utilisées.....	29
V. Principaux protocoles expérimentaux.....	30
Quantification de l'intensité du superparasitisme	30
Transfert horizontal de LbFV.....	31
Détection de l'infection par LbFV	32
Mesure des traits de fitness du parasitoïde	32
Chapitre 2. Effet du génotype de l'insecte dans l'expression du phénotype étendu	37
Synthèse	37
Manuscrit 1	41

Chapitre 3. Evolution expérimentale du phénotype étendu via le compartiment nucléaire	55
Introduction.....	55
Matériel et méthodes	57
Résultats.....	62
Discussion.....	70
Chapitre 4. Contribution du génotype de LbFV à la variabilité du phénotype étendu	77
Introduction.....	77
Matériel et méthodes	78
Résultats / Discussion	80
Chapitre 5. Infections multiples et compétition entre souches virales	87
Synthèse	87
Manuscrit 2	90
Chapitre 6. Description d'un nouveau virus à ARN chez <i>L. bouhardi</i>: transmission, prévalence et interactions avec LbFV	117
Synthèse	117
Manuscrit 3	120
Chapitre 7. Rôle de LbFV dans l'interaction parasitoïde-drosophile	153
Synthèse	153
Manuscrit 4	155
Discussion générale.....	183
L'étude du phénotype étendu à une échelle micro-évolutive.....	184
Polymorphisme et déterminants fonctionnels du phénotype étendu	187
Coopération et tricherie dans l'effort de manipulation	189
Interactions entre symbiotes et communauté symbiotique	191
Apport de bénéfice dans les associations parasitaires.....	193
Conclusion	195
References	199
ANNEXES.....	209
Annexe 1	211
Annexe 2	225

Introduction générale

Introduction générale

Le phénotype regroupe tout caractère observable d'un individu qui résulte de l'expression de ses gènes dans un environnement donné. Il est le fruit d'un long processus évolutif mêlant hasard et sélection naturelle. Seuls les gènes, qui sont transmis au fil des générations, peuvent offrir une prise à la sélection et ainsi participer à l'adaptation des organismes. Or l'environnement dans lequel s'expriment les gènes de l'individu peut également être de nature génétique si l'on y intègre les innombrables interactions qui s'établissent entre les êtres vivants (Moore *et al.* 1997 ; Shuster *et al.* 2006 ; Lambrechts *et al.* 2006). Dans ce contexte, le phénotype d'un individu ne dépend alors plus seulement de son propre patrimoine génétique mais aussi de celui des organismes avec lesquels il interagit. Ces interactions peuvent être si intimes qu'il est parfois difficile de savoir au premier abord si le phénotype observé résulte de l'expression des gènes de l'individu ou de gènes issus de son environnement (Poulin 1995).

La majorité, si ce n'est la totalité, des êtres vivants vivent en symbiose, soit parce qu'ils constituent un habitat favorable et une ressource pour d'autres espèces, soit parce qu'ils vivent eux-mêmes sur ou à l'intérieur d'autres organismes (Combes 1995, Poulin *et al.* 2011). Telle qu'elle est définie au sens large par Heinrich Anton de Bary (1879), la symbiose regroupe toute association étroite entre espèces différentes, qu'elle soit de type parasitaire ou mutualiste, dès lors qu'elle s'établit dans la durée, à l'échelle du cycle de vie des organismes. Dans une symbiose donnée, on distingue généralement l'hôte, qui constitue l'habitat, et le symbiote qui exploite cet habitat. Le caractère durable de ces interactions implique que les deux partenaires peuvent influencer mutuellement l'expression de leurs gènes. Ainsi, les symbioses ou interactions durables (Combes 1995) se distinguent des autres relations interspécifiques telles que les relations proie-prédateur qui n'impliquent que des interactions ponctuelles entre les partenaires. Le fait que la vie en symbiose soit associée à des modifications majeures du phénotype des partenaires en interaction illustre le concept de « phénotype étendu » énoncé par Richard Dawkins (1982). Au sens large, le phénotype étendu est défini comme l'action des gènes d'un organisme au-delà même de celui-ci, c'est-à-dire sur son environnement. Un exemple frappant de l'existence du phénotype étendu est celui des constructions animales telles que les barrages de castors ou encore les termitières. L'apparition de telles constructions est le fruit de l'évolution du comportement animal, autrement dit

des gènes qui sont à l'origine de ce comportement. Lorsque l'environnement d'un être vivant est un autre organisme, le phénotype étendu caractérise alors toutes modifications du phénotype de l'hôte par son symbiote et inversement. Ces modifications ayant une base génétique, puisqu'elles résultent de l'interaction des génomes des deux partenaires, elles offrent un terrain propice à l'évolution de la coopération ou du conflit entre partenaires pour l'expression du phénotype optimal.

Au cours de ce travail de thèse, je me suis intéressé aux facteurs environnementaux et génétiques qui influencent l'expression et l'évolution du phénotype étendu dans les associations symbiotiques. Dans cette partie introductive, j'exposerai les concepts fondamentaux de la symbiose et ferai une analyse détaillée des contraintes sélectives qui agissent sur le phénotype étendu.

I. La symbiose, un continuum de relations

Si les symbiotes bénéficient en général de la symbiose parce qu'ils doivent passer tout ou partie de leur cycle de vie associés à un hôte, il n'en va pas toujours de même pour les hôtes. Ainsi, on peut classer les associations symbiotiques en fonction du rapport coût-bénéfice de la symbiose pour l'hôte. Dans la mesure où, pour se multiplier, un symbiote doit consommer une partie des ressources énergétiques de l'hôte, on s'attend à ce que la symbiose présente forcément un coût pour ce dernier. Seulement, d'un point de vue évolutif, c'est la balance nette entre les coûts et les bénéfices qui est importante. Lorsque le symbiote est capable d'apporter un bénéfice supérieur au coût de sa multiplication, l'infection va se traduire par une augmentation de la valeur sélective ou fitness de l'hôte. Dans ce cas le bénéfice est réciproque et on parle de mutualisme. A l'inverse, si le bilan de l'association est négatif pour l'hôte et que seul le symbiote présente une augmentation de sa fitness, on parle de parasitisme. On peut enfin imaginer que les bénéfices apportés par le symbiote soient de même ampleur que les coûts qu'il inflige. Dans ce cas précis, la présence du symbiote n'a plus aucun effet sur la fitness de son hôte et on parle de commensalisme.

Ce rapport coût-bénéfice peut dépendre des conditions environnementales, le même symbiote pouvant être mutualiste ou parasite dans des environnements différents. De plus, les associations ne sont pas figées dans le temps, un mutualiste pouvant évoluer vers le parasitisme et inversement (Sachs & Simms 2006 ; Douglas 2008). Ainsi on parle de continuum parasitisme-commensalisme-mutualisme pour

englober l'ensemble des associations symbiotiques, chacune pouvant changer de position, dans le temps et dans l'espace, le long de ce continuum.

II. Les symbiotes, une valeur génétique ajoutée dans l'expression du phénotype

Les organismes eucaryotes hébergent une large diversité de symbiotes tels que des vers parasites, des bactéries, des champignons ou encore des virus (Buchner 1965 ; O'Neill *et al.* 1997 ; Thomas *et al.* 2005). Ces symbiotes sont capables d'induire chez l'hôte des changements physiologiques, morphologiques ou même comportementaux, et peuvent donc avoir un rôle primordial dans l'expression du phénotype.

De nombreux groupes taxonomiques dépendent directement pour leur survie de microorganismes symbiotiques. Par exemple, les insectes piqueurs-suceurs se nourrissant de ressources carencées, telles que la sève phloémienne des plantes ou encore le sang des mammifères, hébergent des symbiotes bactériens qui synthétisent les compléments alimentaires dont ils ont besoin (Moran & Degnan 2006 ; Douglas 2009). La digestion chez les mammifères dépend également largement de la contribution de flores bactériennes ou de protozoaires permettant l'assimilation des nutriments par l'organisme (Mackie 2002). Plus généralement, tous les organismes eucaryotes possèdent dans leurs cellules des organelles appelées mitochondries, dont ils dépendent pour pratiquer la respiration cellulaire, et qui sont le résultat de l'acquisition ancienne d'un symbiote bactérien (Margulis 1993). Dans ces associations bénéfiques pour l'hôte, la coopération entre partenaires a parfois conduit à l'évolution de nouvelles structures morphologiques. Par exemple, certains hôtes développent des structures anatomiques uniquement dédiées à l'hébergement des symbiotes (Nardon & Nardon 1998). C'est le cas chez les plantes Fabacées possédant sur leurs racines des nodosités qui sont colonisées par des bactéries fixatrices d'azote du genre *Rhizobium* (Masson-Boivin *et al.* 2009). Des exemples similaires existent chez certains insectes comme les charançons du genre *Sitophilus* qui sont dotés de bactériomes, de véritables sacs à bactéries, hébergeant des symbiotes nutritionnels (Nardon *et al.* 2002). Pour certaines de ces structures anatomiques, on a pu montrer que leur ontogénèse dépendait d'un dialogue moléculaire complexe entre l'hôte et son symbiote (Oldroyd *et al.* 2011).

Parallèlement, les hôtes représentent un habitat pour de nombreux symbiotes parasites. Outre les effets négatifs des parasites sur la survie des hôtes dus à leur multiplication à l'intérieur de ce dernier, des phénotypes complexes ont pu apparaître

au cours de l'histoire évolutive des associations hôte-parasite. Toutes modifications du phénotype de l'hôte améliorant la multiplication ou la transmission du parasite sont susceptibles d'être sélectionnées dans le génome du parasite (Brown 2005). Certains parasites sont par exemple capables de castrer leur hôte, conduisant ainsi à une ré-allocation d'énergie vers les fonctions favorisant la multiplication des parasites (Ebert *et al.* 1998 ; Sorensen *et al.* 2001). D'autres encore induisent des phénotypes spectaculaires tels que des manipulations du comportement augmentant la probabilité de transmission des parasites (Bakker *et al.* 1997 ; Thomas & Poulin 1998 ; Biron *et al.* 2005). Les parasites à cycle complexe (hétéroxènes) qui doivent passer par plusieurs espèces hôtes pour accomplir l'intégralité de leur cycle de vie ont été parmi les plus étudiés. Les acanthocéphales ont par exemple pour hôte intermédiaire un crustacé amphipode et sont capables d'altérer son phototactisme ou encore son géotactisme, le rendant beaucoup plus vulnérable à la prédation par l'hôte vertébré définitif (Moore 2002, Lagrue *et al.* 2007). Les manipulations du comportement se retrouvent également chez des parasites à cycle simple (holoxènes) n'infectant qu'une espèce hôte. Chez le papillon *Helicoverpa zea*, Hz-2V, un virus transmis sexuellement rend les femelles infectées plus attractives pour les mâles, ces dernières émettant plus de phéromones sexuelles que les femelles non infectées et pratiquant le chant nuptial même après s'être accouplées (Burand *et al.* 2004, 2005).

Ainsi, la présence d'un symbiote peut modifier profondément le phénotype de l'hôte et peut donc être vue comme l'apport d'un « kit de gènes » prêt à l'emploi (Nardon & Grenier 1993). Cette valeur génétique ajoutée peut, soit conférer un avantage direct aux hôtes infectés soit, au contraire, diminuer leur valeur sélective par rapport aux hôtes non-infectés comme dans le cas de la manipulation. Le phénotype étendu complexifie le lien entre le génotype de l'hôte et son phénotype, altérant ainsi l'efficacité de la sélection naturelle sur les gènes de l'hôte (Poulin & Thomas 1999). La variabilité phénotypique supplémentaire qui découle de la présence/absence du symbiote va donc avoir des conséquences majeures sur l'adaptation des populations hôtes (Hochberg *et al.* 1992 ; Lefèvre *et al.* 2008; Oliver *et al.* 2010).

III. Phénotype étendu : quelle est la contribution relative de l'hôte et du symbiote ?

Quantifier le potentiel évolutif d'une population nécessite de distinguer les contributions relatives des effets génétiques et environnementaux dans l'expression du

phénotype. Dans un contexte symbiotique, une partie des effets environnementaux sont génétiquement déterminés lorsqu'ils correspondent à l'acquisition d'un symbiote. D'une part, l'infection par un symbiote crée des différences phénotypiques entre hôtes infectés et non infectés. D'autre part, parmi les hôtes infectés, la variabilité du phénotype étendu qui résulte de l'interaction des partenaires peut être décomposée selon l'équation suivante :

$$V_P = V_{Gh} + V_{Gs} + COV_{Gh \times Gs} + V_E$$

- V_P est la variance totale observée sur le phénotype étendu. Elle se décompose en variance due aux effets des gènes de l'hôte et du symbiote, V_{Gh} et V_{Gs} , en covariance due aux effets d'interaction entre les gènes des deux partenaires, $COV_{Gh \times Gs}$, et en variance due aux effets de l'environnement, V_E . Dans ce modèle on négligera les interactions entre les effets des gènes et ceux de l'environnement ($COV_{G \times E}$).

- V_{Gh} désigne la contribution des gènes de l'hôte à la variance du phénotype étendu. Elle regroupe les effets génétiques additifs, les interactions entre différents allèles d'un même locus (dominance) ainsi que les interactions entre différents loci (épistasie). Ces effets qui dépendent uniquement des gènes de l'individu hôte sont communément appelés effets génétiques directs (DGE pour « direct genetic effects », Moore *et al.* 1997).

- V_{Gs} correspond la à contribution des gènes du symbiote. Elle peut également être décomposée en variance additive, de dominance (dans le cas d'un symbiote diploïde) et d'épistasie. Dans ce cas, on peut parler d'effets génétiques indirects (IGE pour « indirect genetic effects », Moore *et al.* 1997) ou encore d'effets génétiques indirects interspécifiques (IIGE pour « interspecific IGE », Shuster *et al.* 2006) puisque les gènes associés proviennent d'une espèce différente de celle de l'hôte.

- $COV_{Gh \times Gs}$ est la covariance due à l'interaction entre DGE et IIGE (Wolf 2003). Cela signifie que l'expression du phénotype étendu peut dépendre de la combinaison du génotype hôte et du génotype symbiote (Lambrechts 2010). Certains auteurs parlent d'épistasie intergénomique pour qualifier ce type d'effets (Dowling *et al.* 2007; Heath 2009). Chez la luzerne *Medicago truncatula*, l'effet conféré par *Sinorhizobium meliloti*, une bactérie fixatrice d'azote, peut aller du mutualisme à l'absence totale de bénéfice en fonction de la combinaison des génotypes hôte et symbiote en interaction (Heath 2009).

Les interactions entre les génotypes de l'hôte et du symbiote peuvent ainsi contribuer à rendre floue la barrière entre mutualisme et parasitisme.

L'expression du phénotype étendu va donc dépendre des contributions relatives de chacune des composantes ci-dessus. Toute variabilité génétique présente chez l'hôte et/ou le symbiote va potentiellement offrir une prise à la sélection naturelle si elle se traduit par des différences sur le phénotype étendu. On voit ainsi que le phénotype étendu est au cœur de la coévolution hôte-symbiote puisque chaque partenaire va pouvoir en influencer la trajectoire.

IV. Le phénotype étendu: une adaptation au mode de transmission ?

Les différents modes de transmission

Pour envahir et se maintenir dans une population d'hôtes, les symbiotes doivent passer à travers les mailles de différents filtres sélectifs et notamment le filtre de rencontre qui détermine la probabilité qu'un symbiote entre en contact avec un hôte potentiel (Combes 1995). La sélection conduit les symbiotes à ouvrir le filtre de rencontre, c'est-à-dire à augmenter leurs chances de transmission entre les hôtes.

Alors que les gènes de l'hôte sont transmis verticalement, c'est-à-dire de parents à descendants, les symbiotes peuvent emprunter différentes voies pour passer d'un hôte à l'autre. Certains symbiotes sont transmis verticalement, comme les gènes de l'hôte, et participent donc directement à l'héritabilité des caractères. La transmission verticale peut se faire via les deux parents ou uniquement par les mâles, mais dans le cas le plus fréquent, seules les mères sont capables de transmettre l'infection. On distingue deux types de transmission maternelle : la transmission transovarienne où le symbiote est présent à l'intérieur de l'œuf hôte dès les stades les plus précoces, et la transmission « pseudo-verticale » où les descendants hôtes acquièrent le symbiote secondairement via l'environnement maternel. Chez le puceron *Acyrtosiphon pisum*, le symbiote nutritionnel *Buchnera aphidicola* pénètre directement dans les embryons pendant les premiers stades de leur ontogénèse (Braendle *et al.* 2003). Chez la punaise *Megacopta punctatissima*, les descendants naissent sans symbiotes mais s'infectent par la consommation de capsules déposées préalablement par la mère dans l'environnement proche (Hosokawa *et al.* 2007). Dans les deux situations on parlera de symbiotes « hértables » puisque les descendants héritent des symbiotes de leurs parents.

Une autre grande voie de transmission chez les symbiotes est la transmission horizontale. Dans ce cas, la transmission des symbiotes est complètement indépendante de celles des gènes de l'hôte et peut se réaliser entre individus non-apparentés. Cette transmission horizontale peut se faire par contact entre les hôtes ou indirectement via l'environnement comme c'est le cas chez de nombreux pathogènes. Chez les parasites à cycle complexe, la transmission horizontale peut se faire d'une proie à son prédateur lorsque celui-ci consomme sa proie. C'est le cas de certains trématodes, des vers parasites utilisant comme hôte intermédiaire un mollusque ou un insecte et comme hôte définitif un vertébré (Esch *et al.* 2002). Enfin certains symbiotes sont transmis à la fois verticalement et horizontalement.

La corrélation des fitness ou la lutte pour le phénotype optimal

Parce qu'il définit le filtre de rencontre, le mode de transmission va jouer un rôle primordial dans l'évolution du phénotype étendu et donc de la symbiose le long du continuum parasitisme-commensalisme-mutualisme. En fonction du mode de transmission des symbiotes, la corrélation entre la fitness de l'hôte et celle du symbiote va être plus ou moins forte. Cette corrélation des fitness va déterminer l'intensité du conflit d'intérêt entre les partenaires pour la transmission des gènes et donc pour l'expression des traits de fitness.

Selon la métaphore de "l'équipe de rameurs" énoncée par Richard Dawkins (1976), des gènes partageant un destin commun voient leurs intérêts "égoïstes" s'aligner. Cet alignement d'intérêts se retrouve dans les associations où l'hôte est infecté par un symbiote à transmission verticale. Dans ce cas le symbiote bénéficie directement de la reproduction de son hôte et tout bénéfice supplémentaire apporté à l'hôte va directement en faire profiter le symbiote. Les fitness des deux partenaires étant corrélées positivement, on s'attend à ce que les symbiotes à transmission verticale évoluent vers l'avirulence, voire le mutualisme (Fine 1975 ; Ewald 1987). La bactérie *Hamiltonella defensa* est un symbiote de puceron transmis verticalement qui confère à ce dernier une résistance aux attaques de parasitoïdes (Oliver *et al.* 2003 ; Vorburger *et al.* 2009). Ce bénéfice permet ainsi à la bactérie de se répandre dans la population de pucerons lorsque cette dernière est soumise aux attaques de parasitoïdes (Oliver *et al.* 2008).

Dans le cas d'une transmission uniquement maternelle du symbiote, l'alignement d'intérêts entre les partenaires symbiotiques n'est cependant que partiel puisque, du point de vue du symbiote, les mâles sont des impasses évolutives. L'hôte et le symbiote

sont alors en conflit pour la production de femelles. Dans ce contexte, une voie évolutive alternative à l'apport de bénéfices est de favoriser la production de femelles infectées (Hurst *et al.* 1993 ; Werren & Beukeboom 1998). Un exemple frappant est celui de la bactérie *Wolbachia*, très répandue chez les arthropodes chez qui elle exerce toutes sortes de manipulations de la reproduction telles que la féminisation des mâles (Rigaud 1997), la parthénogénèse thélytoque (Weeks & Breeuwer 2001 ; Giorgini *et al.* 2010) ou encore le male-killing (Hurst *et al.* 1999). Ces trois types de manipulations conduisent à une augmentation du nombre ou de la qualité des femelles dans la descendance des femelles infectées, permettant ainsi à la bactérie d'envahir les populations hôtes (Engelstädter & Hurst 2009). Un autre type de manipulation exercé par *Wolbachia* est l'incompatibilité cytoplasmique (IC). Dans sa forme la plus simple, l'IC se traduit par une stérilité des femelles non-infectées lorsque celles-ci s'accouplent avec des mâles infectés (Bourtzis *et al.* 1996). Les femelles infectées pouvant s'accoupler quelque soit le statut d'infection des mâles, elles sont donc avantagées par rapport aux femelles non-infectées, permettant ainsi à la bactérie d'atteindre de fortes prévalences.

Chez les symbiotes à transmission horizontale, le conflit d'intérêt entre l'hôte et son symbiote pour la transmission des gènes est encore plus marqué. On s'attend donc à ce que la virulence soit plus élevée qu'en cas de transmission verticale, sous l'hypothèse qu'une virulence accrue s'accompagne d'une meilleure transmission (Alizon *et al.* 2009). Ainsi, ces symbiotes vont le plus souvent évoluer vers le parasitisme (Ewald 1987, Anderson & May 1979). En plus de la virulence due à la multiplication intra-hôte des parasites, ces derniers vont être avantagés par toutes modifications induites sur le phénotype de l'hôte qui favoriseraient leur transmission. On connaît de nombreux exemples de ces mécanismes de favorisation, telles que les manipulations du comportement. Par exemple, chez les parasites hétéroxènes à transmission trophique, l'hôte intermédiaire montre souvent des comportements « aberrants » comme la prise de risque vis-à-vis des prédateurs (Carney 1969 ; Poulin 1994 ; Lamberton *et al.* 2008). Les prédateurs étant les hôtes définitifs des parasites, on comprend que les parasites aient intérêt à rendre leur hôte intermédiaire plus vulnérable à la prédation.

Chez les symbiotes à transmission mixte, les contributions relatives des transmissions verticale et horizontale vont jouer un rôle important dans l'évolution de l'association (Lipsitch *et al.* 1995, 1996). Plusieurs expériences d'évolution expérimentale montrent en effet que si l'on contraint la transmission à être verticale, le symbiote évolue vers l'avirulence, et à l'inverse si la transmission horizontale est favorisée, la virulence du symbiote augmente (Bull *et al.* 1991 ; Stewart *et al.* 2005 ;

Sachs & Wilcox 2006). La corrélation des fitness entre les partenaires peut ainsi varier en fonction des conditions écologiques et conduire à des changements de positions de l'association le long du continuum parasitisme-commensalisme-mutualisme.

V. Quelles sont les réponses de l'hôte à la manipulation ?

Lorsque le phénotype étendu associé à l'infection par un symbiote est coûteux pour l'hôte, ce dernier va être sélectionné pour limiter l'impact négatif du symbiote sur sa fitness. Différentes stratégies adaptatives peuvent évoluer, la première étant la stratégie d'évitement de l'infection qui consiste à diminuer la probabilité d'entrer en contact avec le symbiote. De nombreux exemples suggèrent en effet que les hôtes ont pu développer des comportements d'évitement, par exemple en limitant les contacts avec d'autres individus infectés (Hart 1990 ; Thieltges & Poulin 2001). Lorsque le contact avec le parasite ne peut être évité, il existe deux autres stratégies, non mutuellement exclusives, appelées résistance à l'infection et tolérance à l'infection (Råberg *et al.* 2009 ; Svensson & Råberg 2010).

La résistance à l'infection consiste en l'élimination active des parasites et conduit à la diminution de la densité en parasites au sein de l'hôte voire à leur élimination totale. La résistance à l'infection peut impliquer des mécanismes aussi divers que le système immunitaire, l'automédication, les comportements d'épouillage ou encore la fièvre comportementale (Clayton & Wolfe 1993 ; Adamo 1998 ; Lozano 1998). Lefèvre *et al.* (2011) ont par exemple mis en évidence un polymorphisme de résistance à l'infection chez le papillon *Danaus plexippus* infecté par le protozoaire parasite *Ophryocystis elektroscirrha*. Les variations de résistance observées sont à la fois qualitatives (proportion d'hôtes infectés après exposition au parasite) et quantitatives (densité intra-hôte en parasites). Dans le cas de parasites à transmission verticale tels que les manipulateurs de la reproduction, la résistance peut se traduire par une diminution de l'efficacité de la transmission verticale. Chez le crustacé isopode *Armadillidium vulgare*, la bactérie *Wolbachia* induit une féminisation des mâles dans la descendance des femelles infectées (Bouchon *et al.* 1998). Les mâles génétiques se développent en femelles fonctionnelles et peuvent ainsi transmettre la bactérie. Les gènes nucléaires étant sélectionnés pour produire une sex-ratio équilibrée, toute adaptation de l'hôte conduisant à l'élimination de la bactérie va donc être sélectionnée (Werren *et al.* 1998). Rigaud & Juchault (1992) ont ainsi mis en évidence des déterminants nucléaires

rétablissant la production de mâles chez les femelles infectées via une diminution du taux de transmission verticale de la bactérie.

La tolérance à l'infection permet également de diminuer l'impact négatif d'une infection sans toutefois conduire à l'élimination du parasite ou à la diminution de sa densité intra-hôte. Cette tolérance peut impliquer directement les traits associés à la manipulation. En effet, diminuer l'intensité de la manipulation est une façon de limiter les coûts liés à l'infection. La tolérance peut donc s'exprimer par une forme de résistance à la manipulation, qu'il ne faut pas confondre avec une résistance à l'infection. Franceschi *et al.* (2010) ont par exemple mis en évidence que les populations de l'amphipode *Gammarus pulex* naturellement exposées à l'acanthocéphale *Pomphorhynchus laevis* étaient moins sensibles à la manipulation exercée par ce dernier qu'une population indemne de parasite. Cette différence dans l'intensité de la manipulation n'était de plus pas associée à des variations de densité intra-hôte en parasites, suggérant un réel mécanisme de tolérance. Chez le papillon *Hypolimnas bolina*, certaines populations sont infectées par une souche de *Wolbachia* induisant du male-killing, une manipulation conduisant à une sex-ratio biaisée en faveur des femelles dans la descendance des femelles infectées (Charlat *et al.* 2005). Cependant, d'autres populations également infectées par la même souche de *Wolbachia* ne présentent aucun biais de sex-ratio. Ces dernières possèdent en fait un allèle dominant qui supprime l'action du male-killer sans empêcher l'infection (Hornett *et al.* 2006). Des observations sur le terrain ont permis d'estimer que dans une population insulaire, la proportion de mâles était passée de 1 à 50 % en l'espace de dix générations sans perte de l'infection, suggérant la propagation des gènes de résistance à la manipulation (Charlat *et al.* 2007). Pour conclure à un réel mécanisme de tolérance chez *H. bolina*, il faudrait cependant vérifier que la résistance à la manipulation ne se traduit pas par une diminution de la densité intra-hôte en *Wolbachia*, auquel cas on parlerait alors de résistance à l'infection.

Ensuite, la tolérance peut impliquer un trait différent de celui qui est la cible de la manipulation. En effet, la plasticité phénotypique des hôtes peut permettre la compensation du coût de la manipulation par un changement phénotypique sur un autre trait (Poulin 1995). Chez *Drosophila nigrospiracula*, les mâles infectés par l'ectoparasite *Macrocheles subbadius* vivent moins longtemps mais parodent et s'accouplent d'avantage. Ce changement comportemental pourrait être une réponse compensatoire des mâles leur permettant de minimiser l'effet négatif d'une durée de vie raccourcie (Polak & Starmer 1998).

Une hypothèse intéressante développée par Lefèvre *et al.* (2008) est que certains parasites pourraient avoir été sélectionnés pour exploiter les réponses compensatoires de leur hôte. En effet, certaines compensations de l'infection peuvent être bénéfiques non seulement pour l'hôte mais aussi pour le parasite. Chez les insectes hématophages vecteurs de parasites, il est souvent noté une augmentation du taux de nourrissage ou encore un allongement de la durée de nourrissage lorsque les insectes sont infectés par le parasite (Hurd 2003 ; Lefèvre & Thomas 2008). Dans les cas où les mécanismes sont connus, cette modification du comportement de nourrissage est provoquée par un blocage mécanique des pièces buccales ou par des modifications physiologiques dans les glandes salivaires de l'insecte (Ribeiro *et al.* 1985 ; Rogers & Bates 2007). Ainsi, les insectes compenseraient l'effet direct du parasite en se nourrissant plus fréquemment ou plus longtemps, conduisant inévitablement à multiplier les opportunités de transmission du parasite lors des repas sanguins.

Dans les cas de résistance à l'infection et de tolérance par résistance à la manipulation, la réponse de l'hôte est coûteuse pour le parasite puisqu'elle diminue son taux de transmission. Le parasite est alors à son tour sélectionné pour contourner ou supprimer les réponses de l'hôte. Les pressions de sélection antagonistes qui agissent sur l'hôte et le parasite peuvent ainsi conduire à une véritable « course aux armements » dans laquelle les deux partenaires sont engagés dans une lutte perpétuelle d'adaptations et de contre-adaptations (van Valen 1973). Dans le cas de la résistance à la manipulation (tolérance), cette course aux armements va pouvoir s'exprimer directement sur l'expression du phénotype étendu.

VI. Quel phénotype étendu en cas d'infections multiples ?

Tragédie des biens communs et action collective

Si le mode de transmission des symbiotes est un facteur clé dans l'évolution du phénotype étendu (Fine 1975; Ewald 1987; Hurst *et al.* 1993 ; Lipsitch *et al.* 1996), l'existence des infections multiples peut aussi profondément altérer l'issue de l'association hôte-symbiote. De nombreux modèles théoriques sur l'évolution de la virulence des parasites prédisent une augmentation de la virulence lorsque plusieurs souches de parasites peuvent infecter un même individu hôte (Nowak & May 1994; May & Nowak 1995; van Baalen & Sabelis 1995; Read & Taylor 2001; Gandon *et al.* 2002). Lorsque plusieurs souches de parasites sont en compétition pour les mêmes ressources limitées, cela peut conduire au problème de « tragédie des biens communs » énoncée

par Hardin en 1968. Dans ce contexte, il y a un conflit entre un intérêt individuel à exploiter au maximum la ressource et l'intérêt du groupe à exploiter la ressource de manière prudente. En effet, à l'échelle du groupe, plus la virulence est faible, plus la durée de l'infection est grande. Une durée d'infection plus longue peut permettre aux parasites de se transmettre efficacement tout au long de la vie de l'hôte infecté, maximisant ainsi leurs chances de transmission. En revanche, un taux de multiplication élevé va permettre à une souche de parasite donnée d'éliminer rapidement ses compétiteurs au sein de l'hôte infecté, même si cela se traduit par une plus grande mortalité de l'hôte, réduisant ainsi les opportunités de transmission à un nouvel hôte. Ainsi, la compétition intra-hôte entre les parasites va favoriser les souches qui se multiplient plus rapidement, conduisant inévitablement à l'augmentation de la virulence et donc à la surexploitation des ressources de l'hôte (Frank 1996a).

Cependant, ces modèles considèrent uniquement la trajectoire évolutive des traits spécifiques de chaque souche de parasite comme le taux de multiplication mais ne prédisent pas l'évolution de traits dépendants d'une action collective comme la manipulation du phénotype de l'hôte (Brown 1999). Or, la manipulation peut être vue comme la production d'un bien commun qui est coûteuse pour l'individu parasite qui l'exprime, mais dont les bénéfices sont partagés par toutes les souches de parasites infectant le même individu hôte (si elles partagent le même mode de transmission). Le partage des bénéfices offre un contexte favorable à l'évolution de parasites tricheurs, profitant de l'action collective des parasites manipulateurs, sans payer le coût de la production de la manipulation (Olson 1965 ; Brown *et al.* 2002 ; Buckling & Brockhurst 2008). La présence de tricheurs a pour effet d'augmenter le coût de l'expression de la manipulation pour les parasites qui coopèrent dans l'effort collectif et peut conduire à des niveaux de manipulation plus faibles qu'en l'absence de tricheurs (Vickery & Poulin 2010). L'intensité de la manipulation est ainsi le résultat d'une tension entre la sélection inter-hôte favorisant une intensité de manipulation optimale et la sélection à l'échelle intra-hôte favorisant un effort de manipulation plus faible (Brown 1999). Ainsi, du point de vue de la population de symbiotes, la manipulation peut être vue comme un trait altruiste (Hamilton 1964) et va donc obéir aux mêmes contraintes sélectives. En particulier, un faible coefficient d'apparentement entre les parasites infectant un même hôte va représenter une barrière à l'évolution de la manipulation (Vickery & Poulin 2010).

Infections multiples et mode de transmission

Dans le cas de symbiotes ayant le même mode de transmission nous avons vu que l'évolution de la tricherie était une issue possible. La coinfection d'un même individu hôte par des symbiotes utilisant des modes de transmission différents offre un autre contexte favorable au conflit d'intérêts entre parasites pour l'exploitation optimale de l'hôte (Lafferty 1999). Le crustacé *Gammarus pulex* est par exemple un hôte intermédiaire pour deux espèces d'acanthocéphales, *Pomphorhynchus laevis* et *Polymorphus minutus*. Or ces deux parasites ont des hôtes définitifs différents, *P. laevis* terminant son cycle de vie chez un poisson (Bauer *et al.* 2000) et *P. minutus* chez un oiseau (Bauer *et al.* 2005). *P. laevis* altère le phototactisme des crustacés, tandis que *P. minutus* altère leur géotactisme. Les deux parasites modifient ainsi la répartition spatiale des crustacés dans la colonne d'eau de façon différente, en concordance avec leur hôte définitif (Cézilly *et al.* 2000). Les crustacés infectés par les deux parasites expriment un phénotype étendu intermédiaire entre les mono-infectés par *P. laevis* et les mono-infectés par *P. minutus* (Cézilly *et al.* 2000). Ce résultat met en évidence le coût associé à la coinfection pour les deux parasites. Pour un symbiote donné, Lafferty *et al.* (2000) ont défini trois adaptations possibles à ce type de conflit : (i) éviter d'infecter des hôtes déjà infectés par le symbiote conflictuel ; (ii) éliminer ce dernier ; (iii) augmenter ses aptitudes compétitives afin de prendre le contrôle de l'hôte (stratégie du « hijacking »). Thomas *et al.* (2002) ont introduit une stratégie supplémentaire, celle du « sabotage » consistant à supprimer la manipulation exercée par le symbiote conflictuel. Par exemple, un symbiote à transmission verticale qui aurait donc intérêt à garder son hôte en bonne santé sera en conflit avec un symbiote à transmission horizontale manipulant le phénotype de l'hôte pour sa propre transmission. Le crustacé *Gammarus roeseli* est à la fois l'hôte de *P. minutus* (Bauer *et al.* 2005) et de microsporidies transmises verticalement (Haine *et al.* 2005). La manipulation comportementale exercée par *P. minutus* est en grande partie supprimée en présence de microsporidies, en accord avec l'hypothèse de sabotage.

Le mécanisme de sabotage est une explication potentielle à la variabilité du phénotype étendu chez les hôtes infectés par des parasites manipulateurs (Thomas *et al.* 2002 ; Rigaud & Haine 2005). Cette source de variabilité phénotypique s'additionne ainsi aux effets de la diversité génétique de l'hôte et du parasite.

VII. Phénotype étendu : vers un phénotype multidimensionnel

L'infection par un symbiote modifie généralement plus d'un seul trait de l'hôte à la fois (Thomas *et al.* 2011). Le caractère multidimensionnel du phénotype offre la possibilité pour les deux partenaires de présenter à la fois un alignement et un conflit d'intérêts sur des traits différents, que l'association soit globalement mutualiste ou parasitaire.

Des conflits d'intérêts dans les associations mutualistes

Si le mutualisme est défini comme une association à bénéfices réciproques, le génome de chaque partenaire est néanmoins sélectionné pour augmenter sa propre transmission. Ainsi, certains auteurs préfèrent voir le mutualisme comme une exploitation réciproque (Smith 1992 ; Herre *et al.* 1999). Les conflits d'intérêts entre les partenaires ont donc toute leur place dans les associations à bénéfices réciproques (Douglas 2008). Un exemple marquant est celui de la stérilité mâle cytoplasmique (CMS) induite par les mitochondries chez certaines plantes gynodioïques (Touzet & Budar 2004 ; Chase 2007). Les mitochondries sont des partenaires indispensables du métabolisme cellulaire chez les eucaryotes. Bien que l'association mutualiste eucaryotes-mitochondries soit ancienne, des conflits nucléo-cytoplasmiques subsistent car si les gènes nucléaires sont transmis par les deux sexes, les mitochondries ne le sont que par le cytoplasme des mères. Ainsi certains variants mitochondriaux sont capables de supprimer la fonction mâle des fleurs hermaphrodites, conduisant à une réallocation des ressources vers la production de graines par lesquelles sont transmises les mitochondries. Ceci illustre le fait que des conflits d'intérêts peuvent persister au sein d'associations mutualistes. Cette stérilité induite est un exemple supplémentaire de manipulation de la reproduction des hôtes comme observé chez d'autres symbiotes à transmission maternelle (Engelstädter & Hurst 2009).

Des alignements d'intérêts dans les associations parasitaires

Les symbiotes parasites peuvent également présenter un alignement d'intérêts avec l'hôte pour certains traits. Les parasites ont par exemple intérêt à protéger leur hôte des surinfections par d'autres parasites. On observe ainsi des cas de parasites conférant un effet « vaccin » tels que l'herpesvirus empêchant l'infection par les bactéries pathogènes *Listeria monocytogenes* et *Yersinia pestis* chez la souris (Barton *et al.* 2007). Une littérature grandissante montre également que la bactérie *Wolbachia*,

manipulatrice de la reproduction, confère une résistance contre des virus à ARN (Hedges *et al.* 2008 ; Teixeira *et al.* 2008 ; Osborne *et al.* 2009 ; Walker *et al.* 2011) ou d'autres parasites tels que *Plasmodium*, l'agent du paludisme (Moreira *et al.* 2009).

Du fait de sa transmission verticale, *Wolbachia* a également un intérêt à augmenter le nombre de descendants produits par son hôte. Weeks *et al.* (2007) ont par exemple démontré qu'une souche de *Wolbachia* induisant de l'incompatibilité cytoplasmique (IC) avait évolué vers l'apport de bénéfice sur la fécondité de son hôte *Drosophila simulans*. L'IC a permis à la bactérie d'envahir en quelques années les populations californiennes de *D. simulans*. De plus, les femelles infectées voient aujourd'hui leur fécondité relative augmentée de 10 % par rapport aux non-infectées alors que vingt années auparavant, leur fécondité était à l'inverse réduite de 20 %. Ce changement temporel est contrôlé par un effet du génotype bactérien suggérant que la souche ancestrale de *Wolbachia* aurait ainsi évolué vers l'apport de bénéfice.

VIII. L'organisme : une arène de conflit et de coopération

Nous avons vu que le phénotype d'un organisme est le fruit de l'interaction étroite entre plusieurs génomes. L'individu hôte est alors une unité plus ou moins cohérente où chaque entité génomique peut utiliser des voies de transmission différentes et nécessiter des adaptations spécifiques. Ainsi, la trajectoire évolutive du phénotype étendu va dépendre d'une tension entre coopération et conflit parmi les différents génomes partageant le même individu hôte. Les insectes sont des modèles de choix dans l'étude des relations hôte-symbiote car ils hébergent fréquemment toutes sortes de partenaires symbiotiques tels que des bactéries ou des virus. Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressé aux facteurs influençant l'expression et l'évolution du phénotype étendu dans une association entre un insecte parasitoïde et des virus.

Chapitre 1

Présentation de la symbiose *Leptopilina bouvardi*-LbFV

Chapitre 1. Présentation de la symbiose *Leptopilina boulardi*-LbFV

I. Le phénotype étendu chez *Leptopilina boulardi*

Les insectes parasitoïdes sont des espèces pondant leurs œufs à l'intérieur ou sur d'autres espèces d'insectes (Godfray 1994). Leur cycle de vie est ainsi constitué d'un stade adulte libre au cours duquel les femelles ont pour activité principale la recherche des insectes hôtes dans lesquels elles déposent leurs œufs. La larve de parasitoïde se développe ensuite aux dépens de l'insecte hôte et constitue le stade parasite. De nombreux travaux sur les parasitoïdes de l'ordre des Hyménoptères ont montré que ceux-ci sont eux-mêmes les hôtes de bactéries ou virus à transmission verticale (Boulétreau & Fleury 2005). Ces micro-partenaires peuvent influencer différents traits phénotypiques, en particulier des traits impliqués dans l'efficacité du parasitoïde à exploiter les insectes hôtes. C'est le cas de diverses particules virales qui contribuent à la virulence du parasitoïde sur son hôte comme les polydnavirus (Whitfield & Asgari 2002 ; Drezen *et al.* 2006) ou encore certains ascovirus (Stasiak *et al.* 2005). Ces particules sont injectées pendant l'oviposition et suppriment la réponse immunitaire de l'insecte hôte, permettant ainsi le développement du jeune parasitoïde.

Les drosophiles, comme la plupart des insectes, sont attaquées par différentes espèces de parasitoïdes. Un des plus fréquents dans le quart sud-est de la France est le parasitoïde larvaire *Leptopilina boulardi* (*Hymenoptera : Eucoilidae*, Barbotin, Carton & Kelner-Pllault, 1979). Dans cette région, *L. boulardi* se développe principalement dans les larves de *Drosophila melanogaster* et *D. simulans* (Carton *et al.* 1986). Les femelles parasitoïdes adultes du parasitoïde parasitent les larves de drosophiles grâce à leur ovipositeur (cycle de vie représenté en Figure 1). L'œuf de parasitoïde éclotse nourrit de l'hémolymphe de la larve hôte sans toutefois la tuer. Au moment de la pupaison de la larve de drosophile, le parasitoïde en développement consomme l'intégralité des tissus de la larve hôte, tuant ainsi cette dernière. Après un stade nymphal au sein de la pupa de drosophile, un nouveau parasitoïde adulte émerge. Ce cycle de vie dure environ trois semaines à 26°C. Dans certains cas, la larve de drosophile est aussi capable de tuer le parasitoïde en développement par une réaction immunitaire conduisant à la formation d'une capsule de mélanine autour de ce dernier (Carton & Nappi 2001, Figure 1).

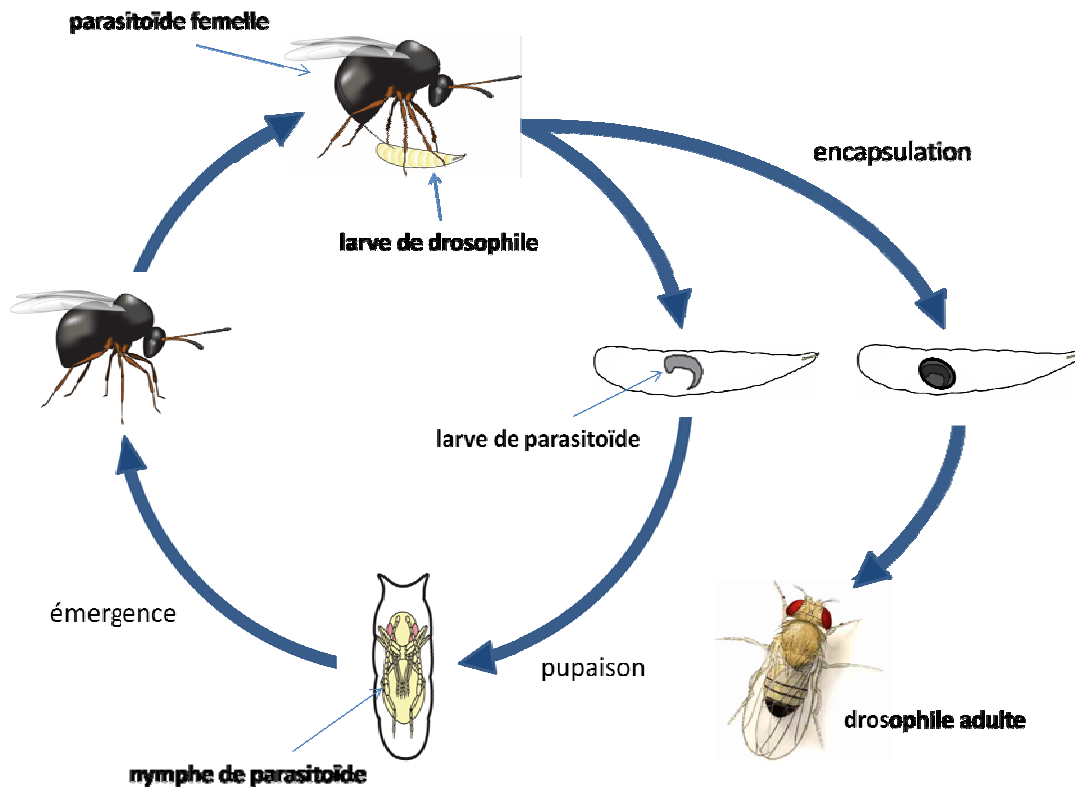


Figure 1. Représentation schématique du cycle de vie de *L. boulardi*.

Certaines femelles *L. boulardi* sont infectées par un virus, nommé LbFV pour *Leptopilina boulardi* Filamentous Virus, identifié pour la première fois en 2003 (Varaldi *et al.* 2003). Alors, que les femelles non-infectées rejettent systématiquement les larves de drosophile déjà parasitées, les femelles infectées par le virus acceptent fréquemment de pondre dans des larves déjà parasitées, un comportement qualifié de superparasitisme (Varaldi *et al.* 2003, 2006b). Bien que les deux types de femelles ne déposent qu'un seul œuf à chaque oviposition, dans le cas de femelles infectées, des rencontres multiples avec la même larve hôte vont aboutir à une intensité de superparasitisme élevée. Dans des conditions très contraignantes, cette intensité de superparasitisme va parfois dépasser une dizaine d'œufs déposés dans la même larve (Figure 2).

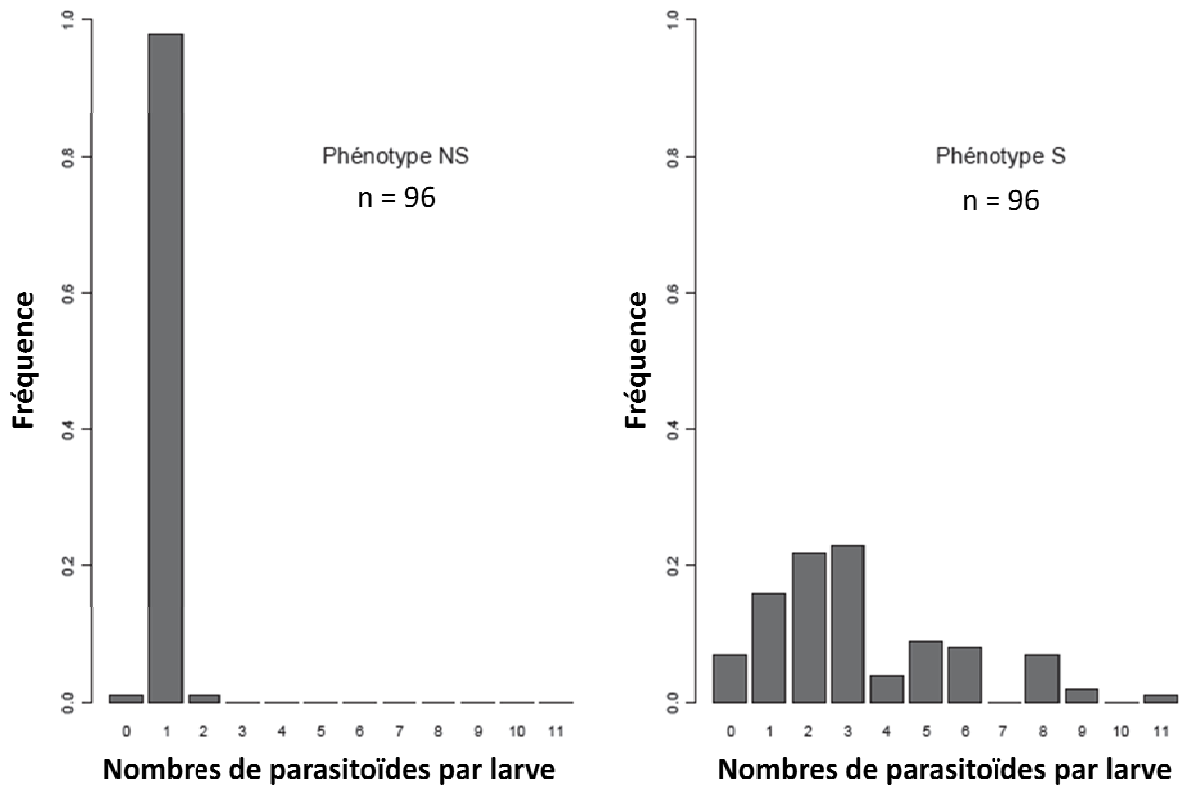


Figure 2. Distribution du nombre de parasitoïdes par larve hôte chez les femelles non-infectées (phénotype NS pour Non-Superparasitant : non-infectées par LbFV) et les femelles infectées (phénotype S pour Superparasitant : infectées par LbFV) (figure extraite de la thèse de Sabine Patot, 2009). Dans cette expérience, les femelles sont placées individuellement face à dix larves de drosophiles pendant une nuit.

Le superparasitisme est généralement coûteux pour le parasitoïde puisque *L. boulardi* est une espèce solitaire. Cela signifie qu'une larve hôte ne peut donner naissance qu'à un seul parasitoïde quelque soit le nombre d'œufs déposés. De plus, la probabilité de gagner la compétition pour un œuf surnuméraire diminue drastiquement lorsque le délai entre les deux ovipositions augmente (Bakker *et al.* 1985 ; Visser *et al.* 1992). En évitant le superparasitisme, les femelles non-infectées évitent ainsi d'exposer leur descendance à une intense compétition lors du développement. En revanche, le superparasitisme permet au virus d'être transmis horizontalement d'un parasitoïde infecté à un parasitoïde non-infecté lorsqu'ils se développent au sein de la même larve de drosophile. Cette transmission horizontale très efficace (taux de succès \approx 50 %, Varaldi *et al.* 2006a) vient compléter la transmission maternelle imparfaite du virus. En effet, bien que le taux de transmission verticale soit proche 100%, les mères infectées produisent parfois des descendants non-infectés (Varaldi *et al.* 2006a).

Ainsi, le superparasitisme qui avait initialement été interprété comme une erreur de discrimination des hôtes par les femelles parasitoïdes (van Lenteren 1981) puis

comme une adaptation à la faible disponibilité en hôtes dans le milieu (van Alphen & Visser 1990) est ici déterminé en grande partie par l'action du virus LbFV. Par une approche de modélisation, Gandon *et al.* (2006) ont prédit la stratégie évolutivement stable du superparasitisme (ESS pour Evolutionary Stable Strategy) à la fois pour le virus et le parasitoïde (Figure 3). Leurs résultats ont confirmé certaines prédictions sur le rapport coût-bénéfice du superparasitisme pour le parasitoïde et ont démontré le caractère adaptatif de la modification comportementale pour le virus :

- en l'absence de virus, le parasitoïde a généralement intérêt à éviter le superparasitisme, hormis dans la condition particulière où un œuf surnuméraire a une forte probabilité de gagner la compétition.
- Lorsque le virus est capable de modifier le comportement de superparasitisme, un conflit d'intérêts émerge entre les deux partenaires. Le virus bénéficie toujours plus du superparasitisme que le parasitoïde (excepté lorsque la probabilité de gagner le superparasitisme devient très grande). Le superparasitisme permet aux virus de multiplier les opportunités de transmission horizontale et donc de coloniser en permanence de nouvelles lignées de parasitoïdes.
- Lorsqu'on autorise le parasitoïde et le virus à coévoluer, le conflit d'intérêts est encore plus exacerbé. On prédit alors que les femelles non-infectées devraient éviter le superparasitisme d'autant plus que le virus est prévalent dans la population. Elles diminueraient ainsi le risque d'infecter leur descendance.

Ainsi, bien que le virus soit transmis maternellement, l'alignement d'intérêts avec le parasitoïde n'est que partiel du fait de la transmission horizontale. L'induction du superparasitisme est donc un exemple de manipulation comportementale, puisque ce phénotype étendu avantage le virus au détriment de son hôte parasitoïde.

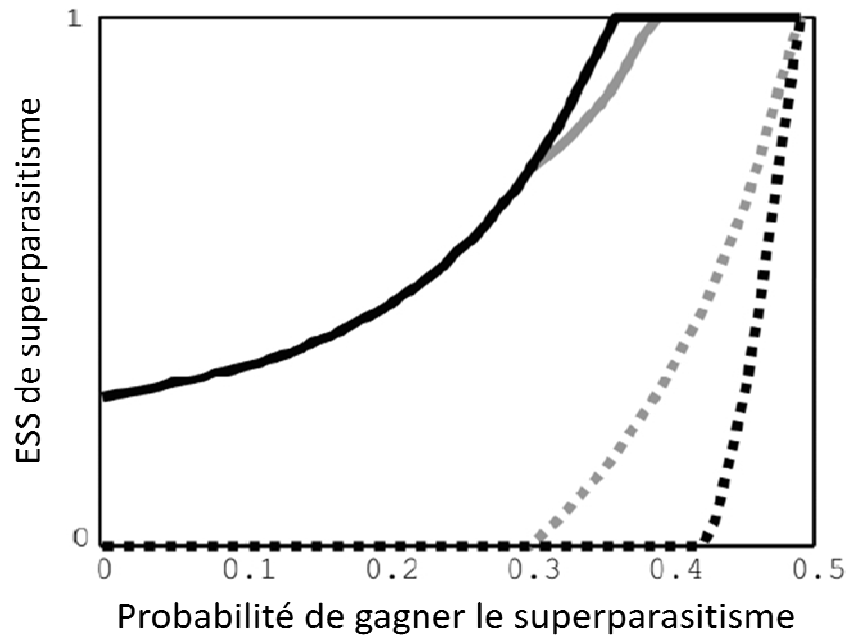


Figure 3. Stratégie évolutivement stable (ESS) du superparasitisme (taux d'acceptation des hôtes parasités) pour le virus (lignes pleines) et le parasitoïde (lignes en pointillés) en fonction de la probabilité de gagner le superparasitisme pour un œuf surnuméraire (extrait de Gandon *et al.* 2006). Les lignes grises indiquent le cas où le parasitoïde ne coévolve pas avec le virus. Les lignes noires indiquent le cas où le virus et le parasitoïde coévoluent. Paramètres : taux de transmission horizontale du virus = 0,75 ; taux de transmission verticale du virus = 0,95 (voir Gandon *et al.* 2006 pour les autres paramètres du modèle).

Dans le modèle évoqué à l'instant, une souche de virus ne pouvait infecter un parasitoïde déjà infecté (pas d'infection multiple). Dans ce cas, on constate que l'ESS de superparasitisme pour le virus diminue avec une augmentation de la prévalence virale (Figure 4). En effet, plus la prévalence atteinte est élevée, moins il reste de parasitoïdes à infecter. L'augmentation de la prévalence génère ainsi un « feedback » épidémiologique conduisant à diminuer la contribution de la transmission horizontale à la fitness totale du virus. On s'attend alors à ce que l'intensité de la manipulation soit plus faible dans les populations à forte prévalence virale. Cependant, Varaldi *et al.* (2009) ont comparé les prédictions de ce modèle sans infection multiple avec un modèle autorisant une souche virale à infecter un parasitoïde déjà infecté. Dans le modèle à infections multiples, on considère que la compétition entre souches virales au sein du parasitoïde conduit instantanément à l'exclusion d'une des deux souches. Ce phénomène est modélisé par le paramètre L , correspondant à la probabilité qu'une souche transmise horizontalement remplace la souche résidente (au sein du parasitoïde). Cette

forme de compétition intra-hôte est analogue à la superinfection définie par Nowak & May (1994). La superinfection ($L > 0$) augmente le nombre d'hôtes (parasitoïdes) potentiels et donc la contribution de la transmission horizontale par rapport au modèle sans superinfection ($L = 0$). Ainsi, la superinfection conduit à une ESS de superparasitisme plus élevée que dans le cas précédent (Figure 4). L'effet de la prévalence virale sur l'ESS de superparasitisme pour le virus est également modifiée et plus complexe que précédemment. Ce résultat montre l'importance de prendre en compte les feedbacks épidémiologiques qui s'établissent entre les paramètres du modèle ainsi que la forte influence des infections multiples sur l'évolution de la manipulation.

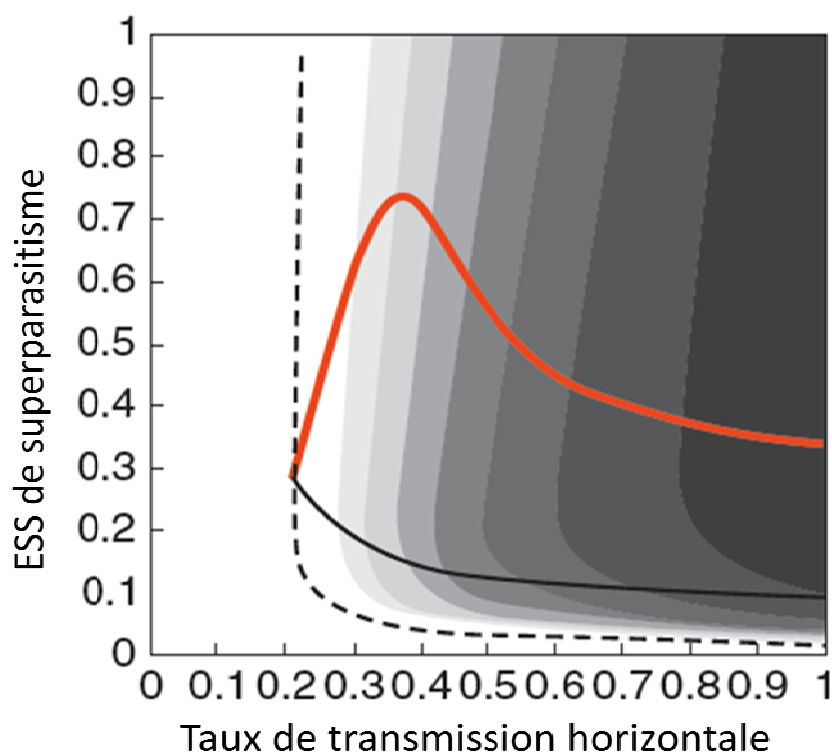


Figure 4. Stratégie Evolutivement Stable (ESS) du superparasitisme (taux d'acceptation des hôtes parasités) pour le virus en fonction du taux de transmission horizontale (extrait de Varaldi *et al.* 2009). Les nuances de gris correspondent à la prévalence virale à l'équilibre, des nuances plus foncées indiquant des prévalences plus élevées (10 % de différence dans la prévalence entre chaque nuance de gris). Ligne en pointillés : seuil en dessous duquel le virus ne peut envahir la population de parasitoïdes. Lignes pleines : ESS avec $\varepsilon = 0$ (ligne noire, pas de superinfection) ; avec $\varepsilon = 0.5$ (ligne rouge, dans 50% des cas, la souche transmise horizontalement remplace la souche résidente).

II. Autres caractéristiques biologiques du modèle *L. bouvardi*-virus

Structure, réplication et génome des particules virales

L'observation de l'appareil reproducteur des femelles par microscopie électronique a révélé la présence de capsides virales de forme filamenteuse dans les cellules des oviductes, et ce uniquement chez les femelles issues de lignées « superparasitantes » (Figure 5). La réplication du virus à l'intérieur du noyau de ces cellules a également été rapportée, suggérant que LbFV est un virus à ADN (Figure 5b & d). La forme filamenteuse et la taille des capsides virales (excédant parfois 1µM de long) suggèrent qu'il pourrait être apparenté aux autres grands virus à ADN infectant les arthropodes tels que les *Baculoviridae* ou encore les *Hytrosaviridae* (Knudson & Harrap 1976 ; Lietze *et al.* 2011 ; Thézé *et al.* 2011).

Une première séquence d'acide nucléique viral a été obtenue grâce à la comparaison des transcriptomes des lignées « superparasitantes » et « non superparasitantes » par SSH (Suppressive Subtractive Hybridization, Patot *et al.* 2009). Cette première séquence virale a permis de développer un marqueur moléculaire basé sur la Polymerase Chain Reaction (PCR), suggérant que le génome viral est constitué d'ADN (Patot *et al.* 2009). Cette hypothèse a par la suite été confirmée par le séquençage du génome viral actuellement en cours.

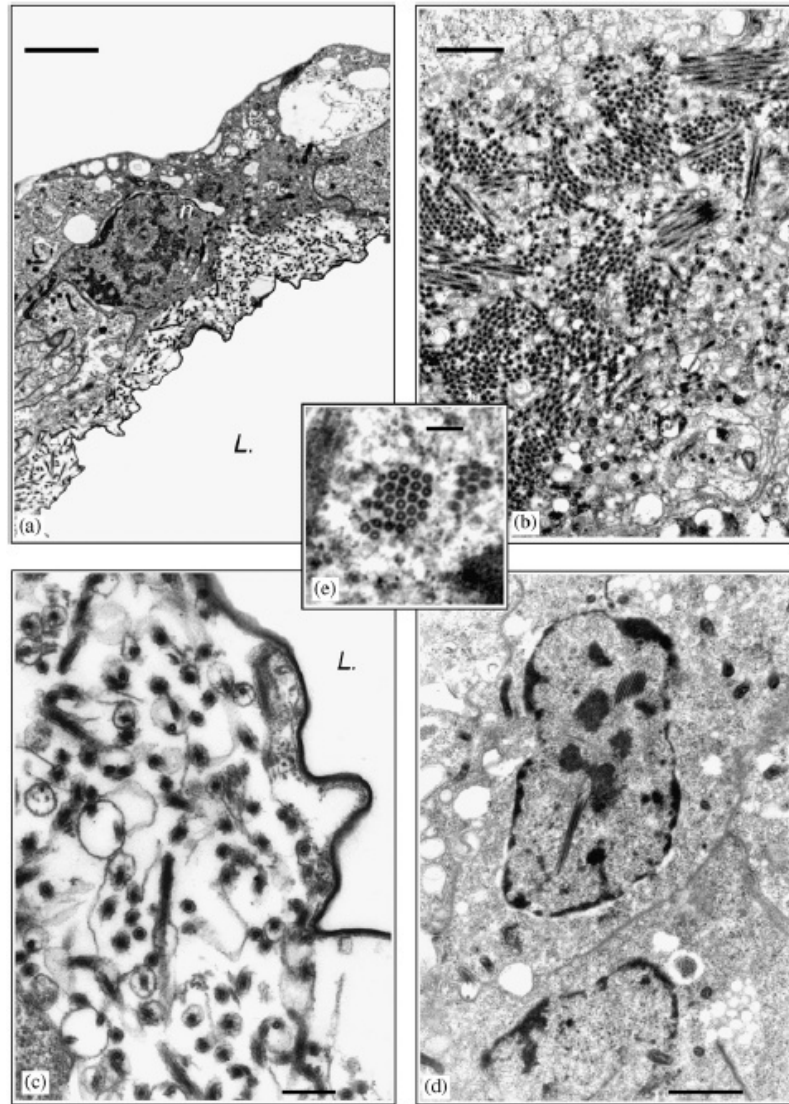


Figure 5. Réplication du virus chez les femelles « superparasitantes » (microscopie électronique, Varaldi *et al.* 2006b). (a) évidence de réplication intra-nucléaire dans les cellules bordant la lumière de l'oviducte ; n : noyau cellulaire ; L : lumière de l'oviducte ; barre = 2,5 μ M. (b) densités élevées de virions dans le cytoplasme de certaines cellules ; barre = 1 μ M. (c) structure des virions accumulés à proximité de la lumière de l'oviducte ; L : lumière ; barre = 250 nm. (d) structure des particules virales à l'intérieur du noyau cellulaire ; barre = 1 μ M. (e) coupe transversale de nucléocapsides dans le noyau cellulaire ; barre = 200nm.

Autres effets phénotypiques de l'infection par LbFV

LbFV a une action spécifique sur le comportement de superparasitisme mais n'a aucun effet sur d'autres comportements des femelles infectées (perception des kairomones des hôtes, communication sexuelle, rythme circadien, préférence de l'espèce hôte) ou sur leur survie (Varaldi *et al.* 2006b, Varaldi *et al.* 2009). Il a cependant été détecté un léger effet positif sur la fécondité des femelles (+ 11%). Les femelles

infectées sont aussi légèrement plus petites (- 2%), ont une activité locomotrice réduite (-45 %) et un temps de développement plus long (+ 3%), suggérant un coût énergétique associé à l'infection (Varaldi *et al.* 2005).

Prévalence de LbFV dans les populations naturelles

Le virus est très fréquent dans les populations naturelles de *L. boucardi* (Patot *et al.* 2010, Annexe 1). Dans le sud-est de la France, la prévalence virale est cependant extrêmement variable d'une population à l'autre et est structurée selon un gradient nord-sud (Figure 5). Dans les populations les plus au nord, à la limite de l'aire de répartition de *L. boucardi*, le virus est rare, parfois absent. En allant vers le sud, la prévalence virale augmente progressivement jusqu'à des valeurs de l'ordre de 90% de parasitoïdes infectés (Figure 5). L'aire étudiée a fait l'objet de nombreuses campagnes de terrain depuis 1994 dans le but d'étudier la communauté drosophiles-parasitoïdes (Fleury *et al.* 2004). Concernant *L. boucardi*, différentes zones ont été délimitées (Figure 6). Dans l'aire centrale, la plus au sud, *L. boucardi* était présente dès les premiers échantillonnages et montrait des densités relatives élevées (par rapport aux nombres d'hôtes drosophiles). L'aire marginale correspond à la limite nord de l'aire de répartition de *L. boucardi* il y a environ dix ans. La densité relative du parasitoïde dans cette aire montre des valeurs intermédiaires. Depuis, *L. boucardi* a montré une progression vers le nord, colonisant de nouveaux sites où on la trouve en faible densité relative. On ne sait pas encore si ces nouvelles populations sont pérennes ou bien si elles dépendent uniquement de flux migratoires récurrents d'individus en provenance des populations du sud. Néanmoins, on note que la prévalence virale est positivement corrélée à la densité relative de *L. boucardi* dans la zone étudiée. En modifiant le modèle développé par Gandon *et al.* (2006), Patot *et al.* (2010) ont montré qu'on s'attend effectivement à ce que la prévalence virale augmente avec la densité relative de parasitoïdes. En effet, la densité relative de parasitoïdes est positivement corrélée au taux de superparasitisme. Or, plus le superparasitisme est fréquent, plus les opportunités de transmission horizontale du virus sont nombreuses. Sur le terrain, il a effectivement été montré que de fortes densités relatives étaient associées à des taux de superparasitisme élevés (Patot *et al.* 2010). La transmission horizontale apparaît donc encore une fois comme un facteur déterminant de l'épidémiologie du virus. On comprend ainsi l'intérêt du virus à augmenter la tendance au superparasitisme.

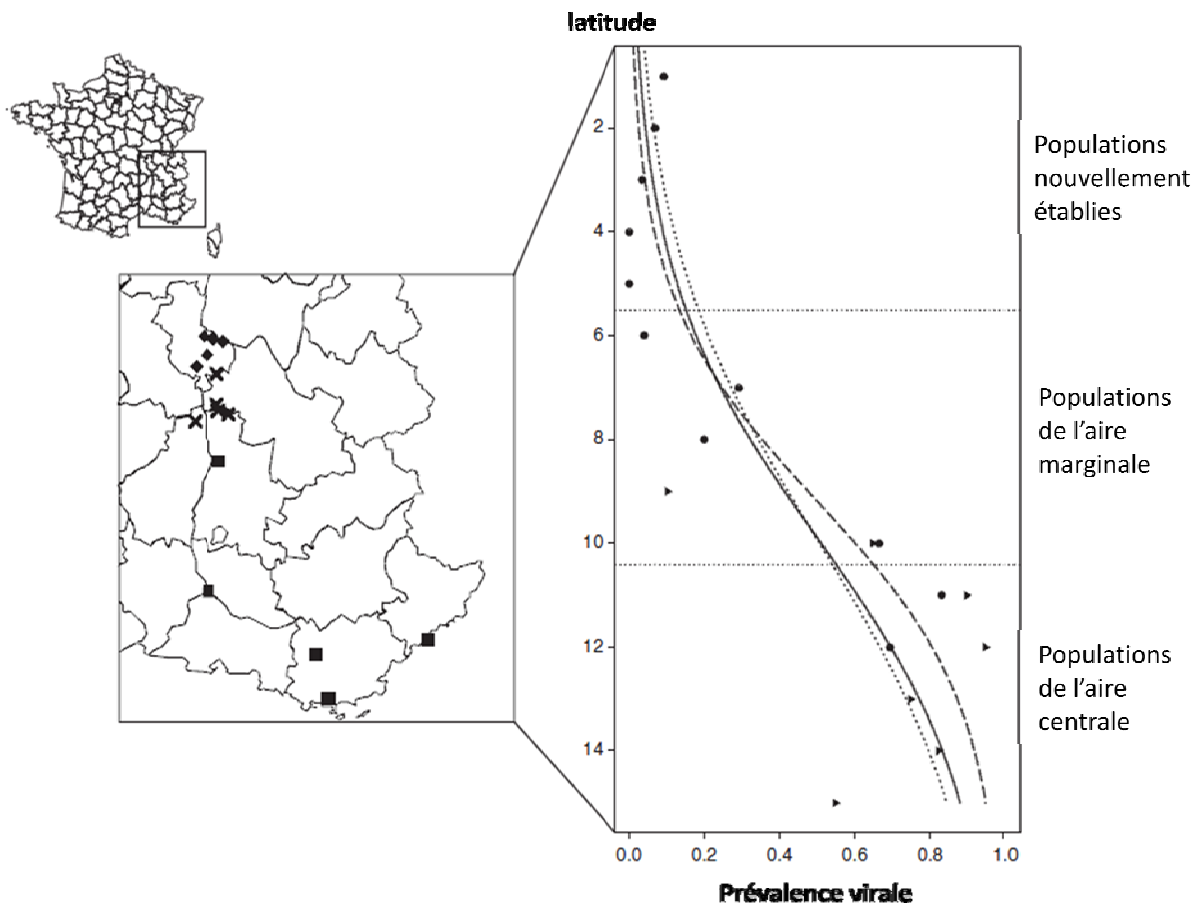


Figure 6. Prévalence de LbFV (proportion de parasitoïdes infectés) en fonction de la latitude (adapté de Patot *et al.* 2010, Annexe 1).

III. Problématique

Au cours de mon travail de thèse, j'ai abordé différentes questions visant à approfondir les connaissances sur différents aspects de l'interaction *L. boulandi*-LbFV. A l'exception des chapitres 3 et 4, chaque chapitre de la thèse est organisé autour d'un article ou manuscrit en préparation, précédé d'une synthèse des objectifs et principaux résultats obtenus.

Dans le chapitre 2, nous nous sommes intéressés à la contribution du génotype du parasitoïde dans l'expression de la manipulation comportementale. Compte tenu du conflit d'intérêts, sur le comportement de superparasitisme, on peut s'attendre à ce que le parasitoïde développe une forme de résistance à la manipulation lui permettant de minimiser le gaspillage en œufs. La présence de génotypes résistants a été recherchée dans différentes populations du sud-est de la France montrant des prévalences virales contrastées.

Le chapitre 3 présente une expérience d'évolution expérimentale dont l'objectif a été de tester le potentiel d'évolution de la résistance à la manipulation. La balance coût-bénéfice du superparasitisme pour le parasitoïde variant avec le niveau de compétition pour les hôtes, l'expérience a été menée dans deux environnements présentant des niveaux de compétition pour les hôtes différents.

Le chapitre 4 est consacré à la recherche de variabilité génétique chez le virus qui pourrait être à l'origine de la variabilité du comportement de superparasitisme. Etant donné que l'intensité optimale de superparasitisme pour le virus dépend de sa prévalence, nous avons mesuré l'intensité de la manipulation induite par différents isolats viraux issus de populations aux prévalences contrastées.

Les chapitres 5 et 6 traitent des infections multiples chez *L. boulandi*. Dans le chapitre 5, l'effet de l'infection par plusieurs souches de LbFV sur l'épidémiologie du virus a été étudié grâce à l'utilisation d'un marqueur moléculaire viral polymorphe. Dans le chapitre 6, nous faisons état de la découverte d'un nouveau virus à ARN parfois retrouvé en coinfection avec LbFV. La transmission de ce virus à ARN, ses effets phénotypiques ainsi que les possibles interactions avec LbFV ont été étudiés.

Enfin, LbFV présente un alignement d'intérêt avec le parasitoïde pour contourner ou supprimer la réponse immunitaire de la drosophile. A l'inverse, le symbiote bactérien *Wolbachia* qui infecte certaines drosophiles peut être sélectionné pour protéger la drosophile des attaques de parasitoïdes. Le chapitre 7 décrit l'influence de ces deux symbiotes sur l'issue de l'interaction drosophile-parasitoïde.

IV. Origine des lignées de parasitoïdes utilisées

Au cours de ce travail de thèse, différentes lignées de *L. boulandi* ont été utilisées. Tout d'abord les lignées de référence NSref et Sref ont été utilisées dans différentes expériences. Ces deux lignées possèdent le même génotype nucléaire et ne diffèrent que par leur statut d'infection. NSref est une lignée non-infectée par LbFV, originaire de Sienne (Italie) et a été rendue consanguine à la suite de 8 générations de croisements frère-sœur (Varaldi *et al.* 2003). Les femelles de cette lignée pondent en moyenne un seul œuf par larve de drosophile rencontrée et montrent donc un phénotype « non-superparasitant » (Varaldi *etal.* 2003). La lignée Sref a été obtenue par l'infection de la lignée NSref, via le transfert horizontal de particules virales portées par des femelles infectées originaires de Gothenon (Drôme, France). Sref s'est révélée stable pour l'infection par LbFV au fil des générations et montre un phénotype « superparasitant »,

pondant en moyenne 3 à 4 œufs par larves dans les conditions du test comportemental de référence (voir partie « Principaux protocoles expérimentaux » ci-dessous).

En plus de ces lignées de références, d'autres lignées originaires des différentes populations du sud-est de la France ont été collectées pour le besoin des expériences. Elles sont issues des campagnes d'échantillonnage annuelles, effectuées pendant l'automne (septembre à octobre). L'échantillonnage se réalise sur des parcelles d'arbres fruitiers (pommiers, pêchers) et consiste à placer sur les branches des arbres des pièges fermés contenant des bananes pour attirer les insectes. Les pièges sont laissés sur place pendant une quinzaine de jours afin de permettre leur colonisation par les drosophiles et les parasitoïdes. Les pièges sont ensuite ramenés au laboratoire et placés à température ambiante pendant le développement larvaire des insectes. A l'émergence des parasitoïdes, mâles et femelles sont collectés. Une fois accouplées, les femelles sont utilisées pour fonder des lignées isofemelles, en plaçant individuellement les femelles dans des tubes d'élevage contenant environ 200 larves de *D. melanogaster*. Chaque lignée de parasitoïdes est ensuite maintenue en petite masse avec, à chaque génération, 3 à 4 femelles fondatrices, accompagnées d'un ou deux mâles et d'environ 200 larves de drosophiles. Les élevages de parasitoïdes sont maintenus en chambre climatisée à 26°C +/- 1°C (photopériode: 12:12 ; humidité relative ≈70%).

La lignée de *D. melanogaster* utilisée pour l'élevage de tous les parasitoïdes est originaire de Sainte Foy-lès-Lyon (Rhône, France). Elle est maintenue en l'absence de parasitoïdes sur milieu contrôlé fabriqué à base de farine de maïs, de levure de bière et d'agar dans des tubes d'élevage en plastique (David 1962). Les drosophiles sont élevées en chambre climatisée à 21°C +/- 1°C (photopériode: 12:12).

V. Principaux protocoles expérimentaux

Quantification de l'intensité du superparasitisme

La découverte de LbFV trouve son origine dans les tests comportementaux utilisés pour étudier le comportement de ponte des femelles parasitoïdes. Ces tests ont permis de caractériser de manière tranchée les phénotypes superparasitant et non-superparasitant des femelles infectées et non-infectées (Varaldi *et al.* 2003). Au cours de mon travail de thèse, les tests comportementaux ont été utilisés pour quantifier l'intensité du superparasitisme entre différents statuts d'infection mais également entre lignées de parasitoïdes au sein d'un même statut d'infection. Les tests consistent à placer une femelle parasitoïde accouplée (âgée de 1 à 2 jours) dans une boîte de Pétri

contenant du milieu gélosé (agar + sucre + patch de levure, Figure 7) ainsi que dix larves de *D. melanogaster* de stade L1 pendant une nuit (17h-10h) à 26°C. Ces conditions contraignantes pour la femelle parasitoïde assurent qu'elle rencontrera les mêmes larves hôtes un grand nombre de fois et qu'elle aura à choisir entre superparasiter ou non. La femelle est ensuite retirée et les boîtes de Pétri placées à 21°C. Trois à quatre jours plus tard, les larves de drosophiles sont disséquées sous loupe binoculaire pour dénombrer les œufs et larves de parasitoïdes. L'intensité du superparasitisme est ensuite estimée par la moyenne du nombre de parasitoïdes pondus par larve de drosophile parasitée.

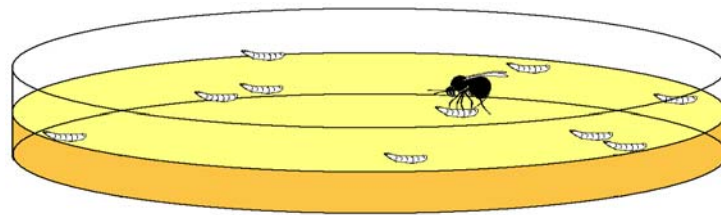


Figure 7. Dispositif du test comportemental utilisé pour la quantification du superparasitisme.

Transfert horizontal de LbFV

La transmission horizontale de LbFV se réalise spécifiquement en condition de superparasitisme (Varaldi *et al.* 2003 ; 2006a). Pour valider le transfert du virus d'une lignée de parasitoïde donneuse vers une lignée receveuse, il faut cependant s'assurer que les descendants ayant acquis l'infection horizontalement proviennent bien de la lignée receveuse. *L. bouleari* est une espèce haplo-diploïde, ce qui signifie que les œufs non-fertilisés donnent naissance à des mâles et les œufs fertilisés à des femelles. Des descendants femelles ne peuvent ainsi provenir que d'une mère s'étant préalablement accouplée. Le transfert horizontal du virus peut donc être identifié simplement en utilisant une femelle vierge pour la lignée donneuse et une femelle accouplée pour la lignée receveuse, et en récupérant uniquement les descendants femelles. Les transferts sont réalisés en plaçant une femelle de la lignée receveuse dans un tube d'élevage avec 100 œufs de *D. melanogaster* pendant 24 heures à 26°C. La femelle est ensuite retirée et remplacée par 4 femelles vierges (isolées avant leur émergence) de la lignée donneuse pendant 24 heures supplémentaires. Au terme de trois semaines de développement à 26°C, les descendants femelles (progéniture de la lignée receveuse) sont récupérés et leur statut d'infection est vérifié par PCR.

Détection de l'infection par LbFV

Patot *et al.* (2009) ont développé un marqueur moléculaire de l'infection par LbFV, une séquence virale de 1039 pb (numéro d'accèsion Genbank : FM876312), permettant de détecter le virus par PCR. L'ADN total des parasitoïdes est d'abord extrait par broyage mécanique des tissus dans 150 µl d'une solution de Chelex à 5% (Bio-Rad, USA). Après broyage, 5 µl de protéinase K (20 mg/l, Eurobio, France) sont ajoutés dans chaque échantillon qui est ensuite placé pendant une nuit au bain-marie à 56°C. Les échantillons sont enfin chauffés à 95 °C pendant 10 minutes pour inactiver la protéinase K. Les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 10000 g et le surnageant est utilisé dans les réactions PCR.

A partir du marqueur viral, un fragment de 399 pb est amplifié avec les amorces spécifique du virus, 500-R (5'-TGATGATGATGCTGCTGAAA-3') et 102-F (5'-TGTGGCGTTTATTCTTCTTTAGG-3'). De plus, afin de s'assurer de la qualité des extractions d'ADN, les amorces du virus sont utilisées en multiplexage avec les amorces RPS2-R (5'-AAACGCACCTGAACTGAACC-3') et RPS2-F (5'-TGCTATTGGAGACAGCAACG-3'), amplifiant une séquence de l'insecte de 162 pb (protéine ribosomale putative). Pour chaque réaction PCR, 2 µl d'échantillon sont ajoutés à 23 µl d'un mélange réactionnel contenant du MgCl₂ à 1,5 mM, 50 µM de chaque dNTP, 200 nM de chacune des quatre amorces, ainsi que de la Taq polymérase à 5 unités/µl. L'amplification PCR débute avec une phase de dénaturation à 95 °C pendant 4 minutes et se termine par une phase d'élongation à 72 °C pendant 10 min. Entre ces deux phases, 35 cycles PCR sont réalisés avec le programme suivant : 94 °C pendant 30 s, 56 °C pendant 1 min et 72 °C pendant 30 s. Les échantillons sont enfin analysés sur gel d'électrophorèse (agarose à 1%).

Mesure des traits de fitness du parasitoïde

Afin d'évaluer la fitness des femelles parasitoïdes, différents traits d'histoire de vie sont mesurés. Les femelles sont placées individuellement dans des tubes d'élevage à 26°C contenant des larves de *D. melanogaster* écloses de 100 œufs déposés le jour précédent. Au bout de 24 heures les femelles parasitoïdes sont retirées. Parallèlement des tubes témoins sans parasitoïdes sont préparés pour mesurer la mortalité naturelle des drosophiles. A l'émergence des drosophiles après 7 jours de développement à 26°C, puis des parasitoïdes au bout de 21 jours, les insectes sont récoltés et comptés chaque jour. De plus, les drosophiles adultes sont écrasées entre deux lames de verres afin de visualiser celles ayant développé la réaction immunitaire d'encapsulation contre les parasitoïdes en développement. Le degré d'infestation (DI) est alors défini comme la

proportion de larves de drosophile parasitées, incluant celles ayant survécu grâce à l'encapsulation du parasitoïde (Figure 8). Le taux d'encapsulation (TE) est estimé par la proportion de drosophiles adultes contenant au moins une capsule dans leur abdomen (Figure 8). Enfin, le succès parasitaire (SP) ou succès développemental est défini comme la proportion de larves parasitées ayant donné naissance à un parasitoïde adulte (Figure 8). Les femelles parasitoïdes émergées sont nourries avec une goutte de miel pendant 5 jours puis utilisées pour les mesures de fécondité sous microscope après dissection des ovaires. *L. boulandi* est une espèce proovigénique, c'est-à-dire que les femelles émergent de la larve hôte avec leur stock d'œufs définitif. La longueur du tibia de la troisième patte arrière droite est également mesurée sous microscope sur les femelles ayant servi aux mesures de fécondité.

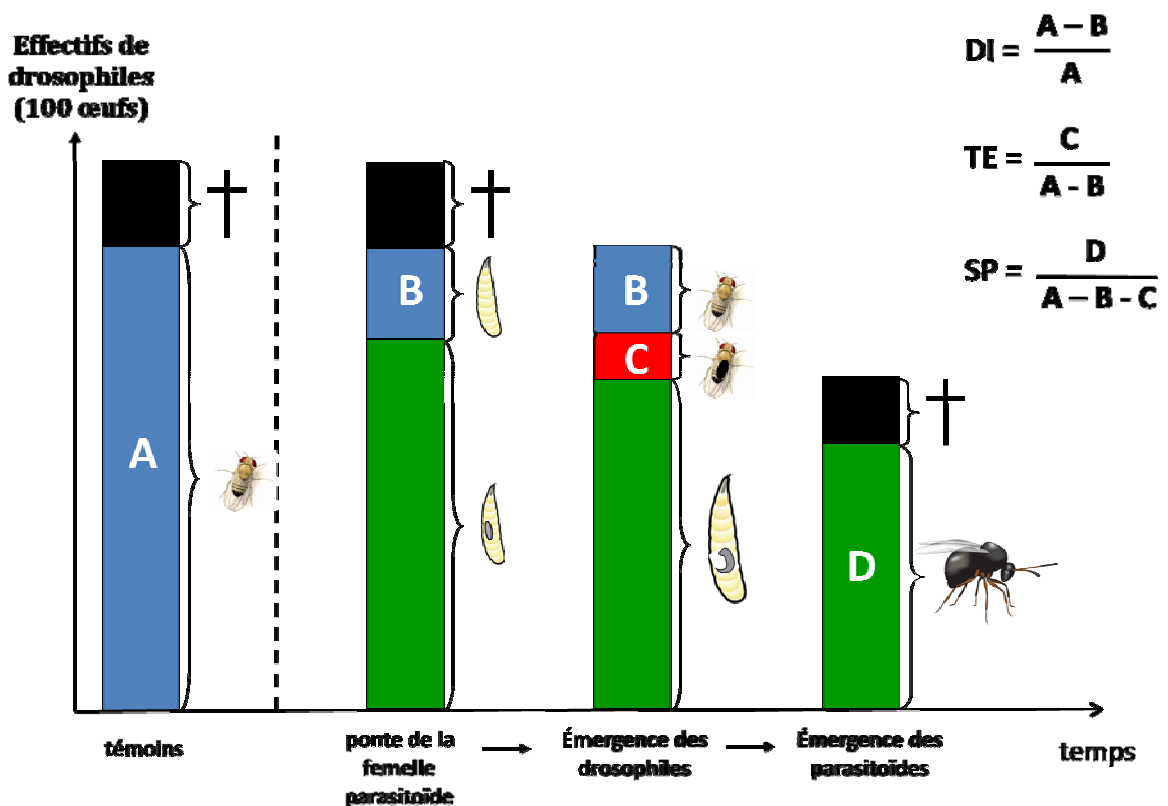


Figure 8. Représentation schématique de l'interaction drosophile-parasitoïde. DI : degré d'infestation ; TE : taux d'encapsulation ; SP : succès parasitaire. Les aires noires correspondent à la proportion d'hôtes drosophiles ne donnant naissance ni à des drosophiles ni à des parasitoïdes.

Chapitre 2

Effet du génotype de l'insecte dans l'expression du phénotype étendu

Chapitre 2. Effet du génotype de l'insecte dans l'expression du phénotype étendu

Synthèse

Le comportement de superparasitisme est en lien direct avec la fitness des femelles parasitoïdes puisqu'il détermine la qualité de l'environnement dans lequel vont se développer leurs descendants. Compte tenu du conflit d'intérêts entre le parasitoïde et le virus pour l'expression du superparasitisme (Gandon *et al.* 2006), on peut s'attendre à ce que les populations de parasitoïdes s'adaptent à la présence du virus via des mécanismes de résistance à l'infection ou de tolérance à l'infection. La tolérance à l'infection pourrait notamment s'exprimer sous la forme d'une résistance à la manipulation chez les femelles infectées, un mécanisme différent de la résistance à l'infection puisqu'il n'implique pas l'élimination du virus. On peut également s'attendre à ce que l'évolution de la résistance ou la tolérance à l'infection soit corrélée à l'intensité des pressions de sélection exercées par le virus et donc à sa prévalence. A l'échelle du sud-est de la France, la prévalence de LbFV est extrêmement variable d'une population à l'autre, les populations du nord étant peu ou pas infectées alors que les populations du sud présentent des prévalences élevées, parfois proche de 100 % (Patot *et al.* 2010, Annexe 1). Ce gradient latitudinal de prévalence pourrait ainsi conduire à une différenciation génétique des populations de parasitoïdes sur la résistance à l'infection, la tolérance à l'infection ou sur ces deux mécanismes.

Nous avons ainsi tenté de mettre en évidence un polymorphisme de résistance et/ou de tolérance à l'infection chez *L. bouhardi* en échantillonnant 30 lignées de parasitoïdes (8 infectées par LbFV et 22 non-infectées) provenant de cinq populations du sud-est de la France montrant des prévalences contrastées. Chacune de ces 30 lignées a été fondée à partir d'une seule femelle (lignée isofemelle) et maintenue au laboratoire pendant cinq générations par des croisements frère-sœur avant le début des expériences. Ce mode de croisement a permis d'éliminer en grande partie la variabilité génétique intra-lignée (taux d'homozygotie $\geq 67,2$ %) maximisant ainsi les chances d'observer des différences génétiques entre lignées.

Dans un premier temps, la contribution de l'infection par LbFV dans l'expression du superparasitisme a été analysée sur les 30 lignées rendues consanguines. Pour chaque lignée, l'intensité du superparasitisme a été mesurée selon le protocole standard (chapitre 1). Les résultats montrent que la majeure partie de la variance phénotypique du superparasitisme est expliquée par la présence/absence du virus chez les femelles parasitoïdes (Manuscrit 1, Fig.

2). En effet, chez les lignées non-infectées, les femelles superparasitent rarement, pendant la plupart du temps un seul œuf par larve de drosophile rencontrée. A l'inverse, les lignées infectées montrent toujours des intensités de superparasitisme supérieures à celles des lignées non-infectées (en moyenne 3 à 11 œufs par larve). Néanmoins, une variabilité entre lignées a été mise en évidence, à la fois chez les lignées infectées et non-infectées. Bien que dans cette expérience l'effet lignée soit confondu avec d'éventuels effets maternels (les femelles mesurées au sein d'une même lignée étant toutes des sœurs), ces différences peuvent être dues à la présence d'une variabilité génétique chez le parasitoïde. De plus, pour les lignées infectées, les variations inter-lignées pourraient aussi s'expliquer par une variabilité génétique d'origine virale ou par des interactions entre le génotype du parasitoïde et le génotype virus.

Afin de mesurer uniquement la variabilité phénotypique due au génotype du parasitoïde, il a fallu s'affranchir de la variabilité génétique d'origine virale. Pour ce faire, le génotype nucléaire des 30 lignées consanguines a été introgressé sur 3 générations (G1, G2 et G3) dans un cytoplasme infecté de référence contenant la même souche virale. L'opération a consisté à croiser des mâles des différentes lignées à des femelles de la lignée infectée de référence Sref. A chaque génération, les femelles issues de ces croisements ont été croisées à nouveau avec des mâles de leur lignée paternelle respective (Fig. 1). Afin de s'affranchir de possibles effets maternels, deux réplicats d'introgression ont été réalisés par lignée.

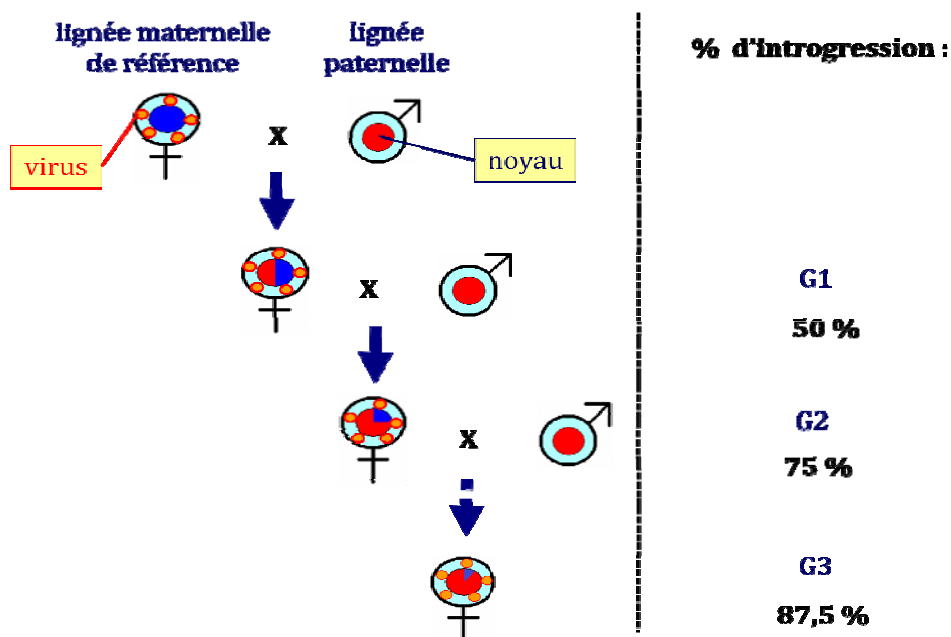


Figure 1. Protocole d'introgression du génotype nucléaire dans un cytoplasme infecté de référence.

Après introgression, l'ensemble des lignées étaient infectées. Le virus a donc bien été transmis au fil des générations d'introgression montrant qu'aucune lignée n'est totalement résistante à l'infection. L'analyse du comportement de superparasitisme aux différentes générations d'introgression a révélé des différences d'intensité entre lignées de parasitoïde. Ces différences se transmettent d'une génération à l'autre, même si les effets environnementaux ont une contribution importante dans la variabilité phénotypique totale (Manuscrit 1, Fig. 3 & 4). Ainsi, bien que toutes les lignées introgressées superparasitent, certaines tendent à être moins manipulées que d'autres, suggérant la présence d'un polymorphisme de tolérance à l'infection (= résistance à la manipulation). En revanche, ce polymorphisme est restreint à l'échelle intra-population puisque les différences de comportement entre lignées de parasitoïdes ne sont pas corrélées à leur population d'origine. Les différences de superparasitisme ne sont pas non plus corrélées à la densité virale chez les femelles parasitoïdes indiquant qu'il s'agit bien d'un mécanisme de tolérance et non de résistance à l'infection.

Enfin, le déterminisme génétique de cette tolérance à l'infection a été étudié par un protocole de génétique quantitative afin de mesurer la part des effets additifs, les seuls impliqués dans la réponse des populations à la sélection. Deux lignées montrant des phénotypes contrastés ont ainsi été utilisées comme lignées parentales pour établir différents types de croisements (F1 et backcross). L'analyse du comportement de superparasitisme dans les différents croisements a révélé la présence d'effets génétiques additifs ainsi que d'importants effets de dominance dus aux allèles de la lignée la plus manipulée. En revanche, aucun effet maternel n'a été détecté. De plus, la lignée parentale la plus manipulée s'est avérée avoir un stock d'œufs plus important. Bien que ce lien entre comportement de superparasitisme et fécondité devra être testé sur un plus grand nombre de génotypes, une fécondité plus élevée chez les génotypes les plus manipulés pourrait compenser le gaspillage en œufs dû au superparasitisme induit par le virus.

La présence d'un tel polymorphisme dans les populations naturelles de parasitoïdes suggère un potentiel d'évolution vers une tolérance à l'infection. Cependant, nous n'avons pas observé de différenciation génétique entre les populations du nord, peu exposées au virus, et les populations du sud où une forte proportion des femelles parasitoïdes doivent faire face à la manipulation par le virus. Différentes hypothèses peuvent expliquer ce résultat, malgré la présence d'un polymorphisme à l'échelle intra-populationnelle. D'une part, nous avons vu que les effets de l'environnement ont une contribution importante dans l'expression de la manipulation, ce qui pourrait rendre inefficace l'effet de la sélection sur ce polymorphisme. D'autre part, il est possible que LbFV ait envahi récemment les populations de *L. boulandi*,

les allèles de tolérance alors n'ayant pas eu le temps d'augmenter en fréquence. Enfin, le polymorphisme pourrait être maintenu activement par des mécanismes de « balancing selection ». En particulier, un trade-off entre résistance à la manipulation et fécondité, tel que suggéré par nos données, pourrait participer au maintien du polymorphisme de tolérance à l'infection.

D'autres mécanismes tels que les interactions génotype \times environnement peuvent également favoriser le maintien de ce polymorphisme. En particulier, le coût de la manipulation pour le parasitoïde pourrait varier en fonction de la compétition pour les hôtes drosophiles. En effet, plus la compétition est forte, plus les femelles ont intérêt à superparasiter (van Alphen & Visser 1990). Or la compétition pour les hôtes montre des variations importantes dans la nature, à l'échelle intra-populationnelle (chapitre 3). Les génotypes les plus manipulés pourraient ainsi être avantagés dans les cas de forte compétition pour les hôtes.

En conclusion, nous avons mis en évidence la contribution du génotype du parasitoïde dans l'expression de la manipulation. Si les causes du maintien de ce polymorphisme dans les populations naturelles sont encore inconnues, ce travail suggère qu'il existe un potentiel évolutif pour ce phénotype étendu dans le pool génique du parasitoïde. De plus, ces résultats apportent de nouvelles perspectives dans l'étude des mécanismes fonctionnels de la manipulation. L'analyse des gènes différentiellement exprimés entre lignées faiblement et fortement manipulées permettra de faciliter l'identification des gènes du parasitoïde ciblés par la manipulation virale.

Heritable variation in an extended phenotype: the case of a parasitoid manipulated by a virus

J. MARTINEZ, F. FLEURY & J. VARALDI

Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, CNRS, UMR5558, Université de Lyon, Villeurbanne, France

Keywords:

behavioural manipulation;
Drosophila parasitoid;
Leptopilina bouleardi;

Abstract

In host–symbiont interactions, the genes of both host and symbiont can influence phenotypic traits. In the context of a conflict of interest, fitness-related traits are subjected to opposing selective pressures in the genomes of

differentiation was observed although some genotypes underwent less manipulation than others, and these differences were heritable across generations. The viral titre was not correlated with these differences although fecundity differed between extreme lines.

Introduction

The genetic diversity underlying phenotypic variation provides the raw material on which selection works, provided that the variation is heritable. In addition to the nuclear and cytoplasmic genes of an individual, additional evolutionary potential may be provided by infection by various heritable symbionts, because symbionts can modify the host's phenotype by inducing diverse morphological, physiological or even behavioural changes (Poulin & Thomas, 1999; Stouthamer *et al.*, 1999; Zchori-Fein *et al.*, 2001; Moran, 2007; Douglas, 2009; Hurd, 2009). Because the symbiont's genes influence the host's phenotype, the resulting overall phenotype can be described as an 'extended phenotype' (Dawkins, 1982), although the original definition was much wider, including 'effects [of genes] on the world at large'.

In such a host–symbiont context, there are several potential genetic sources underlying phenotypic variation. First, in the absence of the symbiont, the genetic

variation in the host may translate into phenotypic variation. Second, the infection status of the host, i.e. whether the host harbours the symbiont or not, may also lead to phenotypic differences. Third, when the host is infected, the observed extended phenotype results from the interplay between the genes of the host and those of the symbiont. Because the symbiont constitutes a genetic environment from the host's point of view, its contribution to the phenotype can be viewed as an indirect genetic effect (IGE) (Moore *et al.*, 1997; Shuster *et al.*, 2006). In this situation of infection, additional phenotypic variation can result both from variability in the host's genotype (Poinot *et al.*, 1998; Jaenike, 2007; Kageyama *et al.*, 2009), which is equivalent to direct genetic effects in the IGE literature, and from variability in the symbiont's genotype (Oliver *et al.*, 2005; Dunbar *et al.*, 2007; Vorburger *et al.*, 2009), i.e. indirect genetic effects. Lastly, variation in the extended phenotype may partly be due to interactions between genotypes of the host and symbiont (James & Ballard, 2003; Lambrechts *et al.*, 2006; Heath, 2009; Lambrechts, 2010), in a manner equivalent to covariance between direct and indirect genetic effects.

In host–symbiont associations, the optimum values for a given phenotypic trait can be either similar or very

Correspondence: Julien Martinez, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, CNRS, UMR5558, Université de Lyon, 69000 Lyon, Université Lyon 1, 69622 Villeurbanne, France.
Tel.: +33 4 7243 2908; fax: +33 4 7243 1388;
e-mail: julien.martinez@univ-lyon1.fr

different for the host and its symbiont, leading to an alignment or conflict of interest, respectively (Herre *et al.*, 1999; Smith, 2007). Alignment of interest is apparent for various traits in host–symbiont associations, for instance when the symbiont provides the host with nutrients (Moran & Degnan, 2006; Douglas, 2009) or with protection against natural enemies (Brownlie & Johnson, 2009; Oliver *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2010). Examples of traits subject to conflict of interest include the sex ratio in host–symbiont associations in which the symbiont is responsible for feminisation (Cordaux *et al.*, 2011) or the egg load in a host–parasite association in which the parasite castrates its host (Hurd *et al.*, 2001).

In the specific context of conflict of interest, the selective pressures acting on the host and symbiont genes are divergent and can lead to rapid co-evolutionary dynamics (Charlat *et al.*, 2007). However, the prerequisite for such a selective response is that sufficient heritable variation is present in the gene pools of both the host and the symbiont. In this paper, we will focus on a host–symbiont association where there is a strong conflict of interest for a behavioural trait. Our main aim will be to find out whether there is significant heritable variation in the parasitoid gene pool concerning the behaviour of interest, by controlling the symbiont genetic diversity.

The parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae) exhibits considerable phenotypic variability in a type of behaviour known as superparasitism. Adult females specifically parasitize *Drosophila* larvae by laying their eggs in the body cavity of their host (Fleury *et al.*, 2009). The offspring then develop by consuming the *Drosophila* tissues, ultimately killing it. Only one adult parasitoid can emerge from a single *Drosophila* larva, whatever the number of eggs deposited (Carton *et al.*, 1986). Some females deposit a single egg inside each larva and usually reject already parasitized ones, thus avoiding competition during development. However, when infected by the maternally transmitted DNA virus known as LbFV (*Leptopilina boulardi* filamentous virus), females frequently deposit supernumerary eggs into previously parasitized larvae, leading to a situation of superparasitism (Varaldi *et al.*, 2003). Superparasitism is frequently observed in the field (Fleury *et al.*, 2004; Patot *et al.*, 2010). It allows the virus to colonize uninfected parasitoid lineages as the virus is horizontally transmitted between parasitoids sharing the same *Drosophila* larva. By a theoretical approach, Gandon *et al.* (2006) determined the optimum value for superparasitism (i.e. the rate of superparasitism acceptance) both for the parasitoid and for the virus. This model confirmed previous findings that in the absence of any virus, parasitoids may benefit from superparasitism under a high level of competition due to the rarity of unparasitized *Drosophila* larvae (van Alphen & Visser, 1990). However, the model indicates that the optimum value for superparasitism is always higher for the virus than for the parasitoid because of the

opportunities for horizontal transmission under conditions of superparasitism, indicating a conflict of interest for this trait. Previous work showed that the virus is efficiently vertically transmitted (although <100%), has no detectable effect on other behavioural traits or female survival (Varaldi *et al.*, 2006a, 2009), but has a slightly positive effect on egg load and a weakly negative effect on tibia length and locomotor activity (Varaldi *et al.*, 2005a). In south-eastern France, the viral prevalence is spatially structured along a north–south axis, ranging from almost no infection in northern populations to nearly fixation in the south (Patot *et al.*, 2010).

In this paper, we sampled 30 parasitoid lines derived from five populations showing striking differences in viral prevalence. Using these lines, we addressed the following questions:

1. To what extent does the presence/absence of the virus explain the variation in superparasitism phenotype between different parasitoid lines?
2. Is there any genetic variation for superparasitism in the parasitoid gene pool in a context of infection (direct genetic effects)? If so, is there any sign that resistance evolved in heavily infected southern populations?
3. Does variation in the extended phenotype correlate with variation in virus titre or parasitoid egg load?

Materials and methods

Field sampling and rearing conditions of *L. boulardi*

Five populations of *L. boulardi* in south-eastern France were selected along the latitudinal gradient of viral prevalence (Fig. 1), ranging from populations with low prevalence in the north to heavily infected ones in the south (Patot *et al.*, 2010). In September 2007, the sampling procedure consisted of setting ten closed traps baited with split bananas in four orchards, except for site 5 where rotten apples were collected from the ground. Traps were exposed to colonization by *Drosophila* and parasitoids for 15 days and then brought back to the laboratory. Emerging *L. boulardi* females were then individually isolated to create isofemale lines. During subsequent generations, all parasitoids were reared with a 12-L/12-D photoperiod at 26 °C using a laboratory line of *Drosophila melanogaster* originating from Ste-Foy-lès-Lyon (site 1) fed with a standard diet (David, 1962).

Components of superparasitism variation within and between infection statuses

To assess the contribution of viral infection and parasitoid line to superparasitism variation, we included both uninfected and infected isofemale lines of each population (after PCR detection of LbFV) except at site 1, where no infected line was found. In total, six lines per population (6 × 5 populations = 30 lines) were maintained under laboratory conditions. To maximize

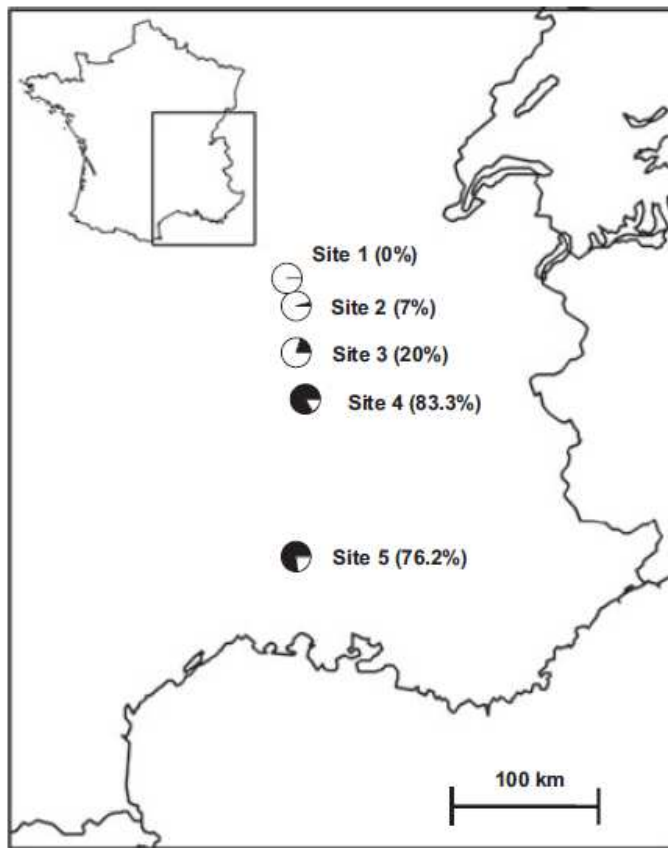


Fig. 1 Geographical locations of the sampling sites in south-eastern France. LbFV prevalence in 2007 is indicated in parentheses and by the black portion of pie charts (from Patot *et al.*, 2010).

the power of the analyses, brother–sister matings were performed for five successive generations of each isofemale line. This rearing method led to a minimum homozygosity of 67.2% for each line. The superparasitism phenotype of these inbred lines was then quantified in five females per line.

Contribution of the parasitoid genotype to the extended phenotype

To test whether nuclear genetic variation contributes to the expression of the behavioural manipulation, we partly introgressed genomes of the 30 inbred lines into a common infected cytoplasm. The common infected line, designated Sref (Varaldi *et al.*, 2006b), is a highly inbred line (eight generations of sib-mating, >82% homozygosity) originating from Sienna (Italy) that has been well characterized for several traits (Varaldi *et al.*, 2005a, 2006a).

Because the virus is maternally transmitted, the introgression was simply initiated by crossing males of the inbred lines with Sref females. Females from the first generation (G1) were then crossed again with males from their respective inbred lines to produce the second generation of introgression (G2). G1 and G2 females shared 50% and 75%, respectively, of their nuclear genome with their respective paternal inbred line. In

order to test for possible maternal effects, common environmental effects or residual genetic variation in inbred lines, two independent introgression replicates per inbred line were performed.

Based on phenotypic data from G1 and G2, the introgression was continued for an additional generation (G3, 87.5% of the paternal inbred line genome introgressed on average) for four extreme lines (two high and two low superparasitizing lines). Each replicate was doubled to establish this third generation (four replicates at G3).

At each generation of introgression, five females from the uninfected counterpart of Sref (NSref) were phenotypically tested. The Sref and NSref lines share the same inbred genotype because they are both derived from the same highly inbred line. This NSref control was not included in the statistical analyses.

Quantification of superparasitism

Superparasitism measurements in emerging females were taken for inbred lines before introgression ($n = 5$ per line) and during the introgression procedure ($n = 5$ per replicate = 10 per line for G1 and G2, and 20 per line for G3), as described in the study of Varaldi *et al.* (2003). Briefly, 1- to 2-day-old mated females were individually isolated with ten 1st-instar larvae of our laboratory line of *D. melanogaster* in a 5-cm-diameter Petri dish containing a thin spot of yeast poured onto an agar layer. After one night at 26 °C (from 17.00 to 10.00), females were removed and individually frozen for subsequent PCR detection of LbFV. For each Petri dish, three to five *Drosophila* larvae were then dissected under a stereomicroscope to count parasitoid eggs. The superparasitism intensity of a given female was then determined as the mean number of parasitoid eggs laid per parasitized *Drosophila* larva. Although these experimental conditions probably enhanced the intensity of superparasitism that females would naturally express if they were not forced to stay on single patch, we must stress that superparasitism also occurs both in laboratory experiments without this constraint (Varaldi *et al.*, 2005b) and under field conditions (Fleury *et al.*, 2004; Patot *et al.*, 2010). Finally, although under these experimental conditions we measured self-superparasitism (i.e. laying of eggs in hosts previously parasitized by the same female), females display the same superparasitism intensity when facing hosts previously parasitized by conspecifics (Varaldi *et al.*, 2003; Appendix S1 in Supporting Information).

Genetic architecture underlying variation in the extended phenotype

To analyse the genetic determinism of the variability of behavioural manipulation in the parasitoid genome, we performed crosses between two infected introgressed lines that displayed contrasting superparasitism intensity

in the introgression experiment. Due to a severe dysfunction of our rearing incubator, most of the lines were lost after the introgression experiments. We therefore repeated the introgression for the surviving Av12 and Av3 inbred lines, in Sref cytoplasm, but for seven generations, leading to more than 99% of the respective inbred line genomes introgressed into the common cytotypic.

These two lines were used to produce eight types of progeny (Table 1). Each type of progeny was produced by crossing independently ten females with males from the appropriate line. Superparasitism intensity was then quantified for two 1- to 2-day-old female offspring per family ($n = 20$ females per type of progeny). Based on the means and variances of progeny phenotypes, a joint-scaling analysis was performed to test for different genetic models incorporating a mean effect m , pooled additivity [a] and dominance [d] effects, as well as cytoplasmic maternal effects c (Cavalli, 1952; Gale *et al.*, 1977; Kearsley & Pooni, 1996; Lynch & Walsh, 1998). In *L. boulandi*, males are haploids, whereas females are diploids. There was, however, no need to take the haplodiploid mode of inheritance into account because we only worked with females, and the different types of progeny used were fully equivalent to progenies originating from strictly diploid species.

The adequacy of models was then tested by comparing the observed and expected means as described in the study of Lynch & Walsh (1998, Ch. 9, pp. 213–217), and the best model was selected according to the Akaike's information criterion (AIC) (Bieri & Kawecki, 2003).

PCR detection of LbFV

Although the DNA genome of LbFV has not been fully sequenced, previous studies led to the development of a molecular marker that can be used for PCR detection (Patot *et al.*, 2009). Using the protocol described in the study of Patot *et al.* (2009), we amplified a specific viral sequence (accession number: FM876312) with primers 102-F and 500-R in a multiplex reaction with insect

Table 1 Crossing design giving rise to eight types of progeny. n : number of tested females. For backcrosses (BC), the mothers originated from F1 hybrids and their two parental lines are indicated in parentheses.

Basic progenies	Crosses	n
P1	♀Av3 × ♂Av3	20
P2	♀Av12 × ♂Av12	20
F1.1	♀Av3 × ♂Av12	20
F1.21	♀Av12 × ♂Av3	20
BC1.1	♀(♀Av3 × ♂Av12) × ♂Av3	19
BC1.2	♀(♀Av3 × ♂Av12) × ♂Av12	20
BC2.1	♀(♀Av12 × ♂Av3) × ♂Av12	20
BC2.2	♀(♀Av12 × ♂Av3) × ♂Av3	18

primers RPS2-F and RPS2-R amplifying a parasitoid ribosomal protein gene to check for the quality of DNA extraction. The viral locus amplified is highly conserved because no genetic variation was observed among viral isolates from distant locations in the world (Patot *et al.*, 2010).

Quantification of viral titre

To test for the correlation between the viral titre and the intensity of the behavioural manipulation, quantitative PCR was carried out on five 3- to 4-day-old G3 females per line that had not experienced oviposition. DNA extraction was performed as described in the study of Patot *et al.* (2009). For each sample, two independent reactions were carried out, one to amplify the specific viral sequence (accession number: FM876312) using primers II1-F and II1-R and one for an insect nuclear marker using 5'-GGACACGTGCAGACTCATCA-3' and 5'-CCCACAGTTGTACTGTCATGC-3' (unpublished, putative importin-beta gene). Reactions were carried out in 10 μ L of a mixture containing 6 μ L of distilled water, 1 μ L of DNA template, 25 mM of MgCl₂, 500 nM of each primers and 1 μ L of reaction mixture containing the Taq polymerase and the SYBRgreen (LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I; Roche, Basel, Switzerland). The same cycling program was used for both markers: 10 s at 95°C, 10 s at 56°C, 20 s at 72°C for 35 cycles (LightCycler® 1.5 Instrument; Roche). After quantification, the virus gene copy number was divided by the insect gene copy number to obtain the viral titre per female.

Relationship between fecundity and behavioural manipulation

Because theoretical and empirical data suggest that the superparasitism phenotype may be influenced by egg load (Fletcher *et al.*, 1994; Sirot *et al.*, 1997), females of the two parental lines Av12 and Av3 that had not experienced oviposition were used to measure the fecundity. The egg load was measured on 5-day-old honey-fed females ($n = 20$ per line) under a microscope (Axio Imager, AxioCam, Software Axiovision LE; Zeiss, Thornwood, NY, USA). Tibia length was also measured to provide an estimate of the total body size of females.

Statistical analysis

All data sets were analysed using version 2.11.1 of R software. Given the nested structure of the designs, a hierarchical linear model was used for both the inbred line experiment (lines within infection status) and the introgression experiments (replicates within line, lines within population). Because we obtained unbalanced data due to losses of some lines or replicates across generations, we fitted a linear mixed model using the lme

function of the nlme package (Pinheiro & Bates, 2000). For generations G1 and G2, the population was treated as a fixed effect, because the five populations had been chosen on the basis of their viral prevalence, whereas the line (within population) and replicate (within line) effects were considered to be random. For G3 alone, the line effect was considered to be fixed because lines were chosen on the basis of their phenotype. The significance of fixed effects was tested on a model fitted by the restricted maximum likelihood method (REML), followed by conditional *F*-tests of the ANOVA method. After removing the nonsignificant fixed effects, variance components for random effects were also estimated by REML in association with 95% approximate confidence intervals (using the intervals function of the nlme package). The significance of random effects was evaluated by fitting models with the maximum likelihood method (ML). Models with and without the given random effect were then compared with a likelihood ratio test. Because there was only one random effect in G3 and lme cannot fit models without any random effect, we compared the full lme model to a model without a replicate effect fitted with the gls function (Pinheiro & Bates, 2000, Section 5.4, p. 250).

Results

Components of superparasitism variation within and between infection statuses

Thirty isofemale lines (22 uninfected/eight infected) derived from five original populations were established. After five generations of brother–sister mating, the inbred lines exhibited highly variable superparasitism

intensity, ranging from 1.04 to 11.28 eggs on average per parasitized *Drosophila* larva (Fig. 2). The striking difference depending on the infection status of females is consistent with previous studies (Varaldi *et al.*, 2003; Patot *et al.*, 2010) and accounted for 77% of the total phenotypic variation (LR = 33.87; $P < 0.0001$). Clearly, uninfected females tended to avoid superparasitism and usually laid only one egg per *Drosophila* larva, whereas infected females superparasitized much more frequently, leading to very high levels of superparasitism intensity. There were however significant differences between lines with the same infection status, both for uninfected (LR = 19.09; $P < 0.0001$) and for infected lines (LR = 4.01; $P = 0.04$), accounting for 37 and 31%, respectively, of the within-infection status variation. Because in this first experiment each line consisted of only one replicate of full-sisters, we cannot rule out the possibility that maternal or common environmental effects may have underlain these differences. Nevertheless, this variation could also reflect parasitoid genotype effects both for uninfected and for infected lines, or viral genotype and/or genotype-by-genotype interactions effects between infected lines. In what follows, we tried to quantify and test for a contribution of the parasitoid genotype to the variation in superparasitism of infected females.

Are some lines totally refractory to infection by LbFV?

Both uninfected and infected inbred lines were introgressed into a standard infected cytotype (Sref). All of them were successfully infected by LbFV at generation G1 and transmitted the virus to G2 and G3 females.

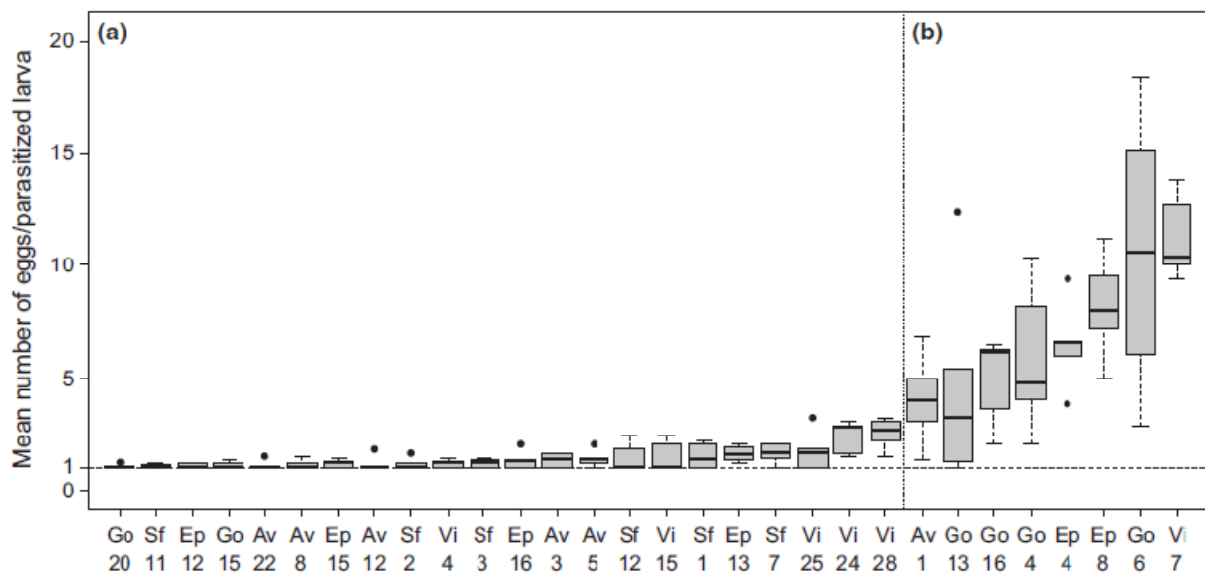


Fig. 2 Superparasitism intensity among inbred lines. (a) uninfected lines, (b) infected lines. The x-axis represents the inbred lines, which are designated by their population of origin: Sf = Sainte Foy-lès-Lyon (site 1); Vi = Villette-de-Vienne (site 2); Ep = Epinouze (site 3); Go = Gotheron (site 4); Av = Avignon (site 5).

The only exception was one of the two replicates of the Go20 line, in which no infection was detected at G1 and G2. Consequently, this replicate was not taken into account in the analyses. Note that because only two replicates per line were performed, we were not able to quantify the potential refractoriness of parasitoid lines to viral infection or the variation in vertical transmission rates between parasitoid lines. Nevertheless, none of the lines displayed complete refractoriness to infection.

Is there any genetic variation among introgressed lines regarding behavioural manipulation?

The superparasitism phenotype of each line introgressed into a common cytotype was quantified under standard conditions. For all generations, the introgressed lines showed higher superparasitism intensity compared with the uninfected control line, suggesting that behavioural manipulation occurs whatever the parasitoid genotype (Fig. 3). At G1 and G2, statistical analyses revealed almost the same pattern as there was no significant difference between populations or between lines for superparasitism intensity (Table 2). Despite the absence

of line effect, the mean superparasitism intensity per line ranged from 3.2 to 12.9 eggs per parasitized larva in G1 and from 3.3 to 10.8 eggs in G2. The main difference between the generations concerned the replicate effect, which was significant in G2 and accounted for 15.2% of the total variance. Maternal effects, common environmental effects and genetic variation between replicates due to residual genetic diversity in the original inbred lines are potential explanations for this between-replicates effect. The line effect accounted for about 6% of the total variance for both generations, whereas residual variance represented 87.3% and 78.8% of the variation in G1 and G2, respectively. These levels of residual variance reflect huge differences between individual females of similar genotypes, which reduces the statistical power in detecting variation at higher levels, i.e. between replicates, between lines or between populations.

To further test for the presence of heritable variation in the superparasitism behaviour of infected females, we tested whether there was any correlation between G1 and G2 with regard to the mean superparasitism phenotype per line. Because the individuals phenotypically tested at G1 were not the mothers of the individuals

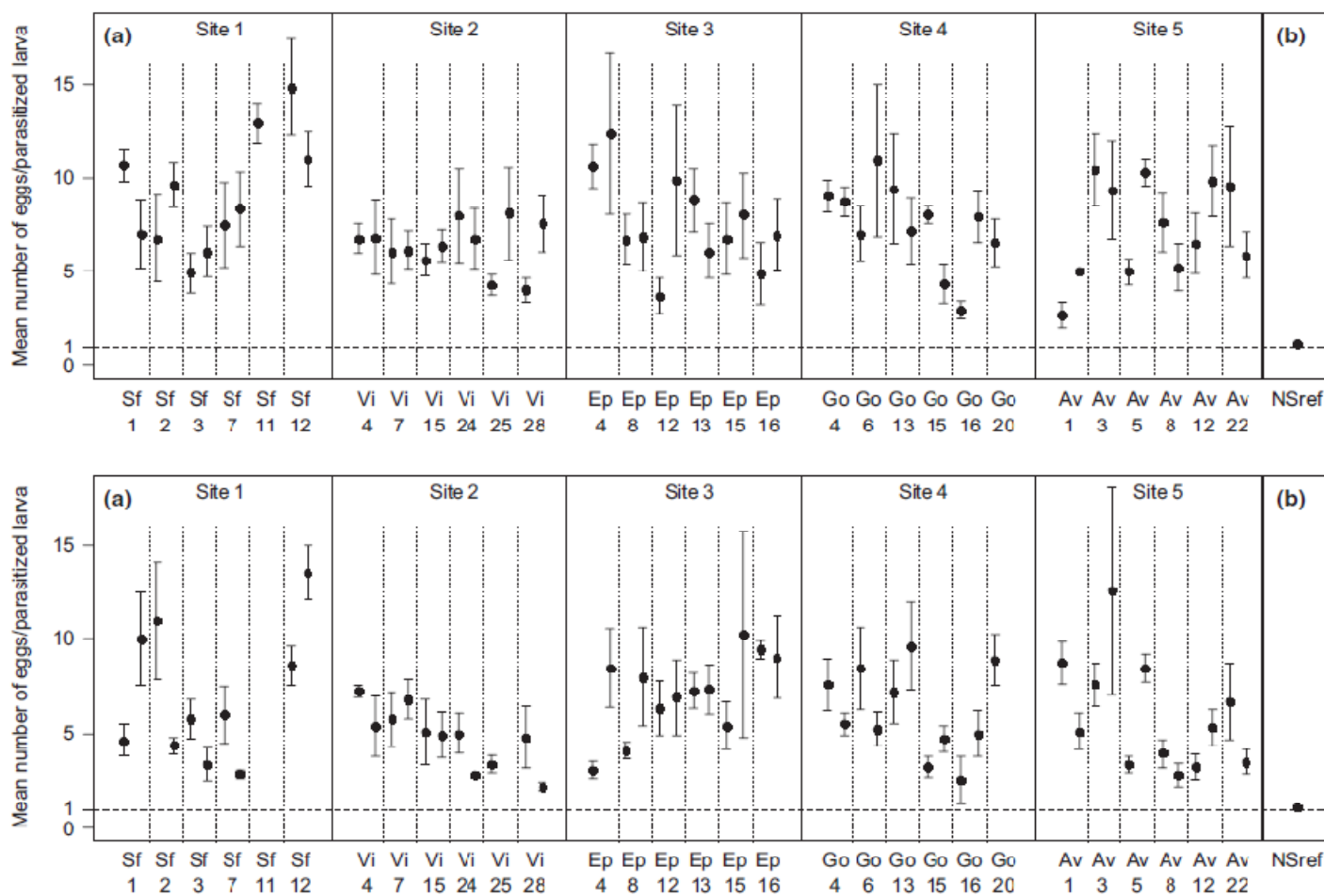


Fig. 3 Mean superparasitism intensity among introgressed lines at generations G1 (top) and G2 (bottom). (a) introgressed lines grouped according to their geographical origin (sites from north to south). (b) uninfected control line. Error bars are standard errors.

Table 2 Hierarchical linear mixed models of superparasitism intensity for the different generations of introgression. Fixed effects were tested using a conditional F -test. Random effects were tested by likelihood ratio tests after eliminating the nonsignificant fixed effects.

Generations	Source of variation	F -ratio for fixed effects/likelihood ratio for random effects	P	Variance component estimates with 95% confidence intervals (IC)	% of total variance
G1	Population	$F_{4,25} = 1.745$	0.17	–	–
	Line	LR = 0.8	0.37	1.10; IC = [0.37; 3.26]	6.2
	Replicate	LR = 1.23	0.27	1.12; IC = [0.36; 2.47]	6.4
	Residuals	–	–	4.13; IC = [3.77; 4.54]	87.3
G2	Population	$F_{4,24} = 1.203$	0.34	–	–
	Line	LR = 0.52	0.47	0.96; IC = [0.16; 5.82]	6
	Replicate	LR = 5.76	0.02	1.64; IC = [0.85; 3.18]	15.2
	Residuals	–	–	3.76; IC = [3.44; 4.14]	78.8
G3	Line	$F_{3,10} = 12.566$	0.001	–	–
	Replicate	LR < 0.0001	0.99	0.49; IC = [0.005; 49.3]	–
	Residuals	–	–	3.24; IC = [2.68; 3.91]	–

tested at G2 (it was their sisters that were used), we did not expect to find any correlation caused by maternal effects. Furthermore, because two independent replicates (two vials) were performed for each line, we did not expect to find any correlation caused by common environment. Yet, the mean superparasitism intensity per line showed a positive correlation between G1 and G2 ($r = 0.48$; d.f. = 27; $P = 0.009$), demonstrating that some of the variation in superparasitism behaviour is transmitted from one generation to another (Fig. 4). This strongly suggests that the phenotypic covariance between G1 and G2 results from genetic covariance

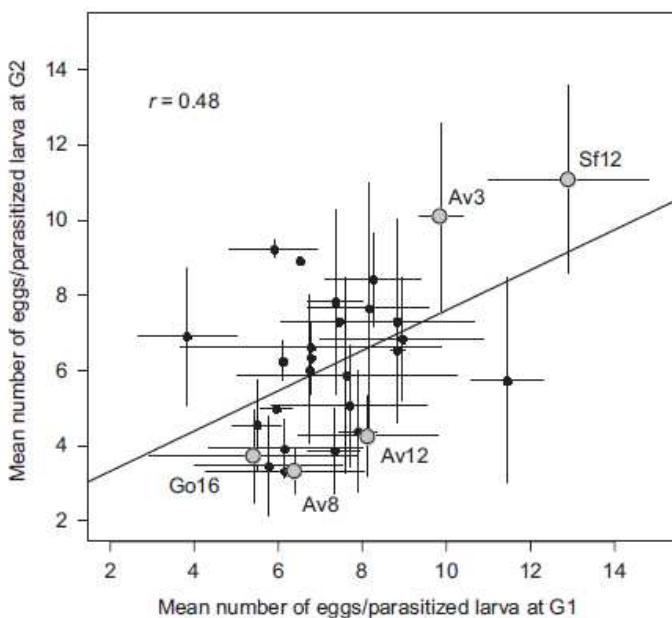


Fig. 4 Correlation of superparasitism intensity between generations G1 and G2. Dots represent the mean number of eggs/parasitized larva/female for each line calculated by averaging the means of the two replicates. Error bars are standard errors (no standard error when one replicate was missing). Grey dots correspond to the lines chosen for the establishment of generation G3 and for the crossing experiment between extreme lines.

between relatives and not from environmental covariance, indicating the presence of heritable variation of the extended phenotype.

Further introgression to establish G3 was performed with the extreme lines Sf12/Av3 and Go16/Av8, which displayed particularly high and low superparasitism intensity, respectively, at G1 and G2 (Fig. 4). In contrast to G2, there was no significant difference between the replicates of each line at G3. More interestingly, the results confirmed the line-specific differences observed in the previous generations (Table 2; Fig. 5). Indeed, an additional pairwise comparison showed that, as expected, the four lines can be assigned to two groups: the highly manipulated lines Av3 and Sf12 and the less manipulated lines Go16 and Av8.

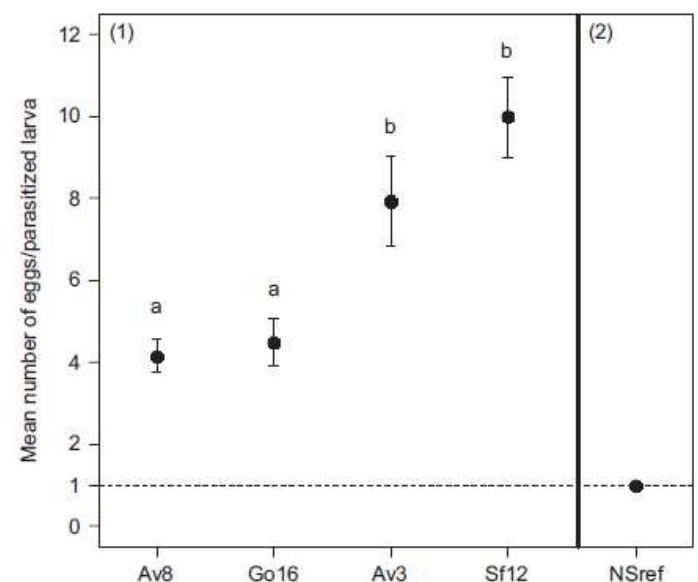


Fig. 5 Mean superparasitism intensity per line at generation G3. (1) four extreme introgressed lines; (2) uninfected control line. Different letters indicate significant differences based on a Tukey's honestly significant differences test. Error bars are standard errors.

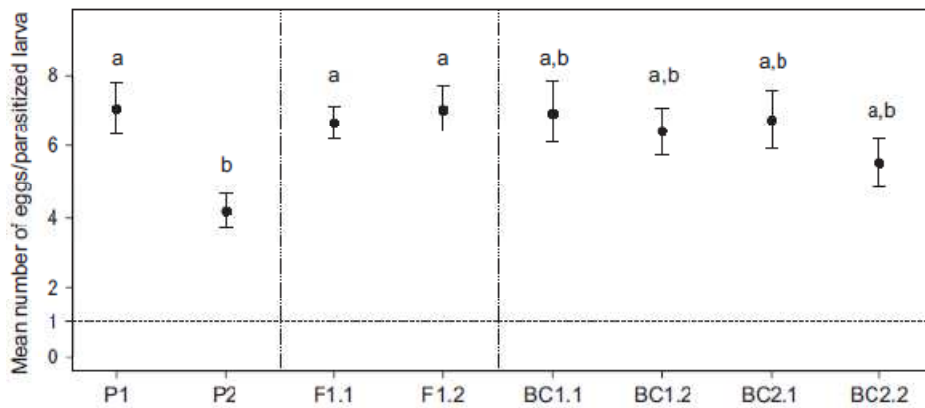


Fig. 6 Mean superparasitism intensity for the different progenies resulting from the crossing procedure between the low and high superparasitizing lines Av12 (P2) and Av3 (P1). Different letters indicate significant differences based on a Tukey's honest significant differences test. Error bars are standard errors.

Because most of the lines obtained from the previous experiments had been lost, we reconstructed extreme introgressed lines. The results obtained using these newly introgressed lines confirmed previous data because, as expected and in accordance with their initial phenotype (Fig. 4), the newly introgressed line Av12 superparasitized less than Av3 (data not shown). This pattern was stable across three generations of introgression ($F_{1,14} = 28.024$; $P < 0.0001$). The fact that the same result was observed in two independent experiments clearly supports the hypothesis that variation in the parasitoid genome is involved in the observed variation of superparasitism.

What is the genetic architecture of the determinants involved in the behavioural manipulation?

To address this question, extreme lines Av3 and Av12 were crossed (after seven generations of introgression).

Analysis of their different types of progeny revealed significant differences between progenies ($F_{7,149} = 2.417$; $P = 0.02$), with the parental line Av12 (P2 in Fig. 6) showing, as expected, lower superparasitism intensity than Av3 (P1 in Fig. 6).

Three adequate models explained the segregation of superparasitism phenotype: $m + [a] + [d]$, $m + [d] + c$ and $m + [a] + [d] + c$ (Fig. 6 and Table 3). Genetic effects [a] and [d] were significant when present in these models, but c did not differ from zero in the third model. Moreover, the AIC scores indicate that the most parsimonious model was $m + [a] + [d]$, which means that there was no need to consider other effects, such as epistasis, to explain the phenotypic variation. The highly superparasitizing alleles (Av3 alleles) displayed strong dominance effect over poorly superparasitizing alleles (Av12 alleles). Thus, superparasitism intensity seems to be influenced by both additive and dominance effects, but not by cytoplasmic effects or epistatic interactions.

Table 3 Goodness-of-fit test of model adequacy, Student's t-tests of parameter estimates for adequate models and the corresponding Akaike's information criterion (AIC).

Model	d.f.*	χ^2 statistic	Goodness-of-fit test (P)	Parameter estimate (t-test in parentheses)	AIC
m	7	22.26	0.002	–	–
m + [a]	6	12.74	0.004	–	–
m + [d]	6	13.38	0.037	–	–
m + [c]	6	16.72	0.01	–	–
m + [a] + [d]	5	7.32	0.198	m = 5.52 ($P < 0.0001$) [a] = 0.94 ($P = 0.007$) [d] = 1.35 ($P = 0.011$)	13.32
m + [a] + [c]	5	12.89	0.024	–	–
m + [d] + [c]	5	9.82	0.08	m = 5.41 ($P < 0.0001$) [d] = 1.37 ($P = 0.01$) [c] = 0.43 ($P = 0.031$)	15.82
m + [a] + [d] + [c]	4	6.18	0.186	m = 5.57 ($P < 0.0001$) [a] = 0.78 ($P = 0.029$) [d] = 1.22 ($P = 0.02$) [c] = 0.27 ($P = 0.144$)	14.13

*Degrees of freedom = number of progeny means – number of parameter estimates.

This supports the hypothesis that variation in superparasitism behaviour, in infected lines, is partly governed by variation in the nuclear genome.

Is there any correlation between behavioural manipulation and virus titre or egg load?

Viral density was measured on entire adult G3 females from extreme lines (Av8, Gol6, Av3 and Sf12) as the ratio between a virus gene and an insect gene copy number. No significant difference in virus titre was found between the extreme lines ($F_{3,16} = 2.492$; $P = 0.1$; mean viral titre: 5.5 virus gene copies/100 insect gene copies) even if we pooled these lines according to their superparasitism phenotype (Av8 + Gol6 vs. Av3 + Sf12, $F_{1,18} = 0.62$; $P = 0.44$), suggesting that the variation in superparasitism does not result from differences in the number of viral particles infecting the females.

Interestingly, the highly superparasitizing line Av3 had a higher egg load than Av12 ($F_{1,33} = 17.67$; $P = 0.0002$) although they had similar tibia lengths ($F_{1,35} = 0.07$; $P = 0.79$).

Discussion

Superparasitism can be expected to be subjected to high selective pressure because of the direct link between the decision-making process and the fitness of parasitoid females (van Alphen & Visser, 1990; Visser, 1993). In *L. boulardi*, the decision to superparasitize is targeted by manipulation induced by the heritable virus LbFV, which benefits from horizontal transmission under superparasitism conditions. Starting from a sample of *L. boulardi* lines originating from various localities, we found that the infection status of the parasitoids accounts for 77% of the total variation in superparasitism behaviour. We also found that the different parasitoid genotypes were not manipulated with the same intensity. Although the parasitoid line effect was not significant at the first two generations of introgression, the positive correlation of the mean line phenotypes between these generations supports the hypothesis of genetic line-specific differences. Taken together with what had been found after further introgression of extreme lines, these results showed that phenotypic variation is transmitted across generations. This line-specific variation is most probably due to nuclear genetic effects because parasitoid genotypes were introgressed into homogenous LbFV-infected cytoplasm. Although we cannot rule out the possibility that some other viral symbiont could be present in this cytotype, no symbiotic bacteria seem to infect *L. boulardi* (Varaldi *et al.*, 2006b). One could argue that the observed differences between introgressed lines result from the accumulation of mutations in LbFV or in other unknown cytoplasmic symbionts infecting the Sref line (and/or the loss of unknown cytoplasmic symbionts) during the course of the introgression experiment. However, such

effects, which would be equivalent to maternal effects, were taken into account because several introgression replicates were performed per line. In addition, this hypothesis cannot explain why several independent introgression experiments always led to the expected phenotypes for both highly and poorly superparasitizing lines. Thus, we conclude that part of the variation was caused by genetic differences between parasitoid lines and was heritable with substantial additive and dominance effects. We did not find any complete resistance to manipulation, but parasitoid genotypes did exhibit differences in their sensitivity to viral manipulation. Reduced sensitivity can be viewed as partial resistance to the virus effect, which amounts to a kind of tolerance to the infection (Svensson & Raberg, 2010). Tolerance is a way the host can defend itself by alleviating the negative fitness consequences of an infection without preventing the infection or reducing the growth of the parasitic symbiont (Lefèvre *et al.*, 2011). Symbiont titre has been shown to vary according to the host genotype in several symbiotic associations (Kondo *et al.*, 2005; Mouton *et al.*, 2007). Under the hypothesis of a resistance to the infection, we would expect that variation in the extended phenotype would be correlated with variation in symbiont titre. In our study, however, the viral titre of the females did not differ between genotypes showing extreme and opposite behavioural phenotypes, which fits with a tolerance mechanism. Between-line differences in superparasitism intensity could be due to allelic variation in the parasitoid genes involved in functions that mediate superparasitism behaviour (tolerance) rather than in functions that control viral multiplication within parasitoid females (resistance). However, we must be cautious about this conclusion, because only four lines were tested, which reduces the statistical power of the viral titre analysis. Additional experiments will be required to test the two hypotheses.

Although there was heritable additive variation within the populations with regard to the superparasitism of infected females, on average the different populations displayed the same superparasitism intensity. This was rather unexpected in view of the contrasting ecological conditions experienced by the northern and southern populations. Indeed, the strength of selection exerted by LbFV is probably greater in the south given the much higher viral prevalence (Patot *et al.*, 2010; Fig. 1). Knowing that uninfected females rarely superparasitize, we can reasonably assume that the parasitoid optimum is lower than the superparasitism intensity expressed by infected females. Thus, given the existence of parasitoid genetic variability for manipulation intensity, we would have expected southern genotypes to be more resistant to manipulation than northern ones, because they are much more likely to be infected. A possible explanation for this absence of differentiation is the fact that the migration rate may be high in this area, thus preventing the development of geographical structuring of the

parasitoid gene pool. Alternatively, the virus could have invaded parasitoid populations only very recently, as has been observed for sigma viruses in *D. obscura* (invasion in England within the past 11 years, Longdon *et al.*, 2011) and *D. melanogaster* (Carpenter *et al.*, 2007). In this case, alleles conferring tolerance would not yet have had long enough time to spread through southern populations. Negative pleiotropy or genotype-by-environment interactions may also play a role in maintaining polymorphism (Gillespie & Turelli, 1989; Curtsinger *et al.*, 1994; Reinhold, 2000; Turelli & Barton, 2004; Byers, 2005; Hedrick, 2007). Our data suggest that a pleiotropic effect might indeed promote the coexistence of several parasitoid genotypes, because the poorly manipulated Av12 line had a lower egg load than the highly manipulated Av3 line. This constitutes a potential cost of tolerance. However, this correlation needs to be tested over a wider range of parasitoid and virus genotypes. Furthermore, in this system, superparasitism tends to decrease the efficiency of the *Drosophila* immune response, especially in *D. simulans* (J. Martinez, F. Fleury & J. Varaldi, unpublished data), thus constituting a potential fitness benefit for highly manipulated genotypes.

Finally, we can question whether selection can act efficiently on the parasitoid genetic variation involved in the expression of behavioural manipulation. This polymorphism, albeit phenotypically expressed, might be neutral with regard to local selective pressures. In this case, however, we would expect that uninfected females would also exhibit such a wide range of superparasitism intensity, which they do not. However, the large residual variance (around 80%) and the low between-line variance (around 6%) show that environmental heterogeneity has a strong influence on this phenotype, and so may preclude the action of selection.

The genetic architecture of superparasitism is clearly extremely complex. The phenotypic value of an individual is likely to depend on its infection status, its own genotype, the genotype of its symbiont, the environment and all the possible interactions. Furthermore, parasitoid and virus genes have different transmission routes and thus experience divergent selective pressures. The prevalence of the virus also differs considerably from one population to another, and so the strength of selection imposed on parasitoid populations might also be very variable. In this paper, we have tried to quantify the influence of one component (the genotype of the individual) infected by the same viral isolate on the extended phenotype and found that it made a significant but relatively small contribution. Further work should evaluate other contributions to the phenotypic variation of superparasitism, such as the viral genetic diversity (Wilfert & Jiggins, 2010), the genetic correlations between infection statuses or between fitness-related traits. This work should shed light on how selection acts on this complex extended phenotype. For instance, one interesting question is whether the differences that we

observed among infected lines would also be observed among their uninfected counterparts (which could be done by introgressing the original inbred lines into the uninfected reference line). In this case, the differences observed between infected females would simply reflect baseline differences in the behaviour of uninfected females. In contrast, complex parasitoid genotype-by-infection status interactions may be found. As we pointed out in the introduction, the IGE theory (McGlothlin & Brodie, 2009) might help us to do this. IGE theory is used to study phenotypes of which the expression is influenced by genes present in other conspecifics. This theoretical framework could be extended to include interactions with genes present in a heritable symbiotic partner.

Acknowledgments

We are grateful to the INRA centres of Avignon and Gotheron and to the landowners for kindly allowing us to collect insects from their orchards. We would like to thank Patricia Gibert and Roland Allemand for their help in the field sampling, Marie-Laure Delignette for helpful discussions, two anonymous referees for helpful suggestions and Monika Ghosh for English revisions. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS 5558).

References

- van Alphen, J.J.M. & Visser, M.E. 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annu. Rev. Entomol.* **35**: 59–79.
- Bieri, J. & Kawecki, T.J. 2003. Genetic architecture of differences between populations of cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) evolved in the same environment. *Evolution* **57**: 274–287.
- Brownlie, J.C. & Johnson, K.N. 2009. Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol.* **17**: 348–354.
- Byers, D.L. 2005. Evolution in heterogeneous environments and the potential of maintenance of genetic variation in traits of adaptive significance. *Genetica* **123**: 107–124.
- Carpenter, J., Obbard, D., Maside, X. & Jiggins, F. 2007. The recent spread of a vertically transmitted virus through populations of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Ecol.* **16**: 3947–3954.
- Carton, Y., Bouletreau, M., van Alphen, J. & Van Lenteren, J. 1986. The *Drosophila* parasitic wasps. In: *The Genetics and Biology of Drosophila* (M. Ashburner, L. Carson & J.N. Thompson, eds), pp. 347–394. Academic Press Inc., London.
- Cavalli, L.L. 1952. An analysis of linkage in quantitative inheritance. In: *Quantitative Inheritance* (E.C. Reeve & C.H. Waddington, eds), pp. 135–144. HMSO, London.
- Charlat, S., Hornett, E., Fullard, J.H., Davies, N., Roderick, G.K., Wedell, N. *et al.* 2007. Extraordinary flux in sex ratio. *Science* **317**: 214.
- Cordaux, R., Bouchon, D. & Grève, P. 2011. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends Genet.* **27**: 332–341.
- Curtsinger, J.W., Service, P.M. & Prout, T. 1994. Antagonistic pleiotropy, reversal of dominance, and genetic-polymorphism. *Am. Nat.* **144**: 210–228.

- David, J.R. 1962. A new medium for rearing *Drosophila* in axenic condition. *Dros. Inf. Serv.* **36**: 128.
- Dawkins, R. 1982. *The Extended Phenotype*. Oxford University Press, Oxford.
- Douglas, A.E. 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Funct. Ecol.* **23**: 38–47.
- Dunbar, H., Wilson, A., Ferguson, N. & Moran, N. 2007. Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biol.* **5**: 1006–1015.
- Fletcher, J.P., Hughes, J.P. & Harvey, I.F. 1994. Life expectancy and egg load affect oviposition decisions of a solitary parasitoid. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **258**: 163–167.
- Fleury, F., Ris, N., Allemand, R., Fouillet, P., Carton, Y. & Boulétreau, M. 2004. Ecological and genetic interactions in *Drosophila*–parasitoids communities: a case study with *D. melanogaster*, *D. simulans* and their common *Leptopilina* parasitoids in south-eastern France. *Genetica* **120**: 181–194.
- Fleury, F., Gibert, P., Ris, N. & Allemand, R. 2009. Ecology and life history evolution of frugivorous *Drosophila* parasitoids. In: *Advances in Parasitology*, Vol. 70 (G. Prévost, ed.), pp. 3–44. Elsevier Academic Press Inc., San Diego.
- Gale, J.G., Mather, K. & Jinks, J.L. 1977. Joint scaling tests. *Heredity* **38**: 47–51.
- Gandon, S., Rivero, A. & Varaldi, J. 2006. Superparasitism evolution: adaptation or manipulation? *Am. Nat.* **167**: E1–E22.
- Gillespie, J.H. & Turelli, M. 1989. Genotype–environment interactions and the maintenance of polygenic variation. *Genetics* **121**: 129–138.
- Heath, K.D. 2009. Intergenomic epistasis and coevolutionary constraint in plants and rhizobia. *Evolution* **64**: 1446–1458.
- Hedrick, P.W. 2007. Balancing selection. *Curr. Biol.* **17**: R230–R231.
- Herre, E., Knowlton, N., Mueller, U. & Rehner, S. 1999. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *Trends Ecol. Evol.* **14**: 49–53.
- Hurd, H. 2009. Evolutionary drivers of parasite-induced changes in insect life-history traits: from theory to underlying mechanisms. In: *Advances in Parasitology*, Vol. 68 (D. Rollinson & S. Hay, eds), pp. 85–110. Elsevier Academic Press Inc., San Diego.
- Hurd, H., Warr, E. & Polwart, A. 2001. A parasite that increases host lifespan. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **268**: 1749–1753.
- Jaenike, J. 2007. Spontaneous emergence of a new *Wolbachia* phenotype. *Evolution* **61**: 2244–2252.
- James, A. & Ballard, J. 2003. Mitochondrial genotype affects fitness in *Drosophila simulans*. *Genetics* **164**: 187–194.
- Kageyama, D., Anbutu, H., Shimada, M. & Fukatsu, T. 2009. Effects of host genotype against the expression of Spiroplasma-induced male killing in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **102**: 475–482.
- Kearsey, M.J. & Pooni, H.S. 1996. *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Chapman and Hall, London.
- Kondo, N., Shimada, M. & Fukatsu, T. 2005. Infection density of *Wolbachia* endosymbiont affected by co-infection and host genotype. *Biol. Lett.* **1**: 488–491.
- Lambrechts, L. 2010. Dissecting the genetic architecture of host–pathogen specificity. *PLoS Pathog.* **6**: 3.
- Lambrechts, L., Fellous, S. & Koella, J.C. 2006. Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends Parasitol.* **22**: 12–16.
- Lefèvre, T., Williams, A.J. & De Roode, J.C. 2011. Genetic variation in resistance, but not tolerance, to a protozoan parasite in the monarch butterfly. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **278**: 751–759.
- Longdon, B., Wilfert, L., Obbard, D.J. & Jiggins, F.M. 2011. Rhabdoviruses in two species of *Drosophila*: vertical transmission and a recent sweep. *Genetics* **188**: 141–150.
- Lynch, M. & Walsh, B. 1998. *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- McGlothlin, J.W. & Brodie, E.D. 2009. How to measure indirect genetic effects: the congruence of trait-based and variance-partitioning approaches. *Evolution* **63**: 1785–1795.
- Moore, A.J., Brodie, E.D. & Wolf, J.B. 1997. Interacting phenotypes and the evolutionary process I. Direct and indirect genetic effects of social interactions. *Evolution* **51**: 1352–1362.
- Moran, N. 2007. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 8627–8633.
- Moran, N. & Degnan, P. 2006. Functional genomics of *Buchnera* and the ecology of aphid hosts. *Mol. Ecol.* **15**: 1251–1261.
- Mouton, L., Henri, H., Charif, D., Boulétreau, M. & Vavre, F. 2007. Interaction between host genotype and environmental conditions affects bacterial density in *Wolbachia* symbiosis. *Biol. Lett.* **3**: 210–213.
- Oliver, K., Moran, N. & Hunter, M. 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., 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.
- Patot, S., Lepetit, D., Charif, D., Varaldi, J. & Fleury, F. 2009. Molecular detection, penetrance, and transmission of an inherited virus responsible for behavioral manipulation of an insect parasitoid. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 703–710.
- Patot, S., Martinez, J., Allemand, R., Gandon, S., Varaldi, J. & Fleury, F. 2010. Prevalence of a virus inducing behavioural manipulation near species range border. *Mol. Ecol.* **19**: 2995–3007.
- Pinheiro, J.C. & Bates, D.M. 2000. *Mixed Effects Models in S and S-PLUS*. Springer-Verlag, New York.
- Poinsot, D., Bourtzis, K., Markakis, G., Savakis, C. & Merçot, H. 1998. *Wolbachia* transfer from *Drosophila melanogaster* into *D. simulans*: host effect and cytoplasmic incompatibility relationships. *Genetics* **150**: 227–237.
- Poulin, R. & Thomas, F. 1999. Phenotypic variability induced by parasites: extent and evolutionary implications. *Parasitol. Today* **15**: 28–32.
- Reinhold, K. 2000. Maintenance of a genetic polymorphism by fluctuating selection on sex limited traits. *J. Evol. Biol.* **13**: 1009–1014.
- Shuster, S.M., Lonsdorf, E.V., Wimp, G.M., Bailey, J.K. & Whitham, T.G. 2006. Community heritability measures the evolutionary consequences of indirect genetic effects on community structure. *Evolution* **60**: 991–1003.
- Sirot, E., Ploye, H. & Bernstein, C. 1997. State dependent superparasitism in a solitary parasitoid: egg load and survival. *Behav. Ecol.* **8**: 226–232.
- Smith, J. 2007. A gene's-eye view of symbiont transmission. *Am. Nat.* **170**: 542–550.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. & Hurst, G. 1999. *Wolbachia pipiensis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 71–102.

- Svensson, E.I. & Raberg, L. 2010. Resistance and tolerance in animal enemy-victim coevolution. *Trends Ecol. Evol.* **25**: 267–274.
- Turelli, M. & Barton, N.H. 2004. Polygenic variation maintained by balancing selection: pleiotropy, sex-dependent allelic effects and GxE interactions. *Genetics* **166**: 1053–1079.
- Varaldi, J., Fouillet, P., Ravallec, M., Lopez-Ferber, M., Boulétreau, M. & Fleury, F. 2003. Infectious behavior in a parasitoid. *Science* **302**: 1930.
- Varaldi, J., Boulétreau, M. & Fleury, F. 2005a. Cost induced by viral particles manipulating superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. *Parasitology* **131**: 1–8.
- Varaldi, J., Fouillet, P., Boulétreau, M. & Fleury, F. 2005b. Superparasitism acceptance and patch-leaving mechanisms in parasitoids: a comparison between two sympatric wasps. *Anim. Behav.* **69**: 1227–1234.
- Varaldi, J., Petit, S., Bouletréau, M. & Fleury, F. 2006a. The 769 virus infecting the parasitoid *Leptopilina boulardi* exerts a specific action on superparasitism behaviour. *Parasitology* **132**: 747–756.
- Varaldi, J., Ravallec, M., Labrosse, C., Lopez-Ferber, M., Boulétreau, M. & Fleury, F. 2006b. Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *J. Insect Physiol.* **52**: 1202–1212.
- Varaldi, J., Patot, S., Nardin, M. & Gandon, S. 2009. A virus-shaping reproductive strategy in a *Drosophila* parasitoid. In: *Advances in Parasitology*, Vol. 70 (G. Prévost, ed.), pp. 333–363. Elsevier Academic Press Inc., San Diego.
- Visser, M.E. 1993. Adaptive self-superparasitism and conspecific superparasitism in the solitary parasitoid *Leptopilina heterotoma* (Hymenoptera, Eucoilidae). *Behav. Ecol.* **4**: 22–28.
- Vorburger, C., Sandrock, C., Gousskov, A., Castañeda, L.E. & Ferrari, J. 2009. Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all-parthenogenetic host parasitoid interaction. *Evolution* **63**: 1439–1450.
- Wilfert, L. & Jiggins, F.M. 2010. Host-parasite coevolution: genetic variation in a virus population and the interaction with a host gene. *J. Evol. Biol.* **23**: 1447–1455.
- Xie, J.L., Vilchez, I. & Mateos, M. 2010. *Spiroplasma* bacteria 793 enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *PLoS One* **5**: 1–7.
- Zchori-Fein, E., Gottlieb, Y., Kelly, S., Brown, J., Wilson, J., Karr, T. et al. 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 12555–12560.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Appendix S1 Comparison of NS (uninfected) and S (infected) parasitoid lines on conspecific superparasitism behaviour.

As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

Data deposited at Dryad: doi: 10.5061/dryad.kp17n860

Received 1 July 2011; accepted 20 September 2011

Chapitre 3

Evolution expérimentale d'un phénotype étendu via le compartiment nucléaire

Chapitre 3. Evolution expérimentale du phénotype étendu via le compartiment nucléaire

Introduction

Bien que le superparasitisme soit généralement coûteux pour les femelles parasitoïdes, il peut devenir avantageux dans des conditions de forte compétition pour les hôtes (van Alphen & Visser 1990 ; Gandon *et al.* 2006). En accord avec cette prédiction, des réponses comportementales conditionnelles ont été mise en évidence chez *Leptopilina heterotoma*, les femelles superparasitant plus lorsque la compétition pour les hôtes devient plus forte (Visser 1993 ; 1995). Cependant, la valeur sélective du superparasitisme n'a encore jamais été testée expérimentalement.

Nous avons vu précédemment que le génotype du parasitoïde contribue en partie à l'expression de la manipulation comportementale exercée par le virus LbFV (Martinez *et al.* 2011, *In Press*). En effet, dans les populations du sud-est de la France, certains génotypes de parasitoïdes tendent à être moins sensibles à la manipulation que d'autres. Ce polymorphisme offre l'opportunité de tester l'évolution du superparasitisme face à différents niveaux de compétition pour les hôtes.

Par une expérience d'évolution expérimentale, nous avons tenté de tester le potentiel évolutif de la résistance à la manipulation face à deux niveaux de compétition pour les hôtes. En partant de populations infectées par une même souche virale et polymorphes pour la résistance à la manipulation, on peut s'attendre à quatre issues évolutives possibles (Fig. 1) :

- le polymorphisme de sensibilité à la manipulation n'offre pas de prise à la sélection. La contribution des effets de l'environnement dans l'expression de la manipulation est importante par rapport aux effets génétiques. Dans ce cas, on ne s'attend pas à observer de changement de l'intensité du superparasitisme au fil des générations (Fig. 1a).
- le polymorphisme de sensibilité à la manipulation n'offre pas de prise à la sélection mais les effets génétiques contribuent plus que les effets de l'environnement à la variabilité du superparasitisme. On peut cette fois s'attendre à des variations aléatoires de l'intensité du superparasitisme, totalement indépendantes de la compétition pour les hôtes, dues aux effets de dérive génétique (Fig. 1b).

- le polymorphisme offre une prise à la sélection et la résistance à la manipulation (tolérance à l'infection) est favorisée quelque soit le niveau de compétition pour les hôtes (un seul optimum pour le parasitoïde). Dans ce cas, on s'attend à ce que les populations évoluent toutes vers une intensité de manipulation plus faible, quelles que soient les conditions de compétition pour les hôtes (Fig. 1c). De plus, on peut s'attendre à une réponse évolutive plus rapide face à une faible compétition où le coût du superparasitisme est plus élevé.
- le polymorphisme offre une prise à la sélection mais les deux niveaux de compétition correspondent à deux optimums de superparasitisme différents. Ainsi, les populations exposées à une faible compétition devraient évoluer vers une intensité de superparasitisme basse, tandis que celles exposées à une forte compétition devraient évoluer vers une intensité de superparasitisme plus élevée (Fig. 1d).

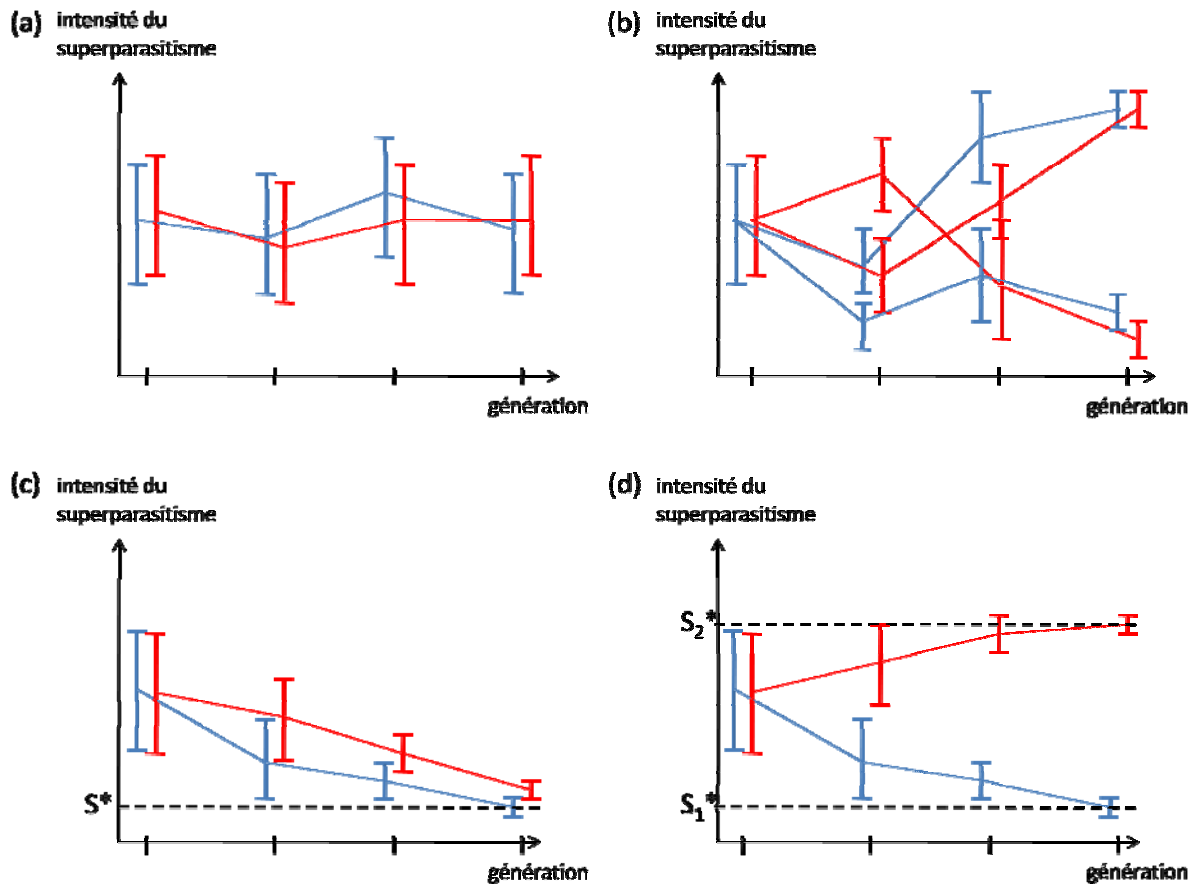


Figure 1. Différents scénarios d'évolution de l'intensité du superparasitisme lorsque les populations de parasitoïdes sont infectées par une même souche virale et polymorphes sur le compartiment nucléaire. Rouge : forte compétition pour les hôtes. Bleu : faible compétition pour les hôtes. (a) Pas de prise à la sélection ; effets de l'environnement >> effets génétiques. (b) Pas de prise à la sélection ; effets de l'environnement << effets génétiques. (c) Prise à la sélection ; un seul optimum bas de superparasitisme (S^*). (d) Prise à la sélection ; deux optimums de superparasitisme dépendant du niveau de compétition (S_1^* , S_2^*).

Matériel et méthodes

Lignées parentales

Les lignées de parasitoïdes Av12 et Av3, originaire de la population d'Avignon, ont été choisies pour fonder les populations de départ de ce protocole. Les génotypes des lignées Av12 et Av3 avaient montré des intensités de superparasitisme respectivement faible et forte lors des introgressions dans un cytoplasme infecté par une même souche virale (chapitre 1). Elles avaient initialement été rendues consanguines par 5 générations de croisements frère-sœur (taux

d'homozygotie supérieur ou égal à 67,5%). A la suite de ces croisements frère-sœur, les deux lignées avaient été maintenues au laboratoire en petite masse pendant plus de 30 générations (à chaque génération, 3 femelles accouplées étaient utilisées pour fonder la génération suivante), assurant un taux d'homozygotie très élevé. Avant le lancement de l'expérience d'évolution expérimentale, les deux lignées ont été introgressées à nouveau dans le cytoplasme de la lignée infectée Sref et le comportement de superparasitisme a été mesuré à différentes générations d'introgession afin de s'assurer du maintien des différences phénotypiques entre ces deux génotypes. Le protocole standard de quantification du superparasitisme a été appliqué sur 15 femelles de chaque lignée introgressée pour les générations F1 (50% du génome introgressé dans le cytoplasme de Sref), Backcross 1 (BC1 ; 75% d'introgession), BC2 (87,5% d'introgession) et BC6 (> 99% d'introgession). Dans la suite du chapitre, les deux lignées introgressées (par la suite maintenues en petite masse) seront désignées respectivement par Av12_{BC6} et Av3_{BC6}. Ces deux lignées diffèrent par leur génotype nucléaire mais ont hérité du même cytoplasme infecté par LbFV. Nous ferons l'hypothèse que la variabilité génétique chez le virus est nulle puisque la lignée d'origine du virus, Sref, est une lignée isofemelle ayant été maintenue au laboratoire en effectif très réduit pendant plusieurs dizaines de générations (2 à 3 femelles à chaque génération). Ainsi, si plusieurs souches de LbFV infectaient la lignée Sref à l'origine, la dérive génétique due aux conditions d'élevage aurait probablement éliminé toute variabilité génétique chez le virus, même si l'on ne peut pas exclure l'apparition de mutations.

Compétition en cages à population

Afin d'approcher les conditions écologiques rencontrées par les parasitoïdes, l'expérience d'évolution expérimentale a été réalisée en cages à populations. A chaque génération, les cages ont été utilisées uniquement lors de la ponte des femelles parasitoïdes afin de mettre en compétition les femelles pour la disponibilité en hôtes drosophiles. Au total, dix cages à population ont été utilisées, constituant dix populations de parasitoïdes indépendantes (Tab. 1). Afin de moduler le degré de compétition entre les femelles parasitoïdes, nous avons fait varier la densité de larves de drosophiles hôtes dans les cages. Cinq populations ont été maintenues avec une faible densité en larves de drosophiles, alors que les cinq autres ont été maintenues avec une forte densité en larves de drosophiles (en maintenant la quantité de parasitoïdes constante). A la génération 0 (G0), pour chaque densité larvaire, trois populations « tests » ont été initiées en mélangeant 25 femelles de la lignée Av12_{BC6} avec 25 femelles de la lignée

Av3_{BC6} (Tab. 1). Les deux autres populations de chaque densité larvaire ont été initiées à partir de 50 femelles d'une des deux lignées parentales pour fonder des populations « témoins » (Tab. 1). Du fait d'une variabilité génétique extrêmement réduite chez les deux lignées parentales, on ne s'attend pas à observer d'évolution dans les cages témoins. Les cages utilisées (35 cm × 25 cm × 16 cm) permettent de faire pondre les femelles sur un total de 11 patches d'hôtes (Fig. 2). Chaque patch d'hôtes consiste en un godet, inséré dans la partie inférieure de la cage, et contenant du milieu de culture standard (David 1962) sur lequel ont préalablement été déposés des œufs de drosophiles. Avant la préparation des godets, des drosophiles de la lignée de laboratoire de *D. melanogaster* (Ste Foy-lès-Lyon) sont mises à pondre pendant 24 heures sur une rondelle de milieu standard. La préparation des deux densités larvaires a ensuite consisté à déposer dans chaque godet soit un tiers de rondelle (environ 130 œufs : forte densité larvaire, soit au total $11 \times 130 = 1430$ hôtes potentiels) soit un huitième de rondelle (environ 50 œufs : faible densité larvaire, soit au total $11 \times 50 = 550$ hôtes potentiels). Après éclosion des œufs de drosophiles au bout de 24 heures de développement à 26°C (photopériode L12:D12), les 50 femelles parasitoïdes âgées de 2 à 3 jours sont ajoutées dans chaque cage. Les femelles sont mises à pondre de 17h00 jusqu'à 10h00 le lendemain (période de forte activité des femelles) puis retirées des cages. Les godets sont ensuite retirés et transvasés dans des récipients en plastique pour le développement des insectes. Au bout de 7 jours de développement à 26°C, les drosophiles commencent à émerger et sont retirées des récipients quotidiennement. Après 21 jours de développement, les parasitoïdes commencent à émerger. L'ensemble des parasitoïdes provenant des 11 godets sont alors mélangés dans des tubes en plastique contenant du coton humidifié et une goutte de miel pour les nourrir. Les parasitoïdes sont gardés en tubes pendant 24 heures pour s'assurer que les femelles se soient accouplées. Pour chaque population expérimentale, 50 femelles sont à nouveau échantillonnées au hasard dans les tubes puis placées dans les cages à population, comme expliqué précédemment, pour fonder la génération suivante. Le même protocole ayant été utilisé sur 15 générations, les deux niveaux de densité larvaire dans les cages ont été gardé constants.

Tableau 1. Plan expérimental des cages à populations. Description : composition en génotypes des différentes populations expérimentales à la génération 0.

Régime de sélection	Population	Description
forte densité larvaire	P1	25 ♀ Av12 _{BC6} + 25 ♀ Av3 _{BC6}
	P2	25 ♀ Av12 _{BC6} + 25 ♀ Av3 _{BC6}
	P3	25 ♀ Av12 _{BC6} + 25 ♀ Av3 _{BC6}
	Av12-	50 ♀ Av12 _{BC6}
	Av3-	50 ♀ Av3 _{BC6}
faible densité larvaire	P4	25 ♀ Av12 _{BC6} + 25 ♀ Av3 _{BC6}
	P5	25 ♀ Av12 _{BC6} + 25 ♀ Av3 _{BC6}
	P6	25 ♀ Av12 _{BC6} + 25 ♀ Av3 _{BC6}
	Av12+	50 ♀ Av12 _{BC6}
	Av3+	50 ♀ Av3 _{BC6}

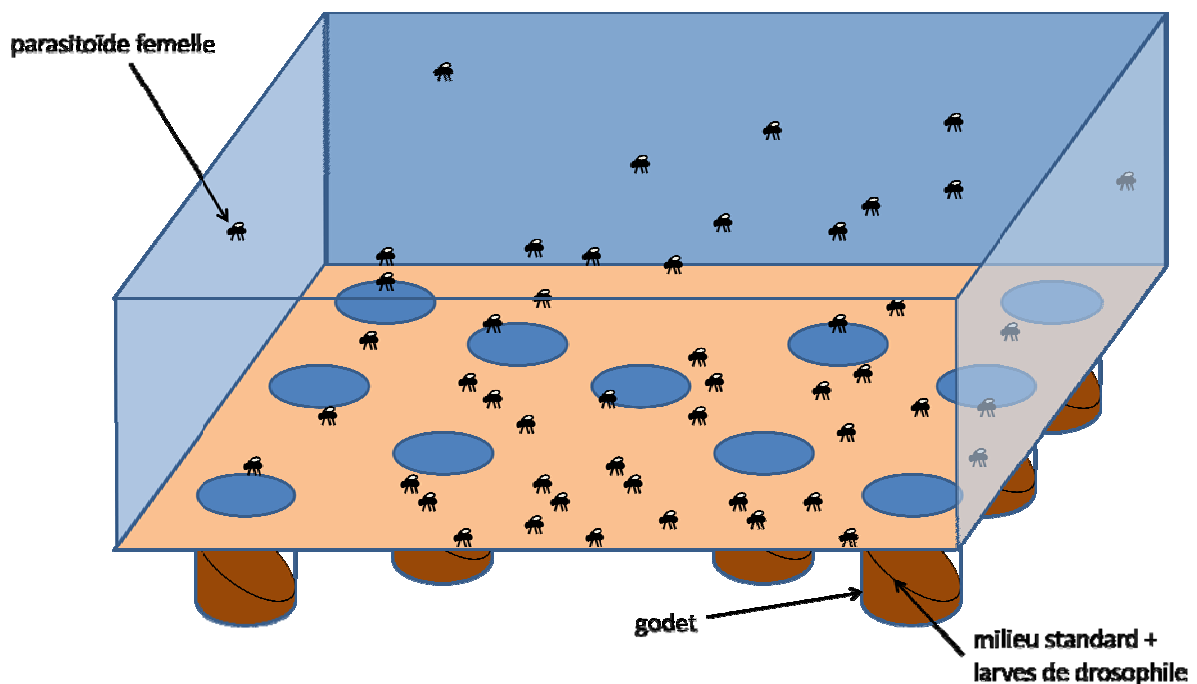


Figure 2. Représentation schématique d'une cage à population.

Taux de parasitisme et niveau de compétition

Afin de vérifier si les deux niveaux de densité larvaire entraînent bien des niveaux de compétition entre parasitoïdes différents, deux indicateurs de l'intensité de la compétition, le taux de parasitisme et l'intensité du superparasitisme, ont été

mesurés. A la génération 0, trois jours après le retrait des femelles parasitoïdes, 25 larves de drosophiles par cage ont été échantillonnées au hasard dans les godets puis disséquées sous loupe binoculaire pour dénombrer les parasitoïdes en développement. Le taux de parasitisme a ensuite été estimé comme étant la proportion de larves de drosophiles parasitées, et l'intensité du superparasitisme, comme le nombre moyen de parasitoïdes par larve parasitée.

Test comportemental

Le test comportemental de référence a été utilisé pour mesurer l'intensité du superparasitisme à différentes générations (chapitre 1). Un premier test a été réalisé à la génération 4, sur des femelles directement émergées des cages à population. Au total, 20 femelles par population expérimentale ont été échantillonnées au hasard pour la mesure du comportement. Dans ce cas, la comparaison des deux densités larvaires mesure à la fois l'effet d'une potentielle différenciation génétique et l'effet des conditions de développement qui sont différentes entre les deux niveaux de densité. En particulier, on s'attend à ce que les femelles parasitoïdes issues des cages à faible densité larvaire aient plus de chances de s'être développées en condition de superparasitisme. Afin d'éliminer l'effet confondant des conditions de développement et ne mesurer que les différences génétiques entre les deux densités larvaires, les tests suivants ont été réalisés après une génération additionnelle de développement en conditions contrôlées en tubes d'élevage. Ainsi, aux générations 4, 5, 9 et 15, dix femelles par cages ont été échantillonnées au hasard et placées individuellement en tube contenant environ 150 œufs de drosophiles. La mesure du comportement a ensuite été effectuée sur deux descendantes par tube ($n = 20$ femelles par population pour le test). Le statut d'infection des femelles a été vérifié par PCR (chapitre 1) pour les femelles montrant une intensité de superparasitisme inférieure ou égale à 2 œufs pondus par larve de drosophile. Les femelles ayant perdu l'infection ont ainsi été retirées des différents jeux de données.

Analyse statistique

L'intensité du superparasitisme a été analysée après transformation des données en logarithme afin de respecter les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité. Pour une génération et une densité larvaire donnée, les populations tests et témoins ont été comparées deux à deux par un test de Student de comparaisons multiples avec correction du risque d'erreur (correction de Bonferroni). De plus, l'effet de la densité

larvaire a été testé uniquement sur les populations tests des deux niveaux de densité larvaire puisqu'aucune évolution n'est attendue chez les populations témoins. Pour ce test, un modèle linéaire à effets mixtes a été utilisé (package nlme du logiciel R, Pinheiro & Bates 2000) en considérant l'effet de la densité larvaire comme fixe et l'effet cage niché dans l'effet densité comme aléatoire. Enfin, les données ont été analysées globalement sur l'ensemble des populations expérimentales (tests + témoins) et sur les quatre générations de développement contrôlé en ajoutant l'effet fixe de la génération. Le fait que les mesures par cage aient été répétées au cours des générations a été intégré à l'analyse statistique afin de prendre en compte les pseudorépliques.

Résultats

Phénotype comportemental des lignées parentales

Au cours des six générations d'introgession des lignées Av12 et Av3 dans le cytoplasme de la lignée infectée Sref, quatre générations ont fait l'objet de tests comportementaux (Fig. 3). Les tests montrent que les différences d'intensité du superparasitisme entre ces deux lignées infectées vont dans le sens attendu et se maintiennent au fil des générations ($F_{1,100} = 56,14$; $P < 0,0001$), bien qu'il y ait une importante variabilité de l'intensité moyenne du superparasitisme entre les générations ($F_{3,100} = 38,31$; $P < 0,0001$). Cette variabilité peut résulter à la fois d'effets génétiques, puisque la composition en génotypes est différente à chaque génération, et d'effets environnementaux.

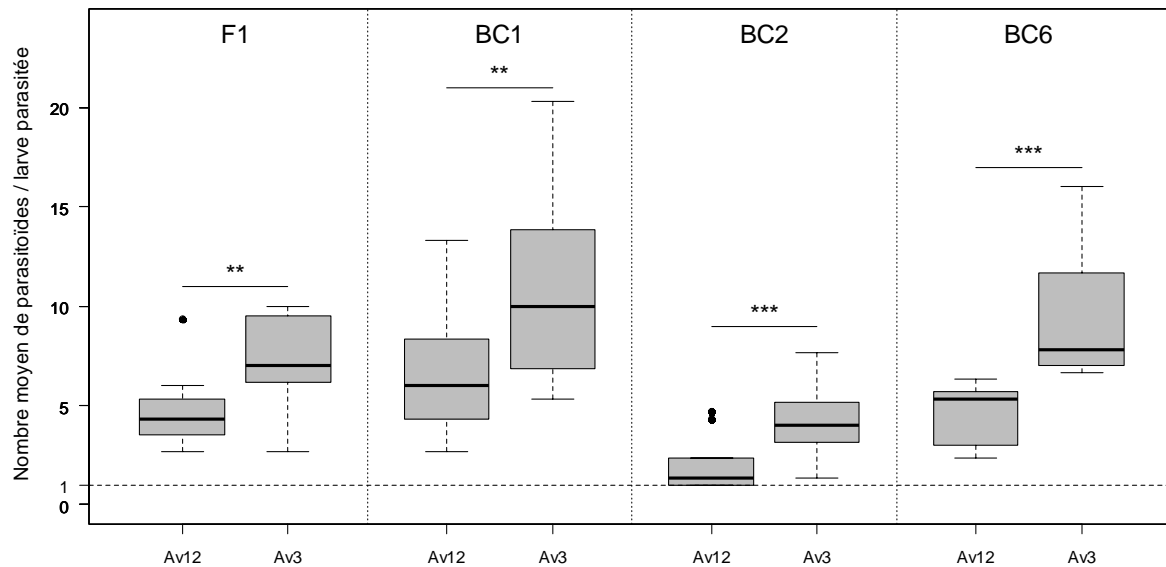


Figure 3. Intensité du superparasitisme pour différentes générations d'introgession (F1, BC1, BC2, BC6) des lignées Av12 et Av3 dans le cytoplasme de la lignée Sref. P -values : " ** " < 0.01 ; " * " < 0.001 .**

Niveau de compétition dans les cages à populations

A la génération 0, le niveau de compétition a été évalué dans chaque cage à population selon deux mesures différentes. Les dissections de larves ont révélé que le taux de parasitisme était significativement différent entre les deux niveaux de densité larvaire, avec en moyenne 40% et 65,6% de larves parasitées en cas de forte et de faible densité en hôtes, respectivement (Fig. 4; modèle linéaire généralisé: déviance résiduelle = 16,62; $P = 0,0009$). Parmi les larves parasitées, l'intensité du superparasitisme montre également des différences significatives entre niveaux de densité larvaire, avec, comme attendu, une intensité plus forte en cas de faible densité en hôtes (Fig. 5; test de Wilcoxon, $P = 0,005$). Ces deux résultats montrent que les deux niveaux de densité en larves de drosophiles se traduisent bien par des niveaux de compétition entre parasitoïdes différents. La comparaison des témoins en condition de forte densité larvaire montre que, comme attendu, l'intensité du superparasitisme est plus faible pour la population Av12- que pour Av3- (test de Wilcoxon, $P = 0,03$). En revanche, la différence n'est pas significative chez les témoins soumis à une faible densité en hôtes (test de Wilcoxon, $P = 0,07$).

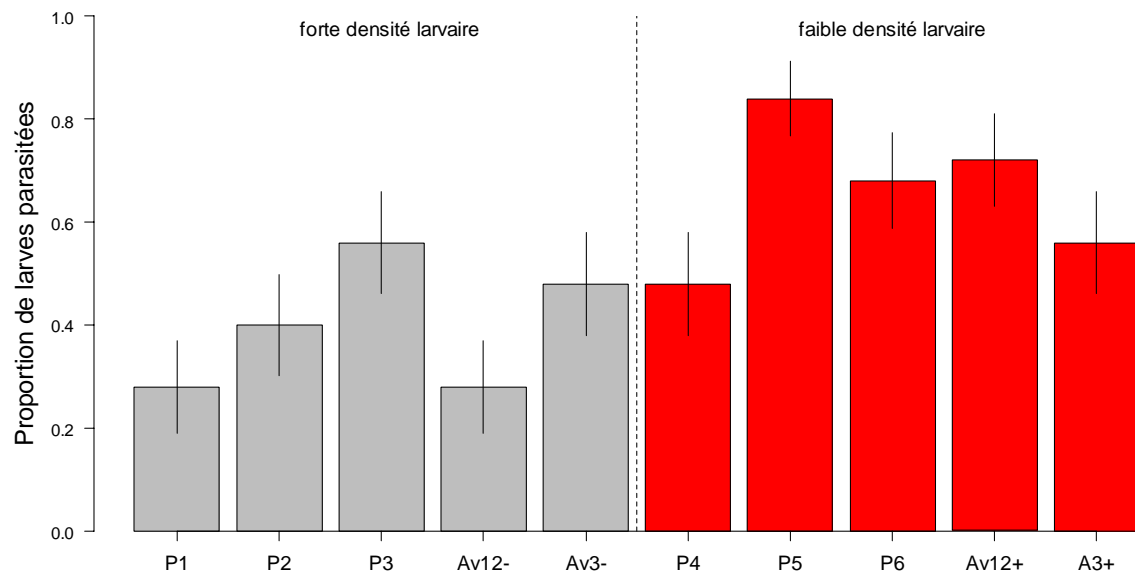


Figure 4. Taux de parasitisme par population expérimentale à la génération 0. Les barres d'erreurs correspondent aux erreurs standards.

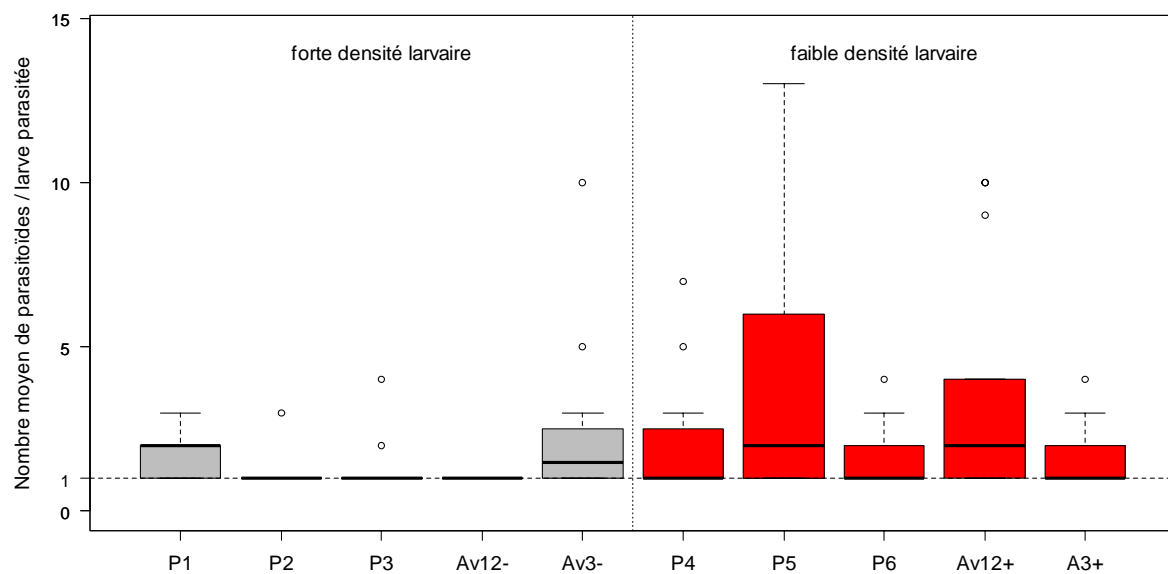


Figure 5. Intensité du superparasitisme par population expérimentale à la génération 0.

Evolution de l'intensité du superparasitisme

Après quatre générations de compétition pour les hôtes, le comportement des femelles émergées des cages à population à été mesuré (Fig. 6). Au sein de chaque niveau de densité larvaire, des comparaisons multiples montrent que, comme attendu, les populations témoins Av12- et Av12+ superparasitent moins que Av3- et Av3+. Cette

différence reflète les phénotypes originaux des deux lignées parentales Av12_{BC6} et Av3_{BC6}. Dans la modalité « forte densité larvaire », les trois populations tests superparasitent moins que le témoin Av3- et ne sont pas significativement différentes du témoin Av12-. Avec une faible densité larvaire, les trois populations tests montrent un phénotype moyen intermédiaire entre celui des deux témoins, sans toutefois montrer de différences significatives avec ces derniers. Enfin, la comparaison des deux niveaux de densité pour les populations tests révèle qu'en cas de forte densité larvaire, les femelles superparasitent moins qu'en cas de faible densité larvaire (Tab. 2), ce qui était attendu sous notre quatrième hypothèse (cf introduction). Cependant, les femelles des deux niveaux de densité larvaire s'étant développées dans deux environnements différents, les différences observées sur le superparasitisme peuvent être la conséquence d'une plasticité phénotypique face aux variations des conditions de développement. Les tests comportementaux suivants, réalisés après une génération de développement contrôlé permettent de s'affranchir de l'effet confondant de cette plasticité phénotypique afin de tester l'évolution du pool génétique.

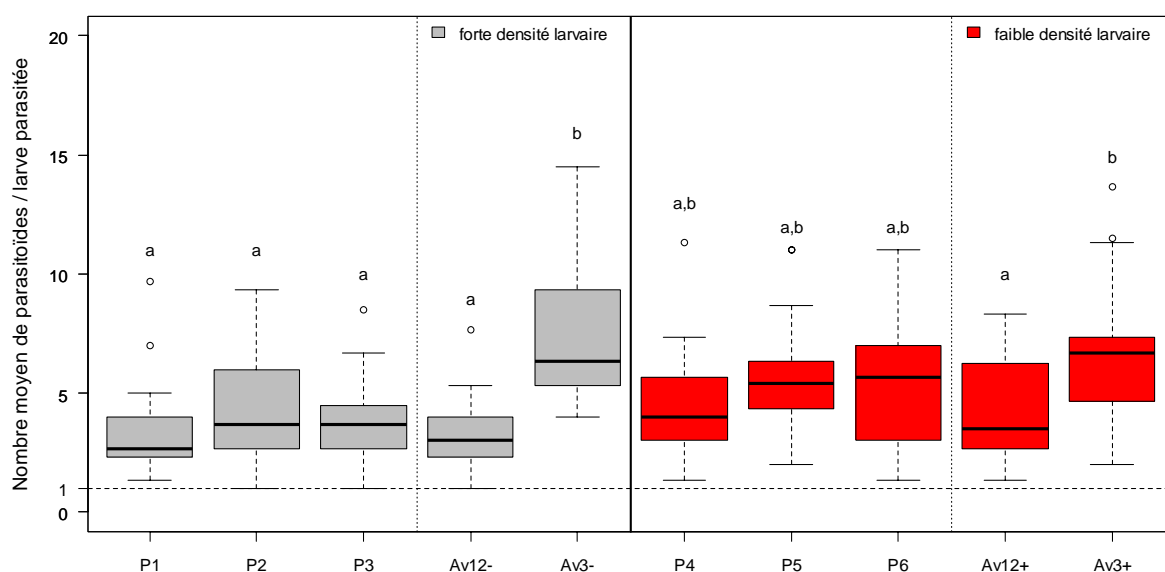


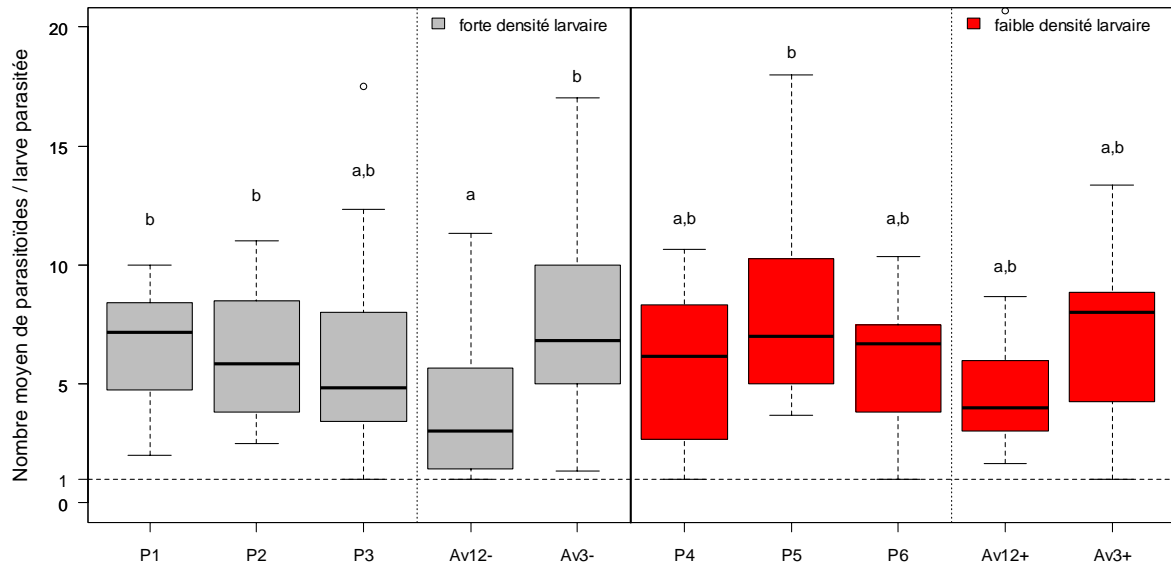
Figure 6. Intensité du superparasitisme à la génération 4 sur des femelles directement issues des cages à population. Les différentes lettres indiquent les différences significatives après un test de Student de comparaisons deux à deux au sein de chaque niveau de densité larvaire.

Le résultat obtenu après développement contrôlé de femelles issues de la génération 4 montre que la différence observée précédemment entre niveaux de densité

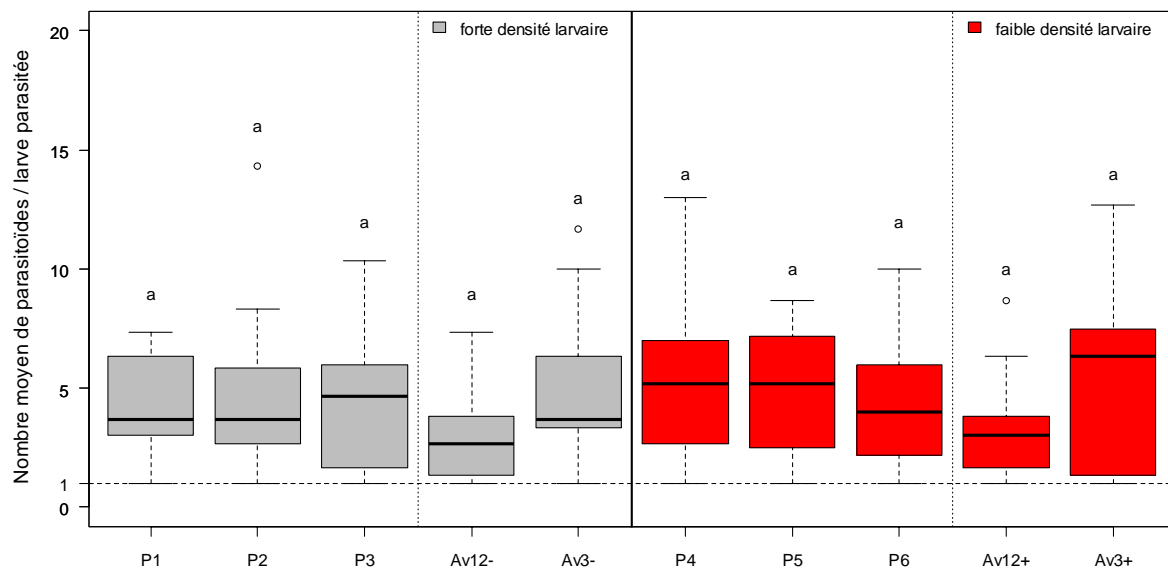
larvaire n'est plus détectée (Fig. 7a, Tab. 2). Pour le niveau de densité larvaire forte, la population témoin Av12- superparasite moins que la population Av3-, comme attendu et observé précédemment. Sur les trois populations tests, P3 a un phénotype intermédiaire entre les deux témoins, alors que P1 et P2 superparasitent autant que le témoin Av3-. Pour le niveau de densité larvaire faible, les deux témoins ne montrent plus de différence significative bien que la différence observée suive la même tendance qu'en cas de densité faible. Sur les trois populations tests, seul P4 se distingue par une intensité de superparasitisme supérieure au témoin Av12+.

A la génération 5, aucune différence significative n'est observée entre niveaux de densité larvaire (Tab. 2) ou entre populations expérimentales d'un même niveau de densité (Fig. 7b). On observe tout de même que les témoins Av3- et Av3+ ont tendance à superparasiter plus que les témoins Av12- et Av12+, même si cette différence n'est pas significative. A la génération 9, on observe à nouveau un effet de la densité larvaire, les populations tests exposées à une forte densité larvaire superparasitent moins que celles exposées à une faible densité (Tab. 2), ce qui est attendu sous notre hypothèse 4 (cf introduction). Cependant, au sein d'un même niveau de densité, on observe un effet « cage » significatif (Tab. 2). Les tests de comparaison deux à deux révèlent en effet que P2 et P3 sont significativement différentes (Figure 7c). Dans chaque niveau de densité, les témoins ne sont pas significativement différents mais présentent encore une fois la tendance attendue, Av12- et Av12+ superparasitent moins que Av3- et Av3+. Enfin, à la génération 15, aucune différence n'est observée, que ce soit entre densités larvaires, ou entre populations d'un même niveau de densité (Tab. 2 ; Fig. 7d).

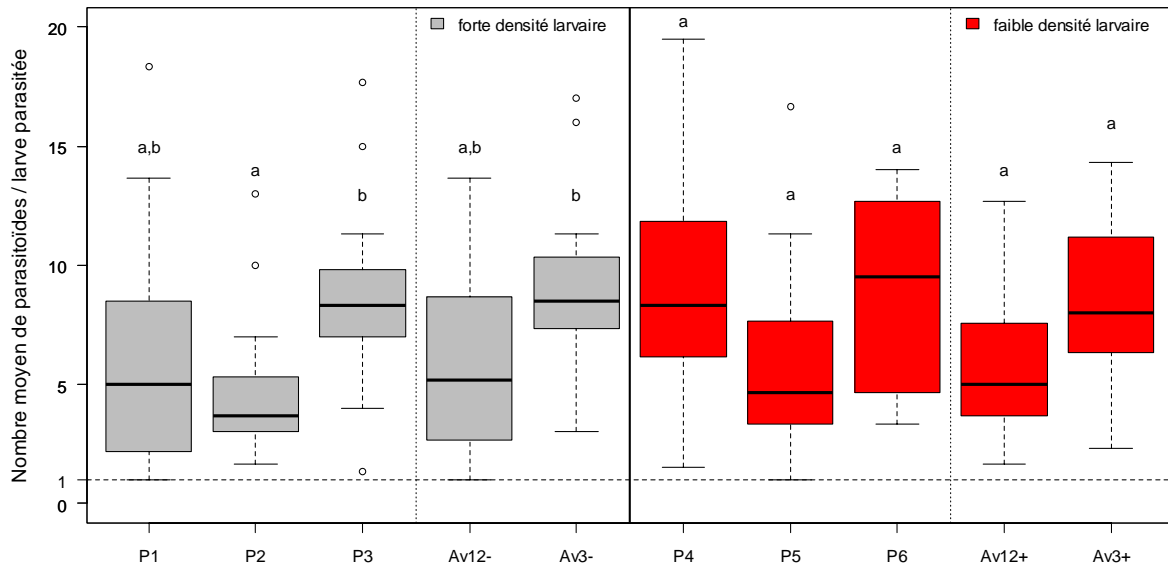
(a)



(b)



(c)



(d)

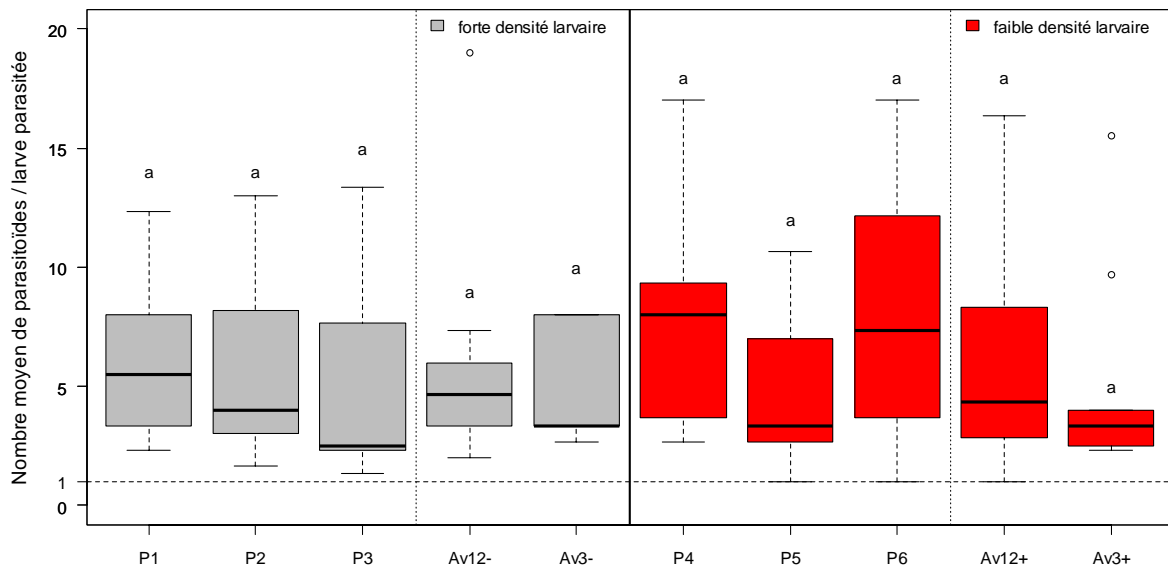


Figure 7. Intensité du superparasitisme après une génération de développement contrôlé. (a) Génération 4 ; (b) Génération 5 ; (c) Génération 9 ; (d) Génération 15. Les différentes lettres indiquent les différences significatives après un test de Student de comparaisons deux à deux au sein de chaque niveau de densité larvaire.

Tableau 2. Analyse de l'intensité du superparasitisme par génération chez les populations tests (données transformées en logarithmes).

Génération	Source de variation	<i>F</i> -ratio pour les effets fixes / Rapport de vraisemblance pour les effets aléatoires (Likelihood Ratio, <i>LR</i>)	<i>P</i>
G4 (sortie de cage)	densité larvaire	$F_{1,113} = 8,47$	0,004
	cage	$LR = 0,32$	0,57
G4 (développement contrôlé)	densité larvaire	$F_{1,107} = 0,18$	0,67
	cage	$LR = 0,11$	0,74
G5 (développement contrôlé)	densité larvaire	$F_{1,100} = 0,36$	0,54
	cage	$LR < 0,0001$	0,99
G9 (développement contrôlé)	densité larvaire	$F_{1,101} = 4,38$	0,04
	cage	$LR = 4,29$	0,04
G15 (développement contrôlé)	densité larvaire	$F_{1,75} = 1,22$	0,27
	cage	$LR < 0,0001$	0,99

L'analyse globale des populations tests et témoins sur les quatre générations (développement contrôlé) ne révèle aucun effet de la densité larvaire ou de la génération et l'interaction entre ces deux facteurs n'est pas significative (Tab. 3 ; Fig. 8). En revanche, l'analyse montre un fort effet « cage » suggérant que les différentes populations ont évolué dans des directions différentes.

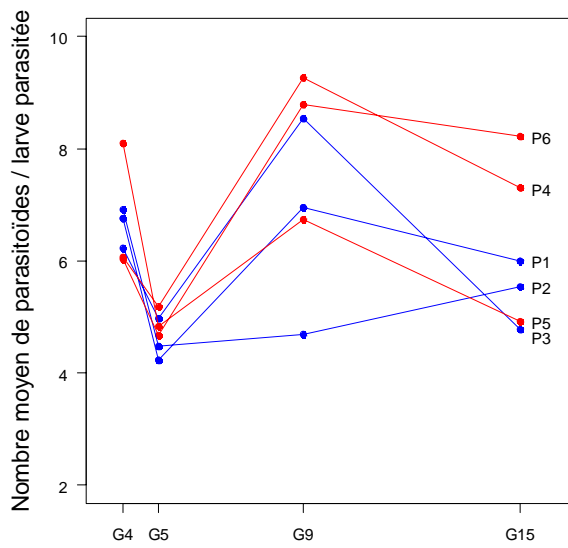
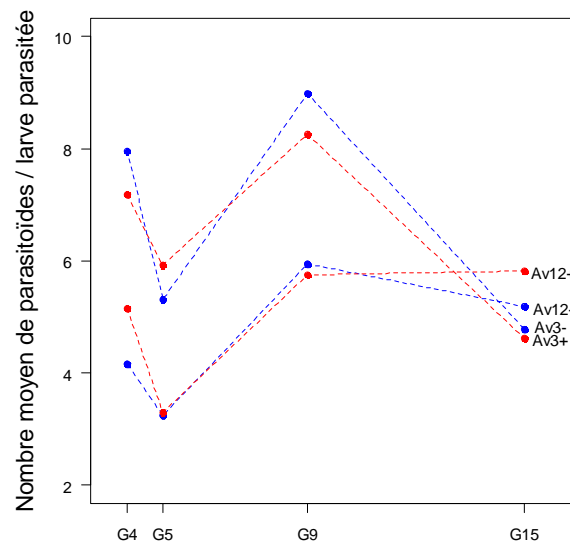
(a)**(b)**

Figure 8. Intensité du superparasitisme moyenne en fonction des générations après une génération de développement contrôlé. (a) populations tests ; (b) populations témoins.

Tableau 3. Analyse globale de l'intensité du superparasitisme après une génération de développement contrôlé (données transformées en logarithmes).

Source de variation	<i>F</i> -ratio pour les effets fixes / Rapport de vraisemblance pour les effets aléatoires (<i>LR</i>)	<i>P</i>
densité larvaire	$F_{1,10} = 1,78$	0,21
génération	$F_{1,740} = 3,38$	0,07
interaction densité larvaire × génération	$F_{1,740} = 0,0009$	0,98
cage	$LR = 22,17$	< 0,0001

Discussion

L'utilisation de génotypes de parasitoïde différenciellement manipulés par le virus LbFV nous a permis d'élaborer un test d'évolution expérimentale du superparasitisme face à deux niveaux de compétition pour les hôtes. En partant de populations polymorphes sur le compartiment nucléaire mais infectées par la même

souche de LbFV, nous avons ainsi tenté de tester le potentiel évolutif de la résistance à la manipulation chez *L. boulandi*.

Les tests comportementaux réalisés lors de l'introgression des lignées Av12 et Av3 dans le cytoplasme de la lignée Sref ont confirmés les différences observés précédemment entre ces deux génotypes (chapitre 1). Malgré des variations entre les différentes générations d'introgression, le génotype Av12 montre toujours une intensité de superparasitisme plus faible que le génotype Av3.

Au lancement de l'expérience en cages à population, les mesures du niveau de compétition dans les cages ont révélées les différences attendues entre les deux densités larvaires. Ainsi, la plus faible densité larvaire était associée à un niveau de compétition entre parasitoïdes significativement plus élevé, ce qui permettait d'envisager une réponse génétique des populations soumises à ces environnements contrastés.

Le premier test comportemental réalisé sur des femelles de la génération 4, directement émergées des cages à population, a montré des différences significatives entre populations tests en rapport avec la densité larvaire. Les populations tests soumises à une faible densité en hôtes montrent en moyenne une intensité de superparasitisme plus élevée que les populations soumises à une forte densité. Cette différence est en accord avec les prédictions des variations de l'optimum de superparasitisme en fonction de la disponibilité en larves hôtes dans le milieu (van Alphen & Visser 1990). Cependant, cette réponse des populations expérimentales à la disponibilité en hôtes ne peut pas s'expliquer par une différenciation génétique. En effet, après une génération de développement contrôlé, les populations tests issues de la génération 4 ne montrent plus de différence. Les différences observées directement à la sortie des cages à populations s'expliquent donc probablement par une réponse plastique des femelles dépendant des conditions dans lesquelles elles se sont développées. En effet, les dissections effectuées à la génération G0 ont montré que le superparasitisme est plus fréquent dans les populations à faible densité larvaire. Par conséquent les femelles utilisées pour ce premier test phénotypique se sont probablement développées dans des conditions de superparasitisme différentes en fonction du niveau de densité larvaire. L'influence du développement en condition de superparasitisme sur le phénotype adulte a déjà été observée chez des femelles infectées de la lignée Sref (Varaldi *et al.* 2005). Lorsque les femelles infectées se développent dans des conditions où le superparasitisme est fréquent, elles ont tendance à superparasiter davantage. Cette plasticité pourrait être une stratégie adaptative des femelles leur permettant d'ajuster leur prise de décision à la qualité du milieu (disponibilité en hôtes)

rencontré par leurs mères. Alternativement, on peut imaginer un effet dose du virus. En effet, il est probable que le virus soit injecté en plus de l'oeuf lors d'une oviposition. Par conséquent, une larve de drosophile superparasitée aura reçu une dose virale supérieure à une larve monoinfectée. Une relation positive entre la dose de virus et le phénotype de superparasitisme des femelles pourrait alors expliquer cette observation.

Pour les générations 5, 9 et 15, l'analyse des tests comportementaux sur les femelles ayant été soumises à un développement contrôlé ne montre pas de signe de différenciation génétique en fonction du niveau de densité larvaire. Bien qu'à la génération 9, les populations tests soumises à une forte densité larvaire superparasitent moins que celles soumises à une faible densité, comme attendu sous l'hypothèse 4 (cf introduction), on observe des différences significatives entre populations tests d'un même niveau de densité. Il est possible que les populations évoluent dans le sens attendu mais avec à des vitesses différentes, expliquant ainsi l'effet « cage » détecté. Cependant, sous cette hypothèse, les différences entre densités larvaires devraient se renforcer au fil des générations, ce qui n'est pas le cas puisqu'on n'observe plus aucune de différence entre populations à la génération 15. L'analyse globale sur les quatre générations de développement contrôlé montre en effet que les populations n'évoluent pas dans une même direction mais plutôt de manière aléatoire (effet cage). Clairement, l'hypothèse adaptative ne permet donc pas d'expliquer les données. Comment expliquer alors les variations des phénotypes moyens des cages ?

Si l'on observe le comportement des cages témoins, on constate un parallélisme frappant entre le phénotype moyen des paires de cages contenant le même génotype de parasitoïde (Fig 8). Cependant on voit également de fortes variations au cours des générations. Deux conclusions peuvent être tirées : (i) le fort parallélisme montre que l'effort d'échantillonnage consenti pour mesurer le phénotype moyen d'une cage est suffisant ($n=20$ femelles), car sinon les phénotypes des paires de cages présentant le même génotype seraient différents ; (ii) il existe de forts effets environnementaux non contrôlés dans cette expérience qui expliquent les fortes variations entre générations. Ces effets peuvent provenir de variations de pression atmosphérique (Fournier *et al.* 2005), de légères variations de températures ou d'humidité (Rousse *et al.* 2009 ; Wu *et al.* 2011) par exemple. Dans les cages tests, on observe également des variations qui suivent globalement les variations des cages témoins, probablement dues aux mêmes facteurs environnementaux que ceux agissant sur les témoins. Cependant on observe également des variations qui semblent aléatoires entre ces cages, y compris entre cages de la même modalité. Ces différences entre cages sont donc soit dues à des effets d'échantillonnage, soit dues à des événements de dérive génétique,

c'est-à-dire une différenciation génétique aléatoire due à un effectif limité. L'observation des cages témoins nous amènent plutôt à pencher pour la deuxième hypothèse.

En conclusion, nous n'avons pas démontré d'évolution de la résistance à la manipulation via le compartiment nucléaire en réponse à la disponibilité en larves hôtes. Plusieurs facteurs ont pu empêcher l'action de la sélection sur ce trait dans les conditions de l'expérience. Tout d'abord, la plasticité phénotypique des femelles en lien avec les conditions de développement a probablement masqué une partie des différences génétiques entre parasitoïdes. De plus, de forts effets de l'environnement associés à un faible effectif efficace de parasitoïdes peuvent avoir contribué à rendre la sélection inefficace. Enfin, il est possible que le polymorphisme identifié chez les lignées parentales Av12_{BC6} et Av3_{BC6} ne s'exprime que très peu dans les cages à population. En effet, à la génération 0, l'intensité du superparasitisme mesurée directement dans les cages a montré les différences attendues entre témoins uniquement en conditions de forte densité larvaire. Bien qu'on ne puisse pas savoir si ce polymorphisme s'exprime dans les populations naturelles, la disponibilité en larves hôtes dans la nature montre des variations spatiales et temporelles drastiques qui pourraient se traduire par des optimums de superparasitisme différents (Fleury *et al.* 2004 ; Patot *et al.* 2010, Fig. 9). Cette sélection fluctuante pourrait conduire à des interactions génotype × environnement et contribuer au maintien du polymorphisme (Gillespie & Turelli 1989 ; Byers 2005 ; Hedrick 2007). L'identification des gènes à l'origine du polymorphisme de résistance à la manipulation permettrait en tout cas d'étudier plus finement le maintien de ce polymorphisme dans les populations naturelles.

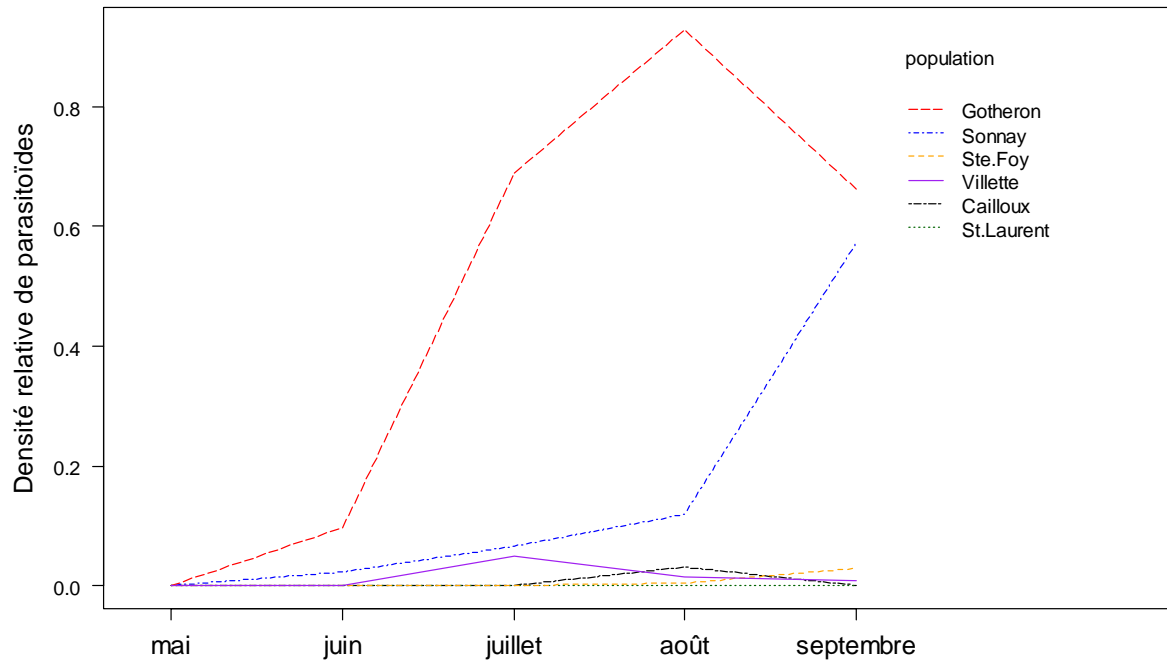


Figure 9. Densité relative de parasitoïdes (*L. bouhardi*) en pourcentage de drosophiles parasitées (*D. melanogaster* + *D. simulans*) de mai à septembre dans six populations du sud-est de la France. Données non publiées récoltées en 2009 par Rolland Allemand et Patricia Gibert.

Chapitre 4

Contribution du génotype de LbFV à la variabilité du phénotype étendu

Chapitre 4. Contribution du génotype de LbFV à la variabilité du phénotype étendu

Introduction

Dans le chapitre 2, nous avons vu que les variations de l'intensité de superparasitisme entre lignées de parasitoïde étaient en grande partie expliquées par la présence/absence de LbFV. Néanmoins, des variations importantes entre lignées infectées ont été détectées. Grâce à une expérience d'introgession, nous avons montré que cette variabilité dépend en partie du génotype du parasitoïde (chapitre 2, Martinez *et al.* 2011, *In Press*). La même question se pose pour le virus. En effet, une variabilité génétique chez le virus pourrait contribuer aux variations de comportement observées chez les lignées infectées. On sait de plus que la stratégie optimale de superparasitisme du point de vue du virus dépend de la prévalence virale (Varaldi *et al.* 2009). Le gradient latitudinal de prévalence observé à l'échelle du sud-est de la France offre ainsi un contexte favorable à la différenciation génétique du virus sur l'intensité de la manipulation (Patot *et al.* 2010, Annexe 1). Dans la mesure où le génotype du parasitoïde contrôle en partie l'expression de la manipulation, la présence d'une variabilité génétique chez le virus pourraient également conduire à des interactions entre le génotype du parasitoïde et le génotype du virus.

Nous avons ainsi testé la contribution du génotype viral dans l'intensité de manipulation dans deux expériences différentes. D'une part, six isolats viraux, issus de populations aux prévalences contrastées ont été transférés horizontalement sur un même fond génétique de parasitoïde. L'intensité de la manipulation dans les nouvelles associations créées à ensuite été mesurée. De manière à tester en plus l'existence d'interactions entre le génotype du parasitoïde et celui du virus, nous avons parallèlement effectué des transferts réciproques de virus entre deux populations à prévalences différentes afin d'obtenir des associations parasitoïde-virus sympatriques et allopatriques.

Matériel et méthodes

Transfert horizontal sur la lignée NSref

En 2008, plusieurs lignées isofemelles de parasitoïdes ont été fondées à la suite de la campagne d'échantillonnage annuelle dans le sud-est de la France. Quatre lignées isofemelles issues de populations aux prévalences contrastées ont été choisies comme lignées donneuses pour le transfert horizontal sur la lignée de référence NSref (Tab. 1). En plus de ces lignées, deux lignées de laboratoire, Palma (Espagne), et la lignée infectée de référence Sref ont également été utilisées.

Tableau 1. Origine des isolats viraux utilisés dans l'expérience de transfert horizontal sur la lignée NSref.

Lignée de parasitoïde	Population	Prévalence	Nombre de répliquats de transfert horizontal
Ca11	Cailloux-sur-Fontaines (France)	40% (n=25)	2
Go8	Gotheron (France)	59% (n=44)	2
Av10	Avignon (France)	69% (n=43)	2
Mo5	Mollèges (France)	25% (n=20)	2
Palma	Palma (Majorque, Espagne)	-	2
Sref	Gotheron (France)	-	2

Pour chacune des six lignées donneuses, deux répliquats de transfert horizontal ont été réalisés en utilisant le protocole standard (chapitre 1). Pour chaque répliquats de transfert, une femelle nouvellement infectée a été utilisée pour fonder une lignée isofemelle. Les lignées isofemelles nouvellement infectées ont été maintenues en petite masse (3 à 4 femelles accouplées) pendant 5 générations avant le test de quantification du superparasitisme. Le comportement de superparasitisme a ensuite été mesuré selon le protocole standard (chapitre 1) sur 10 femelles par isolat de virus (5 femelles × 2 répliquats / isolat) et leur statut d'infection a été vérifié. Les données ont été transformées en logarithme et analysées par un modèle linéaire à effets mixtes (Pinheiro & Bates 2000). L'effet de l'isolat viral a ainsi été modélisé comme effet fixe et l'effet du répliquat de transfert comme effet aléatoire niché dans l'effet fixe.

Associations sympatriques versus allopatriques

A partir de l'échantillonnage de 2008, les populations de Gotheron et Mollèges ont été choisies pour le test des interactions entre le génotype du parasitoïde et celui du virus. Après vérification du statut d'infection par PCR, quelques lignées infectées de même statut d'infection ont été mélangées pour fonder respectivement une souche infectée et une souche non-infectée pour chaque population (Tab. 2). Les différentes souches ont été maintenues au laboratoire pendant 10 générations avec, pour chaque souche, 4 tubes d'élevage fondés à chaque génération par 6 femelles accouplées. Afin de limiter la perte de polymorphisme au sein de ces souches, les descendants des 4 tubes ont été mélangés à chaque génération, 24 femelles (6 femelles × 4 tubes) étant alors tirées au hasard pour fonder la génération suivante.

Au bout de 10 générations, l'intensité du superparasitisme des lignées infectées Go[Go2] et Mo[Mo2] a été mesurée sur 20 femelles par lignée (5 femelles × 4 tubes / lignée). Les données transformées en logarithmes ont été analysées avec un modèle à effets mixtes intégrant l'effet souche de parasitoïde comme effet fixe et l'effet tube comme aléatoire.

Tableau 2. Origine des souches de parasitoïdes utilisées pour le test des interactions génotype × génotype. Statut d'infection et origine des isolats de LbFV entre crochets, Ø indiquant les souches non-infectées.

souche de parasitoïde	Population	Statut d'infection	Nombre de lignées isofemelles poolées
Go1[Ø]	Gotheron	non-infectée	9
Go2[Go2]	Gotheron	infectée	5
Mo1[Ø]	Mollèges	non-infectée	15
Mo2[Mo2]	Mollèges	infectée	5

Les souches infectées par leur virus d'origine Go[Go2] et Mo[Mo2] ont ensuite été utilisées comme lignées donneuses pour le transfert horizontal de LbFV sur les souches non-infectées Mo1[Ø] et Go1[Ø] respectivement. Pour chaque isolat viral, 3 réplicats de transfert ont été réalisés. Au final 3 à 5 femelles nouvellement infectées par réplicat de transfert ont été utilisées pour fonder les deux associations parasitoïde-virus allopatriques, Mo1[Go2] et Go1[Mo2]. Cinq générations après le transfert horizontal, l'intensité du superparasitisme de ces associations allopatriques ainsi que celle des associations sympatriques Go2[Go2] et Mo2[Mo2] ont été mesurées sur 15 femelles par

lignée (5 femelles \times 3 tubes / lignée). Les données transformées en logarithme ont été analysées par un modèle linéaire à effets mixtes intégrant comme effets fixes la population d'origine des parasitoïdes, des isolats viraux ainsi que l'interaction de ces deux facteurs. L'effet du réplicat de transfert a été considéré comme aléatoire.

Résultats / Discussion

Effet de l'isolat viral

L'analyse du comportement de superparasitisme chez la lignée NSref a montré que tous les isolats viraux sont capables de manipuler le comportement des femelles (Fig. 1). En effet, l'intensité moyenne du superparasitisme des différentes lignées NSref infectées est toujours supérieure à celle observée chez le témoin non-infecté. L'analyse ne révèle cependant pas d'effet de l'isolat viral ($F_{5,51} = 0,37$; $P = 0,86$) ni d'effet du réplicat au sein de chaque isolat viral (Rapport de vraisemblance $< 0,0001$; $P = 0,99$). Ce résultat suggère l'absence de variabilité génétique chez le virus pour les traits impliqués dans l'expression de la manipulation.

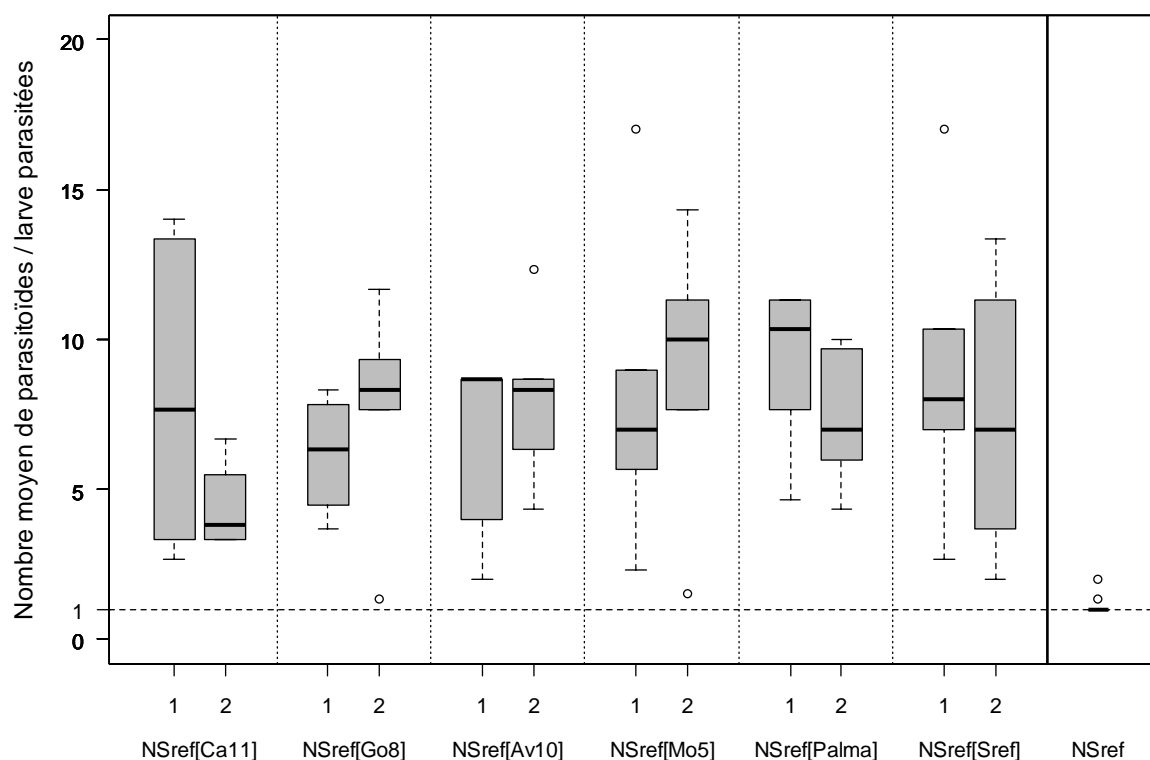


Figure 1. Intensité du superparasitisme chez la lignée NSref infectée par les différents isolats viraux ainsi que chez un témoin NSref non-infecté. 1 et 2 indiquent les deux réplicats de transfert horizontal.

Test de l'interaction génotype × génotype

Les souches infectées Go[Go2] et Mo[Mo2] issues chacune d'un pool de lignées isofemelles infectées de leur population d'origine ont été testées pour l'intensité du superparasitisme (Fig. 2). Aucun effet tube ne s'est avéré significatif suggérant que l'environnement commun des femelles issues d'un même tube n'a pas affecté leur comportement (Rapport de vraisemblance = 1,83 ; $P = 0,18$). Par contre, les résultats montrent que la souche infectée de Gotheron Go2[Go2] superparasite significativement plus que la souche infectée de Mollèges Mo2[Mo2] ($F_{1,35} = 83,1$; $P < 0,0001$). Cet effet souche détecté dans ces associations parasitoïde-virus sympatriques peut être la conséquence de différences génétiques chez le parasitoïde, chez le virus ou chez les deux partenaires. Les associations allopatriques ont ainsi été comparées aux associations sympatriques afin de tester ces trois hypothèses (Fig. 3).

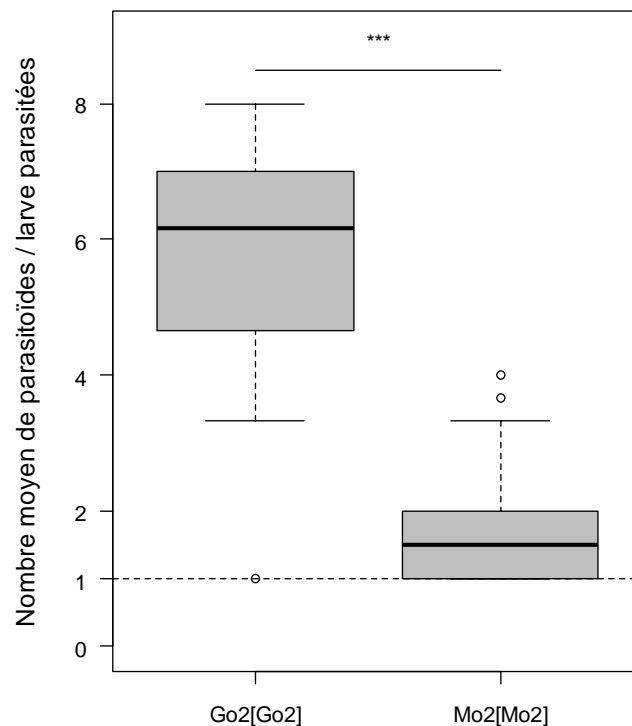


Figure 2. Intensité du superparasitisme dans les associations parasitoïde-virus sympatriques. *** : $P < 0,0001$ (données transformées en logarithme).

L'analyse des associations sympatriques et allopatriques a révélé un effet de la population d'origine du parasitoïde ($F_{1,35} = 19,47$; $P = 0,0001$) mais pas d'effet de l'isolat viral ($F_{1,35} = 2,82$; $P = 0,1$) ni d'interaction parasitoïde-virus ($F_{1,35} = 0,26$; $P =$

0,61). Aucun effet du réplicat de transfert n'a été détecté (Rapport de vraisemblance < 0,0001 ; $P = 0,99$).

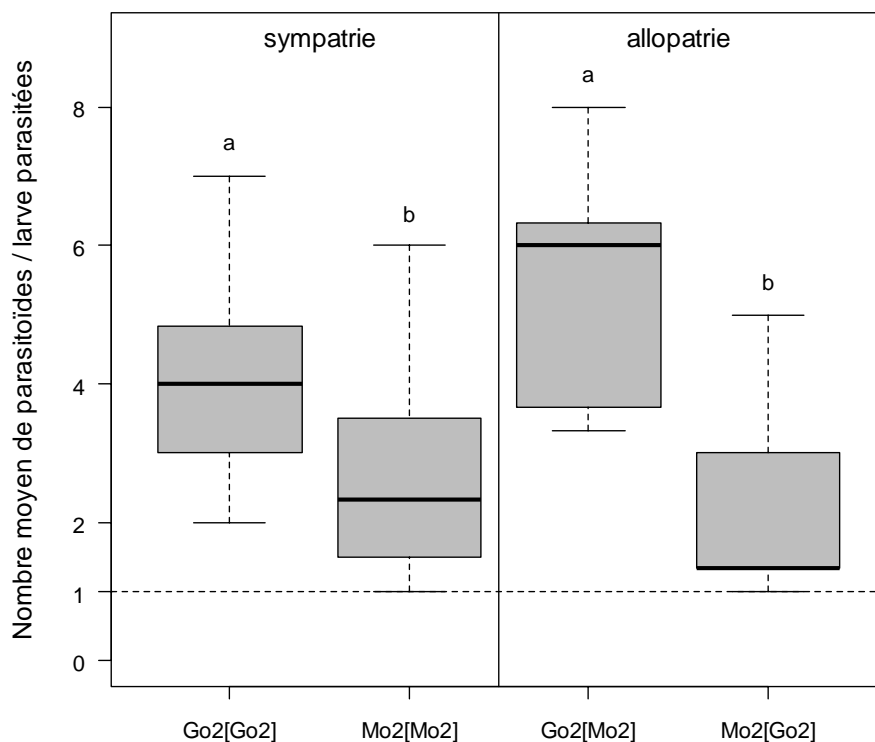


Figure 3. Intensité du superparasitisme dans les associations parasitoïde-virus sympatriques et allopatriques. Différentes lettres indiquent des différences significatives après un test de Student de comparaisons multiples (données transformées en logarithme, correction de Bonferroni).

Les différences dans l'intensité de la manipulation observées dans les associations sympatriques ne sont donc pas expliquées par l'origine des isolats viraux mais uniquement par l'origine des parasitoïdes. Ce résultat confirme les résultats obtenus précédemment (chapitre 2), c'est-à-dire que le génotype du parasitoïde est impliqué dans l'expression de la manipulation. Il est intéressant de noter que contrairement aux résultats du chapitre 2, nous avons ici mis en évidence une différence entre populations. En effet, les deux souches de parasitoïdes originaires de Mollèges sont moins sensibles à la manipulation que les deux souches de Gotheron. Bien qu'il n'y ait que deux souches par population pour faire la comparaison, il faut noter que chaque souche était issues d'un pool de plusieurs lignées isofemelles. La différence entre les souches de Mollèges et de Gotheron suggère que l'adaptation locale du parasitoïde sur la sensibilité à la manipulation est possible. Cependant, cette différenciation n'est pas

corrélée à la prévalence virale dans les populations d'origine, comme on pourrait l'attendre. Bien que les populations de Gotheron et Mollèges montrent des prévalences virales très différentes, aucune corrélation n'avait été trouvée entre la prévalence virale et la sensibilité à la manipulation dans les expériences du chapitre 2. De plus, si la sensibilité à la manipulation avait évolué en réponse à la prévalence virale, on s'attendrait plutôt à ce que les lignées de Gotheron superparasitent moins car elles sont beaucoup plus exposées à la manipulation. Il est possible que l'évolution de la résistance à la manipulation (tolérance à l'infection) soit contrainte par l'évolution sur d'autres traits du parasitoïde.

En tout cas, le génotype du virus ne semble pas contribuer aux variations observées entre lignées de parasitoïdes sur l'intensité du superparasitisme. L'hypothèse d'une invasion récente des populations de *L. bouvardi* par le virus pourrait expliquer l'absence de différenciation génétique du virus malgré des conditions écologiques très variables entre populations (prévalence virale, densité de parasitoïdes).

Chapitre 5

Infections multiples et compétition entre souches virales

Chapitre 5. Infections multiples et compétition entre souches virales

Synthèse

La manipulation comportementale exercée par LbFV a été interprétée comme une adaptation du virus au mode de transmission horizontal (Gandon *et al.* 2006). Si elle rend le superparasitisme bénéfique pour le virus, la transmission horizontale offre aussi un contexte favorable aux infections multiples et à la compétition entre souches virales. En effet, des lignées de parasitoïdes infectées pourraient être fréquemment réinfectées par transfert horizontal, mettant ainsi en compétition des souches de virus pour l'exploitation du parasitoïde et pour la transmission verticale et horizontale.

Ainsi, les infections multiples pourraient profondément affecter l'évolution des effets du virus sur le parasitoïde. D'une part, elles favorisent les souches ayant un taux de réplication élevé, exploitant rapidement les ressources du parasitoïde et conduisant à une augmentation de la virulence du virus envers ce dernier (Nowak & May 1994 ; van Baalen & Sabelis 1995). D'autre part, le type d'interactions entre souches virales peut profondément affecter l'évolution de l'intensité de la manipulation. Par une approche de modélisation, Varaldi *et al.* (2009) ont notamment montré que la superinfection, c'est-à-dire le remplacement immédiat d'une souche virale résidente par une souche transférée horizontalement conduit à une sélection favorisant les souches virales induisant une intensité de manipulation élevée (augmentation de l'ESS de superparasitisme, Manuscrit 2, Fig. 1). Ils ont également mis en évidence un « feedback » épidémiologique complexe reliant l'ESS de superparasitisme à la prévalence du virus. Cependant, la coinfection, c'est-à-dire la coexistence durable de plusieurs souches virales au sein du même individu parasitoïde, pourrait conduire à des prédictions différentes de celles du modèle de superinfection. En effet, la manipulation est une forme de production de biens communs puisqu'elle profite à toutes les souches de virus infectant le même individu parasitoïde. Ce bénéfice partagé pourrait favoriser l'émergence de souches non-manipulatrices profitant de l'effort collectif des souches manipulatrices sans payer le coût de l'expression de cette manipulation. L'évolution de la non-coopération dans l'effort de manipulation pourrait alors affecter négativement l'intensité de la manipulation chez LbFV.

Dans le manuscrit 2, nous faisons état de la découverte d'une nouvelle souche de LbFV présentant une délétion de 111 pb sur la séquence du marqueur moléculaire de l'infection. La présence de ce polymorphisme d'insertion/délétion chez le virus offre la possibilité de tester l'hypothèse de la transmission du virus à une lignée de parasitoïdes déjà

infectée et donc d'évaluer le type de compétition entre souches virales (superinfection, coinfection).

Dans un premier temps, la souche délétée LbFV2 et la souche de référence LbFV1 ne présentant pas la délétion ont été transférées horizontalement, via le superparasitisme (protocole standard, chapitre 1), sur une même lignée de parasitoïdes initialement non-infectée afin de contrôler les effets du génotype du parasitoïde. La capacité de chacune des souches à coloniser un parasitoïde non infecté ou déjà infecté (par l'autre souche) a ensuite été testée et quantifiée. Les deux souches virales ont été transférées avec la même efficacité sur la lignée initialement non-infectée (Manuscrit 2, Fig. 3). Lorsque la lignée de parasitoïdes receveuse était initialement infectée, le transfert horizontal a conduit à une proportion importante et similaire pour les deux souches de coinfections. Cependant, ce transfert sur une lignée déjà infectée s'est avéré beaucoup moins efficace que sur la lignée non-infectée suggérant l'existence d'un effet « vaccin » conféré par la souche virale résidente. Le transfert horizontal des deux souches de la lignée coinfectée sur une lignée non-infectée à également été testé. Les deux souches ont été transmises avec la même efficacité, suggérant qu'il n'y a pas d'asymétrie compétitive entre elles. De plus, la proportion de coinfections à l'issue de ce transfert est similaire à la proportion de transferts horizontaux chez un témoin infecté par une seule souche de virus, suggérant que les souches virales ne sont pas en compétition pour la transmission horizontale.

A partir des différents statuts d'infection obtenus grâce à ces expériences de transferts horizontaux, le taux de transmission verticale des deux souches a été mesuré sur une génération. Comme dans le cas de la transmission horizontale, les deux souches sont transmises avec la même efficacité (Manuscrit 2, Fig. 4). De plus, en conditions de coinfection, la proportion de descendants coinfectés était légèrement inférieure à celle attendue sous l'hypothèse d'une absence de compétition. Cela suggère que les souches virales sont en compétition pour le passage de la mère aux descendants, possiblement lors de la colonisation des ovocytes par le virus. Ce résultat a été confirmé par l'analyse de la ségrégation des deux souches virales, à partir de lignées coinfectées, sur 4 générations de transmission verticale (Manuscrit 2, Fig. 5). En effet, au bout de 4 générations, il y avait moins de lignées coinfectées qu'attendu sous l'hypothèse d'une absence de compétition.

Enfin, l'étude des effets phénotypiques des deux souches virales et de la coinfection n'a pas révélé de différence sur l'intensité de la manipulation (Manuscrit 2, Fig. 6) ni sur les autres traits de fitness (degré d'infestation des drosophiles par le parasitoïde, succès développemental, temps de développement, sex-ratio et fécondité des femelles).

Ainsi, l'utilisation de cette souche virale délétée nous a permis de montrer que l'infection conférait un certain « effet vaccin ». L'observation de cet effet suggère que des

variations de prévalence doivent entraîner des variations de la stratégie optimale de superparasitisme chez le virus. Cependant cet effet est partiel et les évènements de coinfections sont fréquents dans le système *L. boulandi*-LbFV. Ces coinfections peuvent se maintenir sur plusieurs générations, ce qui constitue un contexte favorable à l'émergence de souches virales non-manipulatrices. Cependant, ces coinfections semblent instables à plus longue échéance (seulement 27,5 % de coinfection après 4 générations de transmission verticale). La fréquence des coinfections dans la nature pourrait alors dépendre d'un équilibre entre les pertes dues à l'effet combiné d'une transmission verticale incomplète et de la compétition entre souches pour l'accès aux descendants du parasitoïde, et une apparition constante de nouvelles lignées coinfectées due aux transferts horizontaux. La mise à jour de ces phénomènes soulève de nombreuses questions sur la nature de la compétition entre souches, mais aussi sur leurs conséquences évolutives. Prédire l'évolution de l'intensité de la manipulation chez LbFV s'avère ainsi complexe et nécessite des approches théoriques prenant en compte les différents paramètres épidémiologiques du virus (coinfection, effet vaccin) ainsi que les feedbacks épidémiologiques qui peuvent s'établir entre ces paramètres.

Multiple infections in a behavior-manipulating virus: between-strains competition and implications for the evolution of the manipulation

Julien Martinez^{1,2}, Frédéric Fleury^{1,3} and Julien Varaldi^{1,4}

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

² E-mail: julien.martinez@univ-lyon1.fr

³ E-mail: frederic.fleury@univ-lyon1.fr

⁴ E-mail: julien.varaldi@univ-lyon1.fr

Abstract

Infections by multiple parasite genotypes are common in nature and may impact the evolution of host-parasite interactions. We investigated the existence of multiple infections for the DNA virus LbFV infecting the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina boulardi*. This vertically-transmitted virus forces infected females to lay their eggs in already-parasitized *Drosophila* larvae (a behavior called superparasitism), thus favouring its spread through horizontal transmission. Previous theoretical developments indicated that the evolution of the manipulation strongly depends on the occurrence of viral strain replacement due to competition within the parasitoid. We describe a strain of LbFV showing a 111 bp deletion within the locus used for PCR detection, allowing us to test for the existence of super- and coinfection. Viral strains did not differ on their vertical or horizontal transmission rates nor on the way they affected the parasitoid's phenotype, including their ability to manipulate the behavior of the wasp. Although already-infected parasitoids were much less susceptible to new infection than uninfected parasitoids, frequent coinfection occurred following horizontal transmission. After few generations of vertical transmission however, one strain usually eliminated the other, even if the outcome was balanced among strains. The implications of these results on LbFV epidemiology and evolution are discussed in the light of the between-strain competition and social dilemmas literature.

Introduction

Multiple infections are common in host-parasite associations (López-Ferber et al. 2003; Mouton et al. 2003; Ben-Ami et al. 2008). When several parasite strains or species compete for shared limited resources, this leads to the classical “tragedy of the commons” problem (Hardin 1968). Under this model, the within-host competition should select for parasites with faster replication rate, and thus greater virulence (Frank 1996). Two types of models have been developed to simulate two different kinds of within-host competition. The first is the superinfection model where there is a competitive hierarchy between parasite strains leading to the exclusion of all strains except the fastest replicating one that is the only one to be transmitted (Nowak & May 1994). The second is the coinfection model where strains stably coexist within the host and are all transmitted independently of the presence of the other strains (May & Nowak 1995). However, those models only predict the virulence that is due to the replication rate of individual parasites. Depending on the parasite traits that evolve in response to competition (replication rate, collective action on the host) or on the kind of competition between parasites (exploitation, interference or apparent competition), multiple infections might also select for a lower virulence and lead to the under-exploitation of hosts (Chao et al. 2000; Gardner et al. 2004). Particularly, production of public goods by parasites can be exploited by non-producing cheater strains which benefit from the collective action of the group without paying the cost of the production (Brown et al. 2002; Buckling and Brockhurst 2008). Numerous parasites have evolved the ability to manipulate the phenotype of the host to their own benefit, which constitutes an additional component of parasite virulence (Combes, 1995; Stouthamer et al. 1999; Thomas et al. 2011a). Producing manipulation effectors is a form of public goods production since it might be costly for the individual parasite producing them but beneficial for the whole group of parasites sharing the same host. Manipulative parasite strains can thus be exploited by non-manipulative strains. Such a within-host competition increases the cost of manipulation for the parasite strains that cooperate in the collective effort of manipulation and might select for an overall weaker, non-optimal, level of manipulation (Brown 1999; Vickery and Poulin 2010).

We investigated the occurrence of multiple infections in the maternally-transmitted DNA virus LbFV that specifically infects and manipulates the behavior of the Hymenopteran parasitoid *Leptopilina boulardi* (Varaldi et al. 2003). The parasitoid exploits *Drosophila* larvae by laying its egg inside their body. The parasitoid larva consumes all the tissues of the *Drosophila* larva, leading to its death and to the emergence of a parasitoid adult. Uninfected parasitoid females lay a single egg into each encountered *Drosophila* larva but usually reject already-parasitized ones. On the contrary, LbFV-infected females readily superparasitize, i.e.

lay eggs into already-parasitized larvae, exposing their offspring to a strong competition since only one parasitoid can emerge from a single larva. Superparasitism allows the virus to be horizontally-transmitted between parasitoid offspring sharing the same *Drosophila* larva, thus complementing its high but partial vertical transmission. By a theoretical approach, Gandon *et al.* (2006) derived the evolutionary stable strategy (ESS) of superparasitism (rate of acceptance of parasitized larvae) both from the parasitoid (in the absence of virus) and from the virus point of view. The model indicates that the ESS is always higher for the virus compared to the ESS of the parasitoid (who may still benefit from superparasitism under harsh competition for hosts). This strongly suggests that this virus-induced behavioral change is indeed a true manipulation induced by the virus. In their initial model, superinfection, i.e. the replacement of a viral strain by another one (Nowak & May 1994), was not allowed. In these conditions, the model predicts that the ESS of superparasitism for the virus is strongly dependent on the viral prevalence at the epidemiological equilibrium (Fig. 1). This is due to the fact that infected parasitoids cannot be infected again and consequently the optimal level of manipulation decreases with an increase in the viral prevalence.

However, in an extension of this model (Varaldi *et al.* 2009), it was pointed out that the occurrence of superinfection may strongly impact the evolution of the manipulation. If some superinfection is allowed, then the virus is selected for much higher superparasitism intensities compared to the predictions without superinfection (Fig 1). This is due to the fact that, in this situation, infected parasitoids still constitute potential hosts for horizontally-transmitted viral strains. Furthermore, the ESS of the virus takes a humped shape, with an initial increase with an increase in viral prevalence (below a threshold in prevalence) followed by a decrease with an increase in viral prevalence (above the threshold in prevalence). This complex evolutionary response is generated by an interplay between the possible replacement of a resident strain by a mutant strain (superinfection) and the partial protective effect of being infected. Unlike superinfection, which does not allow stable coexistence of viral strains, coinfection may impact the evolution of the behavioral manipulation in a different way since this is an ideal context for the evolution of cheater strains.

In this paper, we describe a natural LbFV strain showing a short deletion (111 bp) in the locus classically used for PCR detection. We used this strain together with the complete strain to test several hypotheses regarding the epidemiology and the evolution of the virus. In particular, we tested whether superinfection or coinfection occur. We also compared the fitness of both viral strains by measuring their rates of transmission (vertical and horizontal) and their effects on parasitoid life-history traits including the intensity of the manipulation.

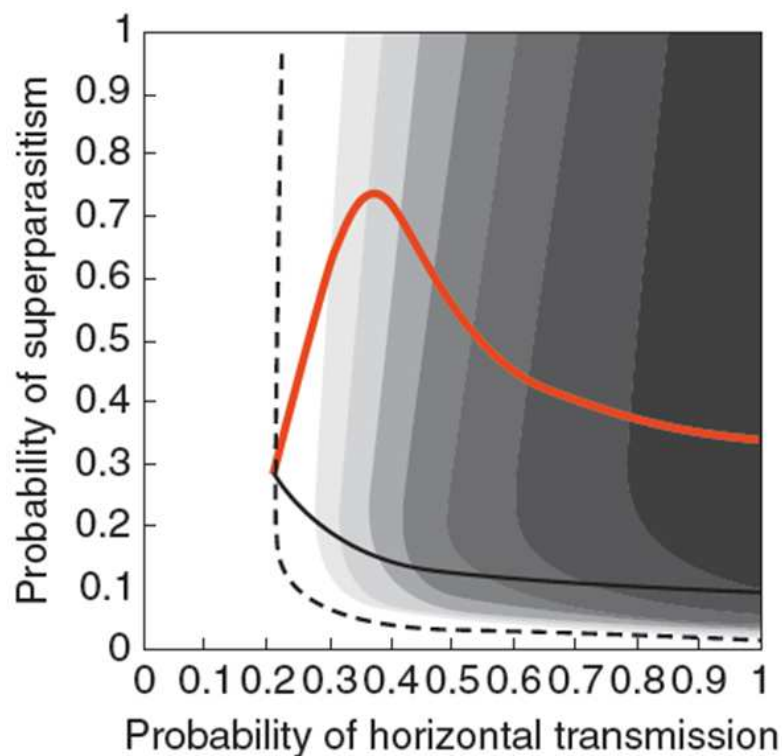


Figure 1. From Varaldi *et al.* 2009: Evolutionarily stable strategy (ESS) of superparasitism for the virus against the probability of horizontal transmission in the context of superparasitism. Shades of gray indicate the prevalence of the virus in the population at the model equilibrium ;darker gray indicates more infected parasitoids (10% difference in prevalence between each shade of gray). The dashed line indicates the threshold below which the virus goes extinct. Black line: $\epsilon = 0$ (no superinfection). Red line: $\epsilon = 0.5$ (some superinfection may occur).

Material and methods

PCR detection of LbFV

Patot *et al.* (2009) identified the first sequence of LbFV by comparing the transcriptome of infected and uninfected parasitoid lines using suppressive subtractive hybridization (accession number: FM876312). The analysis of the mRNA revealed a potential open reading frame encoding 205 amino acids. Using the protocol described in Patot *et al.* (2009), we used the primers 102-F and 500-R to detect LbFV infection. These primers were used in a multiplex reaction with insect primers RPS2-F and RPS2-R amplifying a parasitoid ribosomal protein gene to control for the quality of DNA extractions.

Viral strains and parasitoid genotype

The PCR setup described above typically leads to the amplification of a 399 bp fragment in infected parasitoids (primers 102-F and 500-R, see above). In September 2007, a strain of LbFV was discovered after the sampling of parasitoids in a French orchard (Avignon). Among the 21 parasitoid lines collected from the same trap, 16 displayed a positive PCR amplification. Among these infected lines, one of them displayed an unusual amplification of a 288 bp fragment. Moreover, nine other lines showed this shorter fragment along with the typical 399 bp fragment suggesting that parasitoids can be coinfecting by several strains at the same time. The unusual fragment was sequenced using the Sanger method revealing that it corresponds to a new viral strain presenting a deletion. The reference viral strain LbFV1 (399 bp), as well as the deleted viral strain LbFV2 (288 bp), were maintained in the laboratory on the inbred parasitoid line Av3 (originating from Avignon, 5 generations of sib-mating, Martinez *et al.* 2011). All parasitoids were reared under a 12L:12D photoperiod at 26°C using a laboratory line of *Drosophila melanogaster* originating from Ste-Foy-lès-Lyon (France). *Drosophila* larvae were fed with a standard diet (David 1962).

Experimental set-up for horizontal transmission

Horizontal transmission of LbFV occurs exclusively in the context of superparasitism (Varaldi *et al.* 2003; Varaldi *et al.* 2006a). Since *L. bouleari* is a haplo-diploid species, fertilized eggs develop into females whereas unfertilized ones give rise to males. Hence, virus horizontal transmission can easily be quantified by obtaining *Drosophila* hosts successively parasitized by a mated mother (recipient line) and a virgin infected mother (donor line). Females emerging from these hosts being necessarily offspring of the mated mother, the occurrence of horizontal transmission is simply tested by PCR-detection of the virus in those females. Practically, one mated parasitoid female (1-2 day old) of the recipient line of interest was placed with 100 *Drosophila* eggs for 24 hours in a rearing vial. Then, the female was removed and replaced by four virgin females (2-3 day old) of the donor line of interest for an additional 24 hours. The success of horizontal transmission was then evaluated using the PCR test on emerging females. For each vials, mothers of the recipient and donor lines were PCR checked for viral infection.

In a first experiment, we quantified and compared the ability of both viral strains to be horizontally-transmitted on a similar uninfected parasitoid line (Av3). Furthermore, we tested whether one viral strain can establish in a parasitoid line already infected by the other strain (Tab. 1). From this first experiment, we obtained two coinfecting parasitoid lines, one obtained with the transfer from Av3[LbFV1] to Av3[LbFV2] and the other with the transfer from Av3[LbFV2] to Av3[LbFV1]. Because no differences were found between these two coinfecting lines in the subsequent experiments, they were then considered as single coinfecting line, called A3[LbFV1+LbFV2]. Therefore, data from these coinfecting lines were pooled for all statistical analyses.

In a second experiment, we tested whether the coinfection can be horizontally-transmitted by using the coinfecting line Av3[LbFV1+LbFV2] as the donor line and Av3 as the recipient line (Tab.1). The transfer from A3[LbFV1] to uninfected parasitoids in this second experiment was used as a control for horizontal transmission efficiency.

Successful horizontal transmission depends on the actual rate of transmission (from one parasitoid egg to another in the situation of superparasitism) but also on the opportunities for horizontal transmission (the frequency and the intensity of superparasitism). Therefore, in the first horizontal transmission experiment, superparasitism intensity was quantified by dissecting five *Drosophila* pupae in each vial. Parasitoid eggs were counted under a stereomicroscope and, for a given vial, superparasitism intensity was defined as the mean number of parasitoid eggs per parasitized *Drosophila* larva. Parasitism rate, i.e. the proportion of parasitized larvae was also measured for each vial, as explained below.

Table 1. Different combinations of LbFV horizontal transfer. Av3 stands for the parasitoid’s nuclear background and text in parentheses corresponds to the viral infection status.

experiment	Donor line		Recipient line	Number of replicates	Number of female offspring tested
1	Av3[LbFV1]	→	Av3	n = 7	n = 24
1	Av3[LbFV2]	→	Av3	n = 7	n = 23
1	Av3[LbFV1]	→	Av3[LbFV2]	n = 7	n = 33
1	Av3[LbFV2]	→	Av3[LbFV1]	n = 7	n = 27
2	Av3[LbFV1]	→	Av3	n = 4	n = 18
2	Av3[LbFV1+LbFV2]	→	Av3	n = 4	n = 13

Vertical transmission and segregation of the coinfection

Two generations after the first horizontal transmission experiment, lines Av3[LbFV1], Av3[LbFV2] and Av3[LbFV1+LbFV2] were used to measure the vertical transmission rate of each viral strains from one generation to the next. Ten infected females per infection status (PCR verification) were individually placed for 24 hours in vials containing *Drosophila* larvae hatched from 100 eggs. In such conditions, superparasitism frequency is low enough to ensure that horizontal transmission is negligible. PCR detection of LbFV strains was performed on female offspring emerging from these vials (n = 46 to 100 depending on the modality).

We further tested the within-host competitive ability of LbFV1 and LbFV2 over four generations of vertical transmission. To achieve this, we created 40 coinfecting isofemale lines originating from the line Av3[LbFV1+LbFV2] (PCR verification, generation 0). A single female per isofemale line was kept to establish the next generation. The infection status of the different line was then checked by PCR detection on adult females of the fourth generation. The observed distribution of infection statuses was compared to the expected distribution under the hypothesis of no competition between viral strains (Appendix S1). The proportion of false-negative among PCR tests was evaluated by testing viral infection in lines of the generation 2 that were negative for infection at the previous generation, either for one viral strain or for both. All ten cases of apparent infection loss at the generation 1 (no LbFV1 = 2, no LbFV2 = 3, uninfected = 6) were confirmed at the next generation, suggesting that the proportion of false-negative among PCR tests is rather low.

Effect of LbFV strains on parasitoid life-history traits

Since the fitness of a particular viral strain depends on its transmission rate but also on its effect on the parasitoid's phenotype, we measured several parasitoid life-history traits for the different infection statuses (Av3, Av3[LbFV1], Av3[LbFV2], Av3[LbFV1+LbFV2]). Previous works showed that LbFV increases the tendency of adult parasitoid females to accept superparasitism without detectable effect on other behavioral traits or on female survival (Varaldi *et al.* 2003 ; Varaldi *et al.* 2006b ; Varaldi *et al.* 2009). In addition, it has a slight positive effect on egg-load ($\approx + 10 \%$) and a weak negative effect on tibia length, locomotor activity and development time (Varaldi *et al.* 2005).

Superparasitism behavior was measured as described in Varaldi *et al.* (2003). Adult parasitoid females (1-2 day old) were individually placed with ten *D. melanogaster* 1st instar larvae in a 5 cm diameter Petri dish consisting of a thin yeast spot poured on an agar layer. After one night at 26°C, females were removed and individually frozen for later PCR detection of LbFV. Three *Drosophila* larvae per parasitoid female were dissected under a stereomicroscope in order to count parasitoid eggs. Superparasitism intensity for a given female was defined as the mean number of parasitoid eggs laid per parasitized *Drosophila* larva.

In addition, for each of the five infection statuses, ten females (1-2 day old) were individually placed for 24 hours in a rearing vial containing *Drosophila* larvae hatched from 100 eggs deposited the day before. Parasitoid females were then frozen for later PCR detection of LbFV. Additionally, ten control vials without parasitoid were prepared to measure the natural mortality of *Drosophila*. All emerged flies and parasitoid offspring were daily collected and counted. The parasitism rate for a given female (proportion of parasitized *Drosophila* larvae) was estimated by comparing the number of adult flies emerging from parasitized vials to the mean number of flies emerging from the parasitoid-free control vials, as described in Vavre *et al.* (2000). We estimated the parasitoid sex ratio as the proportion of males in the progeny, as well as the mean development time of parasitoid females and the developmental parasitoid success. This latter parameter is defined as the proportion of parasitized *Drosophila* larvae that give rise to adult parasitoids and thus depends on the parasitism rate estimate (Vavre *et al.* 2000). For each infection status, the egg load and tibia length of eight parasitoid females fed with honey were also measured according to the protocol described in Martinez *et al.* (2011).

Results

Characterization of LbFV2 strain

The sequencing of the viral molecular marker revealed that the only difference between LbFV1 and LbFV2 is a 111 bp deletion in LbFV2 sequence (Fig. 2a & c). The deleted sequence is located in a region of putative duplication with two consecutive repetitions of a 72 bp sequence (Fig. 2a & b). In the complete strain, these DNA repetitions are separated by a 39 bp sequence which is a multiple of 3. Consequently the predicted amino acid sequence also includes amino acid repetitions (Fig. 2b). The deletion in the nucleic sequence does not disrupt the open reading frame previously predicted (Patot *et al.* 2009).

Horizontal transmission and coinfection

Both LbFV strains were successfully horizontally-transmitted, in all tested combinations (Fig. 3). In experiment 1, there were overall differences in the proportion of successful horizontal transmission depending on the transfer combination ($\chi^2 = 21.4$; $df = 3$; $P < 0.0001$). There was no between-virus-strain difference in the proportion of successful transmission of single infections to initially uninfected recipient lines (85% for LbFV1 and 93% for LbFV2; $\chi^2 = 0.06$; $df = 1$; $P = 0.8$) and to already-infected recipient lines (46% for LbFV1 and 39% for LbFV2; $\chi^2 = 0.12$; $df = 1$; $P = 0.73$). However, the efficiency of successful horizontal transmission into already-infected parasitoid lines was about two-fold lower than into the uninfected line ($\chi^2 = 19.1$; $df = 1$; $P < 0.0001$). Nevertheless, horizontal transmission to already-infected lines led to a substantial proportion of coinfection. Newly coinfecting females represented 64% of all horizontal transmission events for the transfer of LbFV1 and 71% for the transfer of LbFV2 but the difference between the two strains was not significant (Fisher's exact test; $P = 0.99$). In the other cases, the horizontally-transmitted strain apparently replaced the resident one. Such replacements do not necessarily mean that superinfection, i.e. replacement due to within-host competition, occurred since the resident strain might have been lost through imperfect vertical transmission. Indeed, the proportion of putative superinfection events was not significantly different from the proportion of infection losses due to incomplete vertical transmission estimated in the next section (Fisher's exact test, LbFV1 as resident strain: $n = 50$; $P = 0.99$; LbFV2 as resident strain: $n = 53$; $P = 0.67$).

In this first experiment, there was no difference between the different combinations of horizontal transmission in both the parasitism rate (arcsinus-transformed data, $F_{3,24} = 1.17$; $P = 0.34$) and the superparasitism intensity (log-transformed data, $F_{3,24} = 1.9$; $P = 0.16$). This suggests that the differences in horizontal transmission efficiency were due to differences in the rate of transmission rather than to differences in horizontal transmission opportunities.

In experiment 2, control transfers (from A3[LbFV1] to uninfected Av3) were much more frequent than in experiment 1 (100%, Fisher's exact test; $P = 0.01$; Fig. 3) due to an unknown environmental factor. Without competition between LbFV1 and LbFV2 during the course of the horizontal transmission, and given the fact that they had similar horizontal transmission rates in the first experiment, we expected that they would be transferred with identical rates from a coinfecting line to an uninfected recipient line. Accordingly, we found that their respective rates of transmission were not statistically significant (Fisher's exact test, $P = 0.99$). In total, horizontal transmission resulted in 92% of coinfection among the newly infected offspring and this was not significantly different from the horizontal transmission of

LbFV1 in the control transfer (Fisher's exact test, $P = 0.99$), suggesting that co-transmission is as efficient as transmission of single infections. We must stress that because only 13 individuals were tested in this condition (Tab. 1), we cannot rule out that differences still exist among virus strains.

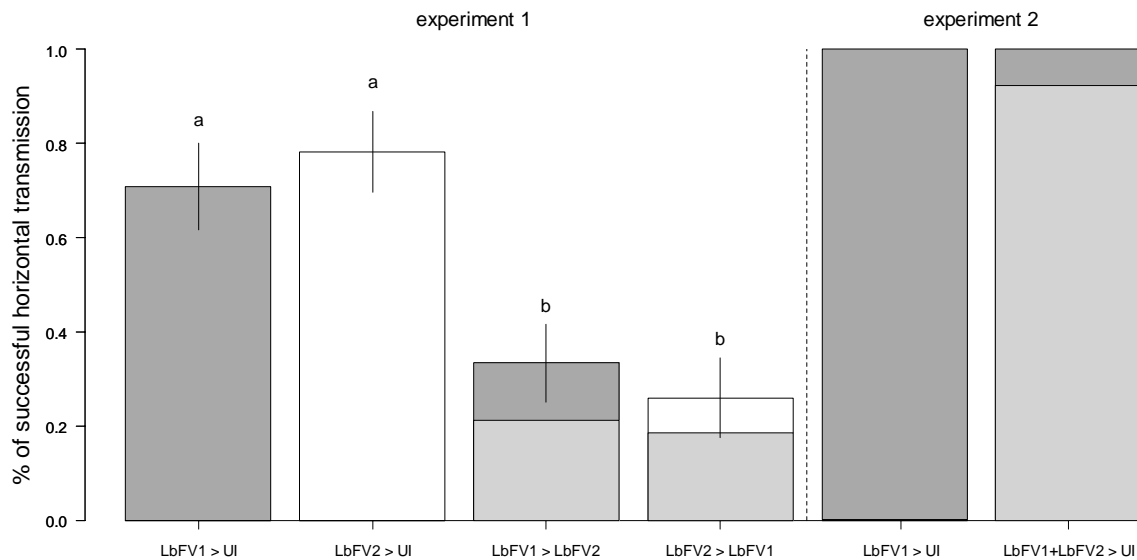


Figure 3. Horizontal transmission efficiency for the different combinations of infection status in experiment 1 (left) and 2 (right). Coloured bars correspond to proportions of horizontally-acquired infections: dark grey for LbFV1; white for LbFV2; light grey for coinfection with LbFV1 and LbFV2. Different letters indicate statistically significant differences (Bonferroni correction for multiple comparisons, $\alpha = 0.008$). UI: uninfected recipient line Av3.

Vertical transmission rate and segregation of LbFV strains

The vertical transmission of both viral strains was quantified from one generation to the next. The vertical transmission rates in the case of single infection was not different between viral strains (96% for LbFV1 and 94.3% for LbFV2, Fisher's exact test; $P = 0.99$; Fig. 4). In the case of coinfection, LbFV1 and LbFV2 were present in 89.8 % and 84.8 % of the offspring (both singly and coinfecting). These proportions were not significantly different ($\chi^2 = 0.69$; $df = 1$; $P = 0.41$) indicating that there is no competitive asymmetry between the two strains. To test the hypothesis of competition for vertical transmission, we calculated the expected proportion of co-transmission of LbFV1 and LbFV2, under the hypothesis of no within-host competition. The expected proportion of co-transmission is then simply the

product of single infection transmission rates, i.e. $96 \times 94.3 = 90.5\%$. The observed proportion of coinfection was slightly different from this expected value (84%; $\chi^2 = 4.19$; $df = 1$; $P = 0.04$), suggesting that there might be a competitive exclusion between viral strains. The expected proportion of uninfected offspring originating from the coinfecting line was 0.0025% (see Appendix S1) which is not different from the observed proportion of 3% (Fisher's exact test; $P = 0.62$). Therefore, competitive exclusion between viral strains is not due to interference competition. Interference competition requires direct interaction between competitors and should lead to a lower production of virions and thus a higher proportion of uninfected offspring than under simple exploitation competition.

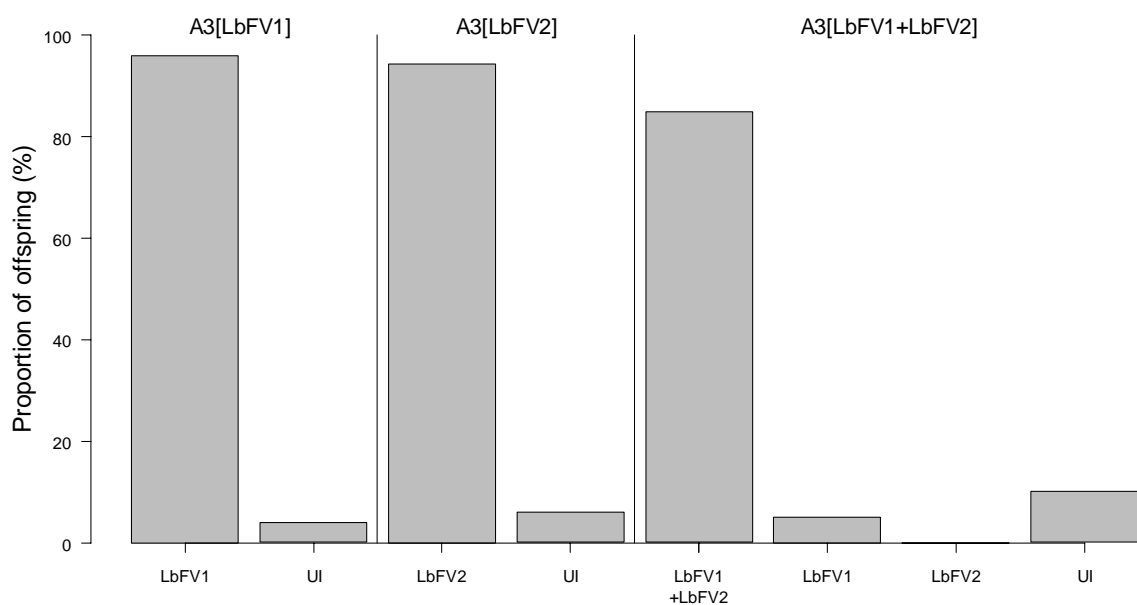


Figure 4. Frequency distribution of infection statuses among progenies of the different infected parasitoid lines. Line origins are indicated on the top of the graph. UI: uninfected offspring. Number of tested female offspring: A3[LbFV1]: 50; A3[LbFV2]: 53; A3[LbFV1+LbFV2]: 100.

We further tested the stability of the coinfection and the fitness of viral strains through four generations of vertical transmission, starting from Av3[LbFV1+LbFV2]. Among the 40 coinfecting lines initially created, only 85% were still infected by at least one viral strain after four generations of vertical transmission (Fig. 5). Importantly, there was no evidence of competitive asymmetry in vertical transmission rates among viral strains since LbFV1 and LbFV2 infected a similar proportion of the lines, respectively 55% and 57.5% ($\chi^2 = 0.225$; $df = 1$; $P = 0.64$). The overall distribution of parasitoid lines among infection statuses at the fourth generation was significantly different from the expected distribution under the

hypothesis of no within-host competition ($\chi^2 = 34.57$; $df = 3$; $P < 0.0001$; see Appendix S1). The observed proportion of coinfecting lines was lower than the expected proportion (Fisher's exact test; $P = 0.0007$) suggesting that within-host competition occurred. The observed proportion of uninfected lines was however not different from the expected proportion (Fisher's exact test; $P = 0.11$), suggesting once again that within-host competition is more an exploitation competition rather than an interference competition. However, we must be cautious with this conclusion. Indeed, no difference between the expected and the observed distribution of lines among infection statuses was detected when doing the same analysis with the low margin of the 95% interval confidence of the vertical transmission rate estimate (i.e. 90.7%; $\chi^2 = 5.15$; $df = 3$; $P < 0.16$; see Appendix S1).

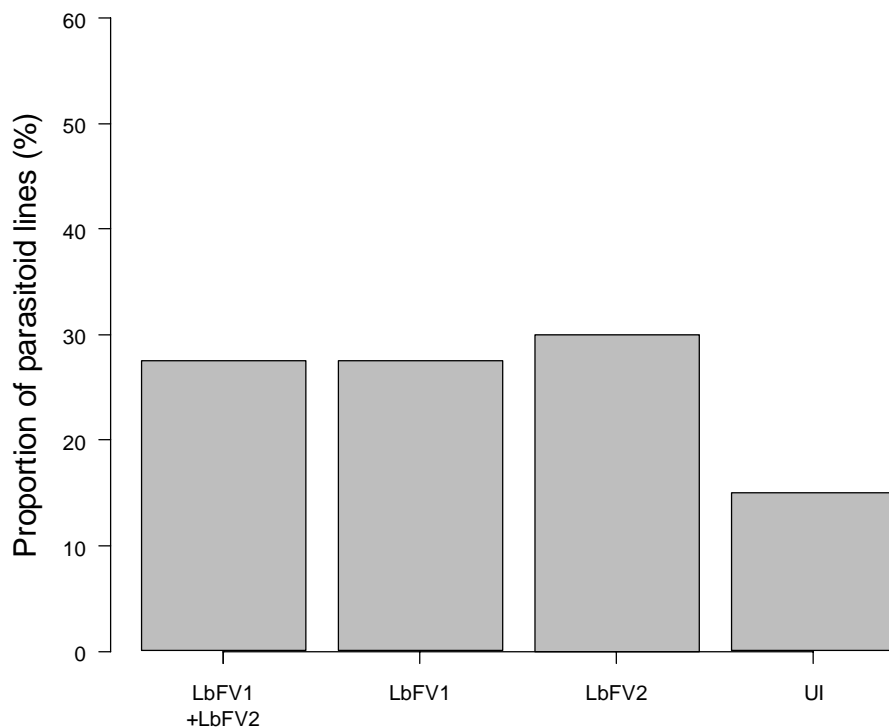


Figure 5. Frequency distribution of infection statuses in isofemale lines originating from the coinfecting line A3[LbFV1+LbFV2] after four generations of vertical transmission. UI: uninfected isofemale lines.

Intensity of the behavioral manipulation induced by LbFV1 and LbFV2

The superparasitism behavior depended on the infection status of females (log-transformed data; $F_{4,83} = 18.7$; $P < 0.0001$; Fig. 6). As expected, infected females superparasitized much more than uninfected ones (pairwise t test with Bonferroni correction

for multiple comparisons, Fig. 6). There was, however, no difference in the superparasitism intensity induced by LbFV1 and LbFV2, nor difference between coinfecting and singly infected females (Fig.6).

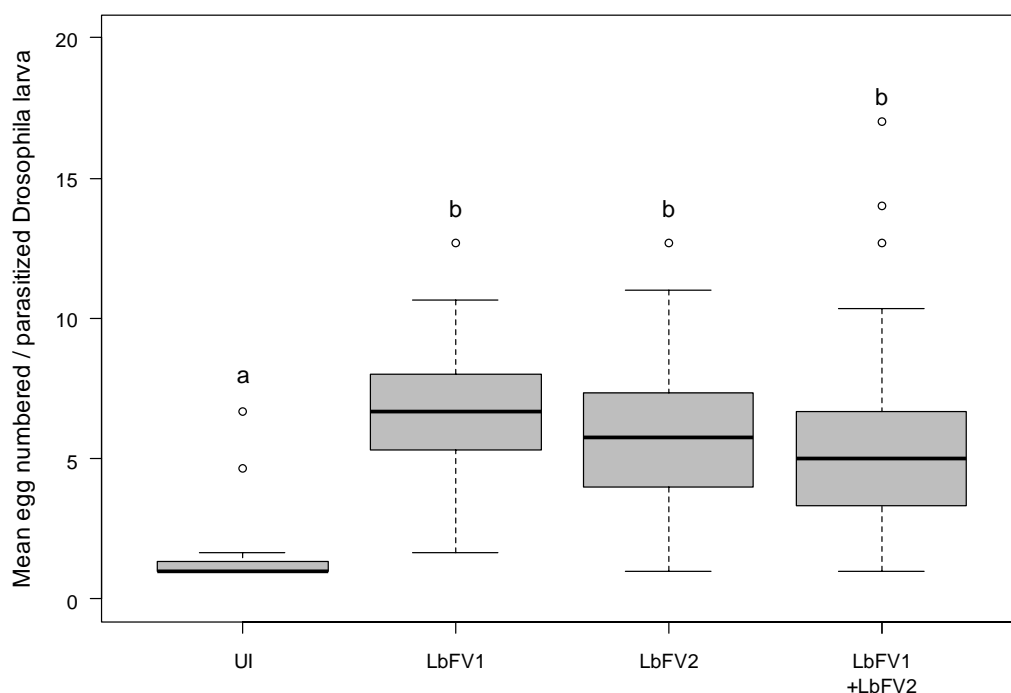


Figure 6. Superparasitism intensity of the different infection statuses. Coinfecting lines are separated according to their line of origin (horizontal transfer combination in parentheses). Different letters indicate significant differences (pairwise *t* test on log-transformed data with Bonferroni correction for multiple comparisons). UI: uninfected line Av3.

Other parasitoid life-history traits

Various parasitoid life-history traits were measured in order to estimate the cost induced by single infection and coinfection. No difference could be attributed to differences in the infection status of parasitoids for any tested traits (Tab. 2).

Table 2. Analysis of the effect of the infection status on different parasitoid life-history traits.

Life-history trait	Source of variation	<i>F</i> ratio	<i>P</i>
Parasitism rate (arcsinus-transformed data)	infection status	$F_{4,65} = 2.17$	0.08
Parasitoid developmental success	infection status	$F_{4,65} = 1.15$	0.34
Sex ratio	infection status	$F_{4,65} = 1.08$	0.38
Mean development time	infection status	$F_{4,53} = 2.18$	0.08
Fecundity	infection status	$F_{4,29} = 1.48$	0.23
	Tibia	$F_{1,29} = 39.52$	< 0.0001
	Interaction	$F_{4,29} = 0.49$	0.74
tibia	infection status	$F_{4,35} = 0.67$	0.62

Discussion

The influence of multiple infections on parasite evolution depends on the specific details of the within-host competition (Nowak & May 1994; van Baalen & Sabelis 1995; Brown *et al.* 2002; Mideo 2009). In the *L. bouleardi*-LbFV system, we identified a viral strain presenting a 111 bp deletion that allowed us to test for the existence of superinfection and coinfection. The fitnesses of the deleted and the non-deleted strains were also compared in the context of single and multiple infections.

The molecular marker used in this study to detect the viral infection has been shown to be highly transcribed in infected parasitoid females infected by LbFV1 and to code for a putative 205 amino acid protein (Patot *et al.* 2009). Since the deletion in LbFV2 does not change the open reading frame of the mRNA, we expect LbFV2 to produce a shorter protein. However, no difference was detected between LbFV1 and LbFV2 regarding their vertical and horizontal transmission rates in single and coinfection or their effect on phenotypic traits including the intensity of the manipulation. Thus, LbFV2 seems not to be defective in any important viral traits and the biological function of the putative viral protein remains unknown. Because LbFV1 is by far the most prevalent allele found in nature (Patot *et al.* 2010) and that LbFV2 has never been found again in its population of origin (sampled again in 2008, 2009 and 2010), nor in other populations, LbFV1 has probably a selective advantage over LbFV2 under natural conditions. Further investigations should take under consideration other viral traits that might underlie fitness differences between the two viral strains. For instance, their respective transmission rates in cases where *L. bouleardi* parasitizes other host

species such as *Drosophila simulans* should be assessed. The occurrence of insertion and deletion is a common mutational event in DNA viruses (Coulson & Upton 2011). The observation of this deleted variant in natural population may thus reflect the recurrent apparition of this deletion favored by the presence of the repeated DNA motifs. The deleted strain may thus maintain in population through mutation/drift or mutation/selection balance.

The isolation of this deleted viral strain allowed us to address questions relating to multiple infections. We were particularly interested in this question since the prediction of theoretical models on the evolution of the behavioral manipulation strongly depends on the occurrence of strain replacement (Gandon *et al.* 2006, Varaldi *et al.* 2009).

Our results indicated that an infected parasitoid still represents a potential host for a horizontally-transmitted viral strain. Indeed, when the recipient parasitoid line was already-infected, horizontal transmission often resulted in coinfection or even in the replacement of one strain by the other. However, we cannot ensure that replacements were due to a true mechanism of superinfection, i.e. a competitive exclusion of one viral strain due to within-host competition (as defined in Nowak & May 1994), because of the incomplete vertical transmission rate of LbFV and potential false-negative PCR tests. However, our data show that one viral strain can replace a resident one (within the parasitoid maternal line) at least after few generations of vertical transmission (Fig. 5). Interestingly, our results indicate that when the recipient line is already-infected, the horizontal transmission efficiency is greatly reduced compared to the situation where the recipient line is uninfected. The resident viral strain was thus at an advantage since most individuals of the recipient parasitoid lines were still infected by their resident strain at the end of the horizontal transmission experiment. Therefore, LbFV infection confers a protection against additional infections, as documented in many host-parasite systems (Hutchison & Sinsheimer 1971; Simon *et al.* 1990; Nethe *et al.* 2005; Huang *et al.* 2008). This priority advantage can be viewed as a kind of preemptive competition and differ from superinfection (contest competition) and coinfection models (scramble competition). Such a protection against new infections effect could be mediated by cross-immunity mechanisms, which means that parasites induce an immune reaction preventing any additional infection (Råberg *et al.* 2006). This protective effect against additional infections thus reduces the opportunities of horizontal transmission at higher viral prevalence and should select for reduced investment in the manipulation in highly infected populations. Thus, we expect that variation in viral prevalence impacts the evolution of the manipulation. In the south east of France, strong variation in viral prevalence is observed (Patot *et al.* 2010), giving the opportunity to address this question. However, the case of LbFV lies between a strict preemptive competition model, where hosts cannot be re-infected (Bremermann & Thieme 1989, equivalent to $\varepsilon = 0$ in the model of Varaldi *et al.* 2009), and

pure superinfection (Nowak & May 1994) or coinfection (May & Nowak 1995) models, where already-infected hosts are fully suitable for the establishment of horizontally-transmitted parasite strains whatever the outcome of the within-host competition. In the *L. boulandi*-LbFV system, an infected parasitoid is still a potential host for horizontally-transmitted viral strains but is less susceptible than an uninfected parasitoid. With strict preemptive competition, competition only occurs at the between-host level. In this case, the selected level of virulence, and thus the level of manipulation, is the one that maximizes the basic reproductive ratio R_0 of the parasite and thus lead to an optimal exploitation of hosts (Anderson and May 1979; Bremermann and Thieme 1989). In contrast, super- and coinfection involve both between- and within-host competition and generate the social dilemma of cooperation. On the one hand, competition for limited resources should favor “rapaciousness”, i.e. favoring viral strains that replicate faster thus causing more damages to the host and leading to its overexploitation (Brown *et al.* 2002). On the other hand, viral traits that depend on the collective action of the group such as the manipulation should evolve differently in the superinfection and the coinfection models. In both models, there is a higher contribution of horizontal transmission to the virus’ fitness compared to the preemptive competition model. However, with superinfection, viral strains do not coexist within the parasitoid since one strain rapidly replaces the other, thus eliminating the viral genetic diversity and leaving no place for conflict on the production of manipulative effectors. In contrast, in the coinfection model, which best characterizes the epidemiology of LbFV, non-related viral strains can coexist within the parasitoid and share the benefit provided by cooperative manipulative strains. Therefore, coinfection leads to a conflict between manipulative and non-manipulative viral strains and should drive the level of manipulation towards lower values than under the superinfection model (Brown *et al.* 2002; Vickery & Poulin 2010). How the ESS of superparasitism for the virus responds to variation in viral prevalence under the coinfection model remains unclear and needs further theoretical works.

Over one generation of vertical transmission, LbFV1 and LbFV2 were transmitted with the same efficiency, and with a mean rate consistent with previous data (Varaldi *et al.* 2006a). Moreover, the vertical transmission rate of both viral strains was not altered by the presence of the other in coinfecting parasitoid lines, suggesting that there was no competition for vertical transmission. However, this latter conclusion, drawn from an experiment on one generation, was contradicted by the results obtained with the segregation of the coinfection through four generations of vertical transmission. Indeed, the proportion of coinfecting lines after four generations was lower than expected under the hypothesis of the absence of competition. However, we must be cautious since this result strongly depends on the precision of the estimate of the vertical transmission rate.

All together, our results bring new light on the epidemiology of LbFV. First, coinfection seems to be a common feature of LbFV epidemiology. It was first observed in parasitoid lines directly collected from the field (see Material and methods). Moreover, in the laboratory, horizontal transmission on already-infected parasitoids led to a substantial proportion of coinfections. In coinfecting parasitoid lines, the two viral strains were co-transmitted very efficiently through both horizontal and vertical transmission. However, several generations of vertical transmission led to the progressive loss of the coinfection. Therefore, in natural populations, the frequency of coinfection may depend on the equilibrium between the loss of coinfection through vertical transmission and the recurrent appearance of coinfecting parasitoid lines through horizontal transmission. The protection conferred by LbFV against additional infections should, however, limit the extent to which coinfection occurs.

Predicting the evolution of the level of the manipulation with such complex epidemiologic features is not straightforward and needs more theoretical work. The ESS model on the evolution of manipulation (Gandon *et al.* 2006 ; Varaldi *et al.* 2009) should be extended to integrate the existence of coinfection. More generally, multiple infections in manipulative parasites should be taken into account when making predictions about the optimal level of manipulation.

Acknowledgements

We are grateful to the INRA centres of Avignon and Gotheron, and to the land-owners for kindly allowed us to collect insects from their orchards. We would like to thank Patricia Gibert and Roland Allemand for their help in the field sampling. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS 5558).

References

- Anderson, R. M., and R. M. May. 1979. Population biology of infectious-diseases: Part 1. *Nature* 280:361-367.
- Asgari, S., U. Theopold, C. Wellby, and O. Schmidt. 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.
- Beckage, N. E. 1998. Modulation of immune responses to parasitoids by polydnviruses. *Parasitology* 116:S57-S64.
- Ben-Ami, F., L. Mouton, and D. Ebert. 2008. The effects of multiple infections on the expression and evolution of virulence in a *Daphnia*-endoparasite system. *Evolution* 62:1700-1711.

- Bezier, A., M. Annaheim, J. Herbinier, C. Wetterwald, G. Gyapay, S. Bernard-Samain, P. Wincker, I. Roditi, M. Heller, M. Belghazi, R. Pfister-Wilhem, G. Periquet, C. Dupuy, E. Huguët, A. N. Volkoff, B. Lanzrein, and J. M. Drezen. 2009. Polydnviruses of Braconid Wasps Derive from an Ancestral Nudivirus. *Science* 323:926-930.
- Bremermann, H. J., and H. R. Thieme. 1989. A competitive exclusion principle for pathogen virulence. *Journal of Mathematical Biology* 27:179-190.
- Brown, S. P. 1999. Cooperation and conflict in host-manipulating parasites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:1899-1904.
- Brown, S. P., M. E. Hochberg, and B. T. Grenfell. 2002. Does multiple infection select for raised virulence? *Trends in Microbiology* 10:401-405.
- Buckling, A., and M. A. Brockhurst. 2008. Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity* 100:484-488.
- Carton, Y., and A. J. Nappi. 1997. *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today* 13:218-227.
- Carton, Y., and A. J. Nappi. 2001. Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* 52:157-164.
- Chao, L., K. A. Hanley, C. L. Burch, C. Dahlberg, and P. E. Turner. 2000. Kin selection and parasite evolution: Higher and lower virulence with hard and soft selection. *Quarterly Review of Biology* 75:261-275.
- David, J. 1962. A new medium for rearing *Drosophila* in axenic condition. *Drosophila Information Service* 36:128.
- Drezen, J. M., A. Bézier, J. Lesobre, E. Huguët, and C. Dupuy. 2006. Virulence genes of parasitoid wasps encoded by symbiotic viruses. Pp. 59-64. ICOPA XI: Proceedings of the 11th International Congress of Parasitology. Medimond S R L, 40128 Bologna.
- Dubuffet, A., S. Dupas, F. Frey, J. M. Drezen, M. Poirié, and Y. Carton. 2007. Genetic interactions between the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* and its *Drosophila* hosts. *Heredity* 98:21-27.
- Dupas, S., Y. Carton, and M. Poirie. 2003. Genetic dimension of the coevolution of virulence-resistance in *Drosophila* - parasitoid wasp relationships. *Heredity* 90:84-89.
- Dupas, S., F. Frey, and Y. Carton. 1998. A single parasitoid segregating factor controls immune suppression in *Drosophila*. *Journal of Heredity* 89:306-311.
- Fleury, F., N. Ris, R. Allemand, P. Fouillet, Y. Carton, and M. Boulétreau. 2004. Ecological and genetic interactions in *Drosophila*-parasitoids communities: a case study with *D. melanogaster*, *D. simulans* and their common *Leptopilina* parasitoids in south-eastern France. *Genetica* 120:181-194.
- Frank, S. A. 1996. Models of parasite virulence. *Quarterly Review of Biology* 71:37-78.
- Fytrou, A., P. G. Schofield, A. R. Kraaijeveld, and S. F. Hubbard. 2006. Wolbachia infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 273:791-796.
- Gandon, S., A. Rivero, and J. Varaldi. 2006. Superparasitism evolution: Adaptation or manipulation? *American Naturalist* 167:E1-E22.
- Gardner, A., S. A. West, and A. Buckling. 2004. Bacteriocins, spite and virulence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271:1529-1535.
- Gilbert, S. F., E. McDonald, N. Boyle, N. Buttino, L. Gyi, M. Mai, N. Prakash, and J. Robinson. 2010. Symbiosis as a source of selectable epigenetic variation: taking the heat for the big guy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 365:671-678.
- Giordanengo, P., and J. P. Nenon. 1990. Melanization and encapsulation of eggs and larvae of *Epidinocarsis lopezi* by its host *Phenacoccus manihoti* - Effects of superparasitism and egg-laying patterns. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 56:155-163.
- Goodrich-Blair, H., and D. J. Clarke. 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular Microbiology* 64:260-268.

- Harcombe, W., and A. A. Hoffmann. 2004. *Wolbachia* effects in *Drosophila melanogaster*: in search of fitness benefits. *Journal of Invertebrate Pathology* 87:45-50.
- Hardin, G. 1968. Tragedy of commons. *Science* 162:1243-&.
- Hedges, L., J. Brownlie, S. O'Neill, and K. Johnson. 2008. *Wolbachia* and Virus Protection in Insects. *Science* 322:702.
- Hoffmann, A. A., D. Clancy, and J. Duncan. 1996. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity* 76:1-8.
- Hughes, G. L., R. Koga, P. Xue, T. Fukatsu, and J. L. Rasgon. 2011. *Wolbachia* Infections Are Virulent and Inhibit the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* in *Anopheles Gambiae*. *Plos Pathogens* 7:8.
- Jaenike, J., R. Unckless, S. N. Cockburn, L. M. Boelio, and S. J. Perlman. 2010. Adaptation via Symbiosis: Recent Spread of a *Drosophila* Defensive Symbiont. *Science* 329:212-215.
- Kambris, Z., P. E. Cook, H. K. Phuc, and S. P. Sinkins. 2009. Immune Activation by Life-Shortening *Wolbachia* and Reduced Filarial Competence in Mosquitoes. *Science* 326:134-136.
- Kinuthia, W., D. M. Li, O. Schmidt, and U. Theopold. 1999. Is the surface of endoparasitic wasp eggs and larvae covered by a limited coagulation reaction? *Journal of Insect Physiology* 45:501-506.
- Kraaijeveld, A. R., E. C. Limentani, and H. C. J. Godfray. 2001. Basis of the trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:259-261.
- López-Ferber, M., O. Simon, T. Williams, and P. Caballero. 2003. Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 270:2249-2255.
- Merçot, H., and S. Charlat. 2004. *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. *Genetica* 120:51-59.
- Min, K. T., and S. Benzer. 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.
- Moran, N. 2007. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *PNAS* 104:8627-8633.
- Moreira, L. A., I. Iturbe-Ormaetxe, J. A. Jeffery, G. J. Lu, A. T. Pyke, L. M. Hedges, B. C. Rocha, S. Hall-Mendelin, A. Day, M. Riegler, L. E. Hugo, K. N. Johnson, B. H. Kay, E. A. McGraw, A. F. van den Hurk, P. A. Ryan, and S. L. O'Neill. 2009. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139:1268-1278.
- Mouton, L., H. Henri, M. Boulétreau, and F. Vavre. 2003. Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Molecular Ecology* 12:3459-3465.
- Oliver, K., J. Russell, N. Moran, and M. Hunter. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *PNAS* 100:1803-1807.
- Oliver, K. M., P. H. Degnan, G. R. Burke, and N. A. Moran. 2010. Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. *Annual Review of Entomology* 55:247-266.
- Osborne, S. E., Y. S. Leong, S. L. O'Neill, and K. N. Johnson. 2009. Variation in Antiviral Protection Mediated by Different *Wolbachia* Strains in *Drosophila simulans*. *Plos Pathogens* 5:9.
- Patot, S., D. Lepetit, D. Charif, J. Varaldi, and F. Fleury. 2009. Molecular Detection, Penetration, and Transmission of an Inherited Virus Responsible for Behavioral

- Manipulation of an Insect Parasitoid. *Applier and Environmental Microbiology* 75:703-710.
- Patot, S., J. Martinez, R. Allemand, S. Gandon, J. Varaldi, and F. Fleury. 2010. Prevalence of a virus inducing behavioural manipulation near species range border. *Molecular Ecology* 19:2995-3007.
- Råberg, L., J. C. de Roode, A. S. Bell, P. Stamou, D. Gray, and A. F. Read. 2006. The role of immune-mediated apparent competition in genetically diverse malaria infections. *American Naturalist* 168:41-53.
- Renault, S., K. Stasiak, B. Federici, and Y. Bigot. 2005. Commensal and mutualistic relationships of reoviruses with their parasitoid wasp hosts. *Journal of Insect Physiology* 51:137-148.
- Scarborough, C. L., J. Ferrari, and H. C. J. Godfray. 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* 310:1781-1781.
- Schneider, D. S., and M. C. Chambers. 2008. Rogue Insect Immunity. *Science* 322:1199-1200.
- Stasiak, K., S. Renault, B. A. Federici, and Y. Bigot. 2005. Characteristics of pathogenic and mutualistic relationships of ascoviruses in field populations of parasitoid wasps. *Journal of Insect Physiology* 51:103-115.
- Sternberg, E. D., T. Lefèvre, A. H. Rawstern, and J. C. de Roode. 2011. A virulent parasite can provide protection against a lethal parasitoid. *Infection, Genetics and Evolution* 11:399-406.
- Stouthamer, R., J. Breeuwer, and G. Hurst. 1999. *Wolbachia* Pipientis: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.* 53:71-102.
- Teixeira, L., A. Ferreira, and M. Ashburner. 2008. The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS. Biol.* 6:2753-2763.
- Thomas, F., R. Poulin, and J. Brodeur. 2011a. Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. *Oikos* 119:1217-1223.
- Thomas, P., N. Kenny, D. Eyles, L. A. Moreira, S. L. O'Neill, and S. Asgari. 2011b. Infection with the *wMel* and *wMelPop* strains of *Wolbachia* leads to higher levels of melanization in the hemolymph of *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans* and *Aedes aegypti*. *Developmental and Comparative Immunology* 35:360-365.
- Turelli, M., and A. A. Hoffmann. 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* - Dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics* 140:1319-1338.
- Varaldi, J., P. Fouillet, M. Ravallec, M. Lopez-Ferber, M. Boulétreau, and F. Fleury. 2003. Infectious Behavior in a Parasitoid. *Science* 302:1930.
- Varaldi, J., S. Petit, M. Bouletreau, and F. Fleury. 2006a. The virus infecting the parasitoid *Leptopilina bouvardi* exerts a specific action on superparasitism behaviour. *Parasitology* 132:747-756.
- Varaldi, J., M. Ravallec, C. Labrosse, M. Lopez-Ferber, M. Boulétreau, and F. Fleury. 2006b. Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Journal of Insect Physiology* 52:1202-1212.
- Vavre, F., F. Fleury, J. Varaldi, P. Fouillet, and M. Bouletreau. 2000. Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: Epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution* 54:191-200.
- Vickery, W. L., and R. Poulin. 2010. The evolution of host manipulation by parasites: a game theory analysis. *Evolutionary Ecology* 24:773-788.
- Volkoff, A. N., V. Jouan, S. Urbach, S. Samain, M. Bergoin, P. Wincker, E. Demetere, F. Cousserans, B. Provost, F. Coulibaly, F. Legeai, C. Beliveau, M. Cusson, G. Gyapay, and J. M. Drezen. 2010. Analysis of Virion Structural Components Reveals Vestiges of the Ancestral Ichnovirus Genome. *Plos Pathogens* 6:10.
- Vorburger, C., L. Gehrler, and P. Rodriguez. 2010. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biology Letters* 6:109-111.

- Vorburger, C., C. Sandrock, A. Gousskov, L. E. Castaneda, and J. Ferrari. 2009. Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all-parthenogenetic host-parasitoid interaction. *Evolution* 63:1439-1450.
- Xie, J. L., I. Vilchez, and M. Mateos. 2010. *Spiroplasma* Bacteria Enhance Survival of *Drosophila hydei* Attacked by the Parasitic Wasp *Leptopilina heterotoma*. *Plos One* 5:7.
- Zhou, W. G., F. Rousset, and S. O'Neill. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:509-515.

Appendix S1

Estimation of the expected distribution of infection statuses in coinfecting lines after 4 generations of vertical transmission:

- Mean vertical transmission rate for LbFV1 and LbFV2 = 0.95

- Markov transition matrix (changes in the distribution through one generation):

```
M=matrix(c(1,1-0.95,1-0.95,(1-0.95)*(1-0.95),0,0.95,0,0.95*(1-0.95),0,0,0.95,0.95*(1-0.95),0,0,0,0.95*0.95),nrow=4)
```

- Distribution at Generation 0:

```
G0=c(0,0,0,1)
```

- Distribution at Generation 1:

```
G0%*%M
      [,1] [,2] [,3] [,4]
[1,] 0.0025 0.0475 0.0475 0.9025
```

```
G1=c(0.0025,0.0475,0.0475,0.9025)
```

- Distribution at Generation 2:

```
G1%*%M
      [,1] [,2] [,3] [,4]
[1,] 0.00950625 0.08799375 0.08799375 0.8145062
```

```
G2=c(0.00950625,0.08799375,0.08799375,0.8145062)
```

- Distribution at Generation 3:

```
G2%*%M
      [,1] [,2] [,3] [,4]
[1,] 0.02034189 0.1222831 0.1222831 0.7350918
```

```
G3=c(0.02034189,0.1222831,0.1222831,0.7350918)
```

- Distribution at Generation 4:

```
G3%*%M
      [,1] [,2] [,3] [,4]
[1,] 0.03440793 0.1510858 0.1510858 0.6634203
```

Difference between expected and observed distributions:

```
Observed distribution: obs=c(6,11,12,11)
```

```
Expected distribution: th=40*(G3%*%M)
```

Chi² test:

```
sum((th-obs)^2/th)
```

```
34.56572
```

```
1-pchisq(34.56572,3)  
1.504775e-07
```


Chapitre 6

**Description d'un nouveau virus à ARN
chez *L. boulandi*:
transmission, prévalence et
interactions avec LbFV**

Chapitre 6. Description d'un nouveau virus à ARN chez *L. boulandi*: transmission, prévalence et interactions avec LbFV

Synthèse

Les parasitoïdes de l'ordre des Hyménoptères sont connus pour héberger fréquemment des virus à transmission verticale. Une grande partie de la littérature scientifique a notamment montré l'importance d'un groupe de virus, les polydnavirus, dans l'adaptation des parasitoïdes à leur mode de vie parasitaire (Webb *et al.* 2006 ; Drezen *et al.* 2006). Ces virus intégrés dans le génome du parasitoïde permettent en effet de supprimer la réponse immunitaire de l'hôte du parasitoïde, autorisant ainsi le développement de ce dernier. D'autres virus à transmission verticale, non-intégrés au génome des parasitoïdes ont également été décrits. Ils appartiennent à différentes familles de virus telles que les *Ascoviridae* (Renault *et al.* 2002) ou encore les *Reoviridae* (Bigot *et al.* 1995). Cependant, la diversité de ces virus non-intégrés reste largement sous-échantillonnée et leurs effets sur le phénotype du parasitoïde sont souvent mal connus. De plus, les parasitoïdes hébergent parfois de véritables communautés virales puisque plusieurs virus peuvent être retrouvés en situation de coinfection, ce qui complexifie encore l'étude des effets de chaque virus (Hamm *et al.* 1992 ; Reineke & Asgari 2005 ; Lawrence *et al.* 2005a ; Lawrence *et al.* 2005b ; Oliveira *et al.* 2010). De plus, à part de rares exceptions, les interactions entre les différents virus et les effets de ces interactions sur le parasitoïde sont encore peu étudiés (Bigot *et al.* 1997 ; Renault *et al.* 2003).

Dans le manuscrit 3, nous faisons état de la découverte d'un nouveau virus à ARN infectant *L. boulandi*. Sa présence a été détectée à la suite d'un protocole de purification des particules virales présentes chez les femelles de la lignée de référence Sref, déjà infectée par LbFV. L'analyse des acides nucléiques par des traitements aux nucléases a révélé qu'il s'agit d'un virus à ARN double brin (Manuscrit 3, Fig. 1). Une séquence génomique partielle de ce virus a été obtenue en combinant le séquençage des ARNs double brin issus de la purification des particules virales et les données d'une banque d'ADNc de *L. boulandi*. Cette séquence de 4862 pb montre des similarités avec les séquences protéiques d'ARN-polymérase ARN-dépendantes appartenant à des virus à ARN double brin de la famille des *Totiviridae*. Cette famille de virus n'a encore jamais été décrite chez les Hyménoptères et infecte généralement des champignons unicellulaires ou encore des protozoaires. Récemment cependant, plusieurs virus à ARN infectant des arthropodes, notamment *D. melanogaster*, ont fait l'objet de tentatives d'assignation à la famille des *Totiviridae*. L'analyse phylogénétique du virus

à ARN de *L. boulandi* montre qu'il existe un groupe monophylétique de totivirus d'arthropodes, bien que la racine la plus profonde obtenue pour ce groupe soit peu soutenue (Manuscrit 3, Fig. 2). Du fait de ses similarités avec les totivirus, le nouveau virus de *L. boulandi* a été baptisé LbTV pour *Leptopilina boulandi* Totivirus.

Afin de faciliter la détection de LbTV et de comprendre ses interactions possibles avec LbFV, nous avons mis au point un marqueur moléculaire permettant de détecter l'infection à l'échelle individuelle par RT-PCR. Nous avons ensuite recherché la présence de LbTV dans 28 lignées de laboratoire de *L. boulandi* ainsi que chez des femelles parasitoïdes directement collectées dans deux populations naturelles françaises. LbTV s'est avéré être extrêmement fréquent. Sa présence dans des lignées de parasitoïdes originaires de localités très éloignées (France, Italie, Australie, Etats-Unis) suggère une très large répartition de ce virus. Aucune association préférentielle ou exclusion n'a été mise en évidence entre LbTV et LbFV. En revanche, LbTV n'a été détecté ni chez *L. heterotoma*, une espèce proche vivant en sympatrie avec *L. boulandi*, ni chez les principaux hôtes de *L. boulandi*, *D. melanogaster* et *D. simulans*, suggérant que ce virus est spécifique de *L. boulandi*.

Par des croisements réciproques entre une lignée infectée par LbTV et une lignée non-infectée, nous avons testé les hypothèses de transmission sexuelle et verticale de LbTV. A l'issue des croisements, tous les parents ont gardé le statut d'infection de leur lignée d'origine, montrant l'absence de transmission sexuelle. L'analyse de la descendance de ces croisements a montré une transmission maternelle très efficace, tous les descendants de mères infectées portant l'infection (Manuscrit 3, Fig. 5). De plus, une transmission paternelle a également été observée chez un descendant parmi les six issus de mères non-infectées et de pères infectés. La transmission paternelle de LbTV apparaît donc comme étant beaucoup moins efficace que la transmission maternelle.

Le virus manipulateur LbFV étant transmis horizontalement de façon très efficace en contexte de superparasitisme, nous avons également testé si LbTV pouvait bénéficier de ce mode de transmission. Une lignée donneuse infectée à la fois par LbTV et LbFV a été utilisée afin d'optimiser les chances de transfert horizontal via le superparasitisme induit par LbFV. Une lignée infectée par aucun des deux virus a été utilisée comme lignée receveuse. A l'issue de l'expérience, comme attendu, le virus manipulateur du comportement LbFV a été transmis horizontalement à 14 descendants de la lignée receveuse sur 20 testés. En revanche, aucun de ces descendants ne présentait l'infection par LbTV, bien que les conditions de la transmission horizontale de LbFV aient été réunies. LbTV serait donc incapable d'être transmis horizontalement, en tout cas en présence de LbFV.

Nous avons enfin posé la question des effets phénotypiques de l'infection par LbTV. Deux lignées infectées par LbTV et deux lignées non-infectées ont été comparées sur

différents traits d'histoires de vie des femelles parasitoïdes. Au début de l'expérience, les femelles de ces lignées ont été croisées soit avec des mâles de leur lignée respective, soit avec des mâles des lignées ayant un statut d'infection différent pour LbTV. Le deuxième type de croisement a été réalisé afin de tester si les effets potentiels de LbTV sur la production de descendants se traduisent par des effets maternels. En effet, la transmission maternelle de LbTV étant bien plus efficace que sa transmission paternelle, on peut s'attendre à des différences de fitness entre mères infectées et non-infectées puisque les descendants ont beaucoup plus de chance de porter l'infection dans le premier cas. Les résultats montrent que la présence de LbTV confère une meilleure fitness aux femelles. En effet, les femelles infectées par LbTV parasitent un plus grand nombre de larves de drosophiles et leurs descendants ont un succès de développement (survie larvaire) plus élevé (Manuscrit 3, Fig. 6). Ces deux effets combinés conduisent à un plus grand nombre de descendants chez les mères infectées par LbTV (+ 60 %). Ce résultat suggère donc une relation de type mutualiste entre *L. boulandi* et LbTV qui reste à confirmer.

La découverte de ce nouveau virus représente une nouvelle composante du phénotype étendu chez *L. boulandi*. Sa forte prévalence ainsi que ces effets bénéfiques sur la fitness des femelles suggèrent qu'il est un partenaire majeur de l'adaptation du parasitoïde. Sa présence en condition de coinfection avec LbFV pose en outre de nouvelles questions sur la compétition entre virus et les interactions qui ont pu évoluer en réponse à cette compétition.

Manuscrit 3

Identification of a new RNA virus infecting the parasitic wasp *Leptopilina boulardi*: transmission, prevalence and phenotypic effects.

Julien Martinez^{1,2}, David Lepetit¹, Frédéric Fleury¹ and Julien Varaldi¹

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

² E-mail: julien.martinez@univ-lyon1.fr

Phone : +33 (0)4 72 43 29 08

Abstract

Hymenopteran parasitoids are known to harbor heritable viruses. However, most studies focused on three parasitoid taxa, where polydnviruses, which genome is integrated into the wasp chromosomes, have been described. Consequently, the diversity of non-polydnviruses remains largely unexplored. Here, we described a new dsRNA virus infecting the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina boulardi*. Purification of viral particles allowed us to obtain a partial genomic sequence showing similarities with the RNA-dependent RNA polymerase of *Totiviridae*. This RNA virus, called LbTV, was very frequent among insect laboratory lines as well as in parasitoid females directly caught in the field. In some cases, LbTV was found in coinfection with LbFV, a DNA virus already known to manipulate the superparasitism behavior of *L. boulardi* females. Like LbFV, LbTV was vertically-transmitted but, unlike LbFV, was not horizontally-transmitted in the context of superparasitism. Its presence in parasitoid females was associated with an increase in the number of offspring produced, partly due to a better survival of parasitoid larvae. The high prevalence of this new virus and its beneficial effect on the parasitoid's fitness suggest that it could be an essential player in parasitoid adaptation.

Introduction

In the seventies, it has been discovered that numerous Hymenopteran parasitoid species have intimate interactions with heritable viruses, known as *Polydnaviridae* (Drezen *et al.* 2006). These viruses have the extraordinary property of protecting parasitoid eggs from the host immune reaction and are completely obligatory for thousands of wasp species in which the virus is strictly vertically-transmitted since millions of years (Whitfield 2002). Polydnaviruses have been described in three Hymenopteran wasp taxa (the microgastroid complex in Braconids, the Campopleginae and Banchinae subfamilies) and their viral origin has been convincingly demonstrated for one of them (Bézier *et al.* 2009; Theze *et al.* 2011). The discovery of such amazing integrated beneficial viruses has focused most of the attention of researchers in the field of parasitoid virology. Today, most publications within this field concern various aspects of the biology of polydnaviruses including physiological, ecological and evolutionary aspects. Consequently, the interaction with the parasitoid and its hosts is now quite well understood. In addition to polydnaviruses, other viruses are occasionally found in parasitoid ovaries, sometimes as a by-product of polydnavirus search (Stoltz *et al.* 1988; Stoltz & Makkay 2000 ; Reineke & Asgari 2005 ; Stasiak *et al.* 2005 ; Renault *et al.* 2005), but their influence on parasitoid biology is much less understood. Nevertheless, some of these non-polydnaviruses do affect the phenotype of parasitoids, either through mutualistic relationship with the parasitoid (Bigot *et al.* 1997 ; Renault *et al.* 2002) similarly to polydnaviruses or through parasitic relationship (Varaldi *et al.* 2003). However, the whole diversity of parasitoid viruses is mostly unknown and assessing their influence on parasitoid biology clearly necessitates a better sampling of this diversity.

We previously reported the presence of an inherited non-polydnavirus in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina boulardi* (Varaldi *et al.* 2003). This DNA virus called LbFV (for *Leptopilina boulardi* Filamentous Virus) exerts a behavioral manipulation in parasitoid females by increasing their tendency to superparasitize, i.e. to lay eggs in already-parasitized *Drosophila* host larvae (Varaldi *et al.* 2003; Varaldi *et al.* 2006a). This manipulation allows the virus to be horizontally-transmitted between parasitoid eggs sharing the same larvae and to complement its imperfect maternal transmission. Superparasitism is usually costly for the parasitoid since only one parasitoid offspring can develop per *Drosophila* larva (Gandon *et al.* 2006).

Here, we describe a new double-stranded RNA virus infecting *Leptopilina bouleardi*. This virus was isolated by purifying putative viral particles from parasitoid females of a laboratory line known to be infected by LbFV. Phylogenetic analysis revealed that this new RNA virus is closely related to dsRNA viruses of the family *Totiviridae*. Whereas most of these viruses are specialized on fungal and protozoan hosts (Icho & Wickner 1989; Stuart *et al.* 1992; Wang *et al.* 1993; Tai & Ip 1995), other totivirus-like elements have recently been found in arthropods hosts (Poulos *et al.* 2006; Wu *et al.* 2010; Zhai *et al.* 2010; Isawa *et al.* 2011). *L. bouleardi* RNA virus was designated as LbTV for *Leptopilina bouleardi* Totivirus. We carried out a large screening of LbTV in several parasitoid laboratory lines originating from various locations. LbTV prevalence was also measured, along with LbFV prevalence, in two French populations. Vertical and horizontal transmissions of LbTV were tested and its potential contribution to the parasitoid phenotype was investigated. Our results suggest that LbTV is involved in a specific beneficial relationship with *L. bouleardi* and therefore could represent an additional symbiotic player that contributes to the adaptation of the parasitoid.

Material and methods

Insect lines and rearing conditions

Several parasitoid lines were used in this study, including the two reference line NSref and Sref. NSref is a highly inbred line uninfected by LbFV (Varaldi *et al.* 2006b). Sref was obtained from the horizontal transfer of LbFV into NSref line. Therefore, the two lines have the same nuclear background and only differ on their LbFV-infection status. Consistently, NSref exhibits a typical non-superparasitizing behavior, laying on average a single egg into each encountered *Drosophila* larva and rejecting already-parasitized larvae, whereas Sref readily accept to lay additional eggs into already-parasitized larvae. In standard laboratory tests, Sref females can lay on average 3 or 4 eggs into the same *Drosophila* larva (Varaldi *et al.* 2003).

All parasitoids were reared under a 12L:12D photoperiod at 26°C using a laboratory line of *Drosophilamelanogaster*, Dm-Sf (originating from Ste-Foy-lès-Lyon, France), fed with a standard diet (David, 1962). All experiments were performed at 26°C.

Purification of viral particles and characterization of LbTV genome

Adult females belonging to the NSref and Sref lines were crushed in a solution containing 20 mM TrisHCl, 10 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 6 mM NaCl, 1 mM Dithioerythrol and 0.1% Tween 20. The solution was filtered (0.2 µm) and further treated by DNase I and RNase A to remove unprotected nucleic acids. After DNase and RNase deactivation, the viral RNA was released using proteinase K and extracted using the protocol described in Chomczynski & Sacchi (1987). Nucleic acids were digested by DNase I (digests both single and double stranded DNA), Mung Bean Nuclease (digests ssDNA and ssRNA but also dsDNA at high concentration) and RNase A (digests both ssRNA and dsRNA) to determine the nature of the nucleic acid. Treated samples were finally visualized by electrophoresis on a 1% agarose gel.

Sequencing strategy

Isolated RNAs were treated with DNase and Mung Bean Nuclease, and differentially LiCl-precipitated to enrich the dsRNA fraction. Sample was then reverse-transcribed and PCR-amplified using sequence-independent technique (Potgieter *et al.* 2009). The PCR products were sequenced using 454 technology. Additional sequences obtained from an independent 454 sequencing of a normalized library of *L. bouhardii* DNAs (unpublished) was also used. The sequences obtained from both 454 runs were mixed and assembled (using Newbler v2.5.3 followed by visual inspection) leading to a final contig of 4862bp. This nucleotide sequence has been submitted to Genbank under the accession number XXXXXX.

RT-PCR detection of LbTV

An RT-PCR protocol was developed to detect LbTV in individual parasitoids. Total RNAs were extracted using the RNeasy kit (Qiagen, Valencia, USA), according to the manufacturer's instructions. Reverse-transcription was performed using the SuperScriptTM III First-Strand Synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, USA) with random primers. Based on

the putative viral sequence obtained from the sequence-independent amplification, we designed PCR primers (5'-CCCACCCTGTCCGTAATG-3' and 5'-CGGTATCCGCCTGATAATTG-3') amplifying a 870 bp fragment. PCRs were performed in 25 µl (final volume) reaction mixture containing 2 µl of cDNA template, 1.5 mM MgCl₂, each dNTP at a concentration of 50 µM, each of the two primers at a concentration of 200 nM, and 0.5 U of *Taq* polymerase (EuroBlueTaq; Eurobio, France). The following cycling program was used: 30 s at 95°C, 1 min at 63°C, and 1 min at 72°C with annealing temperature decreasing of 1°C during the first eight cycles (touchdown) in order to increase the specificity of the amplification. Finally, the annealing temperature was kept at 56°C for the last 27 cycles followed by 10 min elongation at 72°C (PTC-100; MJ Research, USA). LbFV infection was also checked on the same cDNA samples using primers 500-R and 102-F, as described in Patot *et al.* (2009).

Phylogenetic analysis

The RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) open reading frame (ORF) predicted from the 4862 bp sequence showed amino acid sequence similarity (inferred from blastx output) with the RdRp of double-stranded RNA viruses belonging to the family *Totiviridae*. Based on the concatenation of 28 RdRp conserved domains (total length: 577 aa), we analysed the phylogenetic relationships of LbTV with the viruses listed in Table 1. Multiple sequence alignment was performed with Seaview ver. 4.3.0 using the Muscle algorithm (Edgar 2004) with the default parameters (Appendix S1). The phylogenetic analysis was carried out using maximum likelihood with the PhyML algorithm. The generated phylogenetic tree was evaluated using a bootstrap test with 100 replications (Felsenstein 1985) and visualized using the TreeView software ver. 1.6.6 (Page 2001).

Table 1. List of the viruses belonging to the family *Totiviridae* and totivirus-like particles used in the phylogenetic analysis according to their host range. See supplemental information for the alignment of RdRp amino acid sequences.

Host	Virus	Abbreviation	Genus	Accession no.	Reference
Fungi	Saccharomyces cerevisiae virus L-A	ScV-L-A	Totivirus	J04692	Icho and Wickner (1989)
	Saccharomyces cerevisiae virus L-BC	ScV-L-BC	Totivirus	U01060	Bruenn (1993)
	Ustilago maydis virus H1	UmV-H1	Totivirus	U01059	Bruenn (1993)
	Botryotinia fuckeliana totivirus 1	BfTV1	Victorivirus	AM491608	Unpublished
	Chalara elegans RNA virus 1	CeRV1	Victorivirus	AY561500	Park <i>et al.</i> (2005)
	Coniothyrium minitans RNA virus	CmRV	Victorivirus	AF527633	Cheng <i>et al.</i> (2003)
	Epichloe festucae virus 1	EfV1	Victorivirus	AM261427	Romo <i>et al.</i> (2007)
	Gremmeniella abietina RNA virus L1	GaRV-L1	Victorivirus	AF337175	Tuomivirta and Hantula (2003)
	Gremmeniella abietina RNA virus L2	GaRV-L2	Victorivirus	AY615210	Tuomivirta and Hantula (2005)
	Helicobasidium mompa totivirus 1-17	HmTV1-17	Victorivirus	AB085814	Nomura <i>et al.</i> (2003)
	Helminthosporium victoriae virus 190S	Hv190SV	Victorivirus	U41345	Huang and Ghabrial (1996)
	Magnaporthe oryzae virus 1	MoV1	Victorivirus	AB176964	Yokoi <i>et al.</i> (2007)
	Magnaporthe oryzae virus 2	MoV2	Victorivirus	AB300379	Maejima <i>et al.</i> (2008)
	Sphaeropsis sapinea RNA virus 1	SsRV1	Victorivirus	AF038665	Preisig <i>et al.</i> (1998)
	Sphaeropsis sapinea RNA virus 2	SsRV2	Victorivirus	AF039080	Preisig <i>et al.</i> (1998)
Protists	Giardia lamblia virus	GLV	Giardiavirus	L13218	Wang <i>et al.</i> (1993)
	Leishmania RNA virus 1-1	LRV1-1	Leishmaniavirus	M92355	Stuart <i>et al.</i> (1992)
	Leishmania RNA virus 1-4	LRV1-4	Leishmaniavirus	U01899	Scheffter <i>et al.</i> (1994)
	Leishmania RNA virus 2-1	LRV2-1	Leishmaniavirus	U32108	Scheffter <i>et al.</i> (1995)
	Trichomonas vaginalis virus	TVV1	Trichomonasvirus	U08999	Tai and Ip (1995)
	Trichomonas vaginalis virus II	TVV2	Trichomonasvirus	AF127178	Bessarab <i>et al.</i> (2000)
	Trichomonas vaginalis virus 3	TVV3	Trichomonasvirus	AF325840	Unpublished
	Eimeria brunetti RNA virus 1	EbRV1	Unassigned	AF356189	Unpublished
Arthropods	Penaeid shrimp infectious myonecrosis virus	IMNV	Unassigned	AY570982	Poulos <i>et al.</i> (2006)
	Drosophila totivirus	DTV	Unassigned	GQ342961	Wu <i>et al.</i> (2010)
	Armigeres subalbatus virus	AsTV	Unassigned	EU715328	Zhai <i>et al.</i> (2010)
	Omono River virus AK4	OMRV-AK4	Unassigned	AB555544	Isawa <i>et al.</i> (2011)
	Omonon River virus Y61	OMRV-Y61	Unassigned	AB555545	Isawa <i>et al.</i> (2011)

Screening of LbTV among laboratory lines

Using the RT-PCR test described above, the presence of LbTV was tested in 28 laboratory lines of *L. bouhardi* originating from different locations (one female per line). In

order to test for possible interactions between LbTV and LbFV, both LbFV-free and LbFV-infected lines were chosen and their superparasitism behavior was quantified as in Varaldi *et al.* (2003). Additionally, we searched for the presence of LbTV in the related sympatric parasitoid *L. heterotoma* and in the main hosts of *L. boulandi*, i.e. *D. simulans* and *D. melanogaster*. Two lines per species were tested, including the *D. melanogaster* line used for parasitoid rearing (Dm-Sf). The RT-PCR products obtained for six *L. boulandi* lines (Sref, NSref, AvI, Ca1, Lb17 and BNE-A1; Tab.3) were sequenced and analyzed with ClustalW2 using default parameters (Larkin *et al.* 2007).

Prevalence of LbTV in natural populations

In order to quantify the prevalence of LbTV in *L. boulandi* populations, we sampled two French localities of *L. boulandi*, one situated near the upnorth limit of *L. boulandi* in France (Sonny) and one in a more central area (Avignon, 180 km to the south). The sampling was performed in September 2010 by setting closed traps baited with split bananas in orchards. Traps were exposed to colonization by *Drosophila* and parasitoids for 15 days, and then brought back to the laboratory. For each locality, ten *L. boulandi* females emerging from these traps were frozen for later RT-PCR detection of both LbTV and LbFV, as described above.

Vertical transmission experiment

After the screening of LbTV among our laboratory parasitoid lines, we chose the LbTV-free line, Sf1 and the LbTV-infected line, Vi1 (Tab.3), in order to test whether and how vertical transmission of LbTV is achieved. These lines were reciprocally crossed. After mating, females were individually placed in rearing vials containing *D. melanogaster* larvae that hatched from 100 eggs. The LbTV-infection status of both parents as well as the infection status of one male and one female offspring were checked by RT-PCR detection, as previously explained. Three replicates were done for each of the two reciprocal crosses.

Horizontal transmission experiment

Because LbFV is massively horizontally-transmitted within superparasitized hosts (Varaldi *et al.* 2003), we tested whether LbTV could benefit from similar transmission. Since superparasitism in *L. bouleari* is mainly observed in LbFV-infected females, due to the behavioral manipulation induced by LbFV, we chose Av1, coinfecting by both LbFV and LbTV, as the donor line for the horizontal transfer experiment (Tab.3). As a recipient line, we used Sf1 that was neither infected by LbFV nor by LbTV (Tab.3). Since *L. bouleari* is a haplo-diploid species, fertilized eggs develop into females whereas unfertilized ones give rise to males. This mode of reproduction allows the identification of the maternal origin of female offspring that can only be the progeny of a mated mother. Hence, measuring horizontal transmission can be achieved by using a mated LbTV-free mother for the recipient line and a virgin LbTV-infected mother for the donor line, and finally by checking for viral infection in female offspring.

We performed three replicates of the horizontal transfer. In each replicate, one mated parasitoid female (1-2 day old) of the recipient line Sf1 was placed with 100 *Drosophila* eggs for 24 hours in a rearing vial. Then, the female was removed and replaced by four virgin females (2-3 day old) of the donor line Av1 for an additional 24 hours. For each replicate, the infection status of mothers and of 4 to 11 female offspring (progeny of the recipient line) was checked by RT-PCR for LbFV and LbTV infection.

Phenotypic effect of LbTV infection

In order to test whether LbTV impacts parasitoid fitness-related traits, we compared the performances of two naturally LbTV-infected with two naturally uninfected lines. To test for the possibility of interaction with LbFV, we choose one LbFV-infected and one LbFV-uninfected within each condition (Tab. 2). Before the experiment, females were mated with males of their respective lines (pure lines crosses). In addition, we measured the performances of reciprocal crosses between lines differing in their LbTV-infection status (between-lines crosses). This was done in order to test whether the production of offspring depends on the infection status of mothers (Tab. 2). This design also allowed us to test for the hypothesis of

cytoplasmic incompatibility (CI) induced by LbTV. CI is a widespread phenomenon mediated by some bacterial symbionts, such as *Wolbachia* (Werren *et al.* 2008). In parasitoids, CI decreases the fitness of uninfected females since their female offspring either dies or develops into males (in some haplo-diploid species such as *L. boulandi*) when mated with infected males (Vavre *et al.* 2009). For each crossing, eleven replicates were done by placing one mated female in a rearing vial for 24 hours with *Drosophila* larvae that hatched from 100 eggs. Ten control vials without parasitoid were also prepared in order to estimate the natural mortality of *Drosophila* hosts. Emerged flies and parasitoid offspring were daily collected and counted. The parasitism rate for a given female was estimated by comparing the number of adult flies emerged in vials containing a parasitoid to the mean number of flies emerged in the parasitoid-free control vials, as described in Vavre *et al.* (2000). Since parasitized *Drosophila* larvae can kill parasitoid eggs through an immune reaction leading to the encapsulation of the parasitoid egg (Carton *et al.* 2001), we measured the encapsulation rate by crushing entire adult flies and counting the number of flies with a black melanized capsule in their abdomen. Among the 1173 emerged flies, only 6 displayed signs of encapsulation randomly distributed among crosses (mean encapsulation rate : 0.001% ; effect of the cross : Kruskal-Wallis test, $P = 0.58$). Therefore, capsules were not taken into account in the estimation of the parasitism rate. The parasitoid sex ratio was measured as the proportion of males in the progeny. The developmental parasitoid success was measured as the proportion of parasitized *Drosophila* larvae that gave rise to adult parasitoids (Vavre *et al.* 2000). Data from pure lines were analysed separately with a linear model after adequate transformation to reach the assumptions of normality and homoscedasticity. A global analysis was then conducted on both pure lines and between-line crosses. This global analysis was done using linear mixed models (nlme package, Pinheiro & Bates 2000) incorporating the LbTV- and the LbFV-infection status of mothers as fixed effects and the effect of the cross combination as a random effect nested in the mother's infection status.

Table 2. Crossing design between LbTV-free and LbTV infected lines. Text in parentheses indicates LbFV- (left) and LbTV- (right) infection statuses with Ø standing for uninfected lines. n: number of replicates.

Description	Crosses	n
Pure line crosses	♀ Vi1[Ø ; LbTV] × ♂ Vi1[Ø ; LbTV]	11
	♀ Av1[LbFV ; LbTV] × ♂ Av1[LbFV ; LbTV]	11
	♀ Sf1[Ø ; Ø] × ♂ Sf1[Ø ; Ø]	11
	♀ Vs1[LbFV ; Ø] × ♂ Vs1[LbFV ; Ø]	11
Between-line crosses	♀ Vi1[Ø ; LbTV] × ♂ Sf1[Ø ; Ø]	11
	♀ Sf1[Ø ; Ø] × ♂ Vi1[Ø ; LbTV]	11
	♀ Vi1[Ø ; LbTV] × ♂ Vs1[LbFV ; Ø]	11
	♀ Vs1[LbFV ; Ø] × ♂ Vi1[Ø ; LbTV]	11
	♀ Av1[LbFV ; LbTV] × ♂ Vs1[LbFV ; Ø]	11
	♀ Vs1[LbFV ; Ø] × ♂ Av1[LbFV ; LbTV]	11

Results

Characterization of LbTV genome

Following purification of the putative viral particles present in the NSref and Sref lines, extraction of nucleic acids and migration, two bands (> 23 kb and around 8 kb) were observed on agarose gel (Fig. 1). The largest band was specific to the Sref line (NSref data not shown) and was digested by DNase I and Mung Bean Nuclease (MBN), but not by RNase A, suggesting that it consists of DNA molecules, most probably belonging to LbFV which infects Sref but not NSref (Tab. 3). The second fragment was about 8 kb and was observed in both NSref (not shown) and Sref. It was digested by RNase A, but not by DNase I nor MBN indicating the presence of double-stranded RNA molecules.

RNA molecules present in the Sref solution were reverse-transcribed, amplified and sequenced. After combining the sequences obtained with additional sequences from a cDNA library of *L. bouhardi* (unpublished), we obtained a contig of 4862 bp with RNA-virus features. Two large non-overlapping ORFs were inferred on the same frame. ORF1 encodes a

putative 473 amino acid protein showing no significant matches with entries in the databases. ORF2 encodes a putative 595 amino acid protein showing high sequence similarities with RdRp of viruses belonging to *Totiviridae*. This similarity, along with the dsRNA nature of LbTV genome strongly support the hypothesis that LbTV is related to totiviruses which genomes consist of a non-segmented dsRNA molecule with at least two ORFs, encoding a coat protein and an RdRp, respectively (Wickner *et al.* 2005).

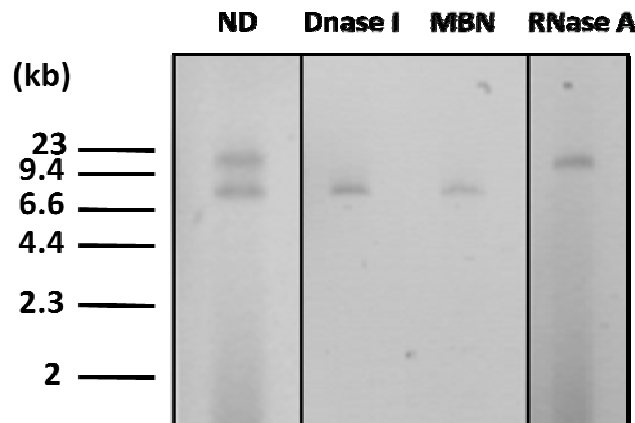


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of nucleic acids purified from Sref viral particles after nuclease treatments. ND: non-digested. MBN: Mung Bean Nuclease. Molecular weight marker on the left in kb.

Phylogenetic analysis of LbTV

The phylogeny inferred from the concatenation of 28 RdRp conserved domains by maximum likelihood grouped viruses previously identified according to their genus (Victorivirus, Leishmanivirus, Trichomonavirus, Gardiavirus, Totivirus) although the basal nodes were often unresolved. Furthermore viruses infecting arthropods, including LbTV, formed a single cluster, although the bootstrap support for the basal node was very low (Fig. 2). LbTV is, however, distantly related to them.

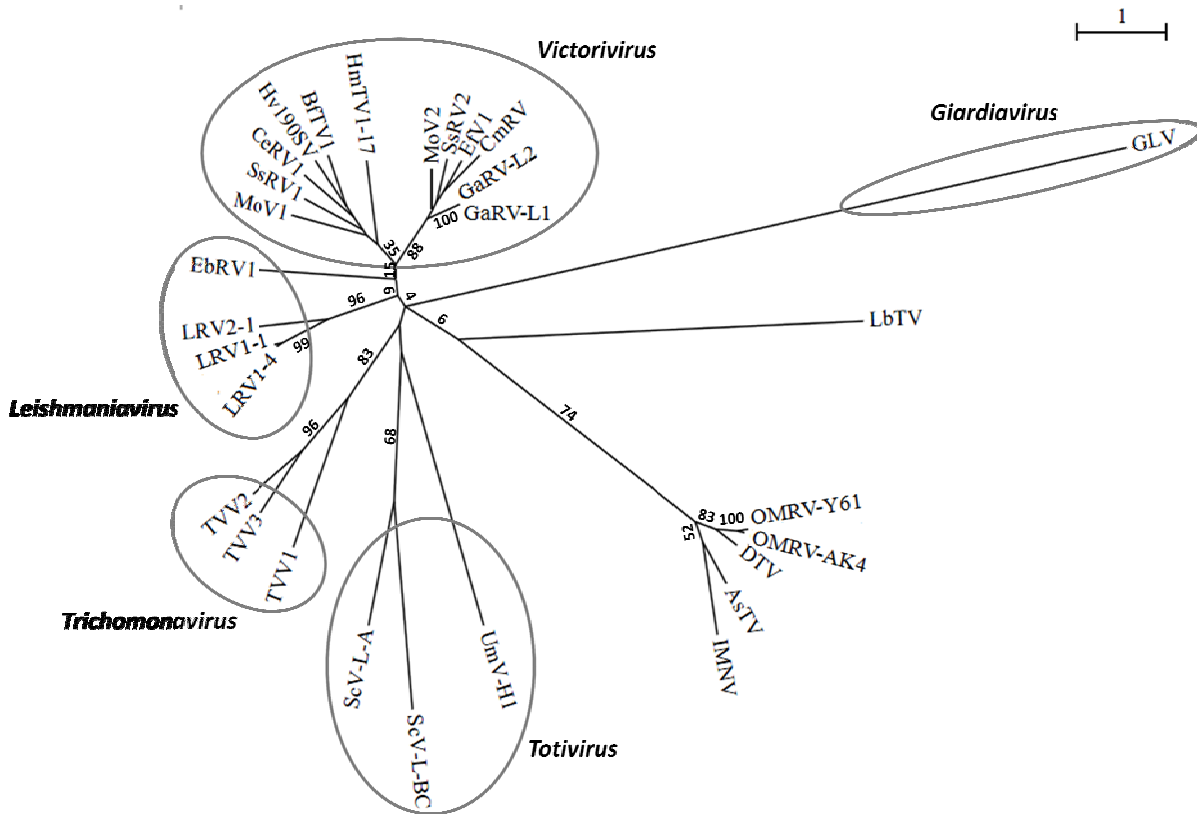


Figure 2. Unrooted phylogenetic tree inferred by maximum likelihood of LbTV, 5 dsRNA arthropod viruses and 23 other viruses of the family *Totiviridae*, based on amino acid similarities of their RdRp sequences (conserved domains). See Table 1 for abbreviations.

Distribution of LbTV among laboratory lines

LbTV was detected in 20 out of 28 (71.4%) laboratory lines of *L. bouhardi* (Tab. 3). Positive lines were sampled in France, Italy, Australia and USA, suggesting a world-wide distribution of LbTV. Sequencing of the 870 bp RT-PCR product revealed that the two French LbTV isolates infecting Av1 and Cal have an identical sequence whereas the Italian isolate infecting both NSref and Sref, the Australian isolate infecting BNE-A1 and the American isolate infecting Lb17 are three different viral haplotype displaying specific point mutations (Fig. 3). This genetic differentiation according to the parasitoid origin supports the hypothesis that LbTV was not acquired in our laboratory conditions but was rather already infecting parasitoid lines when collected in the field. Moreover, the presence of LbTV was checked in two *D. melanogaster* lines, including the line used for parasitoid rearing (Dm-Sf), one *D.*

simulans line and two *L. heterotomalines*. None of them were positive for LbTV, suggesting that LbTV infection is specific to *L. bouhardi*. No preferential association nor exclusion between LbTV and LbFV was detected (Fisher's exact test ; $P = 0.37$). Moreover, LbTV was not involved in the behavioral manipulation of parasitoid females since typical superparasitizing phenotype was only associated with LbFV infection and independent of LbTV (effect of parasitoid line on log-transformed data: $F_{17,169} = 30.92$; $P < 0.0001$; see multiple comparisons in Fig. 4). However, we cannot rule out that LbTV quantitatively influences the expression of the manipulation exerted by LbFV, although there was no indication of this effect.

Table 3. Screening of LbTV and LbFV infections among laboratory insect lines. Black and grey rectangles stand for positive and negative RT-PCR detection, respectively. (*) Tested lines for superparasitism intensity (see Fig 4).

Species	Country	Locality	line	LbTV	LbFV	Reference
<i>L. bouleardi</i>	France	Avignon	Av1*	Positive	Negative	-
		Avignon	Av2	Positive	Negative	-
		Avignon	Av3*	Positive	Negative	Martinez <i>et al.</i> 2011
		Avignon	Av12*	Positive	Negative	Martinez <i>et al.</i> 2011
		Cailloux-sur-Fontaine	Ca1*	Positive	Negative	-
		Chasselay	Ch1.1*	Negative	Negative	-
		Epinouze	Ep1*	Positive	Negative	-
		Epinouze	Ep2*	Positive	Positive	-
		Gotheron	Go1	Positive	Negative	-
		Gotheron	Go2*	Positive	Positive	-
		La Crau	Cr1*	Positive	Negative	-
		Mollèges	Mo1*	Negative	Negative	-
		Mollèges	Mo2*	Positive	Negative	-
		Montpellier	Mp1	Negative	Negative	-
		Montpellier	Mp2	Positive	Positive	-
		Sonnay	So1	Positive	Negative	-
		Ste Foy-lès-Lyon	Sf1*	Negative	Negative	-
		Villesollier	Vs1*	Negative	Positive	-
		Villesollier	Vs2*	Positive	Negative	-
		Villette-de-Vienne	Vi1	Positive	Negative	-
	Italy	Sienna	NSref*	Positive	Negative	Varaldi <i>et al.</i> 2006b
	Italy	Sienna	Sref*	Positive	Positive	Varaldi <i>et al.</i> 2006b
	Congo	Brazzaville	G486	Negative	Negative	Dupas <i>et al.</i> 1999
	Tunisia	Nasr'allah	G431	Negative	Negative	Dupas <i>et al.</i> 1999
	Australia	Brisbane	BNE-A1*	Positive	Negative	-
			BNE-A3*	Positive	Negative	-
BNE-A12			Negative	Negative	-	
USA	California	Lb17	Positive	Negative	Schlenke <i>et al.</i> 2007	
<i>L. heterotoma</i>	France	Antibes	A7 (123)	Negative	-	Mouton <i>et al.</i> 2003
	USA	California	Lh14	Negative	-	Schlenke <i>et al.</i> 2007
<i>D. melanogaster</i>	France	Ste Foy-lès-Lyon	Dm-Sf	Negative	-	-
		Gotheron	DmGo 12BI	Negative	-	-
<i>D. simulans</i>	France	Uchizy	DsUch 9I	Negative	-	-

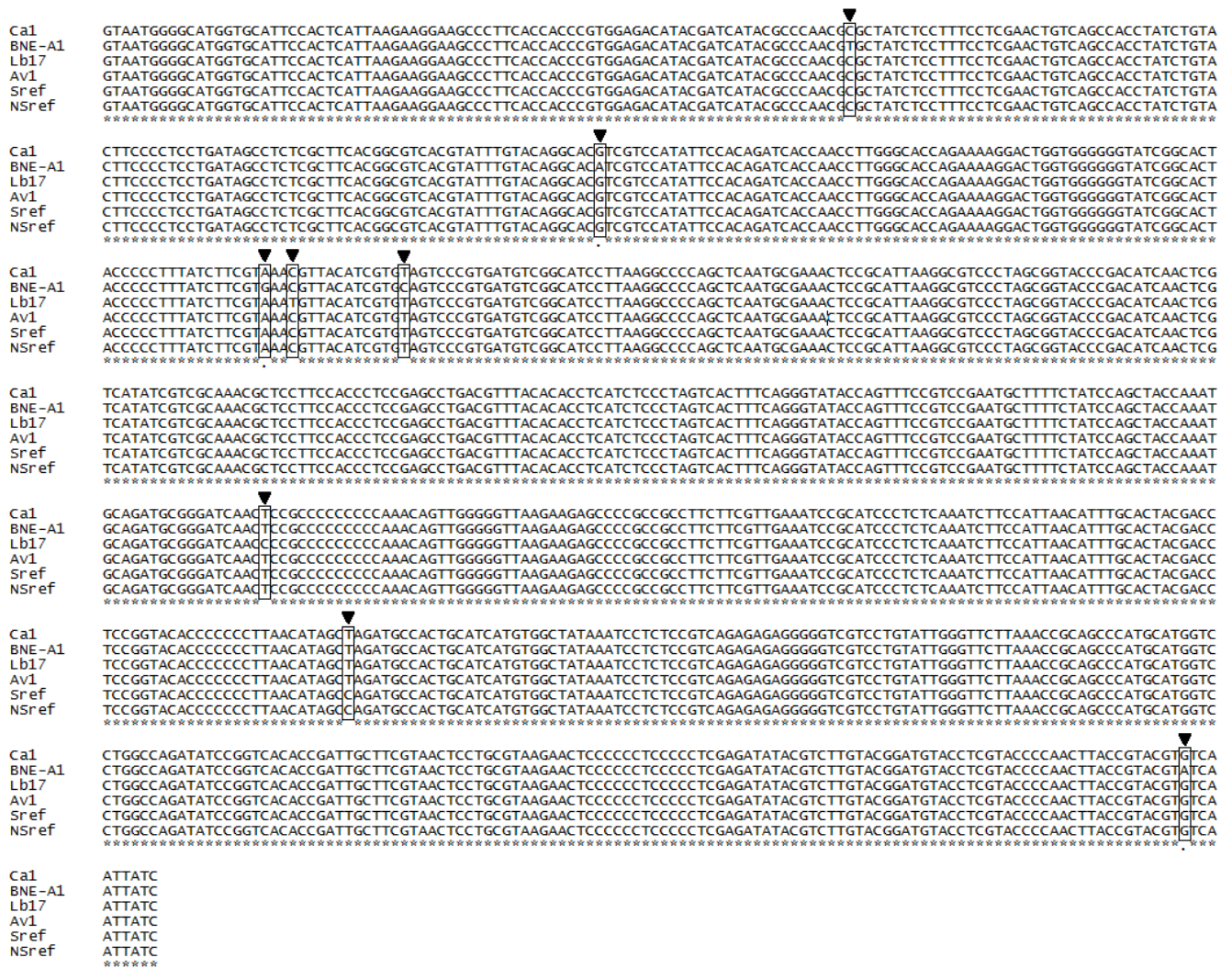


Figure 3. Alignment of RT-PCR products of six laboratory lines of *L. boulandi*. Black triangles indicate substitutions. Sequence accession no. in Genbank: XXXXXX (Av1), XXXXXX (Ca1), XXXXXX (NSref) ; XXXXXX (Sref), XXXXXX (BNE-A1) and XXXXXX (Lb17).

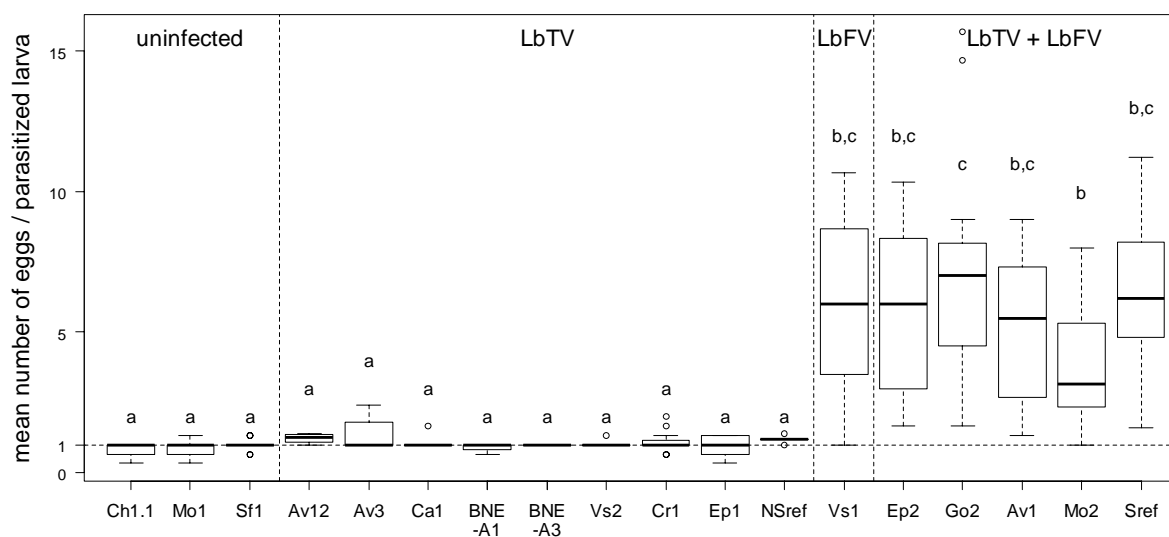


Figure 4. Superparasitism intensity among laboratory lines of *L. boucardi* according to their viral infection statuses. Different letters indicate significant differences using a Student's test of multiple comparisons on log-transformed data (Bonferroni correction).

LbTV prevalence in natural populations

We tested for the presence of LbTV among *L. boucardi* caught in the field. LbTV was detected in 9 out of 10 *L. boucardi* females for both Avignon and Sonnay. Four females in Avignon and one in Sonnay were infected by LbFV. LbTV was found in coinfection with LbFV in 4 out of 20 females but no preferential association nor exclusion between the two viruses were detected (Fisher's exact test ; $P = 0.45$), consistently with what was found in laboratory lines.

Vertical transmission of LbTV

Reciprocal crosses between the LbTV-free line Sf1 and the LbTV-infected line Vi1 were performed to study the vertical transmission of the virus. After mating, all Vi1 parents proved to be LbTV-infected and all Sf1 parents were LbTV-free, showing that LbTV was not sexually-transmitted. The screening of their progeny revealed that LbTV was maternally-

transmitted to all male and female offspring (Fig. 5). Among crosses involving an LbTV-free mother and an LbTV-infected father, only one female offspring displayed a weak RT-PCR signal. The sequencing of this RT-PCR product confirmed that LbTV was paternally-transmitted. However, the paternal transmission was much less efficient than the maternal transmission. Thus the vertical transmission of LbTV was mostly maternal with a minor contribution of paternal transmission.

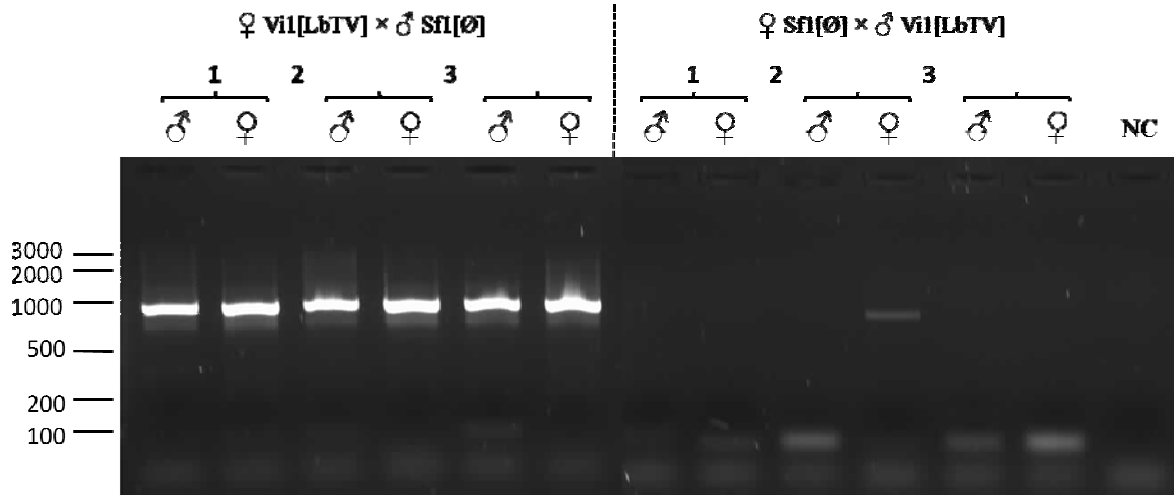


Figure 5. Gel electrophoresis after RT-PCR test on the progeny of the reciprocal crosses between the LbTV-free line, Sf1, and the LbTV-infected line, Vi1. LbTV-infection status of parents is indicated in parentheses with Ø standing for LbTV-free parents. Numbers on the top indicate the different replicates for each kind of cross. Molecular weight marker on the left in bp. NC: negative PCR control.

Horizontal transmission of LbTV

We tested whether superparasitism conditions could allow the horizontal transmission of LbTV, similarly to what is observed for LbFV (Varaldi *et al.* 2003). This hypothesis was tested using the line Av1 which is doubly-infected by LbTV and LbFV. Unfertilized Av1 females (donor line) were used to superparasitize hosts previously parasitized by fertilized uninfected Sf1 females (recipient line). In total, 20 females, offspring of the recipient line, were tested for viral infection. As expected, LbFV was massively horizontally-transmitted, since 14 out of 20 female offspring were infected. This result indicated that superparasitism

was abundant in this experiment, since LbFV can only be horizontally-transferred under superparasitism (Varaldi *et al.* 2006a). In contrast, no LbTV infection was detected in female progeny, even if the conditions for LbFV horizontal transmission were met.

Contribution of LbTV to the parasitoid phenotype

Phenotypic variation potentially attributable to LbTV infection was investigated by comparing the performances of LbTV-free and LbTV-infected females, either crossed with males of their respective lines or with males of lines having a different LbTV-infection status (Fig. 6). There were significant differences between cross combinations on parasitism rate (arcsinus-transformed data; $F_{9,61} = 6.43$; $P > 0.0001$), parasitoid developmental success (arcsinus-transformed data; $F_{9,61} = 7.42$; $P > 0.0001$) and number of offspring ($F_{9,61} = 13.42$; $P > 0.0001$). The analyses on pure lines indicated that LbTV-infected lines had a higher parasitism rate, a higher parasitoid developmental success as well as a greater number of offspring (Tab. 4a). In contrast, differences between LbFV-free and LbFV-infected lines were not significant for any of these traits, nor was the interaction between LbTV- and LbFV-infection statuses (Tab. 4a). In the global analysis, the positive effect of LbTV on these traits was confirmed whereas the effect of LbFV was still not significant (Tab. 4b). The interaction between LbTV and LbFV were not significant except for the parasitoid developmental success (Tab. 4b). Therefore, differences in the performance of parasitoid females were only associated with their LbTV-infection status of mothers.

The analysis of the sex ratio revealed differences between cross combinations ($F_{9,61} = 2.85$; $P = 0.007$), however, multiple comparisons did not show any significant differences. Neither LbTV nor LbFV infection explained differences in sex ratio in both the analysis of pure lines or the global analysis (Tab. 4a & b). There was, however, a significant interaction between LbTV- and LbFV infection statuses. In LbFV-infected mother, the presence of LbTV was associated with an increase in the proportion of male offspring whereas it had the opposite effect in LbFV-free mothers. The analysis of potential incompatible crosses (LbTV-free ♀ × LbTV-infected ♂) with their respective compatible crosses (LbTV-free ♀ × LbTV-free ♂) did not reveal any difference ($F_{1,2} = 0.9$; $P = 0.44$), suggesting that LbTV does not induce cytoplasmic incompatibility.

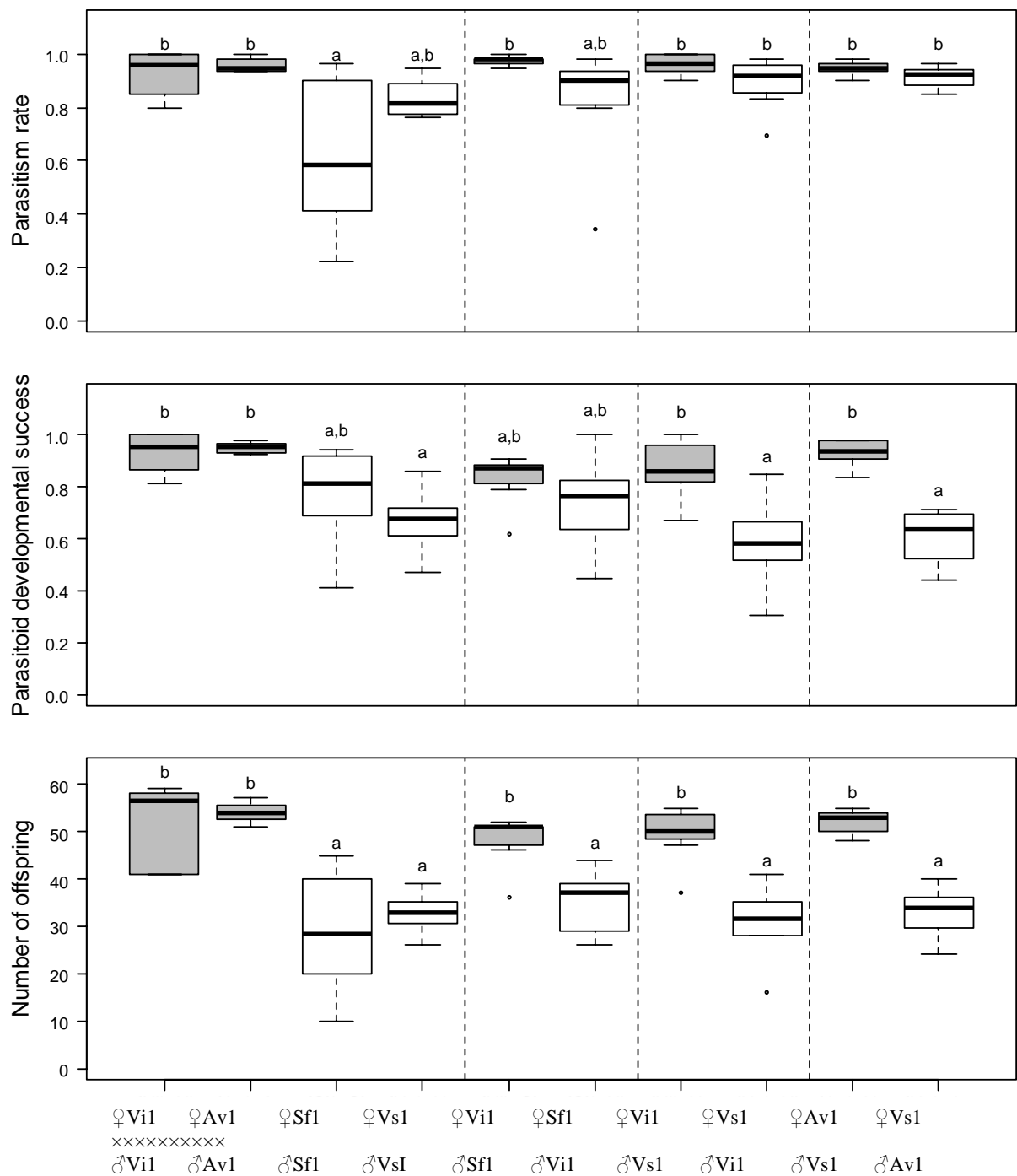


Figure 6. Parasitoid life-history traits measured on parasitoid females in pure line and between-line crosses. (a) Parasitism rate. (b) Parasitoid developmental success. (c) Number of offspring. Left: pure-line crosses; right: between-line crosses. Crosses with LbTV-infected and LbTV-free mothers are depicted in grey and white, respectively. Different letters indicate significant difference based on a pairwise *t* test (Bonferroni correction).

Table 4. Analyses of parasitoid fitness-related traits. Cross: cross combination. LR: Likelihood ratio.

(a) Analysis on pure lines (linear model)

Source of variation	Parasitism rate		Parasitoid developmental success		Number of offspring		Sex ratio	
	statistics	<i>P</i>	statistics	<i>P</i>	statistics	<i>P</i>	statistics	<i>P</i>
LbTV	$F_{1,38} = 22.17$	< 0.0001	$F_{1,38} = 15.24$	0.0004	$F_{1,38} = 53.41$	< 0.0001	$F_{1,38} = 1.96$	0.17
LbFV	$F_{1,38} = 1.28$	0.26	$F_{1,38} = 0.49$	0.48	$F_{1,38} = 0.66$	0.42	$F_{1,38} = 0.38$	0.54
interaction LbTV × LbFV	$F_{1,38} = 0.67$	0.41	$F_{1,38} = 2.16$	0.15	$F_{1,38} = 0.16$	0.69	$F_{1,38} = 8.72$	0.005

(b) Global analysis (linear mixed model)

LbTV	$F_{1,6} = 18.76$	0.005	$F_{1,6} = 48.6$	0.0004	$F_{1,6} = 118.32$	< 0.0001	$F_{1,6} = 2.22$	0.19
LbFV	$F_{1,6} = 2.78$	0.15	$F_{1,6} = 2.89$	0.14	$F_{1,6} = 1.04$	0.35	$F_{1,6} = 1.91$	0.22
interaction LbTV × LbFV	$F_{1,6} = 4.41$	0.08	$F_{1,6} = 9.36$	0.02	$F_{1,6} = 0.43$	0.54	$F_{1,6} = 10.15$	0.02
cross	$LR = 5.66$	0.01	$LR = 2.19$	0.14	$LR < 0.0001$	0.99	$LR = 5.3$	0.02

Discussion

Four different RNA virus families have already been reported in parasitoids including single-stranded RNA viruses, namely *Rhabdoviridae* (Lawrence & Matos 2005), corona-like (Jacas *et al.* 1997) and picorna-like viruses (Reineke & Asgari 2005; Oliveira *et al.* 2010), and including segmented double-stranded RNA viruses of the family *Reoviridae* (Renault *et al.* 2003; Stoltz & Makkay 2000). Here, we report a new RNA virus infecting the parasitoid wasp *L. bouhardi*. From purified viral particles and *L. bouhardi* cDNA library, we obtained a 4862 bp sequence composed of two large ORFs. ORF1 encodes an unknown protein, possibly a coat protein, and ORF2 encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase. Sequences corresponding to each ORF were identified in our normalized cDNA library suggesting that they are transcribed in *L. bouhardi* females. The fact that these sequences were obtained from reverse-transcription of the genome of LbTV is unlikely since the reverse-transcription was done using oligo dTs. ORF2 showed amino acid sequence similarities with the RdRp of non-segmented viruses belonging to the family *Totiviridae*. Treatment with nucleases of nucleic acids from purified viral particles suggested that, like other totiviruses, the genome of LbTV is made of double-stranded RNA. The two predicted ORFs of the LbTV molecular marker do not overlap and are located on the same frame whereas totiviruses typically exhibit two

partially overlapping ORFs on different frames (Wickner *et al.* 2005). However, we must stress that we do not have the complete genomic sequence of LbTV. Future ORF prediction with longer genomic sequences will possibly reveal overlapping ORFs. The phylogenetic analysis of the RdRp conserved domains showed that LbTV is related to the group of totiviruses infecting other arthropods, although LbTV is distantly related to the other members of this group. Surprisingly, LbTV was not particularly related to DTV, a virus that was discovered in cell lines of *D. melanogaster* (Wu *et al.* 2010) which is a common host of *L. boulandi*.

LbTV was very frequent in laboratory lines of *L. boulandi* whereas it was not found in the sibling species *L. heterotoma*, in *D. melanogaster* or in *D. simulans* lines. Thus, LbTV seems to specifically infect *L. boulandi*. However, future work should address the question of LbTV transmission to *Drosophila* hosts via parasitism by LbTV-infected parasitoids since *Drosophila* is thought to be a susceptible host for toti-like viruses (Wu *et al.* 2010). LbTV was also found in most *L. boulandi* females directly sampled from two natural populations. In both laboratory lines and field-collected females, LbTV infection status was uncorrelated to the presence of LbFV in parasitoids, suggesting that there is no strong within-host competition between these viruses.

Like many parasitoid viruses, LbTV is vertically-transmitted. However, parasitoid viruses are usually only transmitted from mother to offspring, except for polydnviruses that are integrated into the wasp genome. We found that LbTV can be paternally-transmitted, although this mode of transmission was much less efficient than maternal transmission. Paternal transmission is occasionally detected in maternally-transmitted bacteria such as in aphids (Moran & Dunbar 2006) and is a common route of transmission for *Drosophila* sigma viruses (Longdon *et al.* 2011). Future work should investigate the localization of LbTV particles inside parasitoid females. Its presence should be monitored in the reproductive apparatus of females (calyx and oviducts), which is a good location for maternal transmission, as it seems to be the case in various parasitoid-virus associations (Krell 1987 ; Stoltz *et al.* 1988 ; Hamm *et al.* 1990 ; Varaldi *et al.* 2003). LbTV may be injected along with the eggs during oviposition and infect parasitoid offspring inside the *Drosophila* larva, as it is thought to occur for LbFV. However, contrary to LbFV, LbTV is not able to be horizontally-transmitted in the context of superparasitism, at least in the presence of LbFV. Therefore, the vertical transmission of LbTV is more likely transovarian. After oviposition, LbTV particules

might only be found inside parasitoid eggs but not in the *Drosophila* hemolymph, accounting for the absence of horizontal transmission.

Nevertheless, the horizontal transmission of LbTV in the absence of LbFV remains to be verified. However, since LbFV-free females rarely superparasitize, we do not expect a high contribution of horizontal transmission to LbTV's fitness. Given that the behavioral manipulation is costly for the parasitoid female in most conditions (Gandon *et al.* 2006), we also expect LbTV's fitness to be negatively affected by the presence of LbFV since, as wasp's genes, LbTV is only vertically-transmitted. In this context, LbTV should be selected to counteract the behavioral manipulation. Such "sabotage" strategy (Thomas *et al.* 2002) was observed in the crustacean *Gammarus pulex* infected by the trophically-transmitted parasite *Polymorphus minutus* and by vertically-transmitted microsporidia (Haine *et al.* 2005). The behavioral manipulation exerted by *P. minutus* is almost completely suppressed in the presence of microsporidia. We did not observe significant modification of superparasitism behavior in lines coinfecting by LbFV and LbTV. However, future work should investigate whether LbTV is able to partially decrease the intensity of superparasitism in LbFV-infected females with a controlled nuclear background.

Finally, we found potential beneficial effect of LbTV infection. Indeed, the fitness of parasitoid females was clearly correlated to their LbTV-infection status. LbTV-infected females produced far more offspring than uninfected females (+ 60%). This difference was related to the fact that LbTV-infected females were slightly more efficient at parasitizing *Drosophila* larvae and that their progeny had a greater developmental success. However, we cannot completely rule out that such effects were the results of genetically-determined maternal effects. Indeed, by chance, the two lines originally infected by LbTV could have fitter genotypes, encoding beneficial maternal effects. In particular, parasitoid females inject a complex set of venoms and proteins inside the host (in addition to viruses) that are involved in the development of their progeny. Thus, we cannot rule out the possibility that LbTV-infected females had particularly beneficial alleles for these injected components. Phenotypic effects of LbTV should be further tested on more genotypes or using females with a similar nuclear background but differing in LbTV infection. What are the biological mechanisms allowing such beneficial effects will be the next question to be answered. LbTV might help the parasitoid larva in exploiting the *Drosophila* host resources as it seems to be the case in the parasitoid *Diadromus pulchellus* infected by the heritable ascovirus DpAV-4 (Stasiak *et al.* 2005). DpAV-4 replicates in the parasitoid's host leading to cell lysis which could enhance

the developmental success of the parasitoid larva (Bigot *et al.* 1997). However, unlike DpAV-4, LbTV cannot be horizontally-transmitted and might not be present inside the parasitoid's host tissues.

The vertical transmission of LbTV and its potential beneficial effect on parasitoid fitness are consistent with its high prevalence in natural populations and laboratory lines. Vertically-transmitted symbionts are, indeed, selected to enhance the fitness of their host since it consequently increases their own transmission (Ewald 1987). However, the existence of LbTV-free lines suggests that either the maternal transmission is not perfect or that beneficial effects are counter-balanced by some costs on other parasitoid traits.

In conclusion, LbTV is an additional example of the diversity of heritable viruses infecting parasitoids. Its discovery, however, extends the range of parasitoid viruses since this is the first description of a toti-like virus in Hymenopteran parasitoids (Renault 2011). Since LbTV and LbFV might compete for resources and because they display partially different routes of transmission, it raises the question of how the two viral species evolved in response to coinfection. Finally, the potential beneficial effects of LbTV infection suggest that, as polydnaviruses, LbTV could be a major player of parasitoid's adaptation.

Acknowledgments

We are grateful to the INRA centres of Avignon and Gotheron, and to the land-owners for kindly allowed us to collect insects from their orchards. We would like to thank Patricia Gibert and Roland Allemand for their help in the field sampling, Anne Duplouy for providing Australian parasitoid lines. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS 5558).

References

- Bessarab, I. N., H. W. Liu, C. F. Ip, and J. H. Tai. 2000. The complete cDNA sequence of a type II *Trichomonas vaginalis* virus. *Virology* 267:350-359.
- Bézier, A., M. Annaheim, J. Herbiniere, C. Wetterwald, G. Gyapay, S. Bernard-Samain, P. Wincker, I. Roditi, M. Heller, M. Belghazi, R. Pfister-Wilhem, G. Periquet, C. Dupuy, E. Huguet, A. N. Volkoff, B. Lanzrein, and J. M. Drezen. 2009. Polydnaviruses of Braconid Wasps Derive from an Ancestral Nudivirus. *Science* 323:926-930.

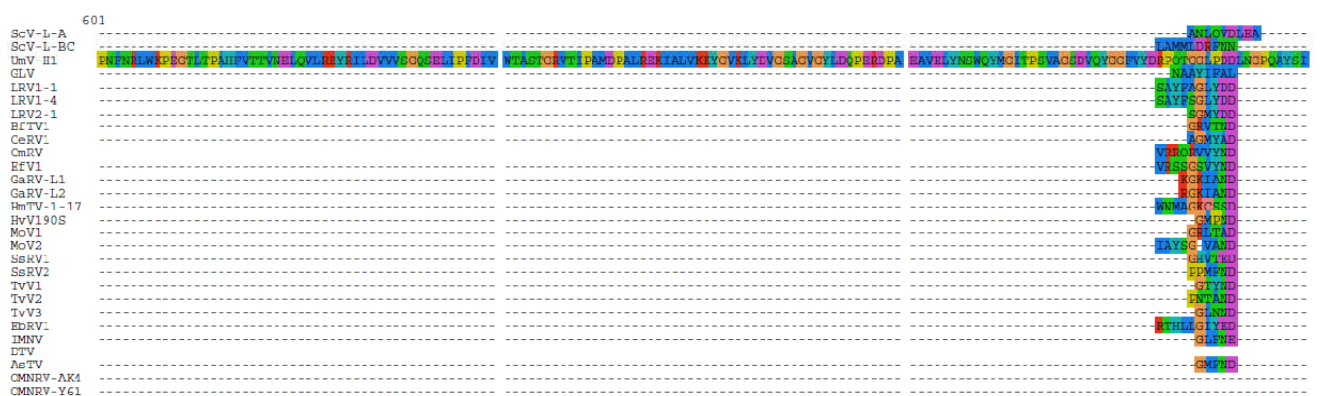
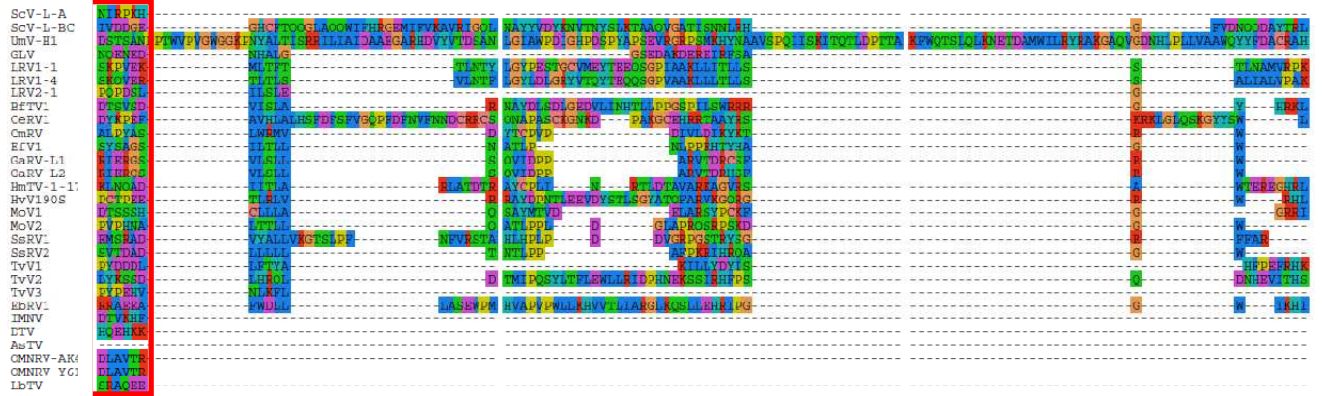
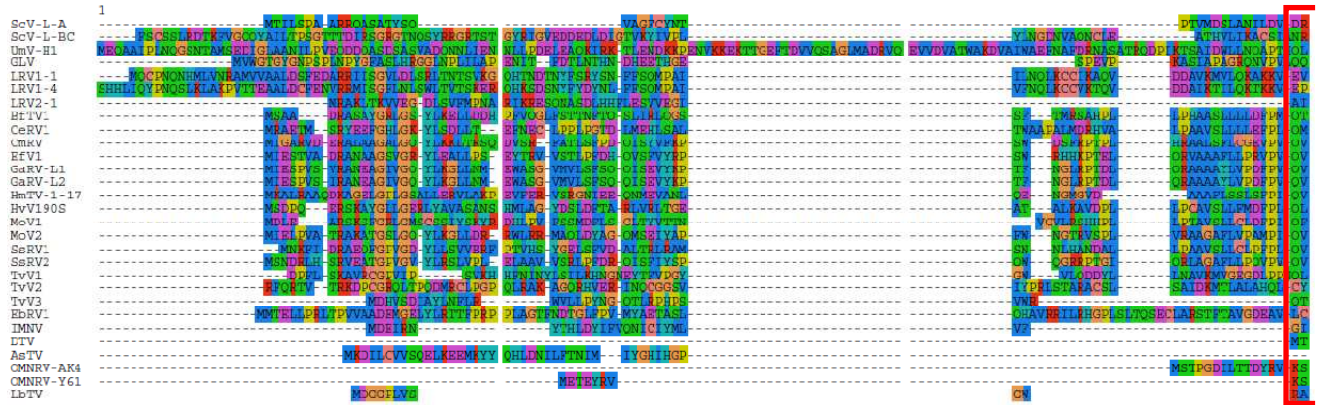
- Bigot, Y., A. Rabouille, G. Doury, P. Y. Sizaret, F. Delbost, M. H. Hamelin, and G. Periquet. 1997. Biological and molecular features of the relationships between *Diadromus pulchellus* ascovirus, a parasitoid hymenopteran wasp (*Diadromus pulchellus*) and its lepidopteran host, *Acrolepiopsis assectella*. *Journal of General Virology* 78:1149-1163.
- Bruenn, J. A. 1993. A closely-related group of RNA-dependent RNA-polymerases from double-stranded RNA viruses. *Nucleic Acids Research* 21:5667-5669.
- Carton, Y., and A. J. Nappi. 2001. Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* 52:157-164.
- Cheng, H., D. H. Jiang, Y. P. Fu, G. Q. Li, Y. L. Peng, and S. A. Ghabrial. 2003. Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. *Virus Research* 93:41-50.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
- David, J. 1962. A new medium for rearing *Drosophila* in axenic condition. *Drosophila Information Service* 36:128.
- Drezen, J. M., A. Bézier, J. Lesobre, E. Hugué, and C. Dupuy. 2006. Virulence genes of parasitoid wasps encoded by symbiotic viruses. Pp. 59-64. ICOPA XI: Proceedings of the 11th International Congress of Parasitology. Medimond S R L, 40128 Bologna.
- Dupas, S., and Y. Carton. 1999. Two non-linked genes for specific virulence of *Leptopilina bouvardi* against *Drosophila melanogaster* and *D. yakuba*. *Evolutionary Ecology* 13:211-220.
- Edgar, R. C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *Bmc Bioinformatics* 5:1-19.
- Ewald, P. W. 1987. Transmission modes and the evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 503:295-306.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Gandon, S., A. Rivero, and J. Varaldi. 2006. Superparasitism evolution: Adaptation or manipulation? *American Naturalist* 167:E1-E22.
- Haine, E. R., K. Boucansaud, and T. Rigaud. 2005. Conflict between parasites with different transmission strategies infecting an amphipod host. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 272:2505-2510.
- Hamm, J. J., E. L. Styer, and W. J. Lewis. 1990. Comparative virogenesis of filamentous virus and polydnavirus in the female reproductive tract of *Cotesia marginiventris* (Hymenoptera, Braconidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 55:357-374.
- Huang, S. H., and S. A. Ghabrial. 1996. Organization and expression of the double-stranded RNA genome of *Helminthosporium victoriae* 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:12541-12546.
- Icho, T., and R. B. Wickner. 1989. The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA-polymerase by fusing 2 open reading frames. *Journal of Biological Chemistry* 264:6716-6723.
- Isawa, H., R. Kuwata, K. Hoshino, Y. Tsuda, K. Sakai, S. Watanabe, M. Nishimura, T. Satho, M. Kataoka, N. Nagata, H. Hasegawa, H. Bando, K. Yano, T. Sasaki, M. Kobayashi, T. Mizutani, and K. Sawabe. 2011. Identification and molecular characterization of a new nonsegmented double-stranded RNA virus isolated from *Culex* mosquitoes in Japan. *Virus Research* 155:147-155.

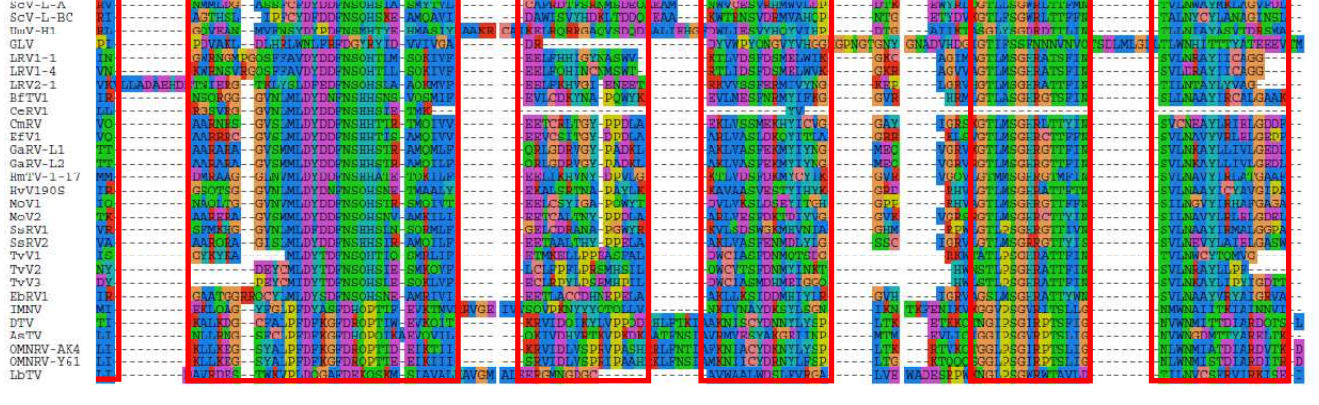
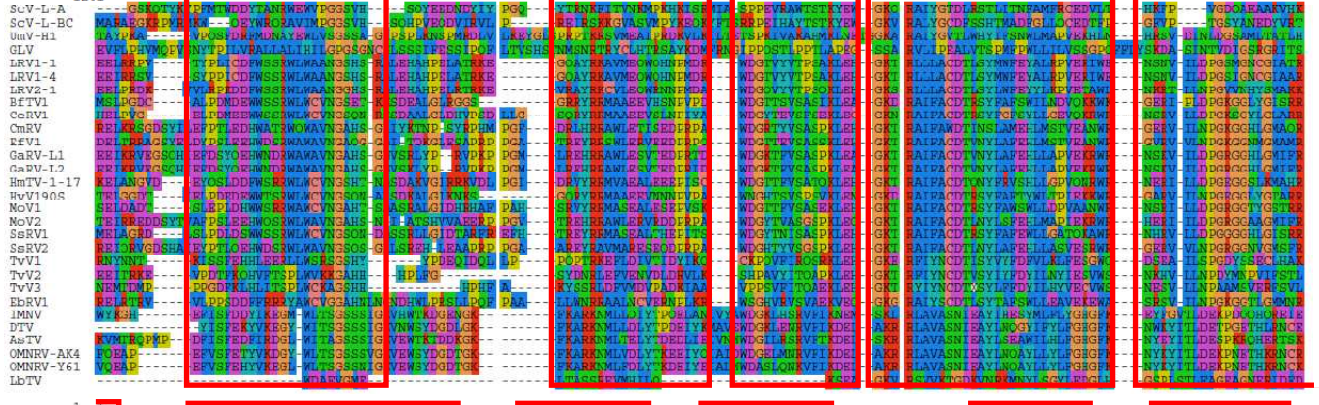
- Jacas, J. A., F. Budia, E. RodriguezCerezo, and E. Vinuela. 1997. Virus-like particles in the poison gland of the parasitic wasp *Opius concolor*. *Annals of Applied Biology* 130:587-592.
- Krell, P. J. 1987. Replication of long virus-like particles in the reproductive tract of the ichneumonid wasp *Diadegma terebrans*. *Journal of General Virology* 68:1477-1483.
- Larkin, M. A., G. Blackshields, N. P. Brown, R. Chenna, P. A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I. M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J. D. Thompson, T. J. Gibson, and D. G. Higgins. 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948.
- Lawrence, P. O., and L. F. Matos. 2005. Transmission of the Diachasmimorpha longicaudata rhabdovirus (DIRhV) to wasp offspring: an ultrastructural analysis. *Journal of Insect Physiology* 51:235-241.
- Longdon, B., L. Wilfert, D. J. Obbard, and F. M. Jiggins. 2011. Rhabdoviruses in Two Species of *Drosophila*: Vertical Transmission and a Recent Sweep. *Genetics* 188:141-150.
- Maejima, K., M. Himeno, K. Komatsu, S. Kakizawa, Y. Yamaji, H. Hamamoto, and S. Namba. 2008. Complete nucleotide sequence of a new double-stranded RNA virus from the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Archives of Virology* 153:389-391.
- Martinez, J., F. Fleury, and J. Varaldi. 2011. Heritable variation in an extended phenotype: the case of a parasitoid manipulated by a virus. *Journal of Evolutionary Biology* In Press.
- Moran, N., and H. Dunbar. 2006. Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *PNAS* 103:12803-12806.
- Mouton, L., H. Henri, M. Boulétreau, and F. Vavre. 2003. Strain-specific regulation of intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Molecular Ecology* 12:3459-3465.
- Nomura, K., H. Osaki, T. Iwanami, N. Matsumoto, and Y. Ohtsu. 2003. Cloning and characterization of a Totivirus double-stranded RNA from the plant pathogenic fungus, *Helicobasidium mompa* Tanaka. *Virus Genes* 26:219-226.
- Oliveira, D., W. B. Hunter, J. Ng, C. A. Desjardins, P. M. Dang, and J. H. Werren. 2010. Data mining cDNAs reveals three new single stranded RNA viruses in *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Insect Molecular Biology* 19:99-107.
- Park, Y. J., D. James, and Z. K. Punja. 2005. Co-infection by two distinct totivirus-like double-stranded RNA elements in *Chalara eleganse* (Thielaviopsis basicola). *Virus Research* 109:71-85.
- Patot, S., D. Lepetit, D. Charif, J. Varaldi, and F. Fleury. 2009. Molecular Detection, Penetrance, and Transmission of an Inherited Virus Responsible for Behavioral Manipulation of an Insect Parasitoid. *Applier and Environmental Microbiology* 75:703-710.
- Pinheiro, J. C., & Bates, D. M. 2000. *Mixed Effects Models in Sand S-PLUS*. New York SpringerVerlag.
- Potgieter, A. C., N. A. Page, J. Liebenberg, I. M. Wright, O. Landt, and A. A. van Dijk. 2009. Improved strategies for sequence-independent amplification and sequencing of viral double-stranded RNA genomes. *Journal of General Virology* 90:1423-1432.
- Poulos, B. T., K. F. J. Tang, C. R. Pantoja, J. R. Bonami, and D. V. Lightner. 2006. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. *Journal of General Virology* 87:987-996.
- Preisig, O., B. D. Wingfield, and M. J. Wingfield. 1998. Coinfection of a fungal pathogen by two distinct double-stranded RNA viruses. *Virology* 252:399-406.

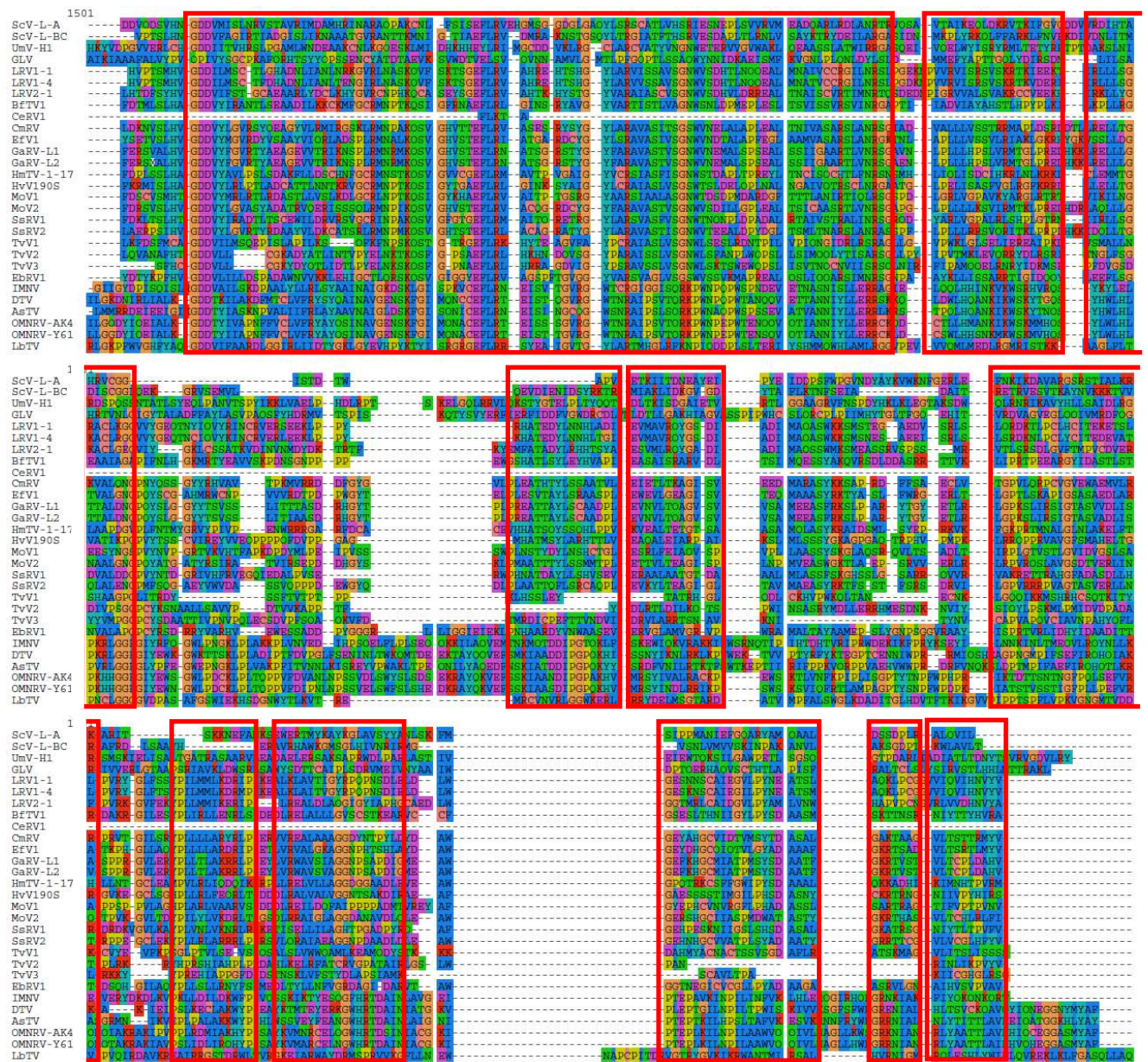
- Reineke, A., and S. Asgari. 2005. Presence of a novel small RNA-containing virus in a laboratory culture of the endoparasitic wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Physiology* 51:127-135.
- Renault, S. 2011. RNA viruses in parasitoid wasps. Pp. 193-201 in N. E. Beckage, and J. M. Drezen, eds. *Parasitoid viruses: symbionts and pathogens*. Academic Press.
- Renault, S., S. Bigot, M. Lemesle, P. Y. Sizaret, and Y. Bigot. 2003. The cypovirus *Diadromus pulchellus* RV-2 is sporadically associated with the endoparasitoid wasp *D. pulchellus* and modulates the defence mechanisms of pupae of the parasitized leek-moth, *Acrolepiopsis assectella*. *Journal of General Virology* 84:1799-1807.
- Renault, S., K. Stasiak, B. Federici, and Y. Bigot. 2005. Commensal and mutualistic relationships of reoviruses with their parasitoid wasp hosts. *Journal of Insect Physiology* 51:137-148.
- Romo, M., A. Leuchtman, B. Garcia, and I. Zabagogeazcoa. 2007. A totivirus infecting the mutualistic fungal endophyte *Epichloe festucae*. *Virus Research* 124:38-43.
- Scheffter, S., G. Widmer, and J. L. Patterson. 1994. Complete sequence of *Leishmania* RNA virus 1-4 and identification of conserved sequences. *Virology* 199:479-483.
- Scheffter, S. M., Y. T. Ro, I. K. Chung, and J. L. Patterson. 1995. The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an old-world parasite strain. *Virology* 212:84-90.
- Schlenke, T. A., J. Morales, S. Govind, and A. G. Clark. 2007. Contrasting infection strategies in Generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*. *Plos Pathogens* 3:1486-1501.
- Stasiak, K., S. Renault, B. A. Federici, and Y. Bigot. 2005. Characteristics of pathogenic and mutualistic relationships of ascoviruses in field populations of parasitoid wasps. *Journal of Insect Physiology* 51:103-115.
- Stoltz, D., and A. Makkay. 2000. Co-replication of a reovirus and a polydnavirus in the ichneumonid parasitoid *Hyposoter exiguae*. *Virology* 278:266-275.
- Stoltz, D. B., P. Krell, D. Cook, E. A. Mackinnon, and C. J. Lucarotti. 1988. An unusual virus from the parasitic wasp *Cotesia melanoscela*. *Virology* 162:311-320.
- Stuart, K. D., R. Weeks, L. Guilbride, and P. J. Myler. 1992. Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:8596-8600.
- Tai, J. H., and C. F. Ip. 1995. The cDNA sequence of *Trichomonas vaginalis* virus-T1 double-stranded RNA. *Virology* 206:773-776.
- Thézé, J., A. Bézier, G. Periquet, J. M. Drezen, and E. A. Herniou. 2011. Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:15931-15935.
- Thomas, F., J. Fauchier, and K. D. Lafferty. 2002. Conflict of interest between a nematode and a trematode in an amphipod host: Test of the "sabotage" hypothesis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51:296-301.
- Tuomivirta, T. T., and J. Hantula. 2003. Two unrelated double-stranded RNA molecule patterns in *Gremmeniella abietina* type A code for putative viruses of the families Totiviridae and Partitiviridae. *Archives of Virology* 148:2293-2305.
- Tuomivirta, T. T., and J. Hantula. 2005. Three unrelated viruses occur in a single isolate of *Gremmeniella abietina* var. *abietina* type A. *Virus Research* 110:31-39.
- Varaldi, J., P. Fouillet, M. Ravallec, M. Lopez-Ferber, M. Boulétreau, and F. Fleury. 2003. Infectious Behavior in a Parasitoid. *Science* 302:1930.

- Varaldi, J., S. Petit, M. Bouletreau, and F. Fleury. 2006a. The virus infecting the parasitoid *Leptopilina boulandi* exerts a specific action on superparasitism behaviour. *Parasitology* 132:747-756.
- Varaldi, J., M. Ravallec, C. Labrosse, M. Lopez-Ferber, M. Boulétreau, and F. Fleury. 2006b. Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Journal of Insect Physiology* 52:1202-1212.
- Vavre, F., F. Fleury, J. Varaldi, P. Fouillet, and M. Bouletreau. 2000. Evidence for female mortality in *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: Epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution* 54:191-200.
- Vavre, F., L. Mouton, and B. A. Pannebakker. 2009. *Drosophila*-Parasitoid Communities as Model Systems for Host-*Wolbachia* Interactions. Pp. 299-331. *Advances in Parasitology, Vol 70: Parasitoids of Drosophila*.
- Wang, A. L., H. M. Yang, K. A. Shen, and C. C. Wang. 1993. Giardiavirus double-stranded RNA genome encodes a capsid polypeptide and a gag-pol-like fusion protein by a translation frameshift. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90:8595-8599.
- Werren, J., L. Baldo, and M. Clark. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature* 6:741-751.
- Wickner, R.B., Wang, C.C., Patterson, J.L., 2005. Family Totiviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London, pp. 571–580.
- Whitfield, J. B. 2002. Estimating the age of the polydnavirus/braconid wasp symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7508-7513.
- Wu, Q. F., Y. J. Luo, R. Lu, N. Lau, E. C. Lai, W. X. Li, and S. W. Ding. 2010. Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:1606-1611.
- Yokoi, T., S. Yamashita, and T. Hibi. 2007. The nucleotide sequence and genome organization of *Magnaporthe oryzae* virus 1. *Archives of Virology* 152:2265-2269.
- Zhai, Y., H. Attoui, F. M. Jaafar, H. Q. Wang, Y. X. Cao, S. P. Fan, Y. X. Sun, L. D. Liu, P. P. C. Mertens, W. S. Meng, D. Wang, and G. D. Liang. 2010. Isolation and full-length sequence analysis of *Armigeres subalbatus* totivirus, the first totivirus isolate from Mosquitoes representing a proposed novel genus (Artivirus) of the family Totiviridae. *Journal of General Virology* 91:2836-2845.

Appendix S1







Alignment of RdRp amino acid sequences of LbTV and 28 other dsRNA viruses. Red rectangles: conserved domains used for the phylogenetic analysis (total size: 578 aa).

Chapitre 7

Rôle de LbFV dans l'interaction parasitoïde-drosophile

Chapitre 7. Rôle de LbFV dans l'interaction parasitoïde-drosophile

Synthèse

Bien que LbFV soit en conflit d'intérêts avec le parasitoïde pour l'expression du superparasitisme, sa transmission en partie verticale conduit néanmoins à un alignement d'intérêts pour certains traits du parasitoïde. En particulier, la survie du parasitoïde au sein de son hôte est une condition indispensable à la transmission du virus. D'autres virus transmis verticalement tels que les polydnavirus (Drezen *et al.* 2006) ou encore l'ascovirus Dp-Av-4 (Renault *et al.* 2002) sont capables de supprimer la réponse immunitaire de l'hôte parasité. Il est possible que LbFV soit aussi sélectionné pour augmenter la virulence de *L. boulandi* vis-à-vis de l'hôte drosophile. En particulier, le virus pourrait empêcher la réaction d'encapsulation, une réponse immunitaire des drosophiles qui conduit à la formation d'une capsule mélanisée autour du parasitoïde en développement, entraînant la mort de ce dernier.

Nous avons ainsi posé la question du rôle potentiel de LbFV dans l'interaction drosophile-*L. boulandi*. Les lignées NSref et Sref, ne différant que par leur statut d'infection pour LbFV ont été utilisées pour infester deux lignées de *D. melanogaster* et deux lignées de *D. simulans*. Les quatre lignées de drosophiles étant infectées chacune par différentes souches de la bactérie *Wolbachia*, nous avons testé dans le même temps l'effet de cette bactérie en créant des lignées non-infectées grâce à un traitement antibiotique. *Wolbachia*, bien connue pour les manipulations de la reproduction qu'elle induit, confère également une protection à ses hôtes contre divers parasites tels que les virus à ARN, les vers parasites agents de la filariose ou encore *Plasmodium*, l'agent du paludisme (Hedges *et al.* 2008 ; Teixeira *et al.* 2008 ; Osborne *et al.* 2009 ; Walker *et al.* 2011 ; Moreira *et al.* 2009). Ainsi, *Wolbachia* pourrait potentiellement protéger les drosophiles des attaques de *L. boulandi* en augmentant l'intensité de la réponse immunitaire ou encore interagir avec les effets potentiels de LbFV.

Différents traits de l'interaction drosophile-*L. boulandi* ont ainsi été mesurés selon le protocole standard décrit au chapitre 1. Les résultats ont montré que la bactérie *Wolbachia* n'avait globalement pas d'effet significatif sur l'interaction (à l'exception d'une interaction complexe avec LbFV et le bloc temporel pour une lignée de *D. simulans* infectée par la souche *wAu*). Par contre, la présence de LbFV modifie l'issue de l'interaction hôte-parasitoïde. Bien qu'associé à une baisse du succès de développement des parasitoïdes, LbFV

diminue le taux d'encapsulation chez *D. simulans* (Manuscrit 4, Fig. 2). Une tendance similaire mais non significative a aussi été observée chez *D. melanogaster*.

Dans une deuxième expérience nous avons pu montrer que l'effet du virus sur l'encapsulation était dû à un effet direct de la présence du virus dans la larve de drosophile (mesuré sur des larves mono-parasitées) mais également un effet indirect dû au superparasitisme (Manuscrit 4, Fig. 4). En effet, les résultats montrent que les larves de drosophiles encapsulent les parasitoïdes avec une efficacité moindre lorsqu'elles sont superparasitées. Les deux effets cumulés de LbFV (réduction du succès de développement mais diminution du risque d'être encapsulé) font qu'aucune différence de fitness entre les lignées de parasitoïdes infectées ou non par LbFV n'a été détectée (même nombre de descendants produits).

Ces résultats montrent l'importance de la prise en compte du compartiment symbiotique dans les relations interspécifiques telles que les interactions hôte-parasitoïde. De plus, ils invitent à reconsidérer la balance coût-bénéfice de l'infection par LbFV pour le parasitoïde. En effet, les coûts associés à l'induction du superparasitisme et à la diminution du succès développemental des parasitoïdes peuvent être compensés en partie par le bénéfice procuré sur la diminution du taux d'encapsulation des hôtes.

Influence of the virus LbFV and of *Wolbachia* in a host-parasitoid interaction

Julien Martinez^{1,4}, Anne Duplouy^{2,5}, Meg Woolfit³, Fabrice Vavre¹, Scott L. O'Neill³ and Julien Varaldi¹

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

² University of Helsinki, PO Box65 Viikinkaari 1, 00790 Helsinki, Finland

³ School of Biological Sciences, Monash University, Victoria 3800, Australia

⁴ E-mail: julien.martinez@univ-lyon1.fr

Phone : +33 (0)4 72 43 29 08

⁵ E-mail: anne.duplouy@helsinki.fi

Phone : +358 (0)9 1911 57740

Abstract

Symbionts are widespread and might have a large contribution on the outcome of interactions between species, such as in host-parasitoid systems. Here, we studied the influence of the virus LbFV, infecting the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*, and the bacterium *Wolbachia*, infecting *Drosophilamelanogaster* and *D. simulans* hosts, on the outcome of the host-parasitoid interaction. The virus is known to manipulate the superparasitism behaviour of the parasitoid whereas *Wolbachia* can manipulate the reproduction of its host. We used two different nuclear backgrounds for both *Drosophila* species, infected with or cured of their respective *Wolbachia* strains, and offered them to one *L. boulardi* nuclear background, either infected or not by the virus. The main defence mechanism against parasitoids, i.e. encapsulation, and other important traits of the interaction were measured. The results showed that virus-infected parasitoids are less frequently encapsulated than uninfected ones. Further experiments showed that this viral effect involved both a direct protective effect against encapsulation and an indirect effect of superparasitism. Additionally, the *Wolbachia* strain wAu affected the encapsulation ability of its *Drosophila* host but the direction of this effect was strongly dependent on the presence/absence of LbFV. Our results confirmed the importance of heritable symbionts in the outcome of antagonistic interactions.

Introduction

Endosymbionts are extremely frequent in arthropods, especially in insects. By providing additional heritable genetic material, they may contribute to the adaptation of their insect host (Moran 2007; Gilbert et al. 2010). A growing literature reports examples of beneficial effects provided by heritable endosymbionts to their hosts when the latter are engaged in antagonistic relationships with other species (Oliver et al. 2003; Scarborough et al. 2005; Goodrich-Blair and Clarke 2007; Teixeira et al. 2008; Jaenike et al. 2010). Host-parasitoid systems are therefore of great interest, as both protagonists may harbour symbiotic organisms influencing the outcome of their interaction, thus offering additional routes towards resistance or virulence besides host nuclear factors (Schneider and Chambers 2008). Indeed, it has been found that several bacteria protect their insect host from parasitoid attacks in aphids (Vorburger et al. 2009; Oliver et al. 2010; Vorburger et al. 2010) or in *Drosophila hydei* (Xie et al. 2010). On the other hand, insect parasitoids can make use of their viral symbiont to cope with the host's immune defences thus increasing their virulence (Renault et al. 2005; Stasiak et al. 2005; Bezier et al. 2009; Volkoff et al. 2010). These heritable viruses are injected into the parasitoid's host together with the eggs, suppressing, to varying degrees the immune reaction of the parasitized host (Drezen et al. 2006).

Whereas most studies have focused on the effect of a single symbiont either in the host or in the parasitoid (Fytrou et al. 2006), we have investigated here the potential influence of two symbionts found in the host and the parasitoid on the outcome of the host-parasitoid interaction. This system involves the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* that is able to parasitize both *Drosophila melanogaster* and *D. simulans* larvae. Parasitization may lead to three different outcomes: (i) the parasitoid avoids the immune system of the *Drosophila* larva, reaches the adult stage and ultimately kills the *Drosophila*; (ii) the *Drosophila* succeeds in killing the parasitoid by a cascade of immune reactions leading to the encapsulation of the young wasp (Carton and Nappi 1997); (iii) the interaction ends with the death of both protagonists.

Drosophila species are often infected by the maternally-transmitted bacterium *Wolbachia*. Different strains have been described, some exerting cytoplasmic incompatibility, a well-known reproductive manipulation in arthropods, while others have unknown effect. This raises the question of the mechanism explaining their prevalence in natural populations (Hoffmann et al. 1996; Merçot and Charlat 2004). One hypothesis is that non-manipulating *Wolbachia* strains may increase the resistance of their *Drosophila* host to parasitoid attacks. Indeed, it has been found that *Wolbachia* can confer resistance against various parasites such as RNA viruses (Hedges et al. 2008; Teixeira et al. 2008; Osborne et al. 2009), filarial

nematodes as well as *Plasmodium* (Kambris et al. 2009; Moreira et al. 2009; Hughes et al. 2011). Moreover, manipulating strains could combine the advantage from both a reproductive manipulation and a protective effect rendering their invasive potential even higher. In contrast to these expectations, a previous study has shown that *Wolbachia*-infected *D. simulans* had reduced encapsulation ability (Fytrou et al. 2006).

The parasitoid *L. boulardi* is often infected by a maternally-transmitted DNA virus called LbFV (*Leptopilina boulardi* Filamentous Virus), whose prevalence may exceed 90% in some locations (Patot et al. 2010). This virus manipulates the behavior of adult females in a way that favours its own transmission (Varaldi et al. 2003). Whereas virus-free females lay a single egg in encountered *Drosophila* larvae and usually avoid superparasitism, i.e. laying eggs in already parasitized larvae, virus-infected females readily lay eggs in previously parasitized host larvae. Infected offspring are consequently exposed to strong competition, as only one parasitoid is able to fully develop inside a single host larva. Superparasitism is adaptive for the virus as it enables its horizontal transmission among the parasitoid larvae competing within the same fly larva. Theoretical work has shown that the virus is selected for increasing the natural superparasitism tendency of the parasitoid because it allows infection of new parasitoid matrilineages (Gandon et al. 2006). Additionally, both the vertical and the horizontal transmission of the virus may benefit from increased virulence of the parasitoid against *Drosophila*'s immune response.

In this paper, we tested the combined effect of LbFV (infecting the parasitoid) and different strains of *Wolbachia* (infecting the *Drosophila* host) on the outcome of the host-parasitoid interaction using two different genetic backgrounds of *D. melanogaster* and *D. simulans* and one genetic background of *L. boulardi*. We measured the successful encapsulation rate by counting adult flies that survived parasitoid attack. In a second experiment, we also controlled for the occurrence and effect of superparasitism by measuring encapsulation in *Drosophila* larvae. The results showed that symbionts indeed influence the final outcome in this host-parasitoid interaction.

Materials and Methods

Insect lines and rearing conditions

Two different nuclear backgrounds of each of *Drosophila melanogaster* (YW-BNE and w^{1118}) and *D. simulans* (CO and DSR) were used, either infected with or cured from different *Wolbachia* strains, leading to eight inbred lines as described in Table 1. All flies

were reared under a 12L:12D photoperiod at 20°C and fed with a standard diet (David 1962). Cured lines were obtained by mixing in each fly vial, 0.5mL of a 100µg/mL rifampicin antibiotic solution to the 10mL/vial fly food, for three generations. To eliminate any potential direct effect of the antibiotics, *Drosophila* lines were then reared on antibiotic-free food for several generations before the start of the experiments. Their *Wolbachia* infection status was checked by PCR detection using the 81F-691R *wsp* primers specific to *Wolbachia* (Zhou et al. 1998).

Two reference lines of *L. boulandi*, designated NSref and Sref, with the same nuclear genetic background but a different virus-infection status were used (Table 1). NSref is an inbred uninfected line (with an estimated homozygosity greater than 82%) originating from Sienna, Italy (Varaldi et al. 2006b). Females of this line lay only one egg per *Drosophila* larva according to the results of a prior standard experimental procedure. Sref is LbFV-infected and derives from the former line that has been infected with natural horizontal transfer, i.e. via superparasitism, of viral particles originating from the south of France (Valence). This newly infected line proved stable over generations for virus infection and susceptible to the behavioral manipulation exerted by LbFV (increase in superparasitism tendency). Before the start of our experiments, parasitoids were maintained under a 12L:12D photoperiod at 26°C, on a laboratory *Wolbachia*-free *D.melanogaster* line originating from Lyon (France). Both NSref and Sref have been shown to be *Wolbachia*-free in a previous study (Varaldi et al. 2006b). Viral infection status of these two *L. boulandi* lines was determined by diagnostic PCR using the primers 500-R/102F designed for specific detection of LbFV (Patot et al. 2009). LbFV has, to date, never been found in *Drosophila* hosts (Patot et al. 2009).

Table 1. Description of the *Drosophila* lines with their respective *Wolbachia* strain, and the *L. boulandi* lines.

Species	<i>Drosophila melanogaster</i>		<i>Drosophila simulans</i>		<i>Leptopilina boulandi</i>	
Nuclear background	YW-BNE	w ¹¹¹⁸	CO	DSR	Sienna9	
Origin	YW wMel × BNE Toowong, Brisbane, Australia	Pasadena, California, USA	Coffs Harbour, Australia	Riverside, California, USA	Sienna, Italy	
Reference	Yamada <i>et al.</i> 2007	Min and Benzer 1997	Hoffmann <i>et al.</i> 1996	Hoffmann <i>et al.</i> 1986	Varaldi <i>et al.</i> 2006	
Symbiont strains	wMel	cured	wMelPop	cured	wAu	cured
	wMel	cured	wAu	cured	wRi	cured
					LbFV particles from a French population (Sref)	uninfected (NSref)

Experimental set-up

In experiment 1, adult flies from each line laid eggs overnight onto a small Petri dish of standard diet. One hundred eggs were then transferred into each rearing vial and 40 vials per *Drosophila* line were prepared (320 vials in total). Twenty four hours later, a single female parasitoid, either LbFV-infected or not, was introduced into each vial (n=15 for each parasitoid infection status). Ten control vials were kept without parasitoid. Experiments were carried out in large incubators at 26°C under 12L:12D photoperiod and 70% relative humidity. Parasitoids were removed from the vials after 24 hours.

From day 7, *Drosophila* flies that were not parasitized, or were parasitized but survived, started to emerge and were collected and counted daily. In response to parasitism, *Drosophila* larvae can initiate a protective immune reaction, which can lead to the encapsulation of the parasitoid egg or larva (Carton and Nappi 1997). Successful encapsulations are easily detected in the adult flies' abdomens, under a stereomicroscope, by crushing the entire individual between two glass slides. The number of flies containing capsules was recorded. Parasitoids started to emerge 12 days after the emergence of the first flies (day 19). They were removed from the vials and counted. For technical reasons, the experiment was split into two temporal blocks, half of the vials being launched on one day and the other half on the following day.

Fitness-related traits involved in the Drosophila-parasitoid interaction

Different key life-history traits influencing the outcome of the *Drosophila*-parasitoid interaction were measured (Figure 1). The parasitism rate (PR_i), or the proportion of *Drosophila* larvae parasitized by a single female parasitoid in a given vial i , was estimated by comparing the number of emerged flies in the treatment vial i (Nd_i) to the mean number of flies in the control vials (\bar{N}_c) of each *Drosophila* line as follows:

$$PR_i = \frac{\bar{N}_c - Nd_i + Ncap_i}{\bar{N}_c}$$

with $Ncap_i$ being the number of adult flies containing capsules in vial i .

From this estimator, the successful encapsulation rate (SER_i), defined as the proportion of parasitized *Drosophila* larvae that survived up to the adult stage, was calculated by dividing the number of flies containing capsules by the estimated number of parasitized larvae:

$$SER_i = \frac{Ncap_i}{PR_i \times \bar{N}_c}$$

The parasitoid developmental success (PS_i), defined as the proportion of parasitoids that survived up to the adult stage after successfully avoiding encapsulation, was calculated as follows:

$$PS_i = \frac{Np_i}{PR_i \times \bar{N}_c - Ncap_i}$$

with Np_i being the number of adult parasitoid offspring in vial i .

Figure 1. Temporal sequence of the *Drosophila*-parasitoid interaction and key life-history traits. We assumed that *Drosophila* natural mortality (not due to parasitism) occurs early, before introduction of parasitoid. (\bar{Sd}_c): mean *Drosophila* survival in control vials, (PR_i): parasitism rate in vial i , (SER_i): successful encapsulation rate in i , (PS_i): parasitoid developmental success in i , ($Ncap_i$): number of flies with successful encapsulation in i and (Np_i): number of emerging parasitoids in i .

Overall fitness

We used the number of adult parasitoid offspring Np_i as the best approximation of the female parasitoid's overall fitness. Due to variations in survival among the *Drosophila* nuclear backgrounds in the absence of parasitoid, we calculated an index of the *Drosophila*'s

fitness relative to their natural survival, i.e. in the absence of parasitoid. *Drosophila* fitness (Sd_{rel}) exposed to parasitoids was thus defined as the fly survival in vial i (Sd_i) relative to their respective survival in control vials ($\overline{Sd_c}$):

$$Sd_{rel} = \frac{Sd_i}{Sd_c} = \frac{Nd_i / 100}{\overline{N_c} / 100}$$

Direct and indirect effect of the virus on encapsulation

Virus-infected and uninfected parasitoids display contrasting egg-laying strategies (frequent superparasitism for Sref and rare for NSref). The virus' effects on the outcome of host-parasitoid interactions may therefore either result from a direct effect of the virus or from an indirect effect through the occurrence of superparasitism. In order to distinguish between these effects, we performed a second experiment using only the cured DSR line. We chose this particular line for its successful encapsulation rate, clearly dependent on the parasitoid infection status. Forty vials were prepared for both uninfected and virus-infected parasitoid lines. Half of these contained 100 *Drosophila* eggs deposited on day 1 (experiment 2.1), and the other half contained 125 eggs deposited on day 2 (experiment 2.2). We used two *Drosophila* densities (100 eggs or 125 eggs) in order to vary the host/parasitoid ratio and possibly the frequency of superparasitism. For each larval density, ten additional vials without parasitoid were used as controls. From each treatment vial, ten randomly chosen *Drosophila* pupae were dissected under a stereomicroscope. We recorded the number of parasitoid eggs, parasitoid larvae and the number of capsules found in each pupa. The larval encapsulation rate (LER_i) is the proportion of fly larvae that encapsulated all parasitoids. For this analysis, we only considered fly larvae containing either one or two parasitoids since larvae containing more than two parasitoids were too rare to support strong statistical analyses. The encapsulation rate at adult stage (SER_i) was measured as previously described in this paper except that dissected larvae were taken into account by subtracting 10 flies from the mean number of flies in the control vials ($\overline{N_c}$).

Statistical analyses

All data sets were analysed with the R software (version 2.11.1) (R Development Core Team, 2005). Except for the larval encapsulation rate, all life-history traits were analysed using linear models after adequate transformation to reach the assumptions of normality and homoscedasticity. The larval encapsulation rate was analysed using a generalized linear model with a binomial error structure (logit link function) given the binary nature of the data (encapsulation of all parasitoids or not).

Results

Successful encapsulation rate

Successful encapsulation rates were relatively low: on average 7.5% of parasitized fly larvae encapsulated and survived to the adult stage (Figure 2a). Although there was a strong temporal block effect and complex interactions between the block and the other variables on encapsulation rates, significant differences between *Drosophila* nuclear backgrounds were detected (Figure 2a; Table 2). Moreover, virus-infected parasitoids were less frequently encapsulated than their uninfected counterparts (4.4% versus 10.6%) (Figure 2a; Table 2). Presence/absence of *Wolbachia* had no significant additive effect on encapsulation but showed significant interactions of second, third and fourth order with the virus, with *Drosophila* nuclear background and with temporal block (Figure 2a; Table 2). Analysis of the data per *Drosophila* nuclear background indicated that infected parasitoids are less often encapsulated than uninfected ones in both *D. simulans* nuclear backgrounds (Table 2). In *D. melanogaster*, a similar trend was observed but was not significant when corrected for multiple comparisons (Table 2). The analysis of the significant virus-by-*Wolbachia* interaction in CO flies revealed that *wAu* reduced the successful encapsulation rate of virus-free parasitoids (Tukey's honest significance test, $P = 0.01$), whereas it slightly increased encapsulation rate of virus-infected parasitoids (Tukey's honest significance test, $P = 0.02$). However, this virus-by-*Wolbachia* interaction was highly dependent on the temporal block effect, according to the significant interaction of third order in Table 2. This strong CO-specific pattern was most likely responsible for the complex interactions observed in the global analysis. A similar analysis excluding data from CO flies no longer showed significant interactions between *Drosophila* nuclear background, virus, *Wolbachia* and temporal block. The virus and the temporal block effects were conserved ($F_{1,143} = 34.51$; $P < 0.0001$ and

$F_{1,143} = 16.45$; $P < 0.0001$), the *Wolbachia* effect remained non-significant ($F_{1,143} = 0.74$; $P = 0.39$), and the *Drosophila* nuclear background effect was lost ($F_{2,143} = 1.85$; $P = 0.16$).

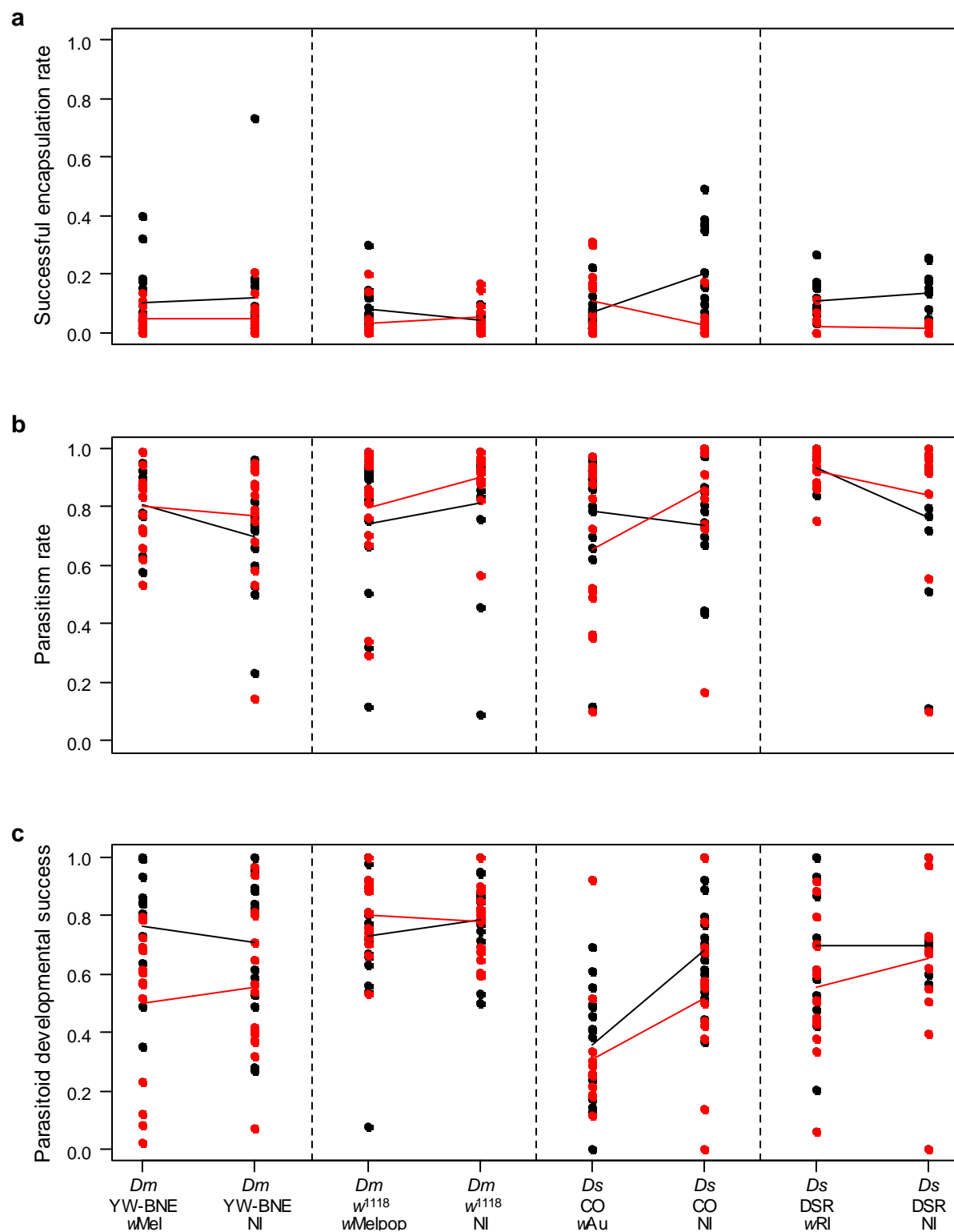


Figure 2. Fitness-related traits under different *Drosophila* nuclear backgrounds, *Wolbachia* and virus infection statuses (experiment 1). Red data points for virus-infected, black for virus-free parasitoids. (*Dm*) for *D. melanogaster* and (*Ds*) for *D. simulans*. (NI) stands for Not Infected and indicates *Wolbachia*-cured *Drosophila* lines.

Table 2. Analysis of variance of successful encapsulation rate based on square root-transformed data (experiment 1). Chosen level of significance is $\alpha = 5\%$ in the global analysis and $\alpha = 1.25\%$ in per *Drosophila* nuclear background analyses (Bonferroni correction for multiple comparisons). (*) indicates significant effect.

		Global analysis		Analysis per nuclear background			
				<i>D. melanogaster</i>		<i>D. simulans</i>	
	df	<i>F</i>	<i>P</i>	YW-BNE	<i>w</i> ¹¹¹⁸	CO	DSR
<i>Drosophila</i> nuclear background (1)	3	4.203	< 0.0001*	-	-	-	-
virus (2)	1	48.669	< 0.0001*	0.03	0.07	0.0004*	< 0.0001*
<i>Wolbachia</i> (3)	1	0.792	0.37	0.71	0.76	0.77	0.39
block (4)	1	11.604	< 0.0001*	0.01*	0.004*	0.82	0.22
interactions							
(1) × (2)	3	4.192	0.007*	-	-	-	-
(1) × (3)	3	0.133	0.94	-	-	-	-
(2) × (3)	1	3.011	0.08	0.73	0.03	< 0.0001*	0.61
(1) × (4)	3	2.227	0.08	-	-	-	-
(2) × (4)	1	0.156	0.69	0.61	0.29	0.97	0.77
(3) × (4)	1	0.209	0.65	0.78	0.49	0.2	0.42
(1) × (2) × (3)	3	8.562	< 0.0001*	-	-	-	-
(1) × (2) × (4)	3	0.416	0.741	-	-	-	-
(1) × (3) × (4)	3	0.809	0.49	-	-	-	-
(2) × (3) × (4)	1	7.778	0.006*	0.53	0.31	< 0.0001*	0.57
(1) × (2) × (3) × (4)	3	4.191	0.007*	-	-	-	-
residuals	191						

Parasitism rate

The parasitism rate varied significantly among *Drosophila* nuclear backgrounds and showed significant interactions, most of them involving *Wolbachia* presence/absence (Figure 2b; Table 3). The analysis per *Drosophila* nuclear background revealed a significant virus-by-*Wolbachia* interaction term ($F_{1,48} = 8.45$; $P = 0.006$) once again restricted to CO flies. Further analysis of this interaction showed that the only significant difference is detected in virus-

infected parasitoid that parasitized more *wAu*-free CO larvaethan *wAu*-infected larvae (Tukey's honest significance test, $P = 0.03$). As for the successful encapsulation rate, this pattern depended on a complex interaction with the temporal block effect (Table 3).

Parasitoid developmental success

Analysis of the parasitoid developmental success revealed that all additive effects were significant and complex significant interactions occurred between them (Figure 2c; Table 3). Parasitoids exhibited variable survivals depending on the *Drosophila* nuclear background, with highest parasitoid mortality observed in CO flies. The virus infection had an overall negative effect on parasitoid developmental success (Figure 2c; Table 3), although the decrease was only significant in YW-BNE flies ($F_{1,52} = 18.12$; $P < 0.0001$). *Wolbachia* presence also decreased the parasitoid developmental success but was in strong interaction with the other variables (Figure 2c; Table 3). Infection with *wAu* again showed a clear effect. The presence of the *wAu*-infection decreased the parasitoid developmental success in CO flies ($F_{1,48} = 14.11$; $P < 0.0001$). This strong effect most likely drives the observed overall difference between *Wolbachia*-cured and infected flies, as suggested by the analysis excluding data from CO flies. In this analysis, the *Wolbachia* effect disappeared ($F_{1,143} = 0.51$; $P = 0.47$) but the *Drosophila* nuclear background effect persisted ($F_{2,143} = 7.65$; $P = 0.0007$).

Parasitoid fitness

The number of parasitoid offspring varied according to *Drosophila* nuclear background (Figure 3a; Table 3). This is partly due to the much lower natural survival of *D. simulans* larvae compared to *D. melanogaster* as observed in control vials without parasitoids (YW-BNE: 82%; *w*¹¹¹⁸: 83.2%; CO: 66.7%; DSR: 44%; nuclear background effect: $F_{3,72} = 182.12$; $P < 0.0001$). *Wolbachia* presence also had a slight negative effect on the number of parasitoid offspring (Figure 3a; Table 3) but the analysis showed a highly significant interaction with the *Drosophila* nuclear background. This interaction suggests that the overall *Wolbachia* effect was the consequence of a strong negative influence of *wAu* in CO flies ($F_{1,48} = 17.88$; $P = 0.0001$). Indeed, further analysis excluding data from CO flies revealed no significant *Wolbachia* effect ($F_{1,143} = 0.0013$; $P = 0.97$). Both virus-infected and virus-free parasitoids produced a similar number of offspring (Figure 3a; Table 3).

Drosophila relative survival depended on the flies' nuclear background, viral infection status and the temporal block, with many significant interactions between these factors (Figure 3b; Table 3). The virus negatively affected *Drosophila* survival, which was consistent with the lower successful encapsulation rate of virus-infected parasitoids. Analysis per nuclear background showed that a decrease of the relative survival rate due to virus infection was only significant in CO ($F_{1,48} = 21.43$; $P < 0.0001$) and DSR flies ($F_{1,41} = 9.66$; $P = 0.003$) though only a non-significant similar trend was observed in YW-BNE and w^{1118} ($F_{1,50} = 3.95$; $P = 0.052$ and $F_{1,50} = 3.84$; $P = 0.056$ respectively). No *Wolbachia* effect was detected in YW-BNE ($F_{1,52} = 1.56$; $P = 0.22$), w^{1118} ($F_{1,50} = 1.94$; $P = 0.17$) nor DSR ($F_{1,41} = 1.87$; $P = 0.18$). wAu infection, however, increased the survival of CO flies ($F_{1,48} = 7.08$; $P < 0.01$) with a significant virus-by-*Wolbachia* interaction ($F_{1,48} = 29.18$; $P < 0.0001$). Analysis of this interaction revealed that wAu had no effect when CO flies were exposed to virus-free parasitoids (Tukey's honest significance test, $P = 0.61$). In contrast, wAu -free flies had a lower survival than wAu -infected flies when exposed to virus-infected parasitoids (Tukey's honest significance test, $P = 0.001$). Note that, once again, this virus-by-*Wolbachia* interaction depended on the temporal block effect (Table 3).

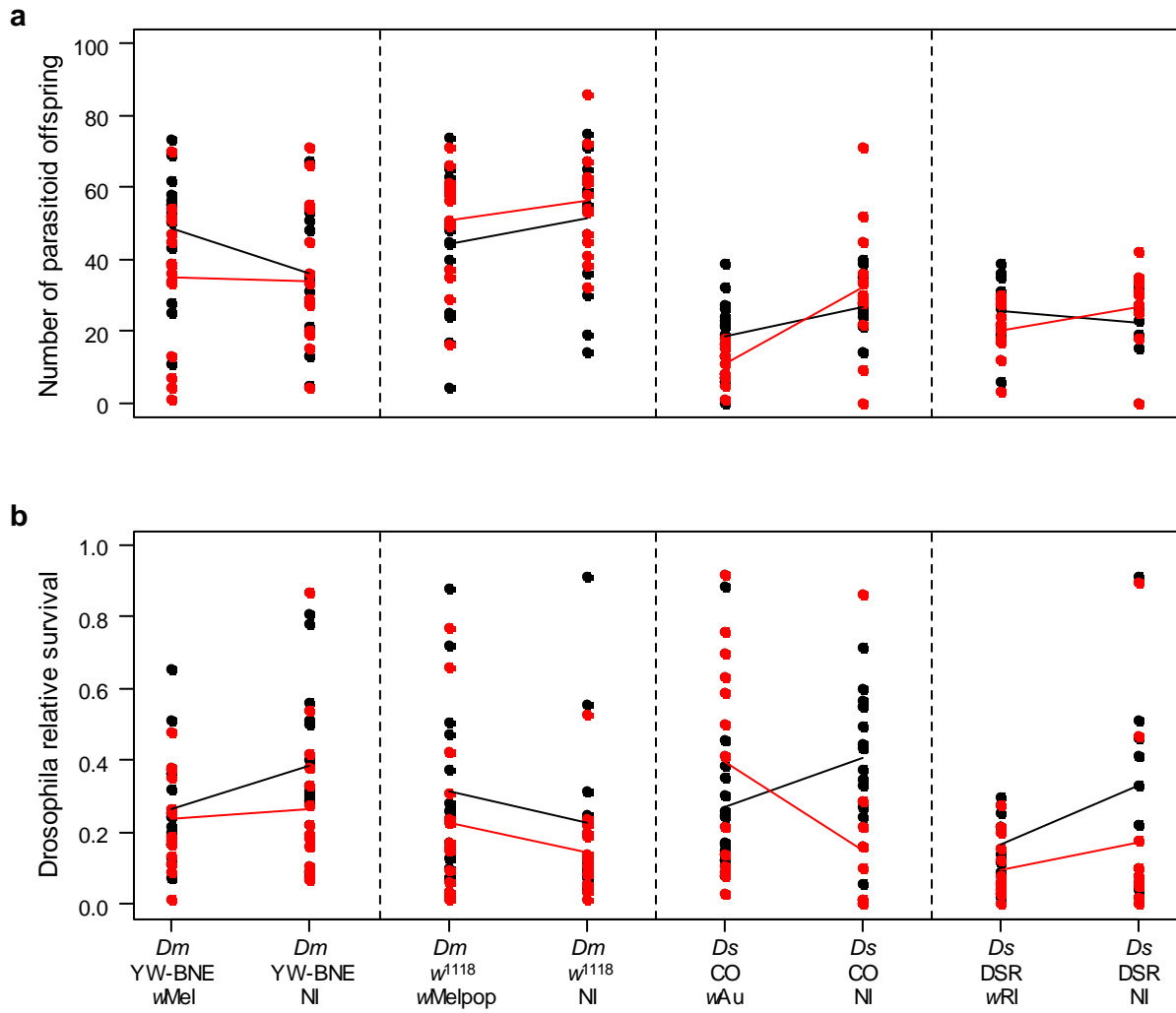


Figure 3. (a) Number of parasitoid offspring and (b) *Drosophila* relative survival under different *Drosophila* nuclear backgrounds, *Wolbachia* and virus infection statuses (experiment 1). Red data points for virus-infected, black for virus-free parasitoids. (*Dm*) for *D. melanogaster* and (*Ds*) for *D. simulans*. (NI) stands for Not Infected and indicates *Wolbachia*-cured *Drosophila* lines.

Table 3. Analysis of variance of the life-history traits investigated. Prior to statistical analysis, parasitism rate was arcsine square root-transformed, parasitoid developmental success was square-transformed, number of parasitoids was square root-transformed and *Drosophila* relative survival was log-transformed (experiment 1). (*) indicates significant effect. Level of significance is $\alpha = 5\%$.

	df	Parasitism rate		Parasitoid developmental success		Number of parasitoid offspring		<i>Drosophila</i> relative survival	
		F	P	F	P	F	P	F	P
<i>Drosophila</i> nuclear background (1)	3	5.778	< 0.0001*	20.86	< 0.0001*	36.073	< 0.0001*	8.536	< 0.0001*
virus (2)	1	3.72	0.06	13.655	0.0003*	0.847	0.36	32.405	< 0.0001*
<i>Wolbachia</i> (3)	1	0.007	0.94	7.838	0.006*	4.09	0.04*	0.436	0.51
block (4)	1	1.765	0.19	12.666	0.0004*	1.652	0.2	9.426	0.002*
Interactions									
(1) × (2)	3	0.191	0.9	3.376	0.02*	1.961	0.12	1.517	0.21
(1) × (3)	3	4.688	0.003*	3.901	0.01*	5.516	0.001*	3.825	0.01*
(2) × (3)	1	6.797	0.01*	0.002	0.96	3.279	0.07	8.337	0.004*
(1) × (4)	3	1.283	0.28	2.909	0.04*	0.604	0.61	0.356	0.78
(2) × (4)	1	3.276	0.07	6.493	0.01*	0.096	0.76	4.155	0.04*
(3) × (4)	1	11.164	0.001*	4.596	0.03*	1.76	0.19	16.165	< 0.0001*
(1) × (2) × (3)	3	1.437	0.23	1.428	0.24	0.581	0.63	5.018	0.002*
(1) × (2) × (4)	3	2.91	0.04*	5.946	< 0.0001*	6.741	0.0002*	3.734	0.01*
(1) × (3) × (4)	3	0.355	0.79	8.299	< 0.0001*	0.665	0.574	1.082	0.36
(2) × (3) × (4)	1	3.481	0.06	1.276	0.26	0.003	0.95	11.463	0.0009*
(1) × (2) × (3) × (4)	3	4.079	0.008*	0.775	0.51	0.635	0.59	6.653	0.0003*
Residuals	191								

Encapsulation rates at larval and adult stages in cured DSR flies

As the virus modifies the way females distribute their eggs among *Drosophila* larvae, we tried to distinguish between direct and indirect effects of the virus on encapsulation using the cured DSR *Drosophila* line. Measures on adult flies confirmed the result from experiment

1: virus-infected parasitoids are less often successfully encapsulated than virus-free parasitoids (Figure 4b & d; $F_{1,75} = 15.3$; $P < 0.0001$). There was also a high variability between experiments 2.1 (low larval density) and 2.2 (high larval density) with a significantly lower successful encapsulation rate in experiment 2.2 ($F_{1,75} = 38.18$; $P < 0.0001$).

Under these experimental conditions, virus-infected parasitoids had a substantial superparasitism rate ($\approx 61\%$ and 30% for low and high larval density respectively) as did uninfected ones ($\approx 30\%$ and 26% for low and high larval density respectively). In low larval density conditions (experiment 2.1), virus-infected parasitoids superparasitized more often than virus-free parasitoids ($\chi_i^2 = 15.86$; $df = 1$; $P < 0.0001$). That difference was not significant under high larval density conditions (experiment 2.2) ($\chi_i^2 = 0.26$; $df = 1$; $P = 0.30$).

Larval encapsulation rate was lower for virus-infected parasitoids, consistent with variations of the successful encapsulation rate. This difference involved both a direct and an indirect effect of the virus (Figure 4a & c; Table 4). Analysis of monoparasitized *Drosophila* larvae demonstrated a direct effect of the virus, with infected parasitoids being encapsulated 11.8% less often than uninfected ones ($Dev = 5.34$; $df = 1$; $P = 0.02$). Additionally, monoparasitized larvae encapsulated all parasitoids 11.7% more often than superparasitized larvae (Table 4).

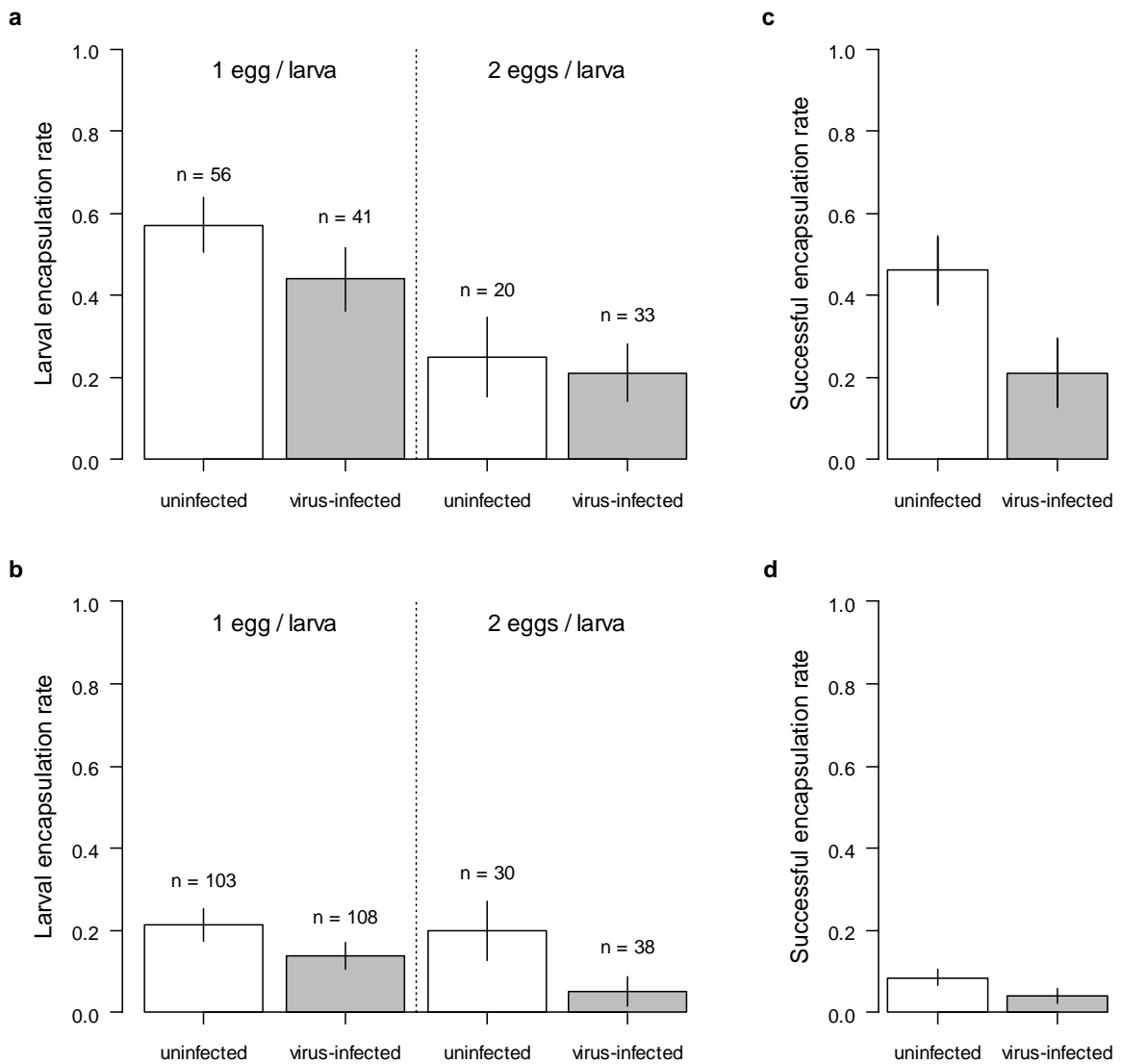


Figure 4. Encapsulation rates in cured DSR flies in (top) experiment 2.1 (low larval density) and (bottom) experiment 2.2 (high larval density). (a & c) Larval encapsulation rate and (c and d) Successful encapsulation rate with “n” giving the number of dissected larvae and vertical segments standing for standard errors.

Table 4. Generalized linear model for the larval encapsulation rate in cured DSR flies of experiments 2.1 (low larval density) and 2.2 (high larval density). (*) indicates a significant effect. Level of significance is $\alpha = 5\%$.

	df	Deviance	<i>P</i>
Virus	1	8.297	0.004*
Superparasitism	1	5.6	0.02*
Experiment	1	35.833	< 0.0001*
Interactions			
virus × superparasitism	1	0.234	0.63
virus × experiment	1	0.281	0.59
superparasitism × experiment	1	1.617	0.2
virus × superparasitism × experiment	1	1.182	0.28

Discussion

Drosophila hosts can suffer high mortality rates due to parasitoid attacks (Fleury et al. 2004; Patot et al. 2010). As a consequence, resistance against parasitoids should be strongly selected for, and encapsulation is one very common host defensive strategy (Carton and Nappi 2001). The expression of resistance is however affected by various factors such as host genotype-by-parasitoid genotype interactions (Dupas et al. 2003; Dubuffet et al. 2007) or competition for resources (Kraaijeveld et al. 2001). The influence of bacterial symbionts on encapsulation was only recently investigated (Fytrou et al. 2006; Xie et al. 2010). Here, we tested the effect of two symbionts on the outcome of the interaction between several *Drosophila* nuclear backgrounds and the parasitoid *Leptopilina boulardi*. We demonstrated that the behavior-manipulating virus LbFV of the wasp can interplay with the *Drosophila*'s immune reaction by increasing the virulence of the parasitoid. Additionally, the *Wolbachia* strain *wAu* also affected the encapsulation rate in CO flies, however, the direction of this effect depended on the parasitoid's infection status and was not observed with any of the other *Wolbachia* strains tested.

In a first experiment, we tested the effect of LbFV and *Wolbachia* across different *Drosophila* nuclear backgrounds. *Drosophila* parasitized by virus-infected parasitoids had a lower successful encapsulation rate. This trend was consistent for all four *Drosophila* nuclear backgrounds tested but only significant in the *D. simulans* CO and DSR backgrounds. The

non-significant trend in YW-BNE and w^{1118} possibly results from a low statistical power due to the overall low encapsulation rate rather than a true absence of virus effect.

In a second set of experiments using *Wolbachia*-cured DSR flies as hosts, we tested whether this virus effect is caused by a direct effect on the encapsulation or by an indirect effect of the increased tendency to superparasitize of virus-infected females. Considering that encapsulation is a costly physiological process, we should expect that flies would not encapsulate more than a few parasitoids. Thus, the higher the superparasitism rate is, the lower the encapsulation rate should be. Dissections of larvae showed that the successful encapsulation rate variation was indeed partly explained by the occurrence of superparasitism. Superparasitized larvae often failed to encapsulate all parasitoids whereas monoparasitized larvae succeeded more frequently, a result that is consistent with earlier studies. In *Spodoptera littoralis* exposed to superparasitism by *Microplitis rufiventris*, a decrease in both cellular (encapsulation) and humoral response efficiencies was demonstrated. In another study (Giordanengo and Nenon 1990), a negative relationship between successful encapsulation in *Phenacoccus manihoti* and superparasitism by *Epidinocarsis lopezi* was reported.

In addition to this indirect effect of the virus on encapsulation rate through the induction of superparasitism, we also demonstrated a significant direct effect of the virus. In monoparasitized larvae, the presence of LbFV was associated with a decrease in larval encapsulation rate. The mechanism responsible for this protection, yet unknown, could involve either a virus-driven immune suppression as observed with polydnviruses (Beckage 1998) or an evasion of the immune system (Asgari et al. 1998; Kinuthia et al. 1999). Another possibility is that the virus may also somehow improve the parasitoid embryos' quality and therefore their survival.

Whereas the direct protective effect of the virus is clearly advantageous for the parasitoid, the fitness reward from the indirect effect of superparasitism is unclear. In our experiment, one single female was put in each treatment vial, therefore females could directly benefit from self-superparasitism. In nature, however, conspecific-superparasitism is likely to be much more frequent than self-superparasitism. In such conditions, it is unknown if the superparasitizing female would benefit from the protective effect offered by superparasitism since this would depend on the outcome of the within-*Drosophila* competition between parasitoid larvae. To clarify this issue, the model developed by Gandon *et al.* (2006), which predicted the evolutionarily stable strategy regarding superparasitism both for the virus and the parasitoid, could be extended to include this potential benefit of superparasitism for the parasitoid.

A positive effect of *Wolbachia* on the successful encapsulation rate was expected, at least for w^{Mel} and w^{MelPop} since these strains previously proved to increase hemolymph

melanization, a key reaction involved in encapsulation, in both *D. melanogaster* and *D. simulans* (Thomas et al. 2011b). No effect was however detected for *wMel*, *wMelPop* nor *wRi*. Fytrou *et al.* (2006) found that *wRi*-infected DSR flies were less efficient in encapsulating the parasitoid *Leptopilina heterotoma*. Their results differ from our findings on the similar DSR *Drosophila* line, and indicate that the final outcome of host-parasitoid interactions also depends on the parasitoid species (*L. boulandi* in our case) and its infection status. Interestingly, we found an effect of *wAu* which globally decreased encapsulation in CO flies but with a complex interaction with the viral infection status. The encapsulation rate decreased with *wAu* against virus-free parasitoids whereas the opposite trend was observed against virus-infected parasitoids. Despite a strong effect of the temporal block, the slight increase in the encapsulation rate of virus-infected parasitoids suggests that a *wAu*-mediated protection could be activated in presence of LbFV. This is consistent with the strong antiviral protection of *wAu* in CO flies, allowing resistance against the RNA virus DCV (Osborne et al. 2009). However, we did not find the effect on encapsulation for the other *Wolbachia* strains tested, although protection has also been demonstrated for strains belonging to the *wMel* group (*wMel* in *w¹¹¹⁸* flies, *wMelCS* in ORC flies, *wMelPop* in *w¹¹¹⁸* flies) as well as *wRi* in DSR flies (Hedges et al. 2008; Teixeira et al. 2008; Osborne et al. 2009).

The other fitness-related traits tested for were also affected by the presence of one or both symbionts. In CO flies, virus-infected parasitoids parasitized more the *Wolbachia*-free than the *Wolbachia*-infected larvae, whereas virus-free parasitoids displayed a similar parasitism rate whatever the infection status of CO flies. Parasitism rate is determined by (i) the ability of parasitoids to locate *Drosophila* larvae, (ii) the parasitoid's egg-laying preferences and (iii) the *Drosophila* larvae's ability to avoid parasitoid detection. Further investigations should determine to which extent each of these processes are involved in the observed variations of parasitism rate in CO flies. However, this *wAu* effect strongly varied between the temporal blocks and might only be due to a high environmental stochasticity influencing the parasitism rate.

The parasitoid developmental success was negatively affected by the virus. This virus effect is either due to a direct effect of the physiological cost of infection or to an indirect effect for infected parasitoids. Indeed, virus-infected parasitoids are expected to develop more frequently in superparasitized larvae and must cope with an intense competition. Parasitoid developmental success was also negatively affected by *Wolbachia* infection in CO flies, for both uninfected and virus-infected parasitoids. *wAu* is thus costly for the parasitoid, but this effect does not positively influence the *Drosophila*'s fitness. Indeed, the parasitoid developmental success concerns *Drosophila* larvae that failed to encapsulate the parasitoid and that are condemned to death (see Figure 1).

Overall, virus-infected and uninfected parasitoids produced similar number of offspring, and therefore have similar fitness in all tested host-parasitoid combinations. Therefore, the virus partly compensates its cost on the parasitoid developmental success by decreasing the successful encapsulation rate. *Wolbachia* did not affect *Drosophila*'s fitness except for CO flies where the relative *Drosophila* survival showed a strong virus-by-*Wolbachia* interaction. Indeed, *Wolbachia*-free CO flies suffered more from virus-infected parasitoid attacks than *wAu*-infected flies did. This effect is likely the result of the lower parasitism rate and the higher successful encapsulation rate in *Wolbachia*-infected CO flies which are thus at an advantage compared to *Wolbachia*-free CO flies when exposed to virus-infected parasitoid. Therefore, *wAu* might have a positive fitness effect on its *Drosophila* host in the case where most of the parasitoids from the population are infected by the virus. A previous study had unsuccessfully attempted to explain the spread and maintenance of *wAu* into Australian *Drosophila* populations (Hoffmann et al. 1996). The *wAu* effect on *Drosophila* survival attacked by virus-infected parasitoids, via an effect on encapsulation and parasitism rate, that we describe in the present study may be a first step to the understanding of *wAu*'s success in natural populations without manipulating the host reproductive system. Benefit from *wAu* would, however, require LbFV-infected parasitoids to be sympatric with *D. simulans* in Australia, a situation that has not yet been confirmed.

No fitness advantage of *Wolbachia* infection was observed for the three other *Wolbachia* strains tested. *wRi* shows a very high level of cytoplasmic incompatibility (CI), a sufficient explanation for its widespread distribution (Turelli and Hoffmann 1995). *wMel*, in comparison, induces only low CI and exhibits highly variable prevalence throughout Australia. In a previous study (Harcombe and Hoffmann 2004), the case of *wMel* was investigated but no direct benefit conferred by the strain was identified, suggesting that it might provide protection against natural enemies. Our results do not support this hypothesis. Concerning *wMelPop*, its origin is unknown since this strain has only been found in a laboratory stock (Min and Benzer 1997). This strain displays CI in addition to a pathogenic phenotype reducing the insect lifespan in laboratory. It is therefore unknown how and if this strain could be maintained in natural populations.

In conclusion, our data confirm that symbionts in hosts and parasitoids contribute to variation in extremely important phenotypes such as resistance and virulence, in addition to classical nuclear factors (Dupas et al. 1998; Dupas et al. 2003). Results also encourage reconsidering the cost-benefit balance of LbFV infection for *L. bouhardi*. A virus-induced increase in *L. bouhardi*'s virulence might depict an ongoing evolution towards a mutualistic association between the virus and the parasitoid, similar to what is believed to have occurred between ancestral polydnaviruses and their wasp carriers (Bezier et al. 2009). From the host

side, we found that *Wolbachia* might not only be a reproductive parasite in arthropods, but may as well contribute to variation of traits involved in host-parasitoid interactions. Because symbionts benefit from vertical transmission, they produce heritable variation on which natural selection can act and directly contribute to the adaptation of their host. As such, there is a crucial need to view infections by so-called parasites in a broader ecological context by considering several life-history traits of their hosts and their interactions with other species within the community (Sternberg et al. 2011). Furthermore, we should also take them into account as a potential force shaping this community (Ferrari & Vavre, 2010).

Acknowledgments

We thank Dr. I. Iturbe-Ormaetxe, Dr. J. Brownlie and Dr. E.A. McGraw for constructive discussions and Yi San for help with establishment of the cured *Drosophila* lines. Financial supports were provided by Prof. O'Neill's Australian Research Council grant (DP0772992) and by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS 5558).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JM AD FV JV. Performed the experiments: JM AD. Analyzed the data: JM AD. Wrote the paper: JM AD MW FV SLO JV.

References

- 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.
- Beckage, N.E. 1998. Modulation of immune responses to parasitoids by polydnaviruses. *Parasitology***116**: S57-S64.
- Bézier, A., Annaheim, M., Herbiniere, J., Wetterwald, C., Gyapay, G., Bernard-Samain, S., Wincker, P., Roditi, I., Heller, M., Belghazi, M., Pfister-Wilhem, R., Periquet, G., Dupuy, C., Huguet, E., Volkoff, A.N., Lanzrein, B. & Drezen, J.M. 2009. Polydnaviruses of Braconid Wasps Derive from an Ancestral Nudivirus. *Science***323**: 926-930.
- Carton, Y. & Nappi, A.J. 1997. *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today***13**: 218-227.
- Carton, Y. & Nappi, A.J. 2001. Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics***52**: 157-164.

- David, J. 1962. A new medium for rearing *Drosophila* in axenic condition. *Drosophila Information Service***36**: 128.
- Drezen, J.M., Bezier, A., Lesobre, J., Huguet, E., Dupuy, C. & Medimond 2006. Virulence genes of parasitoid wasps encoded by symbiotic viruses. In: *ICOPA XI: Proceedings of the 11th International Congress of Parasitology*, pp. 59-64. Medimond S R L, 40128 Bologna.
- Dubuffet, A., Dupas, S., Frey, F., Drezen, J.M., Poirié, M. & Carton, Y. 2007. Genetic interactions between the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* and its *Drosophila* hosts. *Heredity***98**: 21-27.
- Dupas, S., Frey, F. & Carton, Y. 1998. A single parasitoid segregating factor controls immune suppression in *Drosophila*. *Journal of Heredity***89**: 306-311.
- Dupas, S., Carton, Y. & Poirie, M. 2003. Genetic dimension of the coevolution of virulence-resistance in *Drosophila* - parasitoid wasp relationships. *Heredity***90**: 84-89.
- Ferrari, J., and F. Vavre. 2011. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences***366**: 1389-1400.
- Fleury, F., Ris, N., Allemand, R., Fouillet, P., Carton, Y. & Boulétreau, M. 2004. Ecological and genetic interactions in *Drosophila*-parasitoids communities: a case study with *D. melanogaster*, *D. simulans* and their common *Leptopilina* parasitoids in south-eastern France. *Genetica***120**: 181-194.
- Fytrou, A., Schofield, P.G., Kraaijeveld, A.R. & Hubbard, S.F. 2006. *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences***273**: 791-796.
- Gandon, S., Rivero, A. & Varaldi, J. 2006. Superparasitism evolution: Adaptation or manipulation? *American Naturalist***167**: E1-E22.
- Gilbert, S.F., McDonald, E., Boyle, N., Buttino, N., Gyi, L., Mai, M., Prakash, N. & Robinson, J. 2010. Symbiosis as a source of selectable epigenetic variation: taking the heat for the big guy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences***365**: 671-678.
- Giordanengo, P. & Nenon, J.P. 1990. Melanization and encapsulation of eggs and larvae of *Epidinocarsis lopezi* by its host *Phenacoccus manihoti* - Effects of superparasitism and egg-laying patterns. *Entomologia Experimentalis Et Applicata***56**: 155-163.
- Goodrich-Blair, H. & Clarke, D.J. 2007. Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular Microbiology***64**: 260-268.
- Harcombe, W. & Hoffmann, A.A. 2004. *Wolbachia* effects in *Drosophila melanogaster*: in search of fitness benefits. *Journal of Invertebrate Pathology***87**: 45-50.
- Hedges, L., Brownlie, J., O'Neill, S. & Johnson, K. 2008. *Wolbachia* and Virus Protection in Insects. *Science***322**: 702.
- Hegazi, E. & Khafagi, W. 2008. The effects of host age and superparasitism by the parasitoid, *Microplitis rufiventris* on the cellular and humoral immune response of *Spodoptera littoralis* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology***98**: 79-84.
- Hoffmann, A.A., Clancy, D. & Duncan, J. 1996. Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity***76**: 1-8.
- Hughes, G.L., Koga, R., Xue, P., Fukatsu, T. & Rasgon, J.L. 2011. *Wolbachia* Infections Are Virulent and Inhibit the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* in *Anopheles Gambiae*. *Plos Pathogens***7**: 8.
- 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.
- Kambris, Z., Cook, P.E., Phuc, H.K. & Sinkins, S.P. 2009. Immune Activation by Life-Shortening *Wolbachia* and Reduced Filial Competence in Mosquitoes. *Science***326**: 134-136.

- Kinuthia, W., Li, D.M., Schmidt, O. & Theopold, U. 1999. Is the surface of endoparasitic wasp eggs and larvae covered by a limited coagulation reaction? *Journal of Insect Physiology***45**: 501-506.
- Kraaijeveld, A.R., Limentani, E.C. & Godfray, H.C.J. 2001. Basis of the trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences***268**: 259-261.
- Mercot, H. & Charlat, S. 2004. *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. *Genetica***120**: 51-59.
- Min, K.T. & 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.
- Moran, N. 2007. Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *PNAS***104**: 8627-8633.
- Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G.J., Pyke, A.T., Hedges, L.M., Rocha, B.C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L.E., Johnson, K.N., Kay, B.H., McGraw, E.A., van den Hurk, A.F., Ryan, P.A. & O'Neill, S.L. 2009. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell***139**: 1268-1278.
- Oliver, K., Russell, J., Moran, N. & Hunter, M. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *PNAS***100**: 1803-1807.
- Oliver, K.M., Degan, 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.
- Osborne, S.E., Leong, Y.S., O'Neill, S.L. & Johnson, K.N. 2009. Variation in Antiviral Protection Mediated by Different *Wolbachia* Strains in *Drosophila simulans*. *Plos Pathogens***5**: 9.
- Patot, S., Lepetit, D., Charif, D., Varaldi, J. & Fleury, F. 2009. Molecular Detection, Penetrance, and Transmission of an Inherited Virus Responsible for Behavioral Manipulation of an Insect Parasitoid. *Applier and Environmental Microbiology***75**: 703-710.
- Patot, S., Martinez, J., Allemand, R., Gandon, S., Varaldi, J. & Fleury, F. 2010. Prevalence of a virus inducing behavioural manipulation near species range border. *Molecular Ecology***19**: 2995-3007.
- Renault, S., Stasiak, K., Federici, B. & Bigot, Y. 2005. Commensal and mutualistic relationships of reoviruses with their parasitoid wasp hosts. *Journal of Insect Physiology***51**: 137-148.
- Scarborough, C.L., Ferrari, J. & Godfray, H.C.J. 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science***310**: 1781-1781.
- Schneider, D.S. & Chambers, M.C. 2008. Rogue Insect Immunity. *Science***322**: 1199-1200.
- Stasiak, K., Renault, S., Federici, B.A. & Bigot, Y. 2005. Characteristics of pathogenic and mutualistic relationships of ascoviruses in field populations of parasitoid wasps. *Journal of Insect Physiology***51**: 103-115.
- Sternberg, E.D., Lefèvre, T., Rawstern, A.H. & de Roode, J.C. 2011. A virulent parasite can provide protection against a lethal parasitoid. *Infection, Genetics and Evolution***11**: 399-406.
- Teixeira, L., Ferreira, A. & Ashburner, M. 2008. The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. *Plos Biology***6**: 2753-2763.
- Thomas, P., Kenny, N., Eyles, D., Moreira, L.A., O'Neill, S.L. & Asgari, S. 2011. Infection with the wMel and wMelPop strains of *Wolbachia* leads to higher levels of melanization in the hemolymph of *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans* and *Aedes aegypti*. *Developmental and Comparative Immunology***35**: 360-365.

- Turelli, M. & Hoffmann, A.A. 1995. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans* - Dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics***140**: 1319-1338.
- Varaldi, J., Fouillet, P., Ravallec, M., Lopez-Ferber, M., Boulétreau, M. & Fleury, F. 2003. Infectious Behavior in a Parasitoid. *Science***302**: 1930.
- Varaldi, J., Ravallec, M., Labrosse, C., Lopez-Ferber, M., Boulétreau, M. & Fleury, F. 2006. Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Journal of Insect Physiology***52**: 1202-1212.
- Volkoff, A.N., Jouan, V., Urbach, S., Samain, S., Bergoin, M., Wincker, P., Demetree, E., Cousserans, F., Provost, B., Coulibaly, F., Legeai, F., Beliveau, C., Cusson, M., Gyapay, G. & Drezen, J.M. 2010. Analysis of Virion Structural Components Reveals Vestiges of the Ancestral Ichnovirus Genome. *Plos Pathogens***6**: 10.
- Vorburger, C., Sandrock, C., Gousskov, A., Castaneda, L.E. & Ferrari, J. 2009. Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all-parthenogenetic host-parasitoid interaction. *Evolution***63**: 1439-1450.
- Vorburger, C., Gehrler, L. & Rodriguez, P. 2010. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biology Letters***6**: 109-111.
- Xie, J.L., Vilchez, I. & Mateos, M. 2010. Spiroplasma Bacteria Enhance Survival of *Drosophila hydei* Attacked by the Parasitic Wasp *Leptopilina heterotoma*. *Plos One***5**: 7.
- Zhou, W.G., Rousset, F. & O'Neill, S. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences***265**: 509-515.
- R Development Core Team. 2005. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.

Discussion générale

Discussion générale

Ce travail de thèse s'inscrit dans le cadre de l'influence des symbiotes sur l'expression du phénotype de leur hôte et plus généralement dans le contexte de l'évolution des associations symbiotiques. Les symbiotes apparaissent aujourd'hui comme une composante majeure de l'évolution des organismes. Ils représentent une « valeur ajoutée » génétique qui contribue à la variabilité phénotypique des populations. Comprendre l'influence des symbiotes sur l'expression du phénotype est donc une étape nécessaire dans l'étude des causes ultimes de l'adaptation des organismes.

Ce travail de thèse a permis de mieux cerner les facteurs génétiques et environnementaux capables d'influencer l'expression et l'évolution du phénotype étendu issu de l'interaction entre un parasitoïde et deux virus héréditaires. Nous avons d'abord mis en évidence la contribution du génotype de l'insecte dans l'expression de la manipulation comportementale induite par LbFV, suggérant un potentiel d'évolution vers la résistance à la manipulation. Dans une expérience d'évolution expérimentale, nous avons vu que ce polymorphisme offrait néanmoins peu de prise à la sélection, en tout cas dans les conditions de l'expérience menée. Parallèlement, l'étude des infections multiples a montré que d'une part l'infection par LbFV entraîne un effet « vaccin » vis-à-vis des autres souches de LbFV, mais que d'autre part des multi-infections sont fréquemment générées, créant un contexte favorable à la compétition intra-hôte et à la non-coopération des souches virales dans l'effort de manipulation du parasitoïde. De plus, la découverte d'un nouveau virus à ARN, LbTV, affectant positivement la fitness des femelles parasitoïdes ajoute une composante supplémentaire à la complexité du compartiment symbiotique et à l'expression du phénotype étendu chez *L. bouhardi*. Sa présence en condition de coinfection avec LbFV pose en outre de nouvelles questions sur les interactions entre symbiotes. Enfin, nous avons vu que la contribution de LbFV dans l'expression du phénotype de *L. bouhardi* ne s'arrête pas à la manipulation comportementale mais influence également de manière directe et indirecte la virulence du parasitoïde vis-à-vis de son hôte drosophile.

En intégrant dans un cadre plus général les principaux résultats obtenus au cours de ce travail, je chercherai à souligner l'apport de cette étude pour la compréhension des associations symbiotiques et leur évolution. Différentes perspectives pour l'étude du modèle *L. bouhardi*-virus et plus généralement des associations symbiotiques seront envisagées.

L'étude du phénotype étendu à une échelle micro-évolutive

Il est souvent observé des variations inter-individuelles entre hôtes parasités qui pourraient s'expliquer par des capacités de manipulation variables entre parasites et/ou des niveaux de susceptibilité à la manipulation variables entre les hôtes (Cézilly *et al.* 2005). Cependant, l'hypothèse de bases génétiques chez l'hôte ou le parasite à l'origine de ces différences n'est que rarement testée (Thomas *et al.* 2005). L'intensité de manipulation est la conséquence d'une longue histoire coévolutive entre partenaires symbiotiques. Pour autant, les gènes à l'origine de l'expression de la manipulation sont-ils fixés chez l'hôte et/ou le parasite ? Les populations des deux partenaires sont-elles encore capables de s'adapter à une échelle micro-évolutive, conduisant à des patrons d'adaptation locale ?

Le phénotype de superparasitisme induit par LbFV étant coûteux pour le parasitoïde, nous avons posé la question de la réponse du parasitoïde en recherchant la présence de résistance à la manipulation chez ce dernier. La prévalence de LbFV, et donc l'intensité des pressions de sélection exercées sur le parasitoïde étant très variables d'une population à l'autre (Patot *et al.* 2010, Annexe 1), nous avons tenté de voir si cette résistance pouvait varier à une échelle locale. Plusieurs lignées de parasitoïdes ont ainsi été échantillonnées dans cinq populations montrant des prévalences virales contrastées. Nous avons mis en évidence la contribution du génotype de *L. bouvardi* dans l'expression de la manipulation comportementale. La présence de ce polymorphisme chez le parasitoïde montre que la manipulation n'est pas le seul attribut du virus mais bien un trait partagé sur lequel le parasitoïde peut agir. De plus, ce polymorphisme a été détecté à une échelle intra-populationnelle, suggérant que la sélection naturelle pourrait agir sur l'expression de la manipulation à une échelle très locale. Cependant, aucune différenciation entre populations pour ce caractère n'a été détectée. Les résultats obtenus dans l'expérience d'évolution expérimentale (chapitre 3) suggèrent que la forte contribution des effets de l'environnement pourrait prévenir l'action de la sélection naturelle sur ce polymorphisme. Cependant, le faible effectif de parasitoïdes utilisé dans l'expérience pourrait avoir conduit à une forte dérive génétique empêchant l'action de la sélection. Il est possible que dans la nature, la taille des populations soit suffisante pour que le polymorphisme détecté offre une prise à la sélection.

Dans le chapitre 4, la contribution du génotype de LbFV aux variations de l'intensité de la manipulation a également été testée. La comparaison de plusieurs isolats

viraux issus de populations aux prévalences contrastées n'a pas révélé de différenciation génétique chez LbFV sur ce trait. Cependant, une étude sur un plus grands nombre d'isolats viraux serait nécessaire pour augmenter les chances de trouver du polymorphisme chez le virus.

Ainsi, aucun signe d'adaptation locale n'a été révélé chez le parasitoïde et le virus, bien que les fortes variations de la prévalence virale d'une population à l'autre offrent un contexte favorable à la différenciation génétique dans le système *L. boulandi*-LbFV. Il est possible que LbFV n'ait envahit les populations de *L. boulandi* que très récemment expliquant ainsi l'absence de réponse évolutive chez les deux partenaires. De plus, les données de terrain montrent une remontée rapide de *L. boulandi* vers le nord ces dix dernières années (Patot *et al.* 2010, Annexe 1). Ce résultat suggère que *L. boulandi* a une forte capacité de migration, ce qui pourrait prévenir la différenciation génétique des populations.

Jusqu'à présent, l'étude du polymorphisme dans les interactions hôte-parasite s'est principalement focalisée sur la coévolution antagoniste entre gènes de « virulence » (au sens « gènes d'infectivité ») chez le parasite et gènes de résistance à l'infection chez l'hôte (Ebert *et al.* 1998 ; Carius *et al.* 2001 ; Thrall *et al.* 2001 ; Gandon 2002 ; Agrawal & Lively 2002). Différents modèles d'interaction génétique ont ainsi été développés (Encart 1). Selon le type d'interaction entre gènes de virulence et gènes de résistance, la coévolution peut mener à différentes issues telles que la course aux armements ou encore le maintien du polymorphisme via des mécanismes de fréquence-dépendance (Ebert 2008). Par exemple, dans le modèle « gene-for-gene », un génotype parasite possède des gènes de virulence « universelle » lui permettant d'infecter la totalité des génotypes hôtes présents dans la population (Encart 1). En l'absence de coût associé à la virulence, la supériorité de ce génotype de parasite le conduit à envahir la population jusqu'à fixation des allèles de virulence. Les hôtes sont alors fortement sélectionnés pour résister à ce génotype parasite. Par mutation, un nouveau génotype hôte possédant une résistance au parasite « virulent » peut apparaître et envahir à son tour la population, induisant ainsi de fortes pressions de sélection chez les parasites et favorisant l'apparition de nouveaux gènes de virulence universelle. Cette course aux armements est ainsi entretenue par l'apparition régulière d'adaptations du parasite lui permettant d'infecter et de contre-adaptations de l'hôte lui permettant de résister. La présence de coûts associés à la résistance ou à la virulence peut toutefois contribuer à maintenir du polymorphisme chez l'hôte et le parasite. Dans le modèle « matching-alleles », l'infection requiert une complémentarité entre les gènes de virulence et les

gènes de résistance (Encart 1). Ainsi, un génotype parasite ne peut infecter qu'une partie des hôtes de la population et un génotype hôte ne peut résister qu'à une partie des parasites. Avec ce type d'interaction, les parasites capables d'infecter le génotype hôte le plus fréquent sont favorisés et, de manière similaire, les hôtes capables de résister au génotype parasite le plus fréquent sont avantagés. Ainsi, les génotypes hôtes et parasites les plus communs dans la population sont contre-sélectionnés, ce qui conduit à un mécanisme de sélection « balancée » par fréquence-dépendance négative, favorisant le maintien du polymorphisme chez les deux partenaires (Trotter & Spencer 2007).

Bien que ces modèles aient largement contribué à la compréhension des processus coévolutifs dans les interactions hôte-parasite, ils n'ont jamais été appliqués à l'évolution de la manipulation. Pourtant, lorsque l'infection ne peut être évitée, l'expression de la manipulation offre un terrain propice à la coévolution antagoniste (Poulin *et al.* 1994). Les travaux s'intéressant au polymorphisme d'expression de la manipulation sont encore peu nombreux alors qu'une part importante de la coévolution antagoniste entre hôtes et parasites pourrait se réaliser à travers l'expression du phénotype étendu (Lambrechts *et al.* 2006 ; Franceschi *et al.* 2010). De manière équivalente aux interactions génotype \times génotype entre gènes de « virulence » et gènes de résistance à l'infection, l'issue de l'interaction hôte-parasite sur l'expression de la manipulation pourrait dépendre de combinaisons spécifiques entre génotypes hôtes et génotypes parasites. Les modèles « gene-for-gene » et « matching-alleles » seraient dans ce cas des outils indispensables à la compréhension des mécanismes de coévolution entre gènes de manipulation et gènes de résistance à la manipulation.

Ainsi, la coévolution antagoniste peut se réaliser au niveau des processus d'infection mais également au niveau d'interactions plus fines comme l'expression de la manipulation. Une question qui reste en suspens est de savoir comment ces deux niveaux interagissent. Svensson & Råberg (2010) suggèrent que l'évolution de la résistance à l'infection pourrait prévenir l'évolution de la tolérance (résistance à la manipulation) et inversement. Ces deux réponses de l'hôte sont en effet redondantes vis-à-vis de la sélection puisque l'évolution d'une de ces réponses suffit à diminuer le coût induit par les parasites et donc l'intensité des pressions de sélection agissant sur l'autre type de réponse. De plus, il pourrait y avoir des contraintes génétiques ou trade-off entre traits de résistance et de tolérance à l'infection (Råberg *et al.* 2007), ce qui signifie qu'un hôte ne peut pas optimiser à la fois sa résistance et sa tolérance à l'infection. Ainsi l'interaction des deux niveaux de coévolution antagoniste

(résistance/tolérance) pourrait contribuer au maintien du polymorphisme dans les populations naturelles, favorisant ainsi les dynamiques coévolutives rapides.

Encart 1. Modèles d'interaction génétique dans les processus d'infection.

(a) gene-for-gene:

		parasite	
		A	V
hôte	S	infection	infection
	R	résistance	infection

Le génotype parasite « avirulent » (A) ne peut infecter que le génotype hôte « sensible » (S), alors que le génotype parasite « virulent » (V) infecte tout les types d'hôtes, y compris les hôtes « résistants » (R). Ce type d'interaction est fréquemment rencontré dans les interactions plantes-pathogènes (Flor 1956 ; Thompson & Burdon 1992).

(b) matching-alleles:

		parasite	
		P1	P2
hôte	H1	infection	résistance
	H2	résistance	infection

L'infection ne peut avoir lieu que lorsque les génotypes hôtes et parasites sont compatibles. Ce type d'interaction se base sur le mécanisme de reconnaissance du soi et du non-soi fréquemment observé chez les invertébrés (Grosberg & Hart 2000).

(c) inverse-matching-alleles:

		parasite	
		P1	P2
hôte	H1	résistance	infection
	H2	infection	résistance

L'infection ne peut avoir lieu que si les génotypes hôtes et parasites sont incompatibles. Ce type d'interaction reflète le mécanisme de reconnaissance spécifique du type anticorps/antigène rencontrés chez les hôtes vertébrés (Litman et al. 2010).

Polymorphisme et déterminants fonctionnels du phénotype étendu

L'étude de la variation génétique est une approche indispensable dans la recherche de bases fonctionnelles des caractères. Au même titre que la production de mutants de laboratoire permet d'identifier les gènes clés impliqués dans une fonction donnée, l'étude du polymorphisme dans les populations naturelles est une étape cruciale dans la recherche de gènes candidats impliqués dans l'expression du phénotype. De plus, comme ce polymorphisme est présent à l'état naturel, il reflète directement les

pressions de sélection auxquelles les organismes font face et peut donc directement être associé à des variations fonctionnelles. Par exemple, chez le parasitoïde *Asobara tabida*, la totalité des femelles sont infectées par la souche de *Wolbachia* Atab3 dont elles sont totalement dépendantes pour l'oogenèse (Dedeine *et al.* 2001). Cependant, lorsque la bactérie est éliminée par un traitement antibiotique, les femelles montrent différents degrés de dépendance, certaines ne produisant aucun œuf, d'autres produisant quelques œufs mais qui sont condamnés à avorter (Dedeine *et al.* 2005). Ces différences dans l'expression du phénotype en absence d'infection sont expliquées uniquement par un effet du génotype du parasitoïde (Kremer *et al.* 2010). Les auteurs ont ensuite étudié l'expression des gènes parmi les génotypes montrant des phénotypes ovariens contrastés. Ils ont ainsi pu démontrer que ce polymorphisme de dépendance à *Wolbachia* était corrélé à des différentiels d'expression de gènes impliqués dans la gestion du stress oxydatif. Ce résultat apporte de nouveaux éléments fonctionnels sur la manière dont *Wolbachia* manipule la physiologie de son hôte parasitoïde.

De la même façon, le polymorphisme de résistance à la manipulation révélé chez *L. bouhardi* au cours de mon travail de thèse, devrait permettre de mieux cibler les gènes impliqués dans la manipulation. Un projet de séquençage avec le Genoscope est actuellement en cours (<http://www.genoscope.fr/spip/LbFV-un-virus-qui-induit-le-super.html>). Il a pour objectif de séquencer le génome de LbFV mais aussi d'identifier ses mécanismes d'action sur le comportement du parasitoïde, en mesurant son impact sur l'expression des gènes de l'insecte. Dans un premier temps, l'obtention du génome viral et la comparaison des transcriptomes des lignées de référence NSref et Sref, respectivement non-infectée et infectée par LbFV, vont permettre d'obtenir une liste de gènes du parasitoïde différentiellement exprimés en présence du virus. Une étape importante de validation des gènes candidats potentiels par PCR quantitative sera alors nécessaire. Les gènes retenus comprendront probablement des gènes de l'immunité mais aussi les gènes impliqués dans la modification comportementale. Dans un deuxième temps, les transcriptomes des lignées hautement et faiblement manipulées, respectivement Av3 et Av12 caractérisées au cours de mon travail de thèse, seront comparés afin de réduire la liste de gènes candidats à ceux impliqués dans la manipulation. Parmi ces gènes, certains seront probablement directement impliqués dans l'expression du superparasitisme. L'identification de ces gènes a non seulement un intérêt fondamental pour comprendre les mécanismes de la manipulation mais également un intérêt appliqué car de nombreuses espèces de parasitoïdes sont utilisées comme agents de lutte biologique en agriculture (Sáenz-de-Cabezón *et al.* 2010). Le

superparasitisme conduit à une agrégation des pontes des parasitoïdes et donc à une diminution de leur efficacité parasitaire. Identifier les gènes du superparasitisme pourrait permettre à terme d'améliorer l'efficacité de lutte des parasitoïdes contre les ravageurs de culture, par le biais de manipulations génétiques.

Coopération et tricherie dans l'effort de manipulation

Lorsque plusieurs génotypes d'un même parasite infectent le même individu hôte, les génotypes ayant un fort taux de réplication intra-hôte sont avantagés du fait que les ressources de l'hôte sont limitées (Frank 1996). D'un autre côté, ces infections multiples génèrent un dilemme social puisque le bénéfice de la manipulation est partagé par tous les parasites se développant dans le même hôte et ayant un même mode de transmission. Sous l'hypothèse que la manipulation engendre un coût pour le parasite qui l'exprime, les infections multiples devraient favoriser des niveaux de manipulation faibles ou encore l'évolution de génotypes « tricheurs » (Brown *et al.* 2002). Nous avons vu dans le chapitre 5, que la transmission horizontale du virus permet à plusieurs souches de LbFV d'infecter un même parasitoïde. Si les événements de coinfection sont fréquents dans les populations de parasitoïdes, cela pourrait favoriser l'apparition de souches de LbFV non-manipulatrices et conduire à une faible intensité de manipulation à l'échelle du groupe de souches infectant le même parasitoïde. On peut s'attendre à ce que la prévalence virale soit positivement corrélée à la fréquence des coinfections. Ainsi les variations spatiales de la prévalence de LbFV pourraient conduire à une différenciation du pool génétique du virus sur l'intensité de la manipulation entre populations à faible et forte prévalence. Nous n'avons cependant pas détecté de telle différenciation entre isolats viraux issus de populations ayant des prévalences contrastées (chapitre 4). Cependant, nous avons mis en évidence une sorte d'effet « vaccin » puisque l'infection par une souche de LbFV protège partiellement de l'infection par d'autres souches. Cette protection devrait ainsi limiter l'influence des coinfections sur l'évolution de la manipulation. La fréquence des coinfections dans les populations naturelles de *L. bouhardi* reste toutefois à estimer de manière précise si l'on veut évaluer l'importance des pressions de sélection engendrées par ce type d'infections multiples.

Les associations avec des symbiotes manipulateurs sont en tout cas des modèles de choix pour étudier l'évolution de la coopération. Les hôtes représentent des environnements dans lesquels peuvent s'établir des interactions répétées entre souches

de parasites non-apparentées. Le fait que la manipulation du phénotype de l'hôte profite à l'ensemble des parasites présents au sein du même hôte génère un dilemme social dont la résolution peut conduire à l'absence de coopération et donc de manipulation. Un exemple classique de coopération est celui observé chez certaines amibes du genre *Dictyostelium* (Strassmann *et al.* 2000). Lorsque le milieu s'appauvrit, les amibes s'agglutinent pour former un pied surmonté d'une capsule sporifère. Seules les amibes présentes dans la capsule peuvent alors disperser et trouver un milieu plus favorable. Les amibes formant le pied n'ont aucun avenir reproducteur et font donc preuve d'altruisme. Plus le pied est long, plus les chances de dispersion sont grandes. Or, lorsque la structure est composée d'amibes non-apparentées, la longueur du pied est beaucoup plus courte, indiquant que les amibes coopèrent moins quand le bénéfice peut être exploité par des non-apparentés. De façon similaire, on peut imaginer que les symbiotes manipulateurs montrent des réponses conditionnelles à la coinfection en faisant varier leur effort de manipulation selon la présence/absence de compétiteurs.

Cependant, les études empiriques de l'influence des infections multiples sur la coopération entre parasites restent en nombre très limité par rapport au nombre d'études théoriques (Nowak & May 1994 ; May & Nowak 1995 ; van Baalen & Sabelis 1995 ; Gandon *et al.* 2002 ; Brown 1999 ; Vickery & Poulin 2010). De plus, la majorité des études, théoriques et empiriques, se sont intéressées aux traits de fitness des parasites ne dépendant pas d'actions collectives mais plutôt aux traits liés à la réplication intra-hôte des parasites (Davies *et al.* 2002 ; Hodgson *et al.* 2004 ; de Roode *et al.* 2005). Des travaux sur le crustacé *Daphnia magna* infecté par la bactérie castratrice *Pasteuria ramosa* ont montré qu'en situation de coinfection, les haplotypes les plus virulents produisent la majorité des stades infectants et sont donc avantagés (Ben-Ami *et al.* 2008). De plus, les hôtes coinfectés par deux haplotypes de la bactérie produisent plus de descendants que les hôtes infectés par un seul haplotype, indiquant que la castration est moins efficace en cas d'infection multiple. L'hypothèse avancée par les auteurs est que la compétition entre haplotypes s'accompagnerait d'un coût énergétique pour les bactéries empêchant ou ralentissant la castration de l'hôte. Un scénario alternatif pourrait être que les bactéries ont évolué une réponse conditionnelle à la coinfection en investissant moins dans l'effort de castration de l'hôte en cas de coinfection. Cette réponse conditionnelle permettrait ainsi de ne pas avantager les haplotypes non-apparentés.

Déceler une réelle stratégie de non-coopération dans l'effort de manipulation s'avère complexe et nécessite d'étudier en détail les mécanismes de compétition intra-

hôte. On sait notamment que le type de compétition pour les ressources (compétition par exploitation, par interférence, ou compétition apparente via le système immunitaire de l'hôte) affecte profondément la trajectoire évolutive de la virulence des parasites (Mideo 2009). Un autre moyen de tester l'effet des infections multiples par plusieurs souches du même parasite sur l'évolution de la manipulation serait une approche comparative sur un grand nombre d'espèces de parasites. En effet, si les infections multiples favorisent la non-coopération, les espèces de parasites non-manipulateurs, qui pourraient bénéficier de la manipulation, devraient être plus fréquemment exposées à la coinfection que des espèces chez qui la manipulation a évolué.

L'influence des infections multiples sur l'effort de manipulation reste un champ relativement peu exploré des associations hôte-parasite. Compte tenu de l'omniprésence des infections multiples dans la nature et du caractère altruiste de la manipulation (du point de vue de la population de parasites), l'étude de la coopération chez les parasites manipulateurs pourrait s'avérer très fertile.

Interactions entre symbiotes et communauté symbiotique

En plus d'être infectés par plusieurs souches d'un même symbiote, les organismes hébergent fréquemment plusieurs espèces de symbiotes à la fois. Ainsi les hôtes représentent de véritables communautés d'espèces au sein desquelles la coévolution est une force évolutive majeure (Ferrari & Vavre 2011). Le modèle *L. bouhardi*-virus s'est avéré être un bon exemple d'infections multiples par plusieurs symbiotes. En effet, le travail de cette thèse a permis de révéler que non seulement un même parasitoïde pouvait être simultanément infecté par plusieurs souches du virus à ADN LbFV, mais pouvait également être simultanément infecté par LbFV et le virus à ARN LbTV (Chapitre 6). Bien que l'effet bénéfique de LbTV sur la fitness des femelles reste à démontrer sur un plus grand nombre de génotypes de parasitoïdes, ce résultat laisse à penser que LbTV pourrait fortement contribuer à l'adaptation du parasitoïde. Comment les interactions entre LbTV et LbFV peuvent affecter le phénotype du parasitoïde reste une question en suspens. La compétition pour les ressources au sein du parasitoïde entre les deux virus pourrait faire varier le coût de l'infection pour le parasitoïde et donc affecter le devenir de la communauté virale. De plus, les deux virus ayant des modes de transmission différents, ils sont en conflit pour l'expression du phénotype optimal. Face à ce conflit, des interactions entre virus pourraient avoir évolué. LbFV étant en partie transmis verticalement, il bénéficie directement de l'effet

bénéfique apporté par LbTV. En revanche, LbTV étant transmis exclusivement de parents à descendants, la manipulation comportementale exercée par LbFV devrait être coûteuse pour le virus à ARN. Les deux virus sont alors en conflit pour le phénotype optimal de superparasitisme. Ainsi, LbTV, au même titre que le parasitoïde, devrait être sélectionné pour empêcher l'expression de la manipulation du comportement. Nous avons vu cependant que les lignées de parasitoïdes coinfectedes par les deux virus montrent un phénotype « superparasitant » typique des lignées manipulées par LbFV. LbTV ne semble donc pas être capable de supprimer totalement l'expression de la manipulation. Cependant, une étude utilisant des parasitoïdes dont le génotype nucléaire est homogène devrait permettre de tester si LbTV est capable de diminuer au moins partiellement l'intensité de la manipulation exercée par LbFV. Le phénotype issu de l'interaction des deux virus devrait être analysé plus en détails pour comprendre comment ils peuvent affecter mutuellement leur fitness et celle du parasitoïde. Cela sera rendu possible par la création d'une lignée de parasitoïdes au génotype nucléaire homogène mais présentant toutes les combinaisons de statut d'infection pour ces deux virus.

Enfin, il serait intéressant de comparer les densités relatives de LbTV et LbFV en condition de monoinfection et de coinfection. Il est possible que LbTV et LbFV soient en compétition pour les ressources à l'intérieur du parasitoïde et que la coinfection affecte négativement leur densité et donc possiblement leurs taux de transmission. A l'inverse, des interactions bénéfiques entre les deux virus pourraient contribuer à l'augmentation de leurs densités respectives.

Les infections multiples peuvent moduler l'expression du phénotype étendu qui va alors dépendre de la composition en espèces de la communauté symbiotique. Par exemple, chez le puceron *Acyrtosiphon pisum*, les deux symbiotes bactériens *Hamiltonella defensa* et *Serratia symbiotica* confèrent chacun au puceron une résistance aux attaques de parasitoïdes (Oliver *et al.* 2003). En condition de coinfection, cette résistance augmente en intensité mais s'accompagne également d'un coût élevé sur la fécondité des femelles coinfectedes (Oliver *et al.* 2006). Ce coût sur la fécondité est corrélé à une prolifération importante de *S. symbiotica* en coinfection. Ce coût étant associé à la coinfection, cela pourrait expliquer la fréquence très faible des individus coinfectedes dans les populations naturelles. Chez le crustacé *G. roeseli*, le géotactisme est la cible d'une manipulation par l'acanthocéphale *P. minutus*, mais l'intensité de cette manipulation dépend aussi de l'infection par des microsporidies qui supprime en grande partie l'effet de la manipulation (Haine *et al.* 2005). Un autre cas intéressant est celui du

parasitoïde *Diadromus pulchellus* infecté par l'ascovirus DpAV-4 et le réovirus DpRV-1 (Renault *et al.* 2005). Les deux virus sont toujours trouvés en coinfection dans les populations naturelles du parasitoïde. DpAV-4 est considéré comme mutualiste pour le parasitoïde car il interagit avec la physiologie de l'hôte du parasitoïde en facilitant la lyse cellulaire des tissus et en inhibant la réaction immunitaire de mélanisation dirigée contre le parasitoïde (Renault *et al.* 2002). DpRV-1 ne semble pas avoir d'effet notable mais sa présence pourrait être indispensable au maintien de la relation mutualiste entre *D. pulchellus* et DpAV-4. En effet, lorsque seul DpAV-4 est injecté artificiellement dans l'hôte du parasitoïde, ce dernier meurt en 2 à 3 jours à cause d'un taux de réplication élevé du virus. Cet effet devrait être délétère pour le parasitoïde qui n'a pas le temps de d'accomplir l'intégralité de son développement. En revanche, si les deux virus sont co-injectés, la réplication de DpAV-4 est fortement ralentie et l'hôte du parasitoïde ne meurt qu'au bout de 5 à 7 jours, autorisant ainsi le développement normal du parasitoïde (Bigot *et al.* 1997 ; Renault *et al.* 2002).

Le phénotype étendu issu des interactions symbiote × symbiote peut ainsi être déterminant pour le devenir de la communauté symbiotique. S'il est associé à des coûts sévères pour l'ensemble des partenaires, des mécanismes d'évitement ou de résistance à la coinfection peuvent émerger chez chacun des partenaires. Par exemple, Frank (1996b) a émis l'hypothèse que le mode de transmission verticale des symbiotes serait une adaptation des hôtes limitant la diversité génétique au sein de la communauté symbiotique et donc la compétition entre symbiotes qui favorise l'augmentation de la virulence. Si le phénotype émergent à l'échelle de la communauté, via les interactions entre symbiotes, est au contraire avantageux par la sélection, la coopération entre symbiotes pourra être sélectionnée et des mécanismes de co-transmission peuvent alors apparaître chez l'hôte et/ou les symbiotes (Vautrin & Vavre 2009).

Apport de bénéfice dans les associations parasitaires

L'infection par LbFV se traduit par un coût très net sur le comportement de ponte des femelles parasitoïdes. D'autres modifications phénotypiques induites par LbFV ont également été mises en évidence (Varaldi *et al.* 2005). D'une part des coûts faibles associés à l'infection ont été détectés sur la taille des femelles, leur activité locomotrice et sur le temps de développement des parasitoïdes. Ces effets pathogéniques pour l'hôte ne semblent pas avoir de signification adaptative pour le virus. D'autre part, une légère augmentation de la charge en œufs des femelles infectées (+ 11 %) avait été mesurée.

Cet effet pourrait être une réponse plastique des femelles parasitoïdes qui ajustent leur fécondité à leur comportement de superparasitisme, compensant ainsi le gaspillage en œufs dû à la manipulation comportementale (Gandon *et al.* 2009). Une autre explication est que cet effet serait l'expression d'une adaptation du virus. On s'attend effectivement à ce que le virus soit sélectionné pour favoriser l'investissement dans la fécondité du parasitoïde (même au détriment d'autres traits), ce qui améliorerait à la fois sa transmission verticale et horizontale.

Dans le chapitre 7, nous avons mis en évidence un nouvel effet du virus. LbFV augmente la virulence du parasitoïde vis-à-vis de l'hôte drosophile de manière directe et indirecte via l'effet sur le superparasitisme. D'une part, un parasitoïde infecté par le virus a une probabilité plus faible d'être encapsulé par la drosophile. D'autre part, les larves de drosophile montrent des taux d'encapsulation plus faibles lorsqu'elles ont superparasitées. Au même titre que la fécondité, la virulence du parasitoïde est un trait sur lequel les intérêts du virus et du parasitoïde s'alignent. On s'attend donc à ce que LbFV soit sélectionné pour augmenter la virulence du parasitoïde. L'avantage procuré par l'effet indirect du superparasitisme n'est pas certain car il dépend de quel œuf de parasitoïde en bénéficie. En effet, si l'œuf pondue en deuxième a plus de chance d'être encapsulé que celui pondue en premier, alors l'effet du superparasitisme sur l'encapsulation ne bénéficie pas à la femelle ayant superparasité. En revanche, l'effet direct de l'infection par le virus peut clairement être vu comme l'apport d'un bénéfice. Ce bénéfice devrait favoriser la transmission du virus, au même titre que la manipulation comportementale. Une question en suspens est de savoir si cet effet sur le taux d'encapsulation est le fruit de la coévolution avec le parasitoïde ou bien s'il était présent dès l'origine de l'association parasitoïde-virus. On peut penser que la simple présence du virus dans l'hémolymphe de la larve de drosophile a des effets pathogènes sur cette dernière, l'empêchant d'allouer de l'énergie dans l'élimination du parasitoïde. En tout cas, l'effet direct et indirect de LbFV devraient être pris en compte dans l'étude du conflit entre le parasitoïde et le virus. Le modèle d'ESS du superparasitisme développé par Gandon *et al.* (2006) devrait permettre d'évaluer en détail l'influence de ces effets sur l'évolution du conflit entre *L. boulardi* et LbFV.

Ainsi, les symbiotes peuvent associer la manipulation à l'apport de bénéfice, et envahir les populations hôtes de manière encore plus efficace. Des études récentes montrent par exemple que certains symbiotes bactériens transmis maternellement, connus pour manipuler la reproduction de leur hôte, apportent aussi des avantages à ce dernier. C'est le cas de certaines souches de la bactérie *Wolbachia* qui, en plus d'induire

de l'incompatibilité cytoplasmique (croisement stérile entre femelles non-infectées et mâles infectés), confèrent une résistance à plusieurs pathogènes tels que les virus à ARN, les vers parasites agents de la filariose ou encore le protozoaire responsable du paludisme (Teixeira *et al.* 2008 ; Osborne *et al.* 2009 ; Kambris *et al.* 2009 ; Moreira *et al.* 2009). La bactérie *Rickettsia* infectant l'hémiptère *Bemisia tabaci* est aussi capable de manipuler la reproduction de son hôte en induisant des sex-ratios biaisées en faveur des femelles. De plus, sa présence est associée à une augmentation de la performance des insectes qui survivent plus longtemps et dont les femelles ont une meilleure fécondité (Himler *et al.* 2011). La prévalence de *Rickettsia* a été suivie sur une dizaine d'années montrant une invasion rapide des populations de *B. tabaci* par la bactérie qui a atteint un seuil proche de la fixation en seulement 80 générations. Ainsi, l'association de manipulation à l'apport de bénéfices peut conduire à des dynamiques invasives extrêmement rapides. Ces résultats montrent que la distinction entre parasitisme et mutualisme n'est pas si simple et invitent à reconsidérer la balance coût-bénéfice de l'infection pour les symbiotes dits « parasites ». Lorsque les bénéfices apportés dépendent des conditions écologiques comme la présence d'un ennemi naturel, le symbiote peut passer d'un statut de parasite à celui de mutualiste en fonction des populations (Oliver *et al.* 2008). A l'échelle d'une métapopulation, les variations spatiales des conditions écologiques et donc de l'effet net de l'infection sur les hôtes pourraient ainsi favoriser le maintien du polymorphisme sur les gènes de résistance ou de tolérance de l'hôte.

Conclusion

La symbiose a certainement été un moteur de l'évolution dès les premiers stades de la vie. Les premières molécules répliquatrices ont probablement dû faire face à l'exploitation de leurs propriétés par d'autres répliquateurs (Maynard Smith & Szathmáry 2000). La naissance de la première proto-cellule a permis l'évolution d'interactions encore plus intimes entre répliquateurs. En effet, par leur isolement du milieu extérieur, les répliquateurs ont créé un micro-environnement au sein duquel peuvent s'établir des interactions répétées entre différents génomes. L'apparition d'êtres multicellulaires a engendré des environnements encore plus complexes que de nombreux symbiotes mutualistes et parasites peuvent exploiter de multiples façons. En particulier, l'étude des interactions hôte-parasite a révélé l'incroyable diversité des stratégies de manipulation mises en place par les parasites au cours de l'évolution. Cependant, de nombreuses

questions subsistent sur les facteurs qui influencent l'expression et l'évolution de la manipulation à une échelle plus fine. Les parasites évoluent-ils toujours vers un niveau optimal de manipulation ? Quelle est l'influence de la coévolution antagoniste sur la trajectoire évolutive de la manipulation si l'on considère la contribution de l'hôte dans l'expression de cette manipulation ? Comment les conflits entre souches de parasites générés par les infections multiples affectent-ils l'optimum de manipulation ? Les parasites peuvent-ils compléter la stratégie de manipulation par l'apport de bénéfice sur les traits faisant l'objet de pressions de sélection convergentes sur l'hôte et le parasite ?

Ce travail de thèse a tenté d'apporter des réponses à certaines de ces questions sur le modèle parasitoïde-virus. Les résultats montrent un contexte favorable à la coévolution antagoniste entre le parasitoïde et le virus sur l'expression de la manipulation. Des sources de conflits sur l'expression de la manipulation entre symbiotes ont été identifiées par l'étude de l'épidémiologie des différents virus et la mise en évidence d'infections multiples chez *L. boulardi*. Enfin, nous avons montré que la manipulation comportementale n'est qu'un aspect du phénotype étendu induit par ces virus, suggérant qu'une part importante du phénotype global du parasitoïde est déterminée par la présence de cette communauté virale. L'étude des interactions hôte-parasite s'est jusqu'à présent focalisée sur la signification adaptative des manipulations exercées par les parasites, le plus souvent un seul parasite face à un seul hôte. Elle doit aujourd'hui analyser plus finement les mécanismes qui peuvent contraindre l'évolution de la manipulation à travers une approche plus intégrée, englobant l'ensemble des traits affectés et l'ensemble des partenaires impliqués dans ces associations.

Références

References

- Adamo, S. A. 1998. The specificity of behavioral fever in the cricket *Acheta domesticus*. *Journal of Parasitology* 84:529-533.
- Agrawal, A., and C. Lively. 2002. Infection genetics: gene-for-gene versus matchingalleles models and all points in between. *Evolutionary Ecology Research* 4:79-90.
- Alizon, S., A. Hurford, N. Mideo, and M. Van Baalen. 2009. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology* 22:245-259.
- Anderson, R. M., and R. M. May. 1979. Population biology of infectious-diseases: Part 1. *Nature* 280:361-367.
- Bakker, T. C. M., D. Mazzi, and S. Zala. 1997. Parasite-induced changes in behavior and color make *Gammarus pulex* more prone to fish predation. *Ecology* 78:1098-1104.
- Barbotin, F., Y. Carton, and S. Kelner-Pillault. 1979. Morphologie et biologie de *Cothonaspis boulandi* n. sp. parasite de drosophiles. *Bulletin de la Société Entomologique de France* 84:20-26.
- Barton, E. S., D. W. White, J. S. Cathelyn, K. A. Brett-McClellan, M. Engle, M. S. Diamond, V. L. Miller, and H. W. Virgin. 2007. Herpesvirus latency confers symbiotic protection from bacterial infection. *Nature* 447:326-U327.
- Bauer, A., E. R. Haine, M. J. Perrot-Minnot, and T. Rigaud. 2005. The acanthocephalan parasite *Polymorphus minutus* alters the geotactic and clinging behaviours of two sympatric amphipod hosts: the native *Gammarus pulex* and the invasive *Gammarus roeselii*. *Journal of Zoology* 267:39-43.
- Bauer, A., S. Trouve, A. Gregoire, L. Bollache, and F. Cezilly. 2000. Differential influence of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala) on the behaviour of native and invader gammarid species. *International Journal for Parasitology* 30:1453-1457.
- Ben-Ami, F., L. Mouton, and D. Ebert. 2008. The effects of multiple infections on the expression and evolution of virulence in a *Daphnia*-endoparasite system. *Evolution* 62:1700-1711.
- Bigot, Y., J. M. Drezen, P. Y. Sizaret, A. Rabouille, M. H. Hamelin, and G. Periquet. 1995. The genome segments of DpRV, a commensal reovirus of the wasp *Diadromus pulchellus* (Hymenoptera). *Virology* 210:109-119.
- Bigot, Y., A. Rabouille, G. Doury, P. Y. Sizaret, F. Delbost, M. H. Hamelin, and G. Periquet. 1997. Biological and molecular features of the relationships between *Diadromus pulchellus* ascovirus, a parasitoid hymenopteran wasp (*Diadromus pulchellus*) and its lepidopteran host, *Acrolepiopsis assectella*. *Journal of General Virology* 78:1149-1163.
- Biron, D. G., L. Marche, F. Ponton, H. D. Loxdale, N. Galeotti, L. Renault, C. Joly, and F. Thomas. 2005. Behavioural manipulation in a grasshopper harbouring hairworm: a proteomics approach. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 272:2117-2126.
- Bouchon, D., T. Rigaud, and P. Juchault. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc. R. Soc. Lond. B* 265:1081-1090.
- Boulétreau, M., and F. Fleury. 2005. Les insectes parasitoïdes et leurs partenaires multiples : Des surdoués du parasitisme? *Bulletin de la Société zoologique de France* 130:177-192.
- Bourtzis, K., A. Nirgianaki, G. Markakis, and C. Savakis. 1996. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* 144:1063-1073.
- Braendle, C., T. Miura, R. Bickel, A. W. Shingleton, S. Kambhampati, and D. L. Stern. 2003. Developmental origin and evolution of bacteriocytes in the aphid-*Buchnera* symbiosis. *PLoS. Biol.* 1:70-76.

- Brown, S. P. 1999. Cooperation and conflict in host-manipulating parasites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:1899-1904.
- Brown, S. P. 2005. Do all parasites manipulate their hosts? *Behavioural Processes* 68:237-240.
- Brown, S. P., M. E. Hochberg, and B. T. Grenfell. 2002. Does multiple infection select for raised virulence? *Trends in Microbiology* 10:401-405.
- Buchner, P. 1965. *Endosymbiosis of animals with plant microorganisms*. Interscience Publishers.
- Buckling, A., and M. A. Brockhurst. 2008. Kin selection and the evolution of virulence. *Heredity* 100:484-488.
- Bull, J. J., I. J. Molineux, and W. R. Rice. 1991. Selection of benevolence in a host-parasite system. *Evolution* 45:875-882.
- Burand, J. P., C. P. Rallis, and W. J. Tan. 2004. Horizontal transmission of Hz-2V by virus infected *Helicoverpa zea* moths. *Journal of Invertebrate Pathology* 85:128-131.
- Burand, J. P., W. J. Tan, W. J. Kim, S. Nojima, and W. Roelofs. 2005. Infection with the insect virus Hz-2v alters mating behavior and pheromone production in female *Helicoverpa zea* moths. *Journal of Insect Science* 5.
- Carius, H. J., T. J. Little, and D. Ebert. 2001. Genetic variation in a host-parasite association: Potential for coevolution and frequency-dependent selection. *Evolution* 55:1136-1145.
- Carney, W. P. 1969. Behavioral and morphological changes in carpenter ants harboring *Dicrocoeliid metacercariae*. *Am. Midl. Nat.* 82:605-&.
- Carton, Y., M. Boulétreau, J. M. M. van Alphen, and J. C. Van Lenteren. 1986. The *Drosophila* parasitic wasps. In *The Genetics and Biology of Drosophila*. C. H. L. Ashburner M., Thompson, J. N., eds. Academic Press, Orlando. Pp. 347-394
- Carton, Y., and A. J. Nappi. 2001. Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* 52:157-164.
- Cézilly, F., A. Gregoire, and A. Bertin. 2000. Conflict between co-occurring manipulative parasites? An experimental study of the joint influence of two acanthocephalan parasites on the behaviour of *Gammarus pulex*. *Parasitology* 120:625-630.
- Cézilly, F., and M. J. Perrot-Minnot. 2005. Studying adaptive changes in the behaviour of infected hosts: a long and winding road. *Behavioural Processes* 68:223-228.
- Charlat, S., E. Hornett, J. Fullard, N. Davies, G. Roderick, N. Wedell, and G. Hurst. 2007. Extraordinary Flux in Sex Ratio. *Science* 317:214.
- Charlat, S., E. A. Hornett, E. A. Dyson, P. P. Y. Ho, N. T. Loc, M. Schilthuisen, N. Davies, G. K. Roderick, and G. D. D. Hurst. 2005. Prevalence and penetrance variation of male-killing *Wolbachia* across Indo-Pacific populations of the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Molecular Ecology* 14:3525-3530.
- Chase, C. D. 2007. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial-nuclear interactions. *Trends in Genetics* 23:81-90.
- Clayton, D. H., and N. D. Wolfe. 1993. The adaptive significance of self-medication. *Trends in Ecology & Evolution* 8:60-63.
- Combes, C. 1995. *Interactions durables: écologie et évolution du parasitisme*. Masson, Paris.
- David, J. 1962. A new medium for rearing *Drosophila* in axenic condition. *Drosophila Information Service* 36:128.
- Davies, C., nbsp, M, E. Fairbrother, J. Webster, and P. 2002. Mixed strain schistosome infections of snails and the evolution of parasite virulence. *Parasitology* 124:31-38.
- Dawkins, R. 1976. *The selfish gene*. Oxford University Press.
- Dawkins, R. 1982. *The extended phenotype: the long reach of the gene*. Oxford University Press.
- de Roode, J. C., R. Pansini, S. J. Cheesman, M. E. H. Helinski, S. Huijben, A. R. Wargo, A. S. Bell, B. H. K. Chan, D. Walliker, and A. F. Read. 2005. Virulence and competitive ability in genetically diverse malaria infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:7624-7628.

- Dedeine, F., M. Boulétreau, and F. Vavre. 2005. *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. *Heredity* 95:394–400.
- Dedeine, F., F. Vavre, F. Fleury, B. Loppin, M. E. Hochberg, and M. Bouletreau. 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.
- Douglas, A. E. 2008. Conflict, cheats and the persistence of symbioses. *New Phytologist* 177:849-858.
- Douglas, A. E. 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* 23:38-47.
- Dowling, D., U. Friberg, F. Hailer, and G. Arnqvist. 2007. Intergenomic Epistasis for Fitness: Within-Population Interactions Between Cytoplasmic and Nuclear Genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 175:235–244.
- Drezen, J. M., A. Bézier, J. Lesobre, E. Huguet, and C. Dupuy. 2006. Virulence genes of parasitoid wasps encoded by symbiotic viruses. Pp. 59-64. ICOPA XI: Proceedings of the 11th International Congress of Parasitology. Medimond S R L, 40128 Bologna.
- Ebert, D. 2008. Host-parasite coevolution: Insights from the *Daphnia*-parasite model system. *Current Opinion in Microbiology* 11:290-301.
- Ebert, D., C. D. Zschokke-Rohringer, and H. J. Carius. 1998. Within- and between-population variation for resistance of *Daphnia magna* to the bacterial endoparasite *Pasteuria ramosa*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:2127-2134.
- Engelstadter, J., and G. D. D. Hurst. 2009. The Ecology and Evolution of Microbes that Manipulate Host Reproduction. Pp. 127-149. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. Annual Reviews, Palo Alto.
- Esch, G. W., M. A. Barger, and K. J. Fellis. 2002. The transmission of digenetic trematodes: Style, elegance, complexity. *Integr. Comp. Biol.* 42:304-312.
- Ewald, P. W. 1987. Transmission modes and the evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Annals of the New York Academy of Sciences* 503:295-306.
- Ferrari, J., and F. Vavre. 2011. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 366:1389-1400.
- Fine, P. E. M. 1975. Vectors and vertical transmission: an epidemiologic perspective. *Annals of the New York Academy of Sciences* 266:173-194.
- Fleury, F., N. Ris, R. Allemand, P. Fouillet, Y. Carton, and M. Boulétreau. 2004. Ecological and genetic interactions in *Drosophila*-parasitoids communities: a case study with *D. melanogaster*, *D. simulans* and their common *Leptopilina* parasitoids in south-eastern France. *Genetica* 120:181-194.
- Franceschi, N., S. Cornet, L. Bollache, F. X. Dechaume-Moncharmont, A. Bauer, S. Motreuil, and T. Rigaud. 2010. Variation between populations and local adaptation in acanthocephalan-induced parasite manipulation. *Evolution* 64:2417-2430.
- Frank, S. A. 1996a. Models of parasite virulence. *Quarterly Review of Biology* 71:37-78.
- Frank, S. A. 1996b. Host-symbiont conflict over the mixing of symbiotic lineages. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 263:339-344.
- Gandon, S. 2002. Local adaptation and the geometry of host-parasite coevolution. *Ecology Letters* 5:246-256.
- Gandon, S., A. Rivero, and J. Varaldi. 2006. Superparasitism evolution: Adaptation or manipulation? *American Naturalist* 167:E1-E22.
- Gandon, S., M. van Baalen, and V. A. A. Jansen. 2002. The evolution of parasite virulence, superinfection, and host resistance. *American Naturalist* 159:658-669.
- Gandon, S., J. Varaldi, F. Fleury, and A. Rivero. 2009. Evolution and manipulation of parasitoid egg load. *Evolution* 63:2974-2984.

- Giorgini, M., U. Bernardo, M. M. Monti, A. G. Nappo, and M. Gebiola. 2010. Rickettsia Symbionts Cause Parthenogenetic Reproduction in the Parasitoid Wasp *Pnigalio soemius* (Hymenoptera: Eulophidae). *Applied and Environmental Microbiology* 76:2589-2599.
- Godfray, H. C. J. 1994. *Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology*. Princeton University Press.
- Haine, E. R., K. Boucansaud, and T. Rigaud. 2005. Conflict between parasites with different transmission strategies infecting an amphipod host. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 272:2505-2510.
- Hamilton, W. D. 1964. Genetical evolution of social behaviour I. *J. Theor. Biol.* 7:1-&.
- Hamm, J. J., E. L. Styer, and W. J. Lewis. 1992. Three viruses found in the braconid parasitoid *Microplitis croceipes* and their implications in biological control programs. *Biological Control* 2:329-336.
- Hardin, G. 1968. Tragedy of commons. *Science* 162:1243-&.
- Hart, B. L. 1990. Behavioral adaptations to pathogens and parasites - five strategies. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 14:273-294.
- Heath, K. D. 2009. Intergenomic epistasis and coevolutionary constraint in plants and rhizobia. *Evolution* 64:1446-1458.
- Hedges, L., J. Brownlie, S. O'Neill, and K. Johnson. 2008. *Wolbachia* and Virus Protection in Insects. *Science* 322:702.
- Herre, E., N. Knowlton, U. Mueller, and S. Rehner. 1999. The evolution of mutualisms: exploring the paths between conflict and cooperation. *TREE* 14:49-53.
- Himler, A. G., T. Adachi-Hagimori, J. E. Bergen, A. Kozuch, S. E. Kelly, B. E. Tabashnik, E. Chiel, V. E. Duckworth, T. J. Dennehy, E. Zchori-Fein, and M. S. Hunter. 2011. Rapid Spread of a Bacterial Symbiont in an Invasive Whitefly Is Driven by Fitness Benefits and Female Bias. *Science* 332:254-256.
- Hochberg, M. E., Y. Michalakis, and T. Demeus. 1992. Parasitism as a constraint on the rate of life-history evolution. *Journal of Evolutionary Biology* 5:491-504.
- Hodgson, D., R. Hitchman, A. Vanbergen, R. Hails, R. Possee, and J. Cory. 2004. Host ecology determines the relative fitness of virus genotypes in mixed-genotype nucleopolyhedrovirus infections. *J. EVOL. BIOL.* 17:1018-1025.
- Hornett, E., S. Charlat, A. Duploux, N. Davies, G. Roderick, N. Wedell, and G. Hurst. 2006. Evolution of Male-Killer Suppression in a Natural Population. *PLoS. Biol.* 4:1643-1648.
- Hosokawa, T., Y. Kikuchi, and T. Fukatsu. 2007. How many symbionts are provided by mothers, acquired by offspring, and needed for successful vertical transmission in an obligate insect-bacterium mutualism? *Molecular Ecology* 16:5316-5325.
- Hurd, H. 2003. Manipulation of medically important insect vectors by their parasites. *Annual Review of Entomology* 48:141-161.
- Hurst, G. D. D., L. D. Hurst, and M. E. N. Majerus. 1993. Altering sex-ratios - the games microbes play. *Bioessays* 15:695-697.
- Hurst, G. D. D., F. M. Jiggins, J. H. G. von der Schulenburg, D. Bertrand, S. A. West, Goriacheva, II, I. A. Zakharov, J. H. Werren, R. Stouthamer, and M. E. N. Majerus. 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:735-740.
- Kambris, Z., P. E. Cook, H. K. Phuc, and S. P. Sinkins. 2009. Immune Activation by Life-Shortening *Wolbachia* and Reduced Filarial Competence in Mosquitoes. *Science* 326:134-136.
- Knudson, D. L., and K. A. Harrap. 1976. Replication of a Nuclear Polyhedrosis Virus in a Continuous Cell Culture of *Spodoptera frugiperda*: Microscopy Study of the Sequence of Events of the Virus Infection. *J. Virol.* 17:254-268.
- Kremer, N., F. Dedeine, D. Charif, C. Finet, R. Allemand, and F. Vavre. 2010. Do variable compensatory mechanisms explain the polymorphism of the dependence phenotype in the *Asobara tabida*-*Wolbachia* association? *Evolution* 64:2969-2979.

- Lafferty, K. D. 1999. The Evolution of Trophic Transmission. *Parasitology Today* 15:111-115.
- Lafferty, K. D., F. Thomas, and R. Poulin. 2000. Evolution of host phenotype manipulation by parasites and its consequences. Pp. 117-127. *Evolutionary Biology of Host-Parasite Relationships: Theory Meets Reality*.
- Lagrange, C., N. Kaldonski, M. J. Perrot-Minnot, B. Motreuil, and L. Bollache. 2007. Modification of hosts' behavior by a parasite: Field evidence for adaptive manipulation. *Ecology* 88:2839-2847.
- Lamberton, P. H. L., C. A. Donnelly, and J. P. Webster. 2008. Specificity of the *Toxoplasma gondii*-altered behaviour to definitive versus non-definitive host predation risk. *Parasitology* 135:1143-1150.
- Lambrechts, L. 2010. Dissecting the Genetic Architecture of Host-Pathogen Specificity. *Plos Pathogens* 6:3.
- Lambrechts, L., S. Fellous, and J. C. Koella. 2006. Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends in Parasitology* 22:12-16.
- Lawrence, P. O. 2005. Morphogenesis and cytopathic effects of the *Diachasmimorpha longicaudata* entomopoxvirus in host haemocytes. *Journal of Insect Physiology* 51:221-233.
- Lawrence, P. O., and L. F. Matos. 2005. Transmission of the *Diachasmimorpha longicaudata* rhabdovirus (DIRhV) to wasp offspring: an ultrastructural analysis. *Journal of Insect Physiology* 51:235-241.
- Lefèvre, T., C. Lebarbenchon, M. Gauthier-Clerc, D. Missé, R. Poulin, and F. Thomas. 2008a. The ecological significance of manipulative parasites. *Trends in Ecology and Evolution*.
- Lefèvre, T., B. Roche, R. Poulin, H. Hurd, F. Renaud, and F. Thomas. 2008b. Exploiting host compensatory responses: the 'must' of manipulation? *Trends in Parasitology* 24:435-439.
- Lefèvre, T., and F. Thomas. 2008. Behind the scene, something else is pulling the strings: Emphasizing parasitic manipulation in vector-borne diseases. *Infection Genetics and Evolution* 8:504-519.
- Lefevre, T., A. J. Williams, and J. C. de Roode. 2011. Genetic variation in resistance, but not tolerance, to a protozoan parasite in the monarch butterfly. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 278:751-759.
- Lietze, V. U., A. M. M. Abd-Alla, M. J. B. Vreysen, C. J. Geden, and D. G. Boucias. 2011. Salivary Gland Hypertrophy Viruses: A Novel Group of Insect Pathogenic Viruses. Pp. 63-80. *Annual Review of Entomology, Vol 56*.
- Lipsitch, M., M. A. Nowak, D. Ebert, and R. M. May. 1995. The population dynamics of vertically and horizontally-transmitted parasites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 260:321-327.
- Lipsitch, M., S. Siller, and M. A. Nowak. 1996. The evolution of virulence in pathogens with vertical and horizontal transmission. *Evolution* 50:1729-1741.
- Lozano, G. A. 1998. Parasitic stress and self-medication in wild animals. *Stress and Behavior* 27:291-317.
- Mackie, R. I. 2002. Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: Diversity and evolution. *Integr. Comp. Biol.* 42:319-326.
- Margulis, L. 1993. *Symbiosis in cell evolution: microbial communities in the Archean and Proterozoic eons*. Freeman.
- Masson-Boivin, C., E. Giraud, X. Perret, and J. Batut. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology* 17:458-466.
- May, R. M., and M. A. Nowak. 1995. Coinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 261:209-215.

- Maynard Smith, J., and E. Szathmáry. 2000. The origins of life: from the birth of life to the origin of language. Oxford University Press.
- Mideo, N. 2009. Parasite adaptations to within-host competition. *Trends in Parasitology* 25:261-268.
- Moore, A. J., E. D. Brodie, and J. B. Wolf. 1997. Interacting phenotypes and the evolutionary process .1. Direct and indirect genetic effects of social interactions. *Evolution* 51:1352-1362.
- Moore, J. 2002. Parasites and the behavior of animals. Oxford University Press.
- Moran, N., and P. Degnan. 2006. Functional genomics of *Buchnera* and the ecology of aphid hosts. *Molecular Ecology* 15:1251-1261.
- Moreira, L. A., I. Iturbe-Ormaetxe, J. A. Jeffery, G. J. Lu, A. T. Pyke, L. M. Hedges, B. C. Rocha, S. Hall-Mendelin, A. Day, M. Riegler, L. E. Hugo, K. N. Johnson, B. H. Kay, E. A. McGraw, A. F. van den Hurk, P. A. Ryan, and S. L. O'Neill. 2009. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139:1268-1278.
- Nardon, P., and A. M. Grenier. 1993. Symbiosis and evolution. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 29:113-140.
- Nardon, P., C. Lefevre, B. Delobel, H. Charles, and A. Heddi. 2002. Occurrence of endosymbiosis in Dryophthoridae weevils: Cytological insights into bacterial symbiotic structures. *Symbiosis* 33:227-241.
- Nardon, P., and C. Nardon. 1998. Morphology and cytology of symbiosis in insects. *Ann. Soc. Entomol. Fr.* 34:105-134.
- Nowak, M. A., and R. M. May. 1994. Superinfection and the evolution of parasite virulence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 255:81-89.
- O'Neill, S. L., A. A. Hoffmann, and J. H. Werren. 1997. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press.
- Oldroyd, G. E. D., J. D. Murray, P. S. Poole, and J. A. Downie. 2011. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Annual Review of Genetics* 45:null.
- Oliveira, D., W. B. Hunter, J. Ng, C. A. Desjardins, P. M. Dang, and J. H. Werren. 2010. Data mining cDNAs reveals three new single stranded RNA viruses in *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Insect Molecular Biology* 19:99-107.
- Oliver, K., N. Moran, and M. Hunter. 2006. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proc. R. Soc. B* 273:1273-1280.
- Oliver, K., J. Russell, N. Moran, and M. Hunter. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *PNAS* 100:1803-1807.
- Oliver, K. M., J. Campos, N. A. Moran, and M. S. Hunter. 2008. Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 275:293-299.
- Oliver, K. M., P. H. Degnan, G. R. Burke, and N. A. Moran. 2010. Facultative Symbionts in Aphids and the Horizontal Transfer of Ecologically Important Traits. *Annual Review of Entomology* 55:247-266.
- Olson, M. 1965. The logic of collective action: public goods and the theory of groups. Harvard University Press.
- Osborne, S. E., Y. S. Leong, S. L. O'Neill, and K. N. Johnson. 2009. Variation in Antiviral Protection Mediated by Different *Wolbachia* Strains in *Drosophila simulans*. *Plos Pathogens* 5:9.
- Patot, S., D. Lepetit, D. Charif, J. Varaldi, and F. Fleury. 2009. Molecular Detection, Penetrance, and Transmission of an Inherited Virus Responsible for Behavioral Manipulation of an Insect Parasitoid. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:703-710.
- Patot, S., J. Martinez, R. Allemand, S. Gandon, J. Varaldi, and F. Fleury. 2010. Prevalence of a virus inducing behavioural manipulation near species range border. *Molecular Ecology* 19:2995-3007.
- Pinheiro, J. C., & Bates, D. M. 2000. Mixed Effects Models in Sand S-PLUS. New York SpringerVerlag.

- Polak, M., and W. T. Starmer. 1998. Parasite-induced risk of mortality elevates reproductive effort in male *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 265:2197-2201.
- Poulin, R. 1994. Meta-analysis of parasite-induced behavioural changes. *Animal Behaviour* 48:137-146.
- Poulin, R. 1995. "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: A critical review. *International Journal for Parasitology* 25:1371-1383.
- Poulin, R. 2011. The many roads to parasitism a tale of convergence. *Adv Parasitol* 74:1-40.
- Poulin, R., and F. Thomas. 1999. Phenotypic variability induced by parasites: Extent and evolutionary implications. *Parasitology Today* 15:28-32.
- Råberg, L., A. L. Graham, and A. F. Read. 2009. Decomposing health: tolerance and resistance to parasites in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 364:37-49.
- Råberg, L., D. Sim, and A. F. Read. 2007. Disentangling genetic variation for resistance and tolerance to infectious diseases in animals. *Science* 318:812-814.
- Read, A. F., and L. H. Taylor. 2001. The ecology of genetically diverse infections. *Science* 292:1099-1102.
- Reineke, A., and S. Asgari. 2005. Presence of a novel small RNA-containing virus in a laboratory culture of the endoparasitic wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Insect Physiology* 51:127-135.
- Renault, S., S. Bigot, M. Lemesle, P. Y. Sizaret, and Y. Bigot. 2003. The cypovirus *Diadromus pulchellus* RV-2 is sporadically associated with the endoparasitoid wasp *D. pulchellus* and modulates the defence mechanisms of pupae of the parasitized leek-moth, *Acrolepiopsis assectella*. *Journal of General Virology* 84:1799-1807.
- Renault, S., A. Petit, F. Benedet, S. Bigot, and Y. Bigot. 2002. Effects of the *Diadromus pulchellus* ascovirus, DpAV-4, on the hemocytic encapsulation response and capsule melanization of the leek-moth pupa, *Acrolepiopsis assectella*. *Journal of Insect Physiology* 48:297-302.
- Renault, S., K. Stasiak, B. Federici, and Y. Bigot. 2005. Commensal and mutualistic relationships of reoviruses with their parasitoid wasp hosts. *Journal of Insect Physiology* 51:137-148.
- Ribeiro, J. M. C., P. A. Rossignol, and A. Spielman. 1985. *Aedes aegypti*: Model for blood finding strategy and prediction of parasite manipulation. *Experimental Parasitology* 60:118-132.
- Rigaud, T. 1997. Inherited microorganisms and sex determination of arthropod hosts. Pp. 81-102 in S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann, and J. H. Werren, eds. *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Invertebrate Reproduction*. Oxford University Press, New York.
- Rigaud, T., and P. Juchault. 1992. Genetic-control of the vertical transmission of a cytoplasmic sex factor in *Armadillidium vulgare* (Crustacea, Oniscidea). *Heredity* 68:47-52.
- Rigaud, T., and E. R. Haine. 2005. Conflict between co-occurring parasites as a confounding factor in manipulation studies? *Behavioural Processes* 68:259-262.
- Robert, P. 1995. "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: A critical review. *International Journal for Parasitology* 25:1371-1383.
- Rogers, M. E., and P. A. Bates. 2007. *Leishmania* manipulation of sand fly feeding behavior results in enhanced transmission. *Plos Pathogens* 3:818-825.
- Sachs, J. L., and E. L. Simms. 2006. Pathways to mutualism breakdown. *Trends in Ecology & Evolution* 21:585-592.
- Sachs, J. L., and T. P. Wilcox. 2006. A shift to parasitism in the jellyfish symbiont *Symbiodinium microadriaticum*. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* 273:425-429.
- Sáenz-de-Cabezón, F. J., F. G. Zalom, and J. F. López-Olguín. 2010. A Review of Recent Patents on Macroorganisms as Biological Control Agents. *Recent Patents on Biotechnology* 4:48-64.

- Shuster, S. M., E. V. Lonsdorf, G. M. Wimp, J. K. Bailey, and T. G. Whitham. 2006. Community heritability measures the evolutionary consequences of indirect genetic effects on community structure. *Evolution* 60:991-1003.
- Smith, D. 1992. Symbiotic condition. *Symbiosis* 14:3-15.
- Sorensen, R. E., and D. J. Minchella. 2001. Snail-trematode life history interactions: past trends and future directions. *Parasitology* 123:S3-S18.
- Stasiak, K., S. Renault, B. A. Federici, and Y. Bigot. 2005. Characteristics of pathogenic and mutualistic relationships of ascoviruses in field populations of parasitoid wasps. *Journal of Insect Physiology* 51:103-115.
- Stewart, A. D., J. M. Logsdon, and S. E. Kelley. 2005. An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution* 59:730-739.
- Strassmann, J. E., Y. Zhu, and D. C. Queller. 2000. Altruism and social cheating in the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 408:965-967.
- Svensson, E. I., and L. Råberg. 2010. Resistance and tolerance in animal enemy-victim coevolution. *Trends in Ecology & Evolution* 25:267-274.
- Teixeira, L., A. Ferreira, and M. Ashburner. 2008. The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS. Biol.* 6:2753-2763.
- Thézé, J., A. Bézier, G. Periquet, J. M. Drezen, and E. A. Herniou. 2011. Paleozoic origin of insect large dsDNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:15931-15935.
- Thieltges, D. W., and R. Poulin. 2001. *Parasites and Pathogens: Avoidance*. eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Thomas, F., S. Adamo, and J. Moore. 2005a. Parasitic manipulation: where are we and where should we go? *Behavioural Processes* 68:185-199.
- Thomas, F., J. Fauchier, and K. D. Lafferty. 2002. Conflict of interest between a nematode and a trematode in an amphipod host: Test of the "sabotage" hypothesis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 51:296-301.
- Thomas, F., and R. Poulin. 1998. Manipulation of a mollusc by a trophically transmitted parasite: convergent evolution or phylogenetic inheritance? *Parasitology* 116:431-436.
- Thomas, F., R. Poulin, and J. Brodeur. 2011. Host manipulation by parasites: a multidimensional phenomenon. *Oikos* 119:1217-1223.
- Thomas, F., F. Renaud, and J. F. Guégan. 2005b. *Parasitism and ecosystems*. Oxford University Press.
- Thrall, P. H., J. J. Burdon, and A. Young. 2001. Variation in resistance and virulence among demes of a plant host-pathogen metapopulation. *Journal of Ecology* 89:736-748.
- Touzet, P., and F. Budar. 2004. Unveiling the molecular arms race between two conflicting genomes in cytoplasmic male sterility? *Trends Plant Sci.* 9:568-570.
- Trotter, M. V., and H. G. Spencer. 2007. Frequency-dependent selection and the maintenance of genetic variation: Exploring the parameter space of the multiallelic pairwise interaction model. *Genetics* 176:1729-1740.
- van Alphen, J. J. M., and M. E. Visser. 1990. Superparasitism as an adaptive strategy for insect parasitoids. *Annual Review of Entomology* 35:59-79.
- van Baalen, M., and M. W. Sabelis. 1995. The dynamics of multiple infection and the evolution of virulence. *American Naturalist* 146:881-910.
- Van Lenteren, J. C. 1981. Host discrimination by parasitoids. Pp. 153-179 in J. W. J. L. R. L. Nordlund D.A., ed. *Semiochemicals, their role in pest control*. John Wiley, New York.
- van Valen, L. 1973. A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* 1:1-30.
- Varaldi, J., M. Boulétreau, and F. Fleury. 2005. Cost induced by viral particles manipulating superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. *Parasitology* 131:1-8.
- Varaldi, J., P. Fouillet, M. Ravallec, M. Lopez-Ferber, M. Boulétreau, and F. Fleury. 2003. Infectious Behavior in a Parasitoid. *Science* 302:1930.

- Varaldi, J., S. Gandon, A. Rivero, S. Patot, and F. Fleury. 2006a. A newly discovered virus manipulates superparasitism behavior in a parasitoid wasp.. *In* *Insect Symbiosis*, Volume 2. CRC Press. pp. 119-139
- Varaldi, J., S. Patot, M. Nardin, and S. Gandon. 2009. A Virus-Shaping Reproductive Strategy in a *Drosophila* Parasitoid.. *Advances in Parasitology*, Vol 70. Elsevier Academic Press Inc, San Diego. pp. 333-363
- Varaldi, J., S. Petit, M. Bouletreau, and F. Fleury. 2006b. The virus infecting the parasitoid *Leptopilina boulandi* exerts a specific action on superparasitism behaviour. *Parasitology* 132:747-756.
- Vautrin, E., and F. Vavre. 2009. Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict? *Trends in Microbiology* 17:95-99.
- Vet, L. E. M., and K. Bakker. 1985. A comparative functional approach to the host detection behavior of parasitic wasps.2. A quantitative study on 8 eucoilid species. *Oikos* 44:487-498.
- Vickery, W. L., and R. Poulin. 2010. The evolution of host manipulation by parasites: a game theory analysis. *Evolutionary Ecology* 24:773-788.
- Visser, M. E., B. Luyckx, H. W. Nell, and G. J. F. Boskamp. 1992. Adaptive superparasitism in solitary parasitoids - marking of parasitized hosts in relation to the pay-off from superparasitism. *Ecological Entomology* 17:76-82.
- Vorburger, C., C. Sandrock, A. Gouskov, L. E. Castaneda, and J. Ferrari. 2009. Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all-parthenogenetic host-parasitoid interaction. *Evolution* 63:1439-1450.
- Walker, T., P. H. Johnson, L. A. Moreira, I. Iturbe-Ormaetxe, F. D. Frentiu, C. J. McMeniman, Y. S. Leong, Y. Dong, J. Axford, P. Kriesner, A. L. Lloyd, S. A. Ritchie, S. L. O'Neill, and A. A. Hoffmann. 2011. The *w*Mel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476:450-453.
- Webb, B. A., M. R. Strand, S. E. Dickey, M. H. Beck, R. S. Hilgarth, W. E. Barney, K. Kadash, J. A. Kroemer, K. G. Lindstrom, W. Rattanadechakul, K. S. Shelby, H. Thoetkiattikul, M. W. Turnbull, and R. A. Witherell. 2006. Polydnavirus genomes reflect their dual roles as mutualists and pathogens. *Virology* 347:160-174.
- Weeks, A., M. Turelli, W. Harcombe, K. Reynolds, and A. Hoffmann. 2007. From Parasite to Mutualist: Rapid Evolution of *Wolbachia* in Natural Populations of *Drosophila*. *PLoS Biol.* 5:0997-1005.
- Weeks, A. R., and J. A. J. Breeuwer. 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 268:2245-2251.
- Werren, J. H., and L. W. Beukeboom. 1998. Sex determination, sex ratios, and genetic conflict. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:233-261.
- Whitfield, J., and S. Asgari. 2002. Virus or not? Phylogenetics of polydnaviruses and their wasp carriers. *Journal of Insect Physiology* 49:397-405.
- Wolf, J. B. 2003. Genetic architecture and evolutionary constraint when the environment contains genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4655-4660.

ANNEXES

Annexe 1

Patot, S., J. Martinez, R. Allemand, S. Gandon, J. Varaldi, and F. Fleury. 2010. Prevalence of a virus inducing behavioural manipulation near species range border. *Molecular Ecology* 19:2995-3007.

Prevalence of a virus inducing behavioural manipulation near species range border

S. PATOT,* ‡ J. MARTINEZ,* R. ALLEMAND,* S. GANDON, † J. VARALDI* and F. FLEURY*

* Université de Lyon; F-69000, Lyon; Université Lyon 1; CNRS, UMR5558; Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive; F-69622, Villeurbanne, France, † Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE); UMR 5175; 1919 route de Mende; F-34293 Montpellier, France, ‡ Present address: Instituto Gulbenkian de Ciência; Rua da Quinta Grande 6; P-2780-156 Oeiras, Portugal.

Abstract

The densities of conspecific individuals may vary through space, especially at the edge of species range. This variation in density is predicted to influence the diffusion of species-specific horizontally transmitted symbionts. However, to date there is very little data on how parasite prevalence varies around the border of a host species. Using a molecular epidemiology approach, we studied the prevalence of a vertically and horizontally transmitted virus at the edge of the geographic range of its insect host, the *Drosophila* parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*. *L. boulardi* is a Mediterranean parasitoid species showing a recent range expansion to the north (in France). The LbFV virus manipulates the behaviour of females, increasing their tendency to lay additional eggs in already parasitized *Drosophila* larvae (superparasitism). This is beneficial for the virus because it allows the virus to be horizontally transferred during superparasitism. We show that LbFV prevalence is very high in central populations, intermediate in marginal populations and almost absent from newly established peripheral populations of *L. boulardi*. We failed to detect any influence of temperature and diapause on viral transmission efficiency but we observed a clear relationship between prevalence and parasitoid density, and between parasitoid density and the occurrence of superparasitism, as predicted by our epidemiological model. Viral strains were all efficient at inducing the behavioural manipulation and viral gene sequencing revealed very low sequence variation. We conclude that the prevalence reached by the virus critically depends on density-dependent factors, i.e. superparasitism, underlying the selective pressures acting on the virus to manipulate the behaviour of the parasitoid.

Keywords: behavioural manipulation, *Drosophila* parasitoids, epidemiology, *Leptopilina*, species range border, vertically transmitted virus

Received 10 March 2009; revision received 8 April 2010; accepted 15 April 2010

Introduction

All species have a limited distribution and understanding the ecological processes that shape their geographical ranges is an important issue in ecology and biogeography (see Gaston 2009 for a review). Although species have heterogeneous distribution at large spatial scale, a widespread biogeographical assumption is that local abundance and population size declines from the centre towards the range edges of species (Sagarin &

Gaines 2002; Sagarin *et al.* 2006). Despite the fact that this general rule suffers exceptions (see Sagarin *et al.* 2006), many empirical studies are consistent with this 'abundant-center hypothesis' (Sagarin & Gaines 2002; Angert 2009; Gaston 2009; Sagarin *et al.* 2006 for a review).

Variation in abundance towards the range edges is expected to have particular consequences in the context of host–parasite interactions where density-dependent transmission takes place. In particular, classical epidemiological model predicts that specialist parasites are expected to go to extinction at low host density

Correspondence: Sabine Patot; E-mail: spatot@igc.gulbenkian.pt

(Anderson & May 1981; but see Antonovics 2009). Consequently, it is expected that the decrease of density around host species margins should lead to reduced prevalence or to the absence of specialized parasites. However, very few empirical investigations focused on the epidemiology of parasites at the range limit of their hosts (Briers 2003; Alexander *et al.* 2007; references in Gaston 2009).

Symbioses (defined here in the general sense: intimate associations between species that can be mutualistic or parasitic) are extremely frequent in insects, and may have strong effects on host phenotype (Varaldi *et al.* 2003; Tsuchida *et al.* 2004; Varaldi *et al.* 2006a; Teixeira *et al.* 2008; Oliver *et al.* 2009). Symbionts are diverse (viruses, bacteria, fungi), their transmission mode ranges from strictly vertical to strictly horizontal and the interactions with their host range from parasitism to mutualism. Decrease in the density of the host in marginal populations is expected to have consequences on the persistence and spread of symbiotic partners (Anderson & May 1981). Clearly, both the transmission modes of the symbiont (Altizer & Augustine 1997; Rudgers *et al.* 2009) and its host range are key factors determining the expected consequences of a reduction in host density. The prevalence of horizontally transmitted symbionts with density-dependent transmission (see de Castro & Bolker 2005) should decline with a decrease in host density (see, however, the special case of sexually transmitted diseases whose transmission is expected to be frequency dependent, Ryder *et al.* 2005). However, when symbionts are strictly vertically transmitted to host offspring, the frequency of the symbiont should be less affected by variations in host density. Their dynamics should mainly depend on the fitness of infected hosts. Thus, in a given environment, they should provide a fitness benefit to their host to spread (at the exception of manipulative parasites, Vavre *et al.* 2009), as observed with protective symbionts in aphids (Oliver *et al.* 2003, 2009). Lastly, symbionts may benefit from mixed horizontal and vertical transmission. In this case, the transmission of the symbiont is partly linked to the fitness of the host and partly linked to density-dependent processes defining the opportunities of horizontal transmission. Depending on the relative contribution of each transmission mode to the fitness of the symbiont, the consequences of variations in host density may be more or less dramatic.

In this article, we studied a fly-parasitoid-virus community to test whether a decrease in the density of the parasitoid in marginal populations will affect the epidemiology of a virus that benefits from mixed vertical and horizontal transmission. In the south-east of France, *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans* larvae are mainly attacked by two related endoparasitic wasps,

Leptopilina heterotoma and *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera: Figitidae). Both species are solitary parasitoids, i.e. only one parasite per host can complete development to the adult stage. Accordingly, female parasitoids lay a single egg per oviposition. *L. heterotoma* has a holarctic distribution, whereas the distribution of *L. boulardi* is restricted to tropical and Mediterranean climates. In the south of France, where both species coexist, *L. boulardi* is by far the dominant species, outcompeting *L. heterotoma* (Fleury *et al.* 2004, 2009). More to the north, the abundance of *L. boulardi* strongly decreases with a clear-cut species border situated around Valence (45°N, 100 km south of Lyon, Allemand *et al.* 1999 and Fig. 1). Thirty kilometres above this latitude, *L. boulardi* is completely absent and *L. heterotoma* dominates the whole parasitoid community. This situation observed in 1998 has drastically changed during the last decade with a progression of *L. boulardi* of about 60 km to the north (Allemand, unpublished data). This expansion of *L. boulardi* geographic range could be explained by climate modification combined with the high competitive ability of this species. Moreover, some females of *L. boulardi* are sometimes infected with a heritable virus that manipulates their egg laying strategy: infected females are more willing to oviposit in hosts previously parasitized by conspecifics than uninfected females, a behaviour called superparasitism (Varaldi *et al.* 2003, 2006c). This virus, named LbFV (for *Leptopilina boulardi* Filamentous Virus), takes advantage of this behavioural alteration since it can be horizontally transferred during the coexistence of uninfected and infected parasitoid larvae inside the superparasitized *Drosophila* larva (Varaldi *et al.* 2003, 2006a). On the contrary, the sympatric species *L. heterotoma* is not infected by the virus, because of virus specialization or refractoriness of *L. heterotoma* to virus.

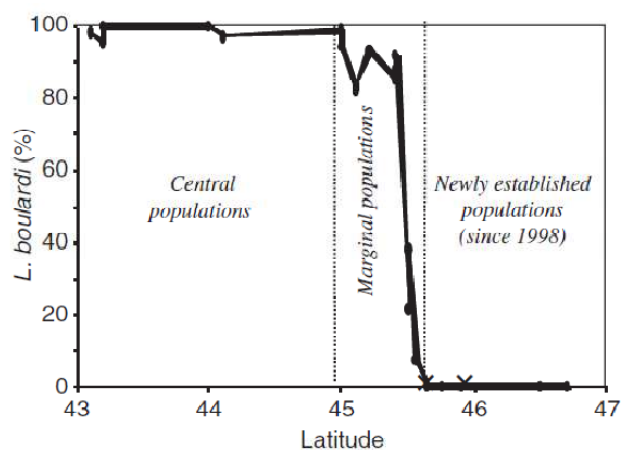


Fig. 1 Relative abundance of *L. boulardi* among *Leptopilina* species (*L. heterotoma* and *L. boulardi*) attacking *Drosophila* larvae in the Rhône valley in 1998 (modified from Allemand *et al.* 1999). The three population groups described in this study are separated on the figure by dotted lines.

infection (Patot *et al.* in prep). Furthermore, to date, all studies failed to detect the virus in *Drosophila* hosts (personal observation). Laboratory experiments showed that LbFV imposes an overall low cost on parasitoid physiology (Varaldi *et al.* 2005) and its effects are restricted to superparasitism behaviour (Varaldi *et al.* 2006b, 2009). Theoretical developments show that horizontal transmission can complement the imperfect vertical transmission allowing it to persist at high frequencies in wasp populations (Gandon *et al.* 2006). However, the model also indicates that the frequency of horizontal transmission is a critical parameter for the epidemiology of the virus (Varaldi *et al.* 2009) and may be impacted by variation in superparasitism phenotype or by variation in the density of *L. boulardi* (which is expected to be directly linked to superparasitism).

In this article, we tested whether the prevalence of LbFV varies among 15 *L. boulardi* populations distributed along the north-south axis of the Rhône valley in France. This sampling includes central, marginal and newly established populations. Because the ability of the virus to manipulate the behaviour of the parasitoid is a critical parameter for virus epidemiology, we also tested whether viruses from different localities were able to manipulate the behaviour of the parasitoid. We

further tested whether the differences in temperature experienced by northern and southern populations may impact the transmission of the virus. Finally, we explored whether variation in *L. boulardi* density were observed at this geographical scale and hence may impact transmission of the virus.

Materials and methods

Sample sites and collection of *L. boulardi* parasitoids

Field populations of *L. boulardi* were sampled during 2004 and/or 2007 in 15 orchards of the south-eastern France, distributed from north to south along the Rhône valley axis (Table 1). We chose sampling sites according to the ecological situation initially observed in 1998 (Fig. 1). We thus defined as central populations (sites 11:15) those that were always included in the geographic range of the species with very high levels of abundance, marginal populations (sites 6:10) those where *L. boulardi* was previously detected with intermediate level of abundance corresponding to the ancient border of the species range and newly established populations (sites 1:5) where *L. boulardi* was never observed before 1998 (Table 1).

Table 1 Collections of *L. boulardi* populations and prevalence of LbFV

Site	Locality	Geographic coordinates	Sampling year	n*	LbFV prevalence	Sequencing
1	Chasselay	45°52' N-4°46' E	2007	11	9 %	x
2	Cailloux-sur-Fontaine	45°51' N-4°52' E	2007	29	7 %	x
3	St Maurice-de-Beynost	45°49' N-4°58' E	2007	30	3 %	x
4	Ste Foy-lès-Lyon	45°44' N-4°48' E	2007	58	0 %	
			2009	14	0 %	
5	St Laurent-d'Agny	45°38' N-4°41' E	2007	12	0 %	
6	Villette-de-Vienne	45°35' N-4°54' E	2007	25	4 %	x
			2009	10	0 %	
7	Sonnay	45°21' N-4°54' E	2007	120	29 %	x
			2009	21	24 %	
8	Epinouze	45°18' N-4°55' E	2007	15	20 %	x
9	Lens-Lestang	45°17' N-5°20' E	2004	59	10 %	x
10	Annonay	45°14' N-4°40' E	2004	40	65 %	
			2007	30	67 %	
11	Gotheron	44°56' N-4°56' E	2004	40	90 %	x
			2007	18	83 %	
			2009	24	71 %	
12	Avignon	43°54' N-4°52' E	2004	40	95 %	x
			2007	23	70 %	
13	Antibes	43°34' N-7°07' E	2004	40	80 %	x
14	Bras	43°28' N-5°57' E	2004	40	83 %	x
15	Pierrefeu-du-Var	43°13' N-6°08' E	2004	40	55 %	x

Samples represent newly colonized (1–5), marginal (6–10) and central (11–15) populations.

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

were tested after one to five generations performed under laboratory conditions: Ville-Sollier: 4 UI and 4 I lines, Cailloux-sur-Fontaine: 4 UI and 4 I lines, Villette-de-Vienne: 4 UI and 1 I lines, Epinouze: 4 UI and 2 I lines, Gotheron: 2 UI and 4 I lines and Avignon: 4 UI and 1 I lines. The superparasitism phenotype was estimated using the same protocol previously described in Varaldi *et al.* (2003). Briefly, individual females (1 or 2 days old) were placed according to their daily rhythm (Fleury *et al.* 2000) from 5 pm to 10 am on 10 first instar *D. melanogaster* larvae in a petri dish containing a layer of agar and a small amount of live yeast. Forty-eight hours later, three to five larvae from each petri dish were dissected and the number of parasites (eggs and larvae) was counted. Superparasitism behaviour of each female was estimated as the mean number of parasitoids per parasitized *Drosophila* host.

Effect of temperature on viral transmission

In order to test for a potential effect of the temperature on viral prevalence, we tested whether temperature may affect viral transmission from one generation to the next. Three temperatures were chosen (18 °C, 20 °C and 26 °C) according to the diapause phenomenon, which is a physiological state of dormancy allowing the parasitoid to survive under low temperatures. In *L. boulardi*, diapause occurs at the end of the larval development. Claret & Carton (1980) showed that *L. boulardi* exhibits 97.4% diapausing larvae at 17.5 °C, 52.7% at 20 °C and 0% at 25 °C, which allowed us to test in the same experiment for the combined effect of temperature and diapause on viral transmission.

For each temperature, 15 replicates were performed by allowing one infected female (S_{ref} line) to oviposit for 24 hours at 26 °C under a 12L:12D photoperiod. Each adult female was placed in a rearing plastic tube (95 mm × 23 mm) containing 15 mL of standard medium and 1-day-old *D. melanogaster* larvae hatched from 125 eggs. In these conditions, superparasitism events are negligible. Consequently, the transmission of the virus is mainly vertical. After the 24 h egg-laying period at 26 °C, tubes were transferred to their respective temperature (18 °C, 20 °C and 26 °C) for development. Ten days after the emergence of the nondiapausing parasitoids, rearing tubes were placed at 26 °C to induce the emergence of diapausing parasitoids. All emerging adult wasps were daily collected and counted. As expected, no diapause was observed at 26 °C, almost all parasitoids entered diapause at 18 °C (except one individual), and intermediate levels of diapause were observed at 20 °C. Thus, the effect of diapause on vertical transmission could only be tested at this last tem-

perature. In total, 50 diapausing *L. boulardi* females and one nondiapausing female were tested for viral infection at 18 °C, 50 diapausing and 50 nondiapausing females at 20 °C and 50 nondiapausing females at 26 °C, using multiplex-PCR (see above).

Relative density of *L. boulardi* and superparasitism in the field

The relative density of *L. boulardi* has been studied in four populations distributed along the north-south axis: one in central area (site 11), two in marginal area (sites 6 and 7) and one in the newly established populations' area (site 4). In September 2009, 12 traps were placed in each orchard during 10 days using the same protocol as previously described. However, in this case, the traps were open, allowing the insects to enter the traps, lay their eggs and leave the traps freely. This provides a reliable estimation of the abundance of each insect species of the community. In the laboratory, all *Drosophila* and parasitoids emerging from traps were collected daily. Based on these counts, we defined a proxy for the density of *L. boulardi* by calculating the ratio between emerging *L. boulardi* and an estimation of the initial number of potential host flies present in the trap. The number of potential host flies was estimated by summing the number of emerging *D. melanogaster*, *D. simulans*, *L. heterotoma* and *L. boulardi* (because each parasitoid emerged from one *Drosophila* host only). This index is a rough estimate of the proportion of potential hosts that were parasitized by *L. boulardi* and will be referred to as the relative density of *L. boulardi* in the following (on average 975 insects per trap were used for this calculation). Note that *D. melanogaster* and *D. simulans* were by far the most abundant *Drosophila* species (mean frequency = 0.98) in the traps. On a sample of *L. boulardi* females, we also studied LbFV prevalence using the multiplex PCR diagnostic as previously described (Table 1). The link between the relative density of *L. boulardi* and the occurrence of superparasitism was studied using data collected in Gotheron (site 11) using similar open traps ($n = 10$). Traps were exposed in the field for few days (before the pupation of *Drosophila* larvae) and a sample of 30 *Drosophila* larvae per trap were dissected in order to count the number of parasitoid eggs per host. This gives a measurement of the intensity of superparasitism. Traps were then incubated in the laboratory at 23 °C until the emergence of all insects in order to calculate the relative density of *L. boulardi* as previously described. They were exposed in June, July, August and September 2001. During this period, the dynamics of *L. boulardi* varies greatly, allowing a test of the effect of density variation on superparasitism intensity.

Modelisation of the epidemiology of the virus in relation to parasitoid density

We used the model of Gandon *et al.* (2006) developed to study the epidemiology of LbFV in populations of *L. boulearidi*. In this model, the virus is both vertically and horizontally transmitted and it manipulates the behaviour of the parasitoid. We used this model to generate predictions regarding the expected relationship between different variables of the model when the system is assumed to reach an epidemiological equilibrium (see Supporting information 1). First, we focused on the relationship between the expected number of parasitoid eggs per parasitized hosts and the number of parasitoids as this informs our interpretation of the observed data presented in Fig. 5. Second, we used this model to study the relationship between the relative density of the parasitoids (measured as the proportion of parasitized larvae) and the prevalence of the virus among adult parasitoids. To do this, we simulated variations in the density of parasitoids by varying the mortality rate of adult females. We present numerical simulations for various parameter values of the mortality rate of adult females and various rates of horizontal transmission

(see Supporting information 1 for additional information on the model).

Statistical analysis

Data were analysed using R version 2.7.0. To analyse prevalence and relative density data, we used a generalized linear model (GLM). Given the binary nature of the data (presence/absence of infection), we used a binomial error structure (logit link function) and chi-square tests of significance.

Results

Prevalence of LbFV among *L. boulearidi* populations

Infections by LbFV vary according to the geographic origin of *L. boulearidi* populations (Fig. 2). Analysis performed separately on 2004 and 2007 samples both showed a significant negative correlation between latitude and LbFV prevalence (2004: dev = 30.03, ddl = 1, $P < 0.0001$; 2007: dev = 100.15, ddl = 1, $P < 0.0001$). Clearly, infections were very high in central populations with a mean of 77.5%. In marginal populations, preva-

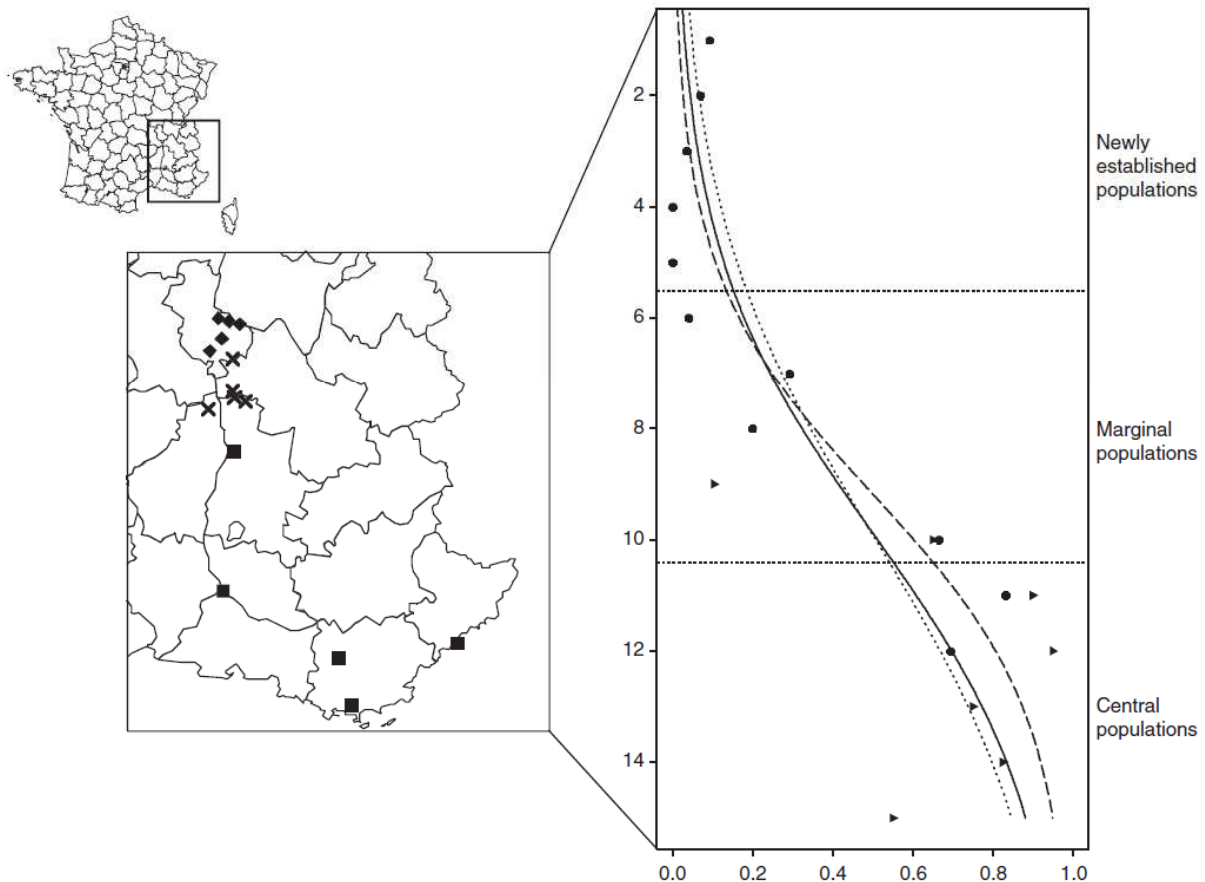


Fig. 2 Prevalence of LbFV across the *L. boulearidi* populations in south-eastern France and predictions of the generalized linear model. The populations were sampled in 2004 (triangles) or 2007 (dots). Continuous line: model prediction for all data (2004 and 2007); dotted line: model prediction for 2004; dashed line: model prediction for 2007.

lence of the virus sharply decreased reaching an average of 30% whereas in newly established *L. boucardi* populations, the prevalence dropped to 3.3% with two populations in this area apparently virus free (sites 4 and 5). Overall, these results show that virus infection is very common since LbFV was detected in 13 out of 15 populations with a progressive decrease of LbFV prevalence in direction of the limit of the *L. boucardi* geographic range.

Three populations sampled both in 2004 and 2007 allowed to test for the temporal stability of viral infection (Table 1). In these three populations, there was no strong variation of the LbFV prevalence between these two sampling years, although this effect was significant ($\chi^2 = 8.59$, $ddl = 1$, $P = 0.0034$). The infection proved stable in site 10 (Annonay) and a slight decrease was observed in 2007 for sites 11 and 12 (Gotheron and Avignon). This may be explained by the fact that molecular test was performed on F1 females (after one generation in the laboratory) in 2007 whereas it was done on individuals emerging from field traps in 2004 (see 'Materials and methods'). Under the hypothesis that some imperfect vertical transmission occurred, a lower prevalence is expected when tests were performed on F1 generation.

Viral sequence diversity

Twelve viral sequences of 399 pb were obtained from the French populations (one per locality) (accession no.: FN691999, FN692010 : FN692020) together with four other viral sequences from the south of Europe (Italy and

Spain), Africa (Ivory Coast) and South America (Brazil) (accession no.: FN692021 : FN692024). The alignment of the 16 sequences revealed that only one originating from the locality Gotheron (site 11), differed from the others by 1 bp only (site 224). This difference was found with two independent sequencing reactions, which ruled out the hypothesis of a sequencing error. However, the sequencing of nine additional viral samples from Gotheron (accession no.: FN692000 : FN692009) did not reveal the 1 bp difference found previously and appeared identical to the 15 other sequences. Apart from this difference, all sequences were identical to the previously described sequence (Patot *et al.* 2009).

Behavioural manipulation induced by LbFV strains

The effect of viral infection on superparasitism behaviour of parasitoid females was tested in two populations of each of the three modalities, i.e. central, marginal and newly colonized sites (Ville-Sollier and sites 2, 6, 8, 11, 12). For these six sites, we compared superparasitism levels of uninfected and infected lines, but since we analysed sympatric parasitoid–virus associations where both the virus and host genotypes may vary, we did not test the site effect. Moreover, this comparison is limited because behavioural assays were not performed at the same time among sites. In all parasitoid–virus associations tested, LbFV induces a very high level of superparasitism whereas uninfected lines did not show a significant level of superparasitism (one parasitoid per *Drosophila* larva) (Fig. 3). Thus in all sites,

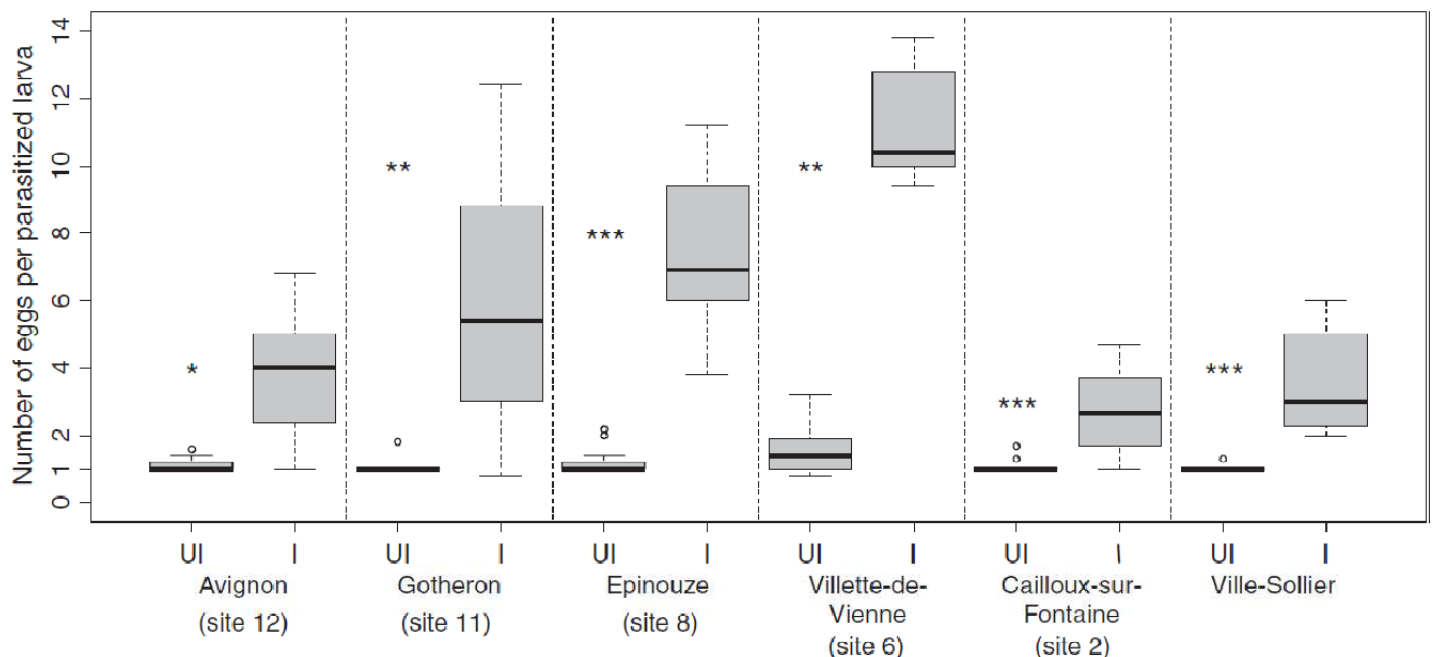


Fig. 3 Superparasitism behaviour of uninfected (UI) and infected (I) isofemale lines from six *L. boucardi* populations of south-eastern France. Wilcoxon test: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$.

Sites 11 and 12: central populations; sites 6 and 8: marginal populations; sites 2 and Ville-Sollier: newly established populations.

LbFV is able to manipulate egg laying behaviour of the parasitoids by inducing superparasitism.

Effect of temperature on virus transmission

As expected, temperature had a drastic effect on the probability of a parasitoid larva entering diapause ($P = 6 \times 10^{-9}$). However, there was no effect of temperature on viral transmission, whether diapause occurred or not. Indeed, results show very little variation since the frequency of infection after development was 0.98 (49/50) at 18 °C (diapausing), 0.98 (49/50) at 26 °C (non-diapausing) and 1.0 (50/50) at 20 °C both for diapausing and nondiapausing females. Furthermore, the only individual that did not enter diapause at 18 °C was infected. Thus, there is no evidence for an effect of temperature or diapause on viral vertical transmission (all P values > 0.99).

Relative density of *L. boulandi* and viral prevalence

Sampling conducted in 2009 permitted to estimate the density of *L. boulandi* in the *Drosophila*-parasitoids community in four sites distributed along the north-south axis. The relative density of *L. boulandi* was clearly correlated with the position of populations along the north to south axis ($\chi^2 = 7244.5$, d.f. = 1, $P < 0.0001$) (Fig. 4). In the two most northern populations, the relative densities of *L. boulandi* (measured as the proportion of potential hosts that are parasitized by *L. boulandi*) were only 0.006 at Ste Foy-lès-Lyon (site 4) and 0.015 at Villette-de-Vienne (site 6). More to the South, the relative density increased (0.107 at Sonnay, site 7), and finally

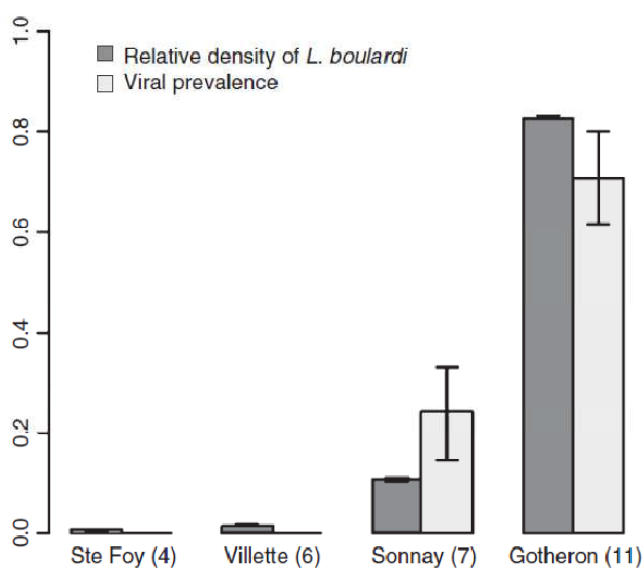


Fig. 4 Relative density of *L. boulandi* and LbFV prevalence in four populations of south-eastern France sampled in September 2009. Bars indicate standard deviation.

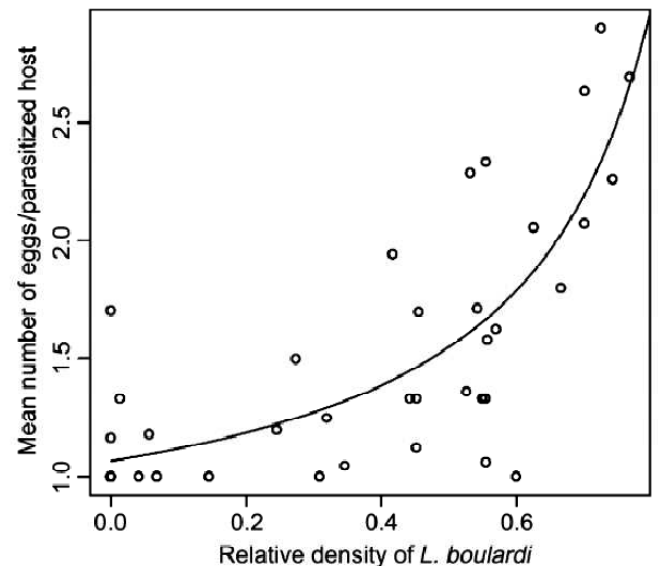


Fig. 5 Mean number of eggs per parasitized host as a function of the relative density of *L. boulandi*. Points correspond to traps exposed from June to September 2001 in Gotheron (site 11). The relative density of *L. boulandi* was transformed using $p/(1-p)$ transformation in order to achieve linearity for regression analysis.

reached 0.83 in the most southern population (Gotheron, site 11).

We also studied the LbFV prevalence in these four locations. Interestingly, the prevalence obtained in 2009 sampling were consistent with data obtained in 2004 and 2007 (see Table 1). Hence, this 2009 sampling revealed a similar cline to that observed in 2007 and 2004. Importantly, there is a clear positive correlation between the relative density of *L. boulandi* and viral prevalence ($t = 6.1$, d.f. = 2, $P = 0.026$) (Fig. 4). Furthermore dissections of *Drosophila* larvae in the field indicated a clear positive correlation between the density of *L. boulandi* and the intensity of superparasitism ($F(1,35) = 56.46$, $P < 10^{-8}$; Fig. 5). This data is consistent with the prediction of our epidemiological model (see Fig. S1).

Modelisation of the epidemiology of the virus in relation to parasitoid density

By varying the mortality rate of the parasitoid, we obtained variations in the proportion of parasitized hosts (similar to the 'relative density' in previous sections). The model predicts that below a critical value of the proportion of parasitized host, the virus cannot maintain in the populations (when m is around 0.1 with this parameter set). Above this threshold, the virus prevalence increases with an increase in the proportion of parasitized hosts (Fig. 6). Note, however, that for very low values of mortality rates the model predicts a

A widespread virus with low sequence diversity

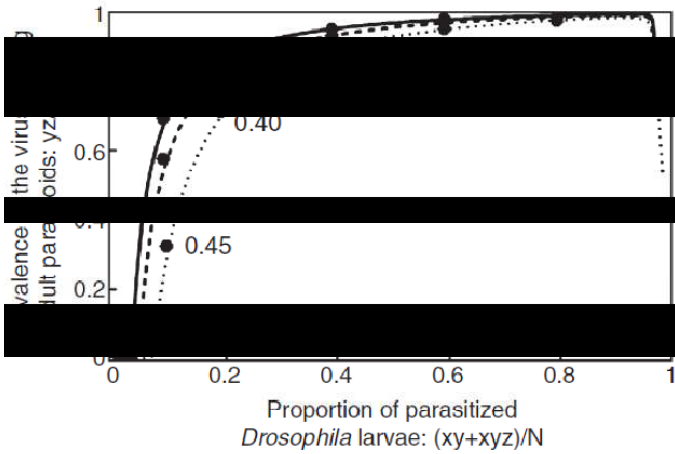


Fig. 6. Predictions for the relation between the equilibrium frequency of virus infection in *L. bouvardi* and the rate of parasitism of *Drosophila* larvae using the epidemiological model presented in Gandon *et al.* (2006). Variations in the rate of parasitism were obtained by varying the mortality of the parasitoid (m varies between 0.001 and 0.5) and the probability of horizontal transmission: th takes the values 0.25 (dotted line), 0.5 (dashed line) and 0.75 (full line). Some values of m are indicated on the curves. *Drosophila* larvae: $N = 100$, $h = 0.2$.

Spain, Ivory Coast and Brazil indicating a wide distribution of this virus. LbFV gene sequencing revealed

nucleotide difference was observed in one sequence). This absence of variation in viral sequences could have

an event of cross-species transmission. This phenomenon has been suggested to explain the low sequence diversity observed for a vertically transmitted virus infecting *D. melanogaster* (Comstock *et al.* 2007). Alternatively, an LbFV mutant may have recently replaced the resident LbFV genotype. Finally, the low viral diversity may be the consequence of strong stabilizing selection acting on the gene. Indeed, we suspect that this is an essential gene for the virus because the cDNA of this gene, obtained from a suppressive subtracted hybridization (SSH) experiment, was found to be highly conserved (Patot *et al.* 2009).

Effect of parasitoid mortality on the prevalence of the virus

egg limitation. In nature, such low levels of mortality are probably unrealistic. Besides, several studies report very low values of egg limitations in parasitoids (Seven-

model predicts a positive correlation between the proportion of parasitized larvae and the prevalence of the virus. In these numerical simulations, we only varied the extrinsic mortality rates of adult parasitoids. This is

any data supporting this variation.

Discussion

Although it is expected that variations in host density dependent transmission (Anderson & May 1981), and that species often change local densities in their ranges have rarely been used to test this prediction. In this article, we analysed the prevalence of a virus that the virus LbFV is widespread in *L. bouvardi* populations, prevalence dramatically decreases in marginal populations. This cline of prevalence was repeatedly observed simple stochastic effects are involved in this pattern.

Low viral prevalence in marginal populations

Our study revealed that LbFV prevalence in natural Whereas LbFV is well established and reached very infection decreases in marginal populations and reaches a very low frequency (close to zero) in newly estab-

symbiont or parasite. For instance the intracellular bac-

from worldwide introduced populations whereas it is highly prevalent in native South American popula-

in a meta-analysis, Mitchell & Power (2003) found that introduced species in the USA from Europe

native counterparts. Very few articles have addressed the question of the prevalence of symbionts in the con-

found that a freshwater gastropod snail suffered more

graphical range than in its central area. Similarly, but on plant models, Garcia *et al.* (2000) found that the

higher in its marginal area than in its central area. On

the contrary, Alexander *et al.* (2007) found the opposite
 gens and predators. Depending on the system, varia-
 tions.

Laboratory experiments showed that viral infection in
 slightly reduced developmental rate and adult body
 size, and leads to a significant decrease in locomotor

how these costs are expressed in the wild especially
 infection induces a higher cost at the limit of the geo-
 virus free individuals should have a higher fitness, thus
 individuals, which colonize new sites. Under this
 hypothesis, the spread of the virus would not have yet

2004 to 2009.

No evidence of a temperature effect

Some studies reported that the transmission of numer-
 ous symbionts of insects is dependent on temperature

explaining the pattern. We thus studied the virus trans-
 mission) under three temperatures (18 °C, 20 °C

individuals of this study entered into the typical over-
 wintering stage (larval diapause), and we found no
 diapause probably lasts for months under natural con-
 ditions, we cannot completely rule out the possibility
 mission. Also we cannot exclude that temperature
 impacts the efficiency of horizontal transmission. Previ-

1996), and to decreased bacterial density in the mos-
 quito *Aedes albopictus* (Bourgeois *et al.* 2004). Com-
 mosquitos, have also been the subject of investigations
 are less transcribed in diapausing versus nondiapausing
 ones but successfully reach the adult stage in both con-
 fidelity of the viral transmission is available. In conclu-
 sion, our data on *L. boulardi* suggest that in our experi-

Depending on ecological conditions such as the parasitoids-*Drosophila* ratio, the opportunities of horizontal transmission of LbFV among *L. boulardi* individuals may vary. Indeed, if this ratio is low (numerous *Drosophila* for few parasitoids), there will be only a few

transmission are not sufficient to compensate for the imperfect vertical transmission of the virus. Above this threshold, the virus is able to persist in the population but its equilibrium frequency will directly depend on the relative density of the parasitoid (Fig. 6 of this article and Fig. 13.3 in Varaldi *et al.* 2009). Thus, from a theoretical point of view, variation in the parasitoid-*Drosophila* ratio should induce variation in opportunities for horizontal transmission and finally variation in virus prevalence.

By using open traps, we were able to calculate a parasitoid-*Drosophila* ratio, which constitutes a good index of the density of *L. boulandi* in newly established, marginal and central populations. This index is a rough parasitization rate of *Drosophila* larvae by *L. boulandi* and thus measures the relative density of the parasitoid among *Drosophila* larvae. This index decreased from the South (central populations) to the North (newly established populations). Furthermore, dissections of larvae collected in the wild revealed the occurrence of frequent superparasitism and a clear correlation between the density index and the intensity of superparasitism. Taken together, these data suggest that the competition for hosts among *L. boulandi* females is very high in the South with frequent superparasitism events and very low in the North with much less superparasitism, consistently with previous data (Fleury *et al.* 2004). Thus, the opportunities for horizontal transmission are much higher in the central than in marginal or in newly established populations. As predicted by our epidemiological model, this pattern of variations in the density of *L. boulandi* should translate into variations in the viral prevalence which is consistent with observations.

Conclusion

This study aimed at investigating whether variations in the density of a species in its range edge may induce variations in the prevalence of a symbiont showing mixed vertical and horizontal transmission. Our results clearly showed a cline in prevalence of the virus LbFV among newly established, marginal and central populations of its parasitoid host *L. boulandi*. This pattern is unlikely to result from stochastic factors since it was repeatedly observed in 2004, 2007 and 2009. We were unable to induce variation in vertical transmission rates by altering the temperature. However, our data indicate that opportunities for horizontal transmission (superparasitism) vary monotonically among populations and theoretical developments show that this may explain the cline in viral prevalence. Although alternative hypothesis may be evoked (as discussed above), this provides a satisfying model explaining the pattern. If this scenario is true, we can draw two conclusions.

First, the predictions rely on the fact that vertical transmission is incomplete. Indeed, if vertical transmission was perfect, the virus should either invade the entire population or should be eliminated from the populations depending on the fitness cost and horizontal transmission opportunities (Lipsitch *et al.* 1995). Here, the data indicate intermediate viral prevalence, suggesting that vertical transmission is incomplete in the field. Second, our results underline the critical role played by horizontal transmission in the propagation and maintenance of the virus. Because horizontal transmission opportunities are obtained from superparasitism, this suggests that superparasitism manipulation induced by the virus is under strong selective pressure, as has been shown theoretically (Gandon *et al.* 2006). This is consistent with the fact that viruses from all populations are able to manipulate the behaviour of the wasp.

In turn, these results raise new questions about the possible consequences of the presence of LbFV on the community. The presence of the virus strongly reduces the competitive ability of *L. boulandi* against *L. heterotoma*, another parasitoid of the community uninfected by LbFV (Patot *et al.* in prep). In central area of *L. boulandi* distribution, high infection rate may thus participate in maintaining parasitoids diversity, in particular the coexistence between *L. boulandi* and *L. heterotoma* (Fleury *et al.* 2004, 2009). By inducing detrimental effects on *L. boulandi* (due to egg-wastage induced by superparasitism), LbFV would reduce the superiority of *L. boulandi*, thus balancing the asymmetry in competitive abilities among *Leptopilina* species. The intensity of the inter-specific competition in these situations and the precise role of this widespread heritable virus on the *Drosophila*-parasitoid community have yet to be evaluated.

Acknowledgements

We are grateful to the INRA centers of Avignon and Gotheron and to the land owners for giving us the possibility to collect insects in their orchards. We thank Patricia Gibert for the help in the field and temperature experiment. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR CNRS 5558), Lyon1 University and the French Ministry « Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Fonds National de la Science, ACI Jeunes Chercheurs 2004 Projet 10013». We also thank members of the GDR 2153 and three anonymous referees for useful comments on the manuscript.

References

- Alexander HM, Price S, Houser R, Finch D, Tourtellot M (2007) Is there reduction in disease and pre-dispersal seed predation at the border of a host plant's range? Field and herbarium studies of *Carex blanda* *Journal of Ecology*, **95**, 446–457.

- Allemand R, Fleury F, Lemaitre C, Boulétreau M (1999) Dynamique des populations et interactions compétitives chez deux espèces de *Leptopilina*, parasitoïdes de drosophiles, dans la vallée du Rhône (Hymenoptera: Figitidae). *Annales de la Société Entomologique de France*, **35**(Suppl.), 97–103.
- Altizer SM, Augustine DJ (1997) Interactions between frequency-dependent and vertical transmission in host-parasite systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **264**, 807–814.
- Anderson RM, May RM (1981) The population-dynamics of micro-parasites and their invertebrate hosts. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, **291**, 451–524.
- Angert AL (2009) The niche, limits to species' distributions, and spatiotemporal variation in demography across the elevation ranges of two monkeyflowers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **106**, 19693–19698.
- Antonovics J (2009) The effect of sterilizing diseases on host abundance and distribution along environmental gradients. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **276**, 1443–1448.
- Briers RA (2003) Range limits and parasite prevalence in a freshwater snail. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **270**, S178–S180.
- Carpenter JA, Obbard DJ, Maside X, Jiggins FM (2007) The recent spread of a vertically transmitted virus through populations of *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, **16**, 3947–3954.
- de Castro F, Bolker B (2005) Parasite establishment and host extinction in model communities. *Oikos*, **111**, 501–513.
- Claret J, Carton Y (1980) Diapause in a tropical species, *Cothonaspsis-boulardi* (parasitic Hymenoptera). *Oecologia*, **45**, 32–34.
- David J (1962) A new medium for rearing *Drosophila* in axenic condition. *Drosophila Info Service*, **36**, 128.
- Fleury F, Allemand R, Vavre F, Fouillet P, Boulétreau M (2000) Adaptive significance of a circadian clock: temporal segregation of activities reduces intrinsic competitive inferiority in *Drosophila* parasitoids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **267**, 1005–1010.
- Fleury F, Ris N, Allemand R et al. (2004) Ecological and genetic interactions in *Drosophila*-parasitoids communities: a case study with *D. melanogaster*, *D. simulans* and their common *Leptopilina* parasitoids in south-eastern France. *Genetica*, **120**, 181–194.
- Fleury F, Gibert P, Ris N, Allemand R (2009) Ecology and life history evolution of frugivorous *Drosophila* parasitoids. *Advances in Parasitology*, **70**, 3–44.
- Frid L, Myers JH (2002) Thermal ecology of western tent caterpillars *Malacosoma californicum pluviale* and infection by nucleopolyhedrovirus. *Ecological Entomology*, **27**, 665–673.
- Gandon S, Rivero A, Varaldi J (2006) Superparasitism evolution: adaptation or manipulation? *American Naturalist*, **167**, E1–22.
- Garcia D, Zamora R, Gomez JM, Jordano P, Hódar JA (2000) Geographical variation in seed production, predation and abortion in *Juniperus communis* throughout its range in Europe. *Journal of Ecology*, **88**, 436–446.
- Gaston KJ (2009) Geographic range limits: achieving synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **276**, 1395–406.
- Guo XX, Zhao TY, Dong YD, Lu BL (2007) Survival and replication of dengue-2 virus in diapausing eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **44**, 492–497.
- Hurst GDD, Jiggins FM, Robinson SJ (2001) What causes inefficient transmission of male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*? *Heredity*, **87**, 220–226.
- Johnson DW, Boucias DB, Barfield CS, Allen GE (1982) A temperature-dependent developmental model for a nucleopolyhedrosis virus of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **40**, 292–298.
- Kilpatrick AM, Meola MA, Moudy RM, Kramer LD (2008) Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *Plos Pathogens*, **4**, e1000092, doi: 10.1371/journal.ppat.1000092.
- Kobayashi M, Inagaki S, Kawase S (1981) Effect of high temperature on the development of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **38**, 386–394.
- Lipsitch M, Nowak MA, Ebert D, May RM (1995) The population-dynamics of vertically and horizontally transmitted parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **260**, 321–327.
- Mitchell CE, Power AG (2003) Release of invasive plants from fungal and viral pathogens. *Nature*, **421**, 625–627.
- 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, USA*, **100**, 1803–1807.
- Oliver KM, Degan PH, Hunter MS, Moran NA (2009) Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. *Science*, **325**, 992–994.
- Osaka R, Nomura M, Watada M, Kageyama D (2008) Negative effects of low temperatures on the vertical transmission and infection density of a *Spiroplasma* endosymbiont in *Drosophila hydei*. *Current Microbiology*, **57**, 335–339.
- Patot S, Lepetit D, Charif D, Varaldi J, Fleury F (2009) Molecular detection, penetrance, and transmission of an inherited virus responsible for behavioral manipulation of an insect parasitoid. *Applied and Environmental Microbiology*, **75**, 703–710.
- Perrot-Minnot MJ, Guo LR, Werren JH (1996) Single and double infections with *Wolbachia* in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*: effects on compatibility. *Genetics*, **143**, 961–972.
- Reisen WK, Kramer LD, Chiles R, Wolfe TM, Green EGN (2002) Simulated overwintering of Encephalitis viruses in diapausing female *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **39**, 226–233.
- Reuter M, Pedersen JS, Keller L (2005) Loss of *Wolbachia* infection during colonisation in the invasive Argentine ant *Linepithema humile*. *Heredity*, **94**, 364–369.
- Rosenheim JA (1999) The relative contributions of time and eggs to the cost of reproduction. *Evolution*, **53**, 376–385.
- Ruang-areerate T, Kittayapong P, McGraw EA, Baimai V, O'Neill SL (2004) *Wolbachia* replication and host cell division in *Aedes albopictus*. *Current Microbiology*, **49**, 10–12.
- Rudgers JA, Afkhami ME, Rua MA et al. (2009) A fungus among us: broad patterns of endophyte distribution in the grasses. *Ecology*, **90**, 1531–1539.

- Ryder JJ, Webberley KM, Boots M, Knell RJ (2005) Measuring the transmission dynamics of a sexually transmitted disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **102**, 15140–15143.
- Sagarin RD, Gaines SD (2002) Geographical abundance distributions of coastal invertebrates: using one-dimensional ranges to test biogeographic hypotheses. *Journal of Biogeography*, **29**, 985–997.
- Sagarin RD, Gaines SD, Gaylord B (2006) Moving beyond assumptions to understand abundance distributions across the ranges of species. *Trends in Ecology and Evolution*, **21**, 524–530.
- Sevenster JG, Ellers J, Driessen G (1998) An evolutionary argument for time limitation. *Evolution*, **52**, 1241–1244.
- Shoemaker DD, Ross KG, Keller L, Vargo EL, Werren JH (2000) *Wolbachia* infections in native and introduced populations of fire ants (*Solenopsis* spp.). *Insect Molecular Biology*, **9**, 661–673.
- Teixeira L, Ferreira A, Ashburner M (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *Plos Biology*, **6**, 2753–2763.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4876–4882.
- Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science*, **303**, 1989.
- Varaldi J, Fouillet P, Ravallec M *et al.* (2003) Infectious behavior in a parasitoid. *Science*, **302**, 1930.
- Varaldi J, Bouletreau M, Fleury F (2005) Cost induced by viral particles manipulating superparasitism behaviour in the parasitoid *Leptopilina boulardi*. *Parasitology*, **131**, 161–168.
- Varaldi J, Gandon S, Rivero A, Patot S, Fleury F (2006a) A newly discovered virus manipulates superparasitism behavior in a parasitoid wasp. In: *Insect Symbiosis* (ed. Bourtzis KMTA), pp. 119–139. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Varaldi J, Petit S, Bouletreau M, Fleury F (2006b) The virus infecting the parasitoid *Leptopilina boulardi* exerts a specific action on superparasitism behaviour. *Parasitology*, **132**, 747–756.
- Varaldi J, Ravallec M, Labrosse C *et al.* (2006c) Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Journal of Insect Physiology*, **52**, 1202–1212.
- Varaldi J, Patot S, Nardin M, Gandon S (2009) A virus-shaping reproductive strategy in a *Drosophila* parasitoid. *Advances in Parasitology*, **70**, 333–363.
- Vavre F, Mouton L, Pannebakker BA (2009) *Drosophila*-parasitoid communities as model systems for host-*Wolbachia* interactions. *Advances in Parasitology*, **70**, 299–331.
- Woodring J, Chandler LJ, Oray CT *et al.* (1998) Diapause, transovarial transmission, and filial infection rates in geographic strains of La Crosse virus-infected *Aedes triseriatus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **58**, 587–588.

Sabine Patot is interested in symbiont influence on the structure of host's populations and in symbionts interactions. Julien Martinez is a PhD student working on evolutionary issues on the *L.boulardi*/LbFV interaction. Roland Allemand is involved in researches on the structure and dynamics of host-parasitoid populations in frugivorous *Drosophila* communities. Sylvain Gandon is a theoretical biologist interested in evolutionary epidemiology. Julien Varaldi is working on the influence of symbiont in host-parasitoid interactions. Finally, Frédéric Fleury's work focuses on the genetics of adaptation in insects.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Supporting information 1: an epidemiological model

Table S1 Main parameters and variables of the model.

Fig. S1 Predictions for the relation between the expected number of parasitoid eggs per host and the proportion of parasitized larvae using the epidemiological model presented in Gandon *et al.* (2006) at equilibrium.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Annexe 2

Varaldi, J., Martinez, J., Patot, S., Lepetit, D., Fleury, F. and Gandon, S. 2011. An inherited virus manipulating the behavior of its parasitoid host: epidemiology and evolutionary consequences. *In: Parasitoid viruses: symbionts and pathogens*. Beckage, N.E. and Drezen, J.M., eds. Academic Press, London, UK, pp. 203-214.

An Inherited Virus Manipulating the Behavior of its Parasitoid Host: Epidemiology and Evolutionary Consequences

Julien Varaldi*, Julien Martinez*, Sabine Patot*, David Lepetit*, Frédéric Fleury* and Sylvain Gandon†

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

†Centre d'Ecologie Fonctionnelle et Evolutive (CEFE); UMR 5175; 1919 route de Mende; F-34293 Montpellier, France

SUMMARY

Insect endoparasitoids harbor a great diversity of viruses within their reproductive tracts. These viruses are injected within the host together with the parasitoid eggs and are often vertically transmitted from mother to offspring. Some of these viruses have evolved towards a mutualistic relationship with the parasitoid since they protect the parasitoid eggs from the host immune response. However, most parasitoid viruses have no clear phenotypic effects, and the means by which they are maintained in parasitoid populations is unclear. A virus infecting the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina boulardi* has been discovered. This virus strongly alters the superparasitism behavior of the parasitoid by increasing its tendency to lay supernumerary eggs in parasitized hosts. The virus is maternally transmitted and also horizontally transmitted in conditions of superparasitism. The virus manipulates the behavior of the parasitoid thus enhancing its own transmission. In this chapter we review the current understanding of this parasitoid/virus system, describing both experimental approaches and theoretical studies. We suggest that virus-induced superparasitism manipulation may be common since the theoretical model used predicts that all parasitoid infectious viruses of the genital tract would be selected for the enhancement of the natural superparasitism tendency of their parasitoid host.

ABBREVIATIONS

ES	evolutionarily stable
ESS	evolutionarily stable strategy
LbFV	<i>Leptopilina boulardi</i> filamentous virus
NS	nonsuperparasitizing
PCR	polymerase chain reaction
S	superparasitizing
SSH	suppressive subtractive hybridization
VLP	virus-like particles

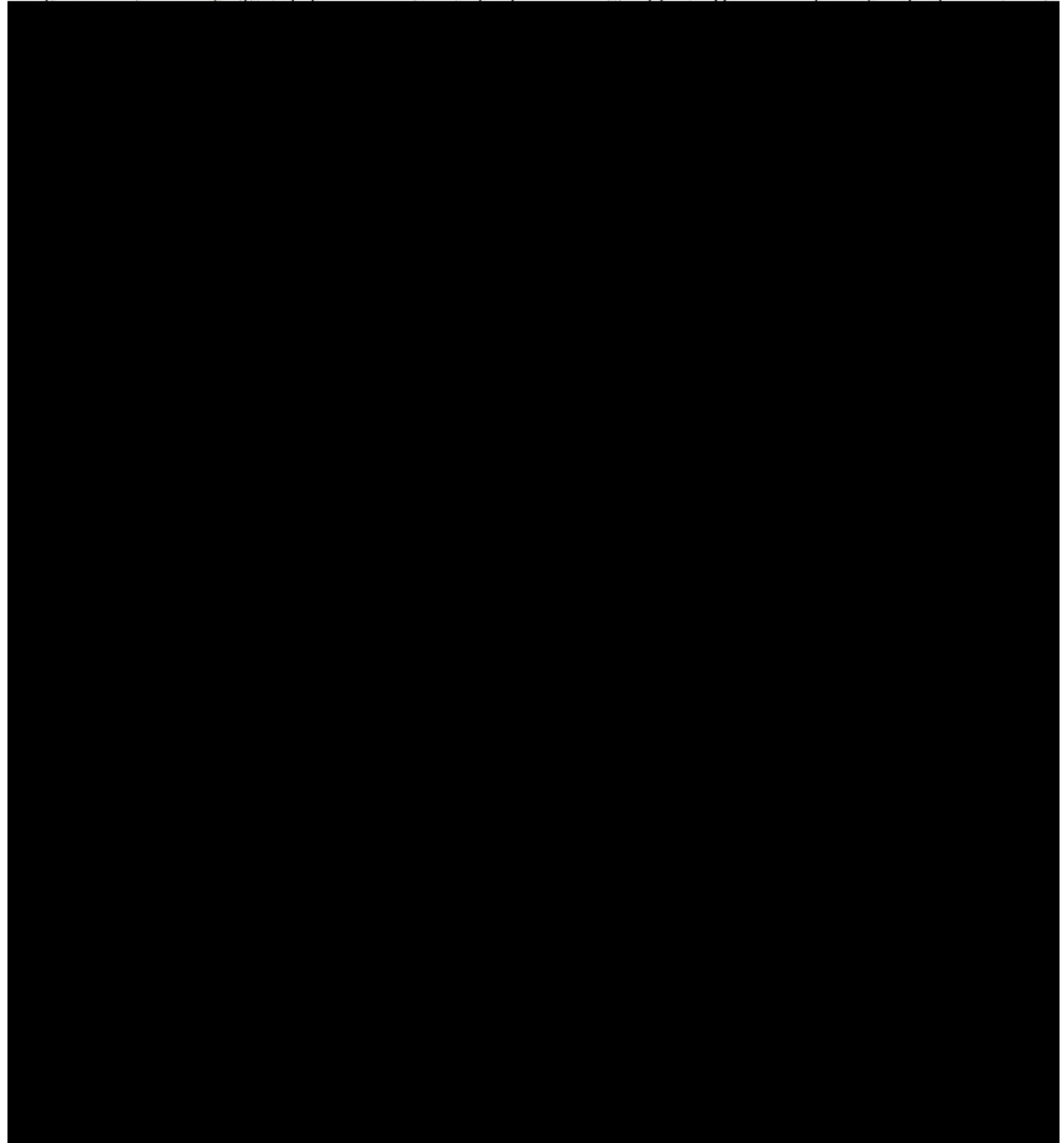
INTRODUCTION

Insect endoparasitoids have a very special way of life. They live as parasites inside the body of other arthropods during their larval stages (see Godfray (1994) for a review). During this parasitic phase, the developing parasitoids feed on the host's tissues and/or hemolymph and they ultimately kill the host.

The parasitoid eggs and larvae are potentially exposed to the host immune response. During oviposition, parasitoid females usually inject a complex set of proteins and particles (secreted from the venom gland and/or the ovaries) inside the host. These injected fluids are involved in the protection of the egg from the host immune response (see Poirié *et al.* (2009) for a review). Interestingly, it has been repeatedly found that these fluids may contain viruses or virus-like particles (VLPs). In particular, more than 17,500 braconid species and 15,000 ichneumonid species inject virions of a polydnavirus inside the host. The genes of the polydnavirus are then expressed inside the parasitized host and manipulate the physiology of the host. They are necessary for the development of the parasitoid offspring and all individuals from these species do harbor the virus. Although it is now clear that they have a viral origin (Bézier *et al.*, 2009; Volkoff *et al.*, 2010), they have lost their autonomy and their transmission is ensured by their integration in wasp chromosomes.

Beside polydnaviruses, parasitoid venoms or ovarian fluids may contain a great diversity of viruses and/or VLPs. These viruses were first described by investigators using electron microscopy (Stoltz and Vinson,

1977; Barratt *et al.*, 1999; Luo and Zeng, 2010) but their discrimination) and often avoid laying eggs in the already



VIRUS DISCOVERY

In solitary parasitoids, one host supports the development

et al., 2006b). The infectious nature of the S-inducing element was further confirmed by injecting solutions derived from S individuals (ovaries and poison gland) into *Drosophila* larvae parasitized by NS females. Solutions

to recognize parasitized from unparasitized hosts (host NS line), whereas NS control injections did not induce

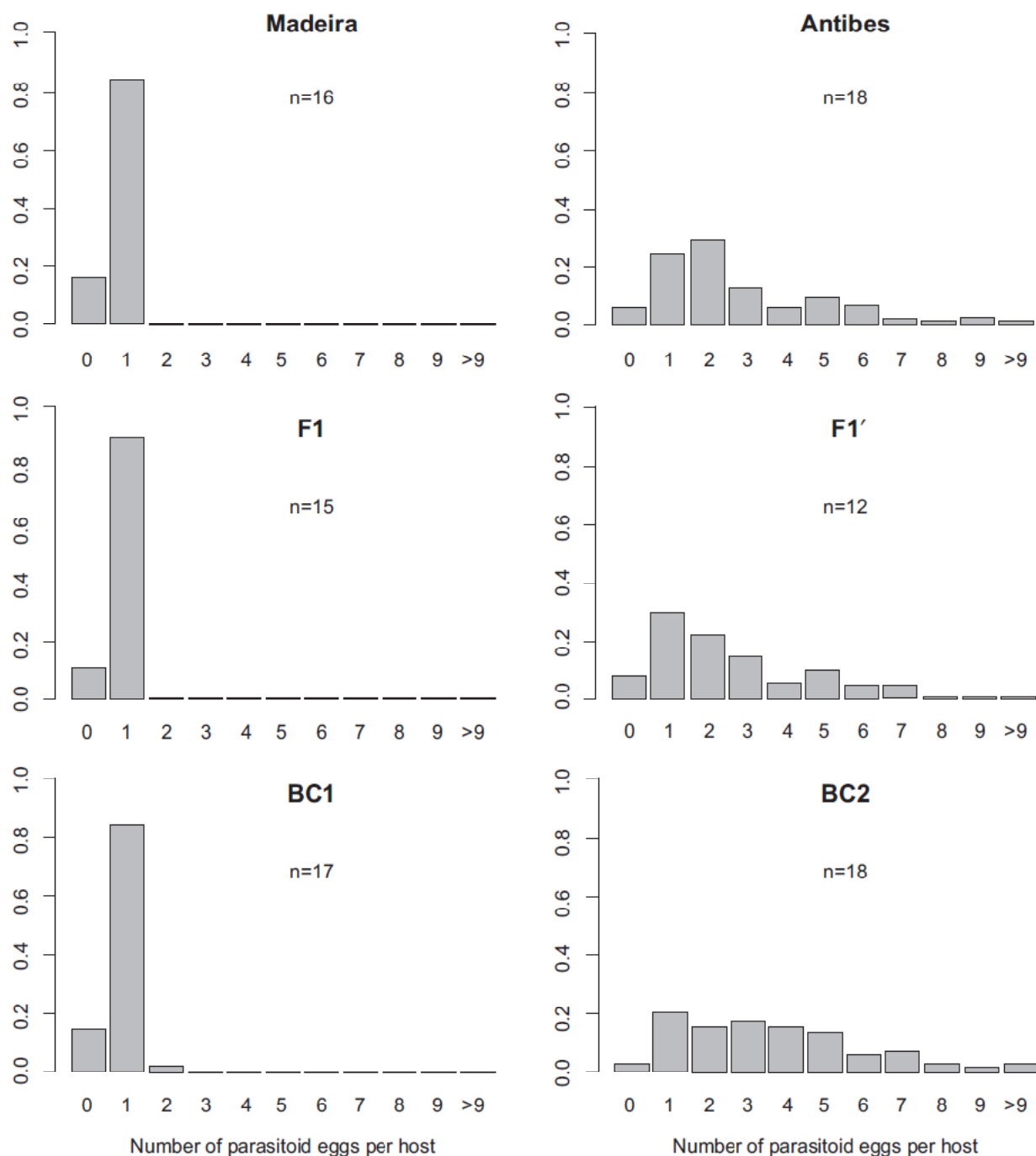


FIGURE 1 Distribution of the number of parasitoid eggs/host larva in Madeira (S phenotype) and Antibes (S phenotype) parental lines, F1 and 2 backcrosses (BC) illustrating two generations of introgression: (mother \times father) : F1: M \times A ; F19: A \times M ; BC1: (M \times A) \times A; BC2: (A \times M) \times M. n, number of females tested. The superparasitism phenotype was estimated by providing each female with 10 *Drosophila melanogaster* larvae.

any behavioral change (Fig. 2; Varaldi *et al.*, 2006b). Furthermore, NS females did not become contaminated by sharing food with S females and they did not contaminate their ovipositor by stinging hosts that had been previously attacked by S females (Varaldi *et al.*, 2006a).

The hypothesis that the causative agent was a bacterium was tested and clearly rejected using antibiotic treatments and a polymerase chain reaction (PCR) approach using primers for genes conserved among bacteria (Varaldi

et al., 2006b). The nature of the infectious element was eventually determined by electron microscopical analysis of the ovaries of *L. bouhardi* females. It was evident that in S lines, a virus was replicating in cells bordering the lumen of the oviduct (Fig. 3a), contrary to NS females (Varaldi *et al.*, 2003, Varaldi *et al.*, 2006b). Based on its morphology, the superparasitism-inducing virus was called LbFV for *Leptopilina bouhardi* filamentous virus (Fig. 3). LbFV is thus vertically transmitted through the female line, and

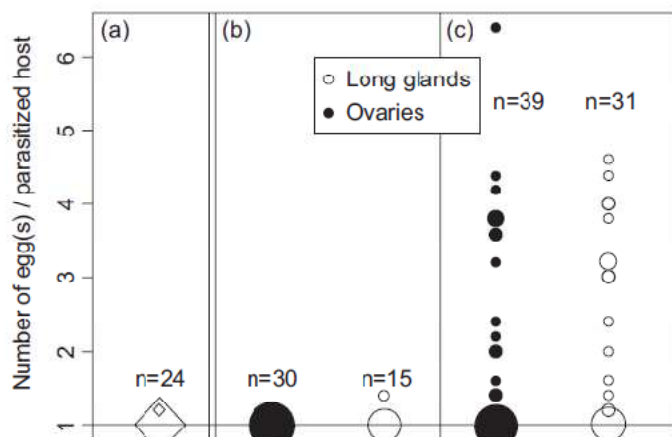


FIGURE 2 Superparasitism behavior of females emerging from hosts parasitized by Sienna0 (NS) females and injected with (a) PBS, (b) long glands or ovaries extracted from Sienna0 (NS) females, or (c) long glands or ovaries extracted from Sienna9 (S) females. Area of symbols is proportional to number of individuals. The superparasitism phenotype was estimated by providing each female with 10 host larvae. After Varaldi *et al.*, 2006b, *Journal of Insect Physiology*.

also horizontally only in conditions of superparasitism. To date, LbFV particles have only been found in *L. bouvardi*, but not in sympatric *L. heterotoma* nor in the host *Drosophila melanogaster* (Patot *et al.*, 2009).

MOLECULAR DATA

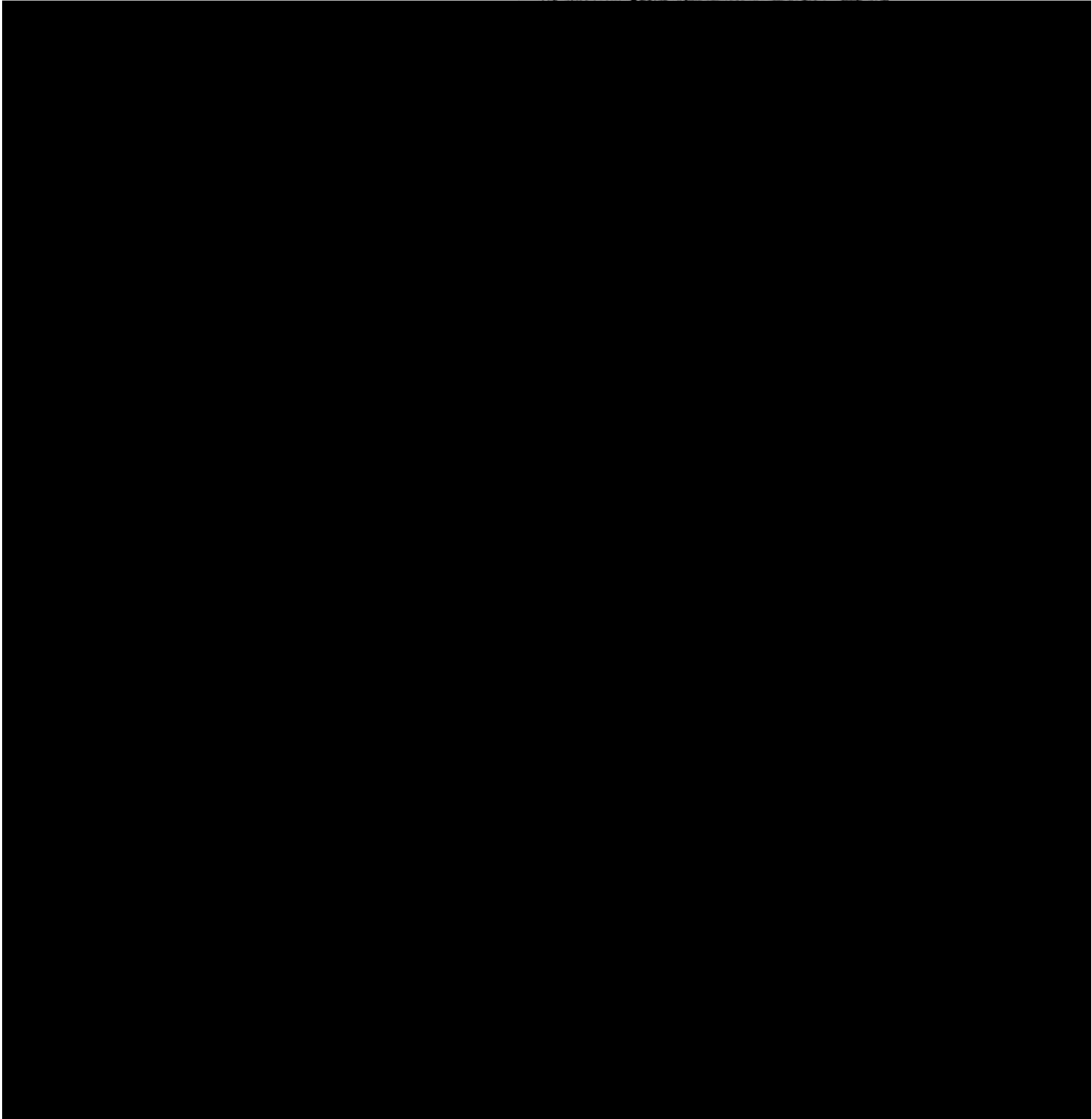
LbFV was discovered using electron microscopy but we lacked the genomic data required for identifying its phylogenetic position and for developing molecular tools. Since LbFV could be either a DNA or an RNA virus, we focused our attention on the identification of viral mRNAs, because both viral genome types should produce mRNAs. We performed a suppressive subtractive hybridization (SSH) between two lines sharing the same genotypic background but differing in their superparasitism behavior. This work permitted us to identify an 810-bp mRNA that is S-specific. From this mRNA sequence, we derived a simple PCR assay using DNA extracts as templates that showed amplification on all 14 independent S lines whereas no amplification was observed for all 11 independent NS lines (Patot *et al.*, 2009). This perfect correlation between superparasitism phenotype and PCR profiles validates the viral origin of this sequence and has been since confirmed on a larger scale (at least $n = 200$ for each status). Furthermore, it shows that LbFV has a DNA genome (unless LbFV is a retrovirus, which is very unlikely). Unfortunately, this 810-bp sequence did not display any similarity with public database sequences and did not allow the identification of the phylogenetic position of the virus. However, LbFV share some morphological features with other large double-stranded insect DNA viruses like nudiviruses, or the recently discovered family

Hytrosaviridae, represented by salivary gland hypertrophy viruses found in the tsetse fly and house fly (Lietze *et al.*, 2010), and to a lesser extent Baculoviridae. The GC content of the 810-bp sequence is very low (24%), a feature shared with the gland hypertrophy viruses of the tsetse fly (28% GC content of the genome).

ADAPTIVE SIGNIFICANCE OF THE PARASITOID'S BEHAVIORAL ALTERATION

The induction of superparasitism increases the chance of horizontal transmission, but at the same time leads to egg wastage as all but one progeny dies. Because the virus also benefits from vertical transmission, it remains unclear whether the induction of superparasitism is adaptive for the virus (Varaldi *et al.*, 2003; Reynolds and Hardy, 2004; Gandon, 2005). To demonstrate the adaptive nature of the alteration of the parasitoid's behavior one must show that a virus increasing superparasitism can invade a virus population. In other words, one must demonstrate that the evolutionarily stable (ES) virus strategy of superparasitism is higher than the ES parasitoid superparasitism strategy (in the absence of the virus). To address this question, we developed a model analyzing the evolution of a population of parasitoids (a proovigenic and solitary species) parasitizing a population of hosts (Gandon *et al.*, 2006). This model includes the potential benefit of superparasitism (i.e., the possibility that a parasitoid larva developing in an already parasitized host wins the within-host competition) and the classical costs of superparasitism (i.e., the costs of spending time ovipositing in already parasitized hosts and the cost of producing the eggs). We first used this model in the absence of a virus, to predict the fate of a mutant parasitoid with superparasitism strategy s^* appearing in a parasitoid population dominated by a resident with strategy s (where s indicates the rate of acceptance of parasitized hosts). As expected, the model predicts that the ES strategy (ESS) of superparasitism is zero when the probability to win the within-host competition (c) is low but increases with this probability (gray dotted line in Fig. 4). This further confirmed previous models showing the potential adaptive value of superparasitism under conditions of host scarcity (van Alphen and Visser, 1990).

Then we extended the model to include a virus able to manipulate the superparasitism behavior of the wasp, based on LbFV biology. When females are infected, it is assumed that the parasitoid behavior is strictly under the control of the virus. In other words, the rate of acceptance of parasitized hosts of an infected female is not s (the superparasitism strategy when the female is uninfected), but instead σ , which is a feature of the virus. The virus is vertically transmitted with a rate of tv (<1), and will gain extra routes of transmission via the horizontal transmission that may occur between a larva infected with the virus and an uninfected



larva (with probability τ_h). To allow direct competition by the host. Note that here, only the virus is allowed to

between viral strains, it is assumed that viral strains can be met the parasitoid (in Fig. D). In the first part

librium set by the resident virus and the strategy s adopted ioral modification from the virus point of view: the virus is

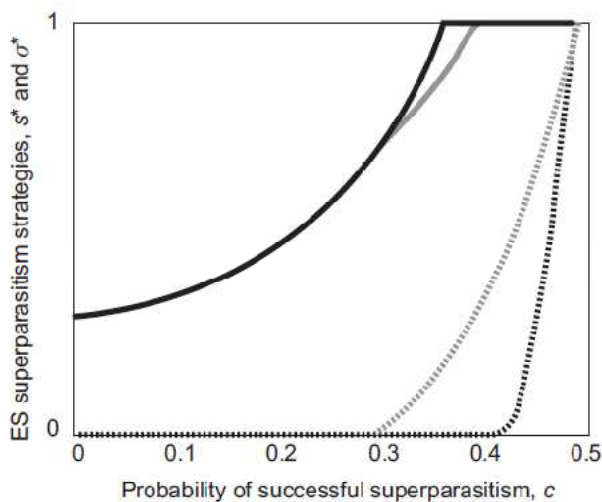


FIGURE 4 Evolutionarily stable superparasitism strategies of the virus (solid lines) and the parasitoid (dotted lines) versus the probability of successful superparasitism. The gray lines indicate a situation where the parasitoid does not coevolve with the virus. The black lines indicate the coevolutionarily stable strategies of the virus and the parasitoid. Parameter values: $th\ p = 0.75$, $tv = 0.95$, $\epsilon = 0$, $N = 100$, $d = e = 0.2$, $m = 0.1$, $a = 0.01$, $t1 = 0$, $t2 = 0.1$, and $E = 10$. After Gandon *et al.*, 2006. *The American Naturalist*.

always selected to increase the natural superparasitism tendency of the parasitoid (gray full line versus gray dashed line in Fig. 4). The presence of the virus thus induces a conflict of interest between the parasitoid and the virus with respect to superparasitism behavior. The intensity of the evolutionary conflict is even increased if both the virus and the parasitoid are allowed to co evolve: after co evolution, uninfected females (that are produced even in infected populations, due to imperfect vertical transmission) should superparasitize less than uninfected females that did not co evolve with the virus (black lines in Fig. 4). This shows that the presence of the virus in a population should indirectly modify the ESS of a trait for uninfected females. When we allowed direct competition between viral strains within *Drosophila* larvae ($\epsilon > 0$), we found that the virus is even selected for much higher superparasitism strategies, thus strongly increasing the conflict of interest between the parasitoid and the virus (Varaldi *et al.*, 2009). These results clearly show that increasing the superparasitism strategy of the parasitoid is an adaptive strategy from the virus's point of view (whatever ϵ). The intensity of the conflict of interest depends critically on the ability of mutant virus strains to replace resident strains inside *Drosophila* larvae (ϵ) and also on coevolutionary processes.

EFFECTS ON OTHER PHENOTYPIC TRAITS

The effects of LbFV on several phenotypic traits have also been studied. It has been found that LbFV infection has no effect on the survival of parasitoid females

but has a negative impact on male survival, and a slight negative impact on size (female tibia length is reduced by 2%) and on developmental time (increased by 3% for both sexes). Strikingly, the overall locomotor activity of infected females is reduced by 45% while no effect was detected in males. Interestingly, we found that egg-load was increased for infected females (+11%) compared to uninfected females (Varaldi *et al.*, 2005b). Because an infected female is at higher risk of being egg-limited (due to superparasitism), both the virus (since it requires eggs to be transmitted) and the infected parasitoid are selected to increase investment in egg-load. As a consequence, the analysis provided by the theoretical model did not allow us to distinguish between the two following interpretations: the increased eggload observed in infected females corresponds to (1) an adaptive plastic response of the parasitoid to the presence of the virus, or (2) to another component of the manipulation induced by the virus (Gandon *et al.*, 2009).

The influence of LbFV on behavior has also been investigated (Varaldi *et al.*, 2006a, 2009). The behavioral components studied included sexual communication, circadian rhythms, ability of females to detect and discriminate odors of hosts, and trajectometric parameters of foraging females. None of these behavioral repertoires seemed to be perturbed by LbFV infection. Interestingly, it has been found that LbFV does not even impair the ability of the female to discriminate between a 'good host species' (*D. melanogaster*) and a 'bad host species' (*D. subobscura*), although this process probably shares some similarities with the process of discrimination between parasitized and unparasitized hosts. All these results illustrate that the action of the virus is targeted on superparasitism behavior. The influence of the virus on the transcriptome of the parasitoid is currently under investigation to unravel the mechanism of action of the virus on the wasp's behavior.

PREVALENCE AND DYNAMICS IN NATURAL POPULATIONS

Leptopilina boulardi is widely distributed under tropical and temperate regions; it has been identified in Africa, Southern Europe, the Middle East, North and South America (California, Brazil), and Australia. It is very abundant in the South of France and its density decreases while going north. In France, *L. boulardi* is completely absent above 45°N latitude. During late summer 2004 and 2007, we sampled the *Drosophila* and parasitoid community in the south-east of France including central and northern populations of *L. boulardi* (Patot *et al.*, 2010). In total, 15 locations were sampled along a north to south axis. Two sampling procedures were used for wasp collection. In 11 localities, we placed in each orchard 10–12

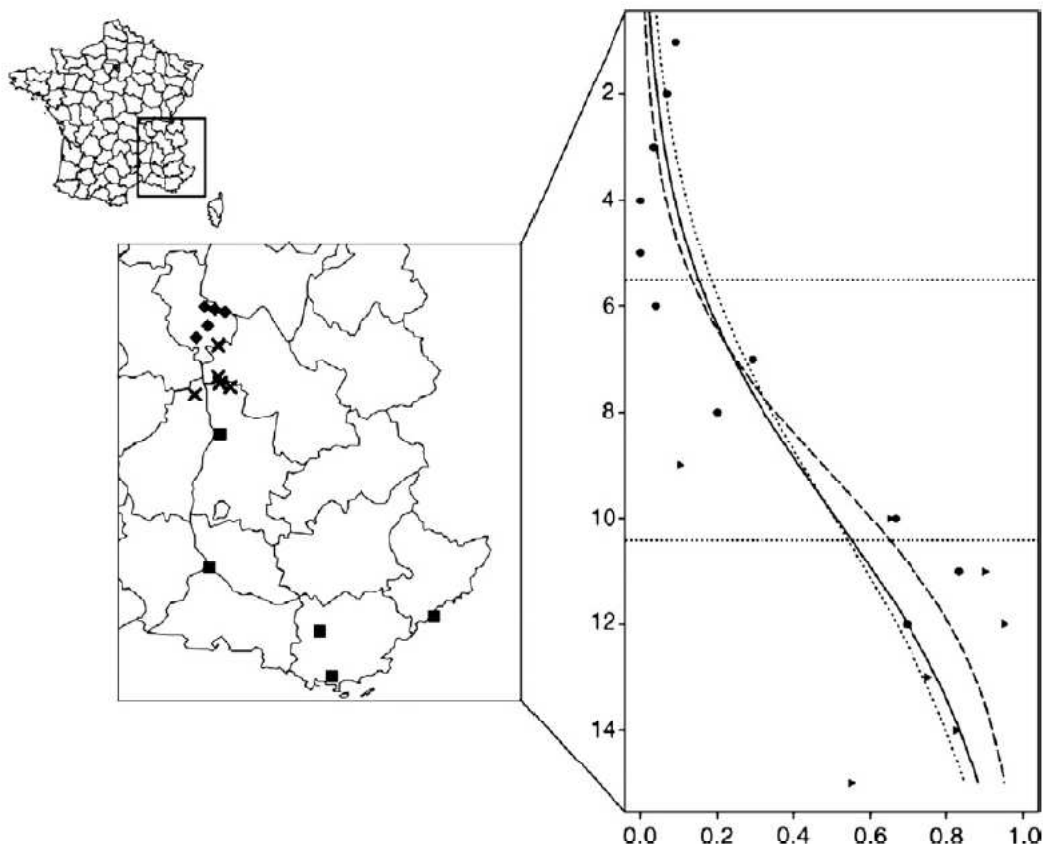


FIGURE 5 Prevalence of LbFV (horizontal axis) in *L. boucardi* populations in south-eastern France and predictions of the generalized linear model. The populations were sampled in 2004 (triangles) or 2007 (dots). They are ranked according to their latitude (vertical axis). Continuous line, model prediction for all data (2004 and 2007); dotted line, model prediction for 2004; dashed line, model prediction for 2007. After Patot *et al.*, 2010, *Molecular Ecology*.

closed traps baited with split bananas. They were exposed to natural colonization for 15 days. In the four other sites (7, 8, 10, and 12), we collected 25–30 rotten apples on the ground. Traps and apples were then brought back to the laboratory, and after incubation at approximately 23°C, all emerging *L. boucardi* were collected daily. For 13 populations, individuals were kept in 100% ethanol at –80°C before DNA extraction. For the other two populations (sites 11, 12; samples 2007), a number of isofemale lines (one foundress per line) were established and reared under laboratory conditions. Viral presence was tested by PCR assay, using an insect gene as a control of DNA extraction. The results indicate that the prevalence of LbFV varies greatly from one population to the next with a clear correlation with latitude (Fig. 5). Indeed, infection was much higher in the south with a mean of 77.5% of wasps infected, than in the north (30%), or in the most northern populations (3.3% with two locations out of five without evidence of LbFV presence). Furthermore, this pattern of viral prevalence was observed both in 2004 and 2007, although some slight temporal variations were observed.

Several factors may explain this variable pattern of virus distribution and four hypotheses have been tested: (1) the northern parasitoid genotypes are resistant to infection;

(2) virus strains in the north are not able to induce superparasitism, thus precluding them to invade; (3) virus transmission is temperature-sensitive and variations in mean temperature between northern and southern locations explain the pattern; (4) the expected variations in the densities of *L. boucardi* between north (low densities) and south (high densities) explain the pattern.

By a crossing experiment, we have found that northern genotypes are not refractory to infection (hypothesis (1), Martinez *et al.*, in preparation). We have also found that infected lineages always superparasitize more frequently than uninfected lineages within a given population (Patot *et al.*, 2010), indicating that the virus is able to manipulate the behavior in all populations, thus rejecting hypothesis (2). To test hypothesis (3), we have tested the influence of temperature on the vertical transmission of the virus and on the induction of diapause. Three temperatures were chosen (18°C, 20°C, and 26°C) according to the diapause, which is a physiological state of dormancy allowing the parasitoid to survive under low temperatures. In *L. boucardi*, diapause occurs at the end of the larval development. Claret and Carton (1980) showed that *L. boucardi* exhibits 97.4% diapausing larvae at 17.5°C, 52.7% at 20°C and 0% at 25°C. We confirmed that the temperature had

a drastic effect on the probability of a parasitoid larva entering diapause. However, there was no effect of temperature on viral transmission, whether diapause occurred or not. Indeed, the frequency of infection after development was 0.98 (49/50) at 18°C (all wasps diapausing), 1.0 (50/50) at 20°C (both diapausing and nondiapausing females), 0.98 (49/50) at 26°C (only non-diapausing). Thus, the vertical transmission of the virus is excellent and appeared independent of temperature or diapause (all P values >0.99). This led us to reject hypothesis (3) (Patot *et al.*, 2010). Finally, to test hypothesis (4), we adapted the model of Gandon *et al.* (2006) to study the epidemiology of the virus in populations of *L. boulandi*. In this model, the virus is both vertically and horizontally transmitted and it manipulates the behavior of the parasitoid by increasing its superparasitism tendency. The parameters used for the model were chosen according to our current knowledge of LbFV characteristics. In particular, vertical transmission is known to be very efficient but imperfect, thus vertical transmission was fixed at 0.98. We used this model to study the prevalence in response to variations in the mortality rate of the parasitoid. Variations in parasitoid mortality rates mimic variations in the density of *L. boulandi* populations and reflect the conditions near the species range border (*L. boulandi* has a better survival rate in the South of France). The model was also used to predict the number of parasitoid eggs in parasitized *Drosophila* larva according to variations in the relative density of *L. boulandi* (relative density is measured as the proportion of all *Drosophila* larvae that are parasitized by the wasp). The model predicts a low mean number of eggs per host when the density of *L. boulandi* is low and an increase in this index with an increase in *L. boulandi* densities, indicating that opportunities for horizontal transmission may be higher in high-density populations than in low-density populations. Accordingly, the viral prevalence at equilibrium is expected to be low in low-density populations and very high in high-density populations (Fig. 6A). The virus is even unable to persist in the population below a threshold of parasitoid density. Below this threshold, opportunities for horizontal transmission are not sufficient to compensate for the imperfect vertical transmission of the virus and the virus disappears from the population. It is noteworthy that for very low mortality rates (very high parasitoid densities) the model predicts a decrease of the viral prevalence. This is due to the effect of egg limitation. In nature, such low levels of mortality are probably unrealistic. Thus, overall, the model predicts a positive correlation between the proportion of parasitized hosts and the prevalence of the virus. We tested the first prediction of the model by dissecting *Drosophila* larvae from the field and calculating the relative density of *L. boulandi* in the sample (proportion of *Drosophila* larvae that are parasitized) and the mean number of parasitoid eggs found within the

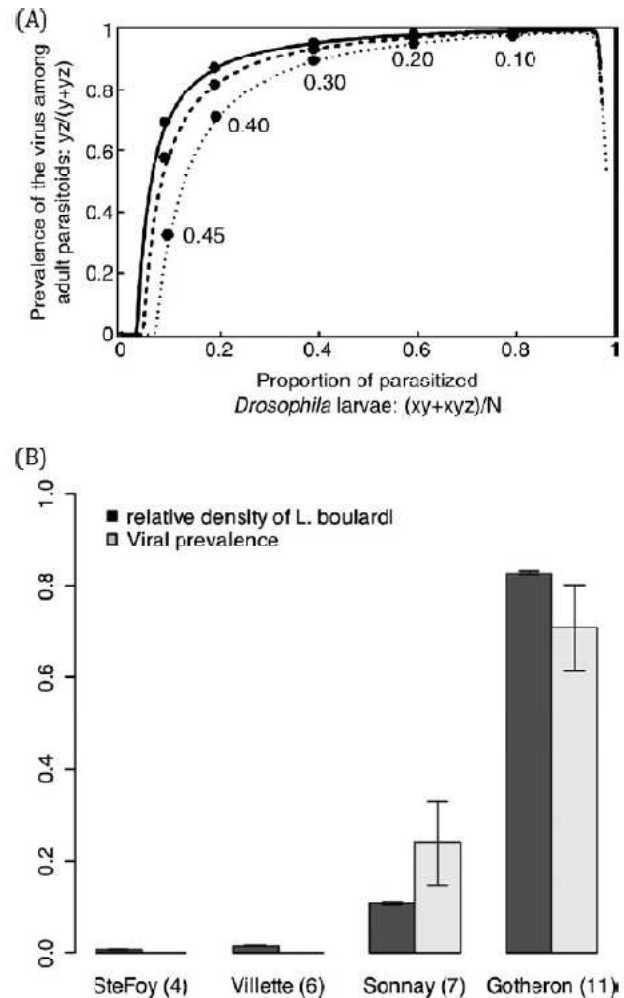


FIGURE 6 A: Predictions for the relation between the equilibrium frequency of virus infection in *L. boulandi* and the rate of parasitism of *Drosophila* larvae using the epidemiological model presented in Gandon *et al.* (2006). Variations in the rate of parasitism were obtained by varying the mortality of the parasitoid (m varies between 0.001 and 0.5) and the probability of horizontal transmission: τ_h takes the values 0.25 (dotted line), 0.5 (dashed line) and 0.75 (solid line). Some values of m are indicated on the figure. Parameter values are: $N = 100$, $d = e = 0.2$, $\Phi = 0.5$, $a = 0.01$, $t_1 = 0$, $t_2 = 0.1$, $E = 100$, $\tau_v = 0.98$. B: Relative density of *L. boulandi* and prevalence of LbFV among four populations sampled in 2009. They are ranked according to their latitude from north to south (left to right). After Patot *et al.*, 2010, *Molecular Ecology*.

parasitized hosts. The plot was qualitatively very similar to the prediction of the model with high occurrence of superparasitism where the relative density of *L. boulandi* is high (Patot *et al.*, 2010). The second and most important prediction was tested by sampling in 2009 four *L. boulandi* populations along the north to south axis using a modified version of the previous sampling procedure. In this case, the 12 traps deposited in each location were open traps. This procedure allows the insects to enter the traps, lay their eggs and leave the traps freely, thus providing a reliable estimation of the abundance of each insect species present in the community. In the laboratory, all

Drosophila and parasitoids emerging from traps were collected daily. Based on these counts, we defined an estimation for the density of *L. bouleardi* by calculating the ratio between emerging *L. bouleardi* and the initial number of potential host flies present in the trap. The number of potential host flies was estimated by summing the number of emerging *Drosophila* and parasitoids since each parasitoid emerged from one *Drosophila* host only. We also studied LbFV prevalence using PCR assays on a sample of *L. bouleardi* females. As in 2004 and 2007, we found a much higher prevalence of LbFV in the south compared to the north (Fig. 6B). Furthermore, there was a positive correlation between the density of *L. bouleardi* and the prevalence of LbFV as predicted by the model. Taken together, these data suggest that the competition for hosts among *L. bouleardi* females is very high in the south with frequent superparasitism and very low in the north with much less superparasitism, which is consistent with previous data (Fleury *et al.*, 2004). Thus, the opportunities for horizontal transmission are much higher in southern than in northern populations. As predicted by the epidemiological model, this pattern of variations in the density of *L. bouleardi* results in variations in virus prevalence. This confirms the critical role played by horizontal transmission in the dynamics of the virus within parasitoid populations.

CONSEQUENCES OF THE PRESENCE OF THE VIRUS

As presented in the previous section, LbFV is widespread among *L. bouleardi* populations (13 out of 15 were infected) and its prevalence may reach very high levels (up to 95% prevalence). In addition, the prevalence of LbFV appears to be quite stable through time indicating that parasitoids from different populations experience different and quite stable selective pressures. Thus, we can expect that the presence of the virus drives local adaptation in *L. bouleardi*.

The presence of the virus induces a dramatic change in the way females manage their egg load and consequently on the distribution of eggs inside hosts. This could have two consequences for the parasitoid. First, because infected females incur a higher risk of being egg-limited, they are selected for increasing investment on this trait, even if there has to be a trade-off with another trait (egg, larval, or adult survival) as expected. Here, two scenarios can be drawn: either the females are able to increase their egg load but only if they are infected (evolution of a plastic response) or they are not able to do so. In this second case, females from heavily infected populations should evolve higher egg loads than females from uninfected populations (evolution of a fixed response). Indeed, we have observed that infected females produce more eggs than uninfected females from the same isofemale line,

which is consistent with the first interpretation (Varaldi *et al.*, 2005b). However, this may also be interpreted as another component of the manipulations induced by the virus because the model shows that the virus would also benefit from an increase in egg load (Gandon *et al.*, 2009). It is known that parasite-induced modification of the host phenotype is often a multidimensional phenomenon. For instance, the presence of the bacterial symbiont *Cardinium* in the wasp *Encarsia pergandellia* induces two main alterations of the phenotype of the wasp (Zchori-Fein *et al.*, 2001; Kenyon and Hunter, 2007). In this species, females lay fertilized female eggs in hemipteran nymphs (the ‘primary hosts’). In contrast, unfertilized eggs are laid in already parasitized hemipteran nymphs (the ‘secondary hosts’) and develop as male hyperparasitoids (as parasitoids of females). Unmated females, capable of laying only unfertilized male eggs, usually refrain from ovipositing within primary hosts suitable only for female development. Generally, when eggs of the ‘wrong’ sex are laid in a host, they do not develop. The bacterium *Cardinium* induces thelytoky in some populations of this species (infected females lay all-female offspring without fertilization). As a consequence, these populations are free of males. Together with thelytoky induction, a shift in the egg-laying strategy is observed in infected *E. formosa*: although they are unfertilized, these females choose the appropriate host for female development and avoid laying eggs in secondary hosts, whereas corresponding controls (unfertilized and uninfected females obtained from antibiotic treatments or from naturally uninfected populations) will choose exclusively this type of host. Here also, because both the symbiont and the parasitoid benefit from this behavioral change, it is not clear whether this is another strategy of the manipulative arsenal of the symbiont or a response of the parasitoid to the presence of the bacteria. In this system, as in the LbFV/wasp system, additional experiments are required to disentangle the two hypotheses.

As mentioned previously, the presence of the virus modifies the distribution of eggs inside *Drosophila* hosts: in a population with no virus, few superparasitisms are expected, whereas in a heavily infected population, superparasitism is expected to be frequent. Note, however, that even within infected populations, both infected and uninfected individuals coexist (this is shown both by theoretical models and by observation). The presence of uninfected individuals is likely due to the imperfect vertical transmission of the virus. Remembering that superparasitism may also have an adaptive value for the parasitoid (see previous sections), we can address the following question: what is the best superparasitism strategy for uninfected females in a population that did not coevolve with the virus (an uninfected population) or in a population that did coevolve with the virus (an infected population)? The

model of Gandon *et al.* (2006) has been used to predict the ESS of superparasitism under these two scenarios. As can be seen in Fig. 4, the ESS of superparasitism is lower when the parasitoid has coevolved with the virus (black dotted line versus gray dotted line). This means that uninfected females from an infected population are selected for less superparasitism than in an uninfected population. Indeed, in populations infected with the virus, superparasitism carries an extra cost for the parasitoid: the cost that the progeny could get infected by the virus if the female lays its egg in a host parasitized by an infected larva (we assumed that the female is unable to distinguish between host parasitized by infected or uninfected larvae). This explains why uninfected parasitoids should superparasitize less frequently when they are evolving in an infected population (when the virus is present in the population). As a conclusion, the presence/absence of the virus is expected to drive local adaptation regarding the superparasitism strategy of uninfected females.

Solitary parasitoids have often evolved large mandibles and aggressive behavior toward conspecific parasitoids in their larval stages, as is observed in parasitized *L. boucardi*. The supernumerary larvae are ultimately killed. At the opposite extreme, gregarious parasitoids are typically characterized by nonaggressive larvae that complete development while coexisting peacefully inside the same hosts. Several theoretical investigations have revealed that the conditions for the invasion of a non-aggressive strategy inside an aggressive population are very restricted (Godfray, 1987; Pexton *et al.*, 2003), contrary to the reverse transition. However, phylogeny of parasitoid clutch size suggests that the ancestral state for most parasitoid taxon is solitary, and that frequent transition from solitary to gregarious way of life did occur. Boivin and van Baaren (2000) suggested that the loss of mobility of parasitoid larvae within the host (which reduces the probability of contact with an aggressive larva) may provide a proximal mechanism by which a solitary species may escape the absorbing solitary state and become gregarious (Mayhew *et al.*, 1998; Pexton and Mayhew, 2002; Pexton *et al.*, 2003). Alternatively, we can imagine that the infection by a manipulative parasite or pathogen could facilitate this transition. Indeed, it is adaptive for the virus to allow several infected larvae to emerge because this will enhance horizontal transmission. A virus may be able to colonize all parasitoid larvae within a given host (this is probably true for LbFV) and to manipulate their respective behaviors towards a tolerant behavior (either by inhibiting the development of mandibles, decreasing larval mobility or aggressiveness). This viral mutant would probably invade the parasitoid population very quickly, leading to the development of several parasitoids from the same host due to the manipulation induced by the virus. Subsequently, evolution may lead to an adjustment of the

clutch size of females (injection of more than one egg per oviposition), thus leading to the evolution of true gregarious development.

Some intriguing observations suggest a potential implication of microparasites in the control of *Muscidifurax raptorellus* gregariousness (Legner, 1989). Legner reported that the oviposition behavior of females with a low tendency to lay gregarious clutches changed (gregariness increased) after mating with a male of a strain known to adopt a higher level of gregariousness. The existence of a sexually transmitted virus manipulating the oviposition behavior of infected females could potentially explain these results.

ANY LINK WITH POLYDNAVIRUSES?

Thousands of endoparasitoid species inject polydnavirus particles into their hosts during oviposition. Today, these particles are absolutely necessary for the wasp progeny because they inhibit the immune reaction of the host by causing hemocyte apoptosis or other immunosuppressing mechanisms. Without these particles, parasitoid eggs would be killed due to the formation of a capsule around the egg in the encapsulation and melanization process. The name PDV comes from the fact that the DNA packed within the particles is composed of multiple circular dsDNA molecules. Most of this DNA encodes for virulence genes that do not show similarities with other known viral genomes. Rather, they resemble eukaryotic genes and it is likely that they do not have any viral origin. Particle production is confined to the wasp ovary where viral DNAs are generated from proviral copies maintained within the wasp genome (Espagne *et al.*, 2004). However, the genes involved in the production of the particles are not included within the particles. This led to some difficulties in obtaining their sequences. Nevertheless, these sequences have been obtained for two associations of polydnavirus/wasp (bracovirus and ichnovirus in braconid and ichneumonid wasps, respectively) and a convincing relationship between bracovirus and a sister group of baculoviruses (nudiviruses) has been established (Bézier *et al.*, 2009). Although the genes involved in the production of ichnovirus particles did not reveal any similarities with known viruses (Volkoff *et al.*, 2010), they have most probably an independent viral origin. Possibly, their virus relatives have not yet been sequenced (which is a plausible hypothesis if we consider the poor actual knowledge of the diversity of viruses) or their close relatives became extinct and so only very distant lineages are available. Thus, ichnoviruses and bracoviruses represent two independent events of domestication of a virus to deliver virulence genes into their hosts.

What does the LbFV/*L. boucardi* system tell us regarding these examples of convergent evolution? By definition, when studying ancient symbioses such as the PDV/wasps associations, it is very difficult to understand the

first step in the establishment of the association because of the evolution of both the host and the symbiont. Indeed the integration of the ancestral nudivirus that gave rise to the *braconiviruses* found today in more than 17,000 species

Barratt, B.I.P., Murney, R., Easingwood, R., Ward, V.K., 2006. Virus-like particles in the ovaries of *Microctonus aethiopoides* Loeb (Hymenoptera: Braconidae): comparison of biotypes from Morocco and Europe. *J. Invertebr. Pathol.* 91, 13–18.

One question is how was the ancestor virus maintained within wasp populations before the mutualistic

derive from an ancestral nudivirus. *Science* 325, 920–930.
Bézier, A., Herbinère, J., Lanzrein, B., Drezen, J.-M., 2009. Polydnavirus hidden face: the genes producing virus particles of par-

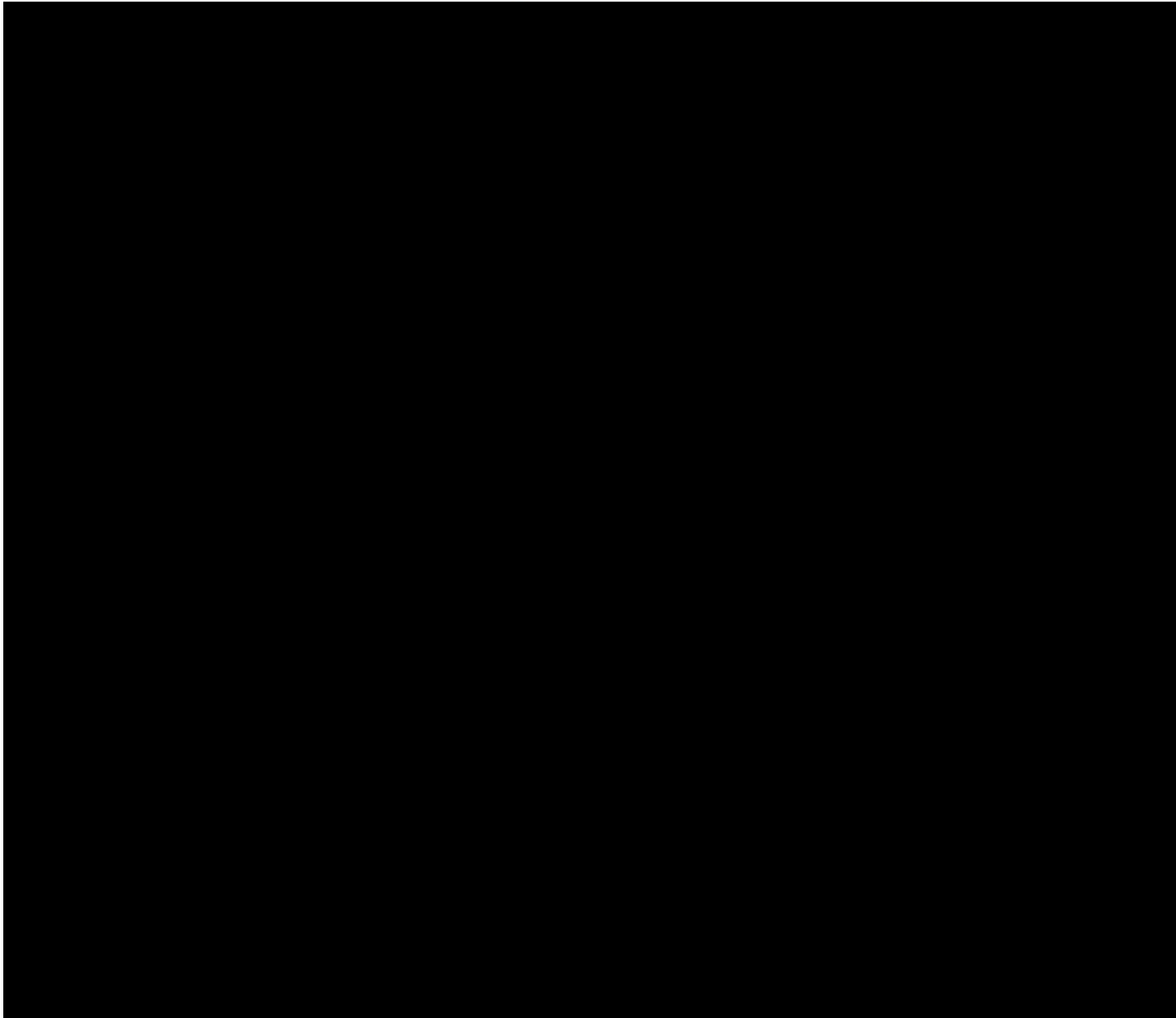
CONCLUSION

ties: a case study with *D. melanogaster*, *D. simulans* and their common *Leptopilina* parasitoids in south-eastern France. *Genetica* 120, 181–194.
Gandon, S., 2005. Parasitic manipulation: a theoretical framework may

(Coleoptera: Curculionidae). *J. Invertebr. Pathol.* 75, 162–168.

Parasitoid clutch size and irreversible evolution. *Ecol. Lett.* 1, 139–141.

Murphy, N., Banks, J.C., Whitfield, J.B., Austin, A.D., 2008. Phylogeny Stoltz, D.B., Krell, P., Cook, D., MacKinnon, E.A., Lucarotti, C.J., 1988.



lations of parasitoid wasps. *J. Insect Physiol.* 51, 103–115.