



**HAL**  
open science

# Utilisation des bactéries *Wolbachia* pour lutter contre une espèce invasive et ravageur de cultures, *Drosophila suzukii*

Julien Cattel

► **To cite this version:**

Julien Cattel. Utilisation des bactéries *Wolbachia* pour lutter contre une espèce invasive et ravageur de cultures, *Drosophila suzukii*. Evolution [q-bio.PE]. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1325 . tel-01673801

**HAL Id: tel-01673801**

**<https://theses.hal.science/tel-01673801>**

Submitted on 1 Jan 2018

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

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



N° d'ordre NNT :

**THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale :**

**Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation**

**Spécialité de doctorat :**

**Biologie**

Soutenue publiquement le 16/12/2016, par :

**Julien Cattel**

---

**Utilisation des bactéries *Wolbachia* pour lutter  
contre une espèce invasive et ravageur de cultures,  
*Drosophila suzukii***

---

Devant le jury composé de :

Monsieur Jérôme MOREAU	(MCF – Université de Bourgogne)	Rapporteur
Madame Ana RIVERO	(DR – CNRS Montpellier)	Rapporteuse
Monsieur Thibaut MALAUSA	(CR – INRA Sophia Antipolis)	Examineur
Monsieur Benjamin PRUD'HOMME	(DR – CNRS Marseille)	Examineur
Madame Patricia GIBERT	(DR – CNRS Lyon)	Co-directrice de thèse
Madame Laurence MOUTON	(MCF – Université Lyon 1)	Directrice de thèse



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD – LYON 1

Président de l'Université	M. le Professeur Frédéric FLEURY
Président du conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLEE
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

## ***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 : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES DEPARTEMENTS DES SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. H. HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C. PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y. VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E. PERRIN
Ecole Supérieur de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITTON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE



# Remerciements

Par bienséance mais aussi parce qu'elles le méritent, je souhaitais commencer ces remerciements par les deux personnes qui sont à la base de ce projet de recherche, à savoir Laurence, ma directrice, et Patricia, ma co-directrice. Tout d'abord, merci à toutes les deux pour votre gentillesse et votre bienveillance pendant ces trois années de thèse. Nous avons pu entretenir, il me semble, des relations humaines très agréables, qui ont créé un environnement de travail sain et appréciable, merci pour ça ! S'il y a bien un remerciement que je peux aussi vous octroyer à toutes les deux, c'est votre disponibilité. Jamais aucun article, abstract, poster ou cover letter, n'est resté plus de deux semaines dans votre boîte mail, ce qui m'a fait gagner un temps précieux, alors un grand merci pour votre réactivité.

Patricia, merci pour ton implication dans cette thèse. Ton expérience de la recherche et ton recul m'ont été bénéfiques. Merci également pour ton investissement lors de la phase de correction et de relecture de ce manuscrit.

Laurence, ce fut un vrai plaisir de t'avoir comme directrice de thèse, tant humainement que scientifiquement. Tu as toujours été disponible et à l'écoute, en apportant avis et conseils pertinents qui ont permis d'orienter au mieux cette thèse. J'ai beaucoup apprécié ton implication pendant ces trois années, même jusqu'à la fin où tes conseils et relectures du manuscrit ont été d'une aide considérable ! Merci.

J'ai eu aussi le plaisir de travailler avec un ingénieur fort sympathique, rigoureux, sûrement bon au basket mais mauvais à la boulette, j'ai nommé Mr Thibault Andrieux. Même si tu as quitté le navire avant l'amarrage, je ne t'en veux point, les plusieurs mois à bosser avec toi compensent très largement ce départ. Merci pour tous ces repiquages, tubes, boîtes, sessions de sexage (de drosophile évidemment). Je sais au combien ce travail répétitif mais nécessaire a pu s'avérer être lassant. Tu as su le faire correctement et apporter un soutien technique utile tout au long de cette thèse, merci.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement Fabrice et Sylvain. Merci pour votre implication aux différents moments de cette thèse, vos connaissances scientifiques ont été très utiles. Continuez à creuser les présentations et travailler les orateurs, c'est parfois déroutant mais tellement formateur !

Merci Hélène pour m'avoir mis dans le bain dès le début de cette thèse et de prendre le temps de finir les différentes expériences en cours. Tu es essentielle à cette équipe, alors essaye quand même de te ménager un peu entre 5 manip...Sinon, le TD c'est top !

Merci à tous les autres membres de l'équipe, votre compagnie a été très agréable. J'ai eu beaucoup de chance d'arriver ici pour réaliser cette thèse. Les relations humaines prennent une place importante, ce qui n'est pas rien dans le monde scientifique. Vous permettez aussi de former les jeunes de part un très bon niveau scientifique. Je recommande ! Continuez à manger du chocolat, faire des pauses, des gâteaux, à discuter, à rigoler, à chambrer, à garder les toiles d'araignées, trier 3 fois par an et ne pas faire de planning pour l'achat du café, vous êtes au top !

Puisque nous en sommes à remercier les personnes davantage pour leur présence que pour leur apport scientifique, je vais remercier mes collègues de bureau ! Franchir la porte de ce bureau a toujours été un plaisir grâce à la présence de « bons gars » comme Gabriel, David, Olivier et Christophe (ok tu n'étais pas dans le bureau mais ça compte aussi). Quand même, qu'est-ce qu'on s'est bien marré ! De la boulette aux affiches, en passant par les sessions « tableau », sans oublier les jeux de mots incessants, vous avez été des partenaires de jeux excellents. MERCI. Au fait, qui a le droit ?

Merci aussi à toutes les personnes que j'ai pu croiser et apprécier dans ce bureau. Merci notamment à Marie C d'avoir tenté et presque réussi d'instaurer des plages horaires studieuses.

Merci à l'équipe de Rovaltain. Nous avons réalisé une belle expérience dans vos locaux. Merci d'avoir assuré comme vous l'avez fait, en particulier David et Aymeric. David se fut très agréable de discuter et de mettre en place ces expériences avec toi. Merci.

Merci à la bande du pôle administratif, en particulier à Nathalie, Odile et Laetitia, vous assurez ! Laetitia les forces 2 doivent être maîtrisées lors de mes prochaines venues.

Merci aux travailleuses de l'ombre, celles qui produisent des milliers de tubes d'élevage chaque année, Nicole et Patricia. Merci Nicole d'avoir souvent répondu favorablement à mes commandes tardives de tubes et de boîtes.

Merci à mes parents. J'imagine que vous auriez préféré plus stable comme choix de carrière, mais vous avez toujours été là et cru en moi. Merci pour ça.

Merci aux membres du jury d'avoir accepté et pris le temps d'examiner mon travail réalisé au cours de ces trois dernières années.

Merci à mes potes du Poitou, aux BeBop, aux Lyonnais et aux autres éparpillés un peu partout sur le globe. Merci d'avoir porté un zeste d'intéressement à mes recherches, du genre « Alors ça avance ton vaccin contre le palu ? Oui. Ok, on va boire une bière ». Vous avez rempli à merveille votre mission d'amis : nous permettre de passer du bon temps.

Merci aux stagiaires que j'ai pu encadrer et ceux que j'ai eu le plaisir de côtoyer au labo.

J'ai gardé le meilleur, ou plutôt la meilleure pour la fin. Ma chère et tendre « Ade ». Evidemment il m'est impossible de résumer ce que tu m'as apporté ces dernières années en quelques lignes. Plutôt que de prendre la thèse comme un parasite de nos temps libres, tu as su être compréhensive, patiente et savoir me remotiver quand il le fallait. Tu as été une vraie alliée pour mener à bien ce projet. Cette thèse tu peux aussi en être fier car elle t'appartient également.

Merci enfin à ma fille, qui verra le jour en 2017 et qui m'a permis de relativiser lors de cette fin de thèse. Si un jour tu lis cette page (qui sera sûrement la plus lue de la thèse), dis-toi que tu auras contribué en motivant davantage ton père pour qu'il finisse dans les temps !

Enfin, merci à tous ceux que j'ai oublié...



# Avant-propos

Les premiers travaux de recherche menés sur les populations européennes de *Drosophila suzukii* n'ont vu le jour qu'à partir de 2012 alors que les dégâts dûs à la présence de ce ravageur de cultures avaient déjà été identifiés dans certaines régions françaises (Weydert & Mandrin 2013). A partir de là plusieurs bourses doctorales et financements gouvernementaux ont été alloués pour tenter de développer des méthodes de lutte efficaces, durables et respectueuses de l'environnement. Financés par la région Rhône-Alpes (ARC Environnement), l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA), et un plan Ecophyto, mes travaux de recherche s'inscrivent dans cette démarche. A l'interface entre la recherche fondamentale et la recherche appliquée, ce projet de thèse avait pour objectif de développer une nouvelle technique de lutte contre ce ravageur de cultures.

Les résultats présentés dans ce manuscrit sont issus d'un travail collaboratif entre partenaires des secteurs public et privé. Une première collaboration avec des équipes de recherche italiennes et autrichiennes a été initiée en début de cette thèse. Malgré quelques désaccords, elle nous a permis d'agrandir notre zone d'étude lors de notre description de l'association entre *D. suzukii* et *Wolbachia* à l'échelle européenne. Des échanges réciproques de matériel biologique avec Vincent Debat et Antoine Fraimout du Museum National d'Histoire Naturel de Paris ont également facilité ce début de thèse. Certains partenaires européens et français du réseau de suivi de *D. suzukii* comme le CTIFL et l'INRA de Gotheron nous ont aussi permis d'obtenir des échantillons dans plusieurs pays européens.

J'ai eu aussi le plaisir de travailler dans l'équipe du Pr F. Jiggins à Cambridge pendant trois semaines. Cette collaboration avait été initiée par des discussions avec Julien Martinez, un ancien thésard de notre équipe, lors d'un colloque international. Ce travail collaboratif nous a permis d'étudier les interactions entre *D. suzukii*, *Wolbachia* et des virus.

Une collaboration avec la « Rovaltain Research Company » avait également été initiée dès le début de cette thèse. Celle-ci nous a apporté une aide humaine et matérielle pour réaliser des expériences d'évolution expérimentale à grande échelle.

J'ai eu aussi le plaisir de participer à l'encadrement de trois stagiaires de 3<sup>ème</sup> année de Licence. Ils ont pu intégrer et découvrir le monde de la recherche en participant aux différents volets de cette thèse.

Enfin, j'ai pu bénéficier du travail précieux de Thibault Andrieux, un ingénieur qui a été présent tout au long de cette thèse.



# Table des matières

Remerciements .....	v
Avant-propos .....	ix
I. Introduction générale .....	1
I.1. Invasions biologiques: causes et impacts sur les sociétés .....	3
I.2. Les insectes ravageurs de cultures : méthodes de lutte .....	5
I.2.1. La lutte biologique .....	9
I.2.2. Contrôle génétique des populations .....	11
I.3. <i>Wolbachia pipientis</i> .....	21
I.3.1. Description générale .....	21
I.3.2. Phénotypes associés à <i>Wolbachia</i> .....	21
I.3.1. L'incompatibilité cytoplasmique (IC) .....	25
I.4. <i>Wolbachia</i> au service de l'humain: du fondamental à l'appliqué .....	33
I.4.1. Remplacement des populations .....	35
I.4.2. Suppression des populations .....	39
I.5. <i>Drosophila suzukii</i> , la mouche à ailes tachetées .....	45
I.5.1. Biologie et Ecologie de l'espèce .....	45
I.5.2. Historique de son invasion .....	47
I.6. Problématique & objectifs de la thèse .....	61
II. L'interaction <i>Drosophila suzukii</i> - <i>Wolbachia</i> .....	63
<b>Chapitre 1: Description générale de l'association <i>D. suzukii</i>-<i>Wolbachia</i></b> .....	63
Introduction .....	65
Article 1: " <i>Wolbachia</i> in European populations of the invasive pest <i>Drosophila suzukii</i> : regional variation in infection frequencies" .....	68
Discussion .....	83
<b>Chapitre 2 : wSuz, un mutualiste facultatif</b> .....	85
Introduction .....	87
Article 2: « <i>Wolbachia</i> -mediated protection against viruses in the invasive pest <i>Drosophila suzukii</i> » .....	90
Discussion .....	101
III. Développement de la Technique de l'Insecte Incompatible chez <i>Drosophila suzukii</i> .....	105
<b>Chapitre 3: Analyse des patrons d'incompatibilité cytoplasmique chez <i>D. suzukii</i></b> ...	105
Introduction .....	107

Article 3: « Back and forth <i>Wolbachia</i> transfers reveal efficient strains to control <i>Drosophila suzukii</i> populations ».....	110
Discussion .....	137
<b>Chapitre 4: Etude de la compétitivité des mâles stérilisants et des traits d’histoire de vie des lignées transinfectées.....</b>	<b>141</b>
Introduction.....	143
Matériel & Méthodes .....	145
Résultats.....	153
Discussion .....	161
IV. Discussion générale.....	165
V. Conclusion.....	191
VI. Bibliographie.....	195

# **I. Introduction générale**



## **I.1. Invasions biologiques: causes et impacts sur les sociétés**

Plusieurs définitions d'une espèce dite « invasive » ont été proposées (Richardson *et al.* 2000; Pyšek *et al.* 2004). Pour la suite de ce manuscrit je définirai une espèce invasive comme « une espèce introduite dans une aire dont elle n'est pas originaire et dont les individus survivent, se reproduisent et se dispersent sans intervention intentionnelle humaine ». Le succès d'une invasion biologique va dépendre de quatre étapes majeures: le transport, l'introduction dans une nouvelle aire, l'établissement de populations viables et leurs proliférations (Blackburn *et al.* 2011). Même si la part des introductions délibérées réalisées par l'Homme demeure minime, ses activités et leurs conséquences indirectes sont impliquées dans plusieurs des étapes de l'invasion et font des invasions biologiques un phénomène en expansion constante à l'échelle mondiale. En effet l'intensification des échanges commerciaux et des déplacements humains joue un rôle majeur lors des premières phases de transport et d'introduction. De plus, le dérèglement climatique entraîne des conditions environnementales de plus en plus favorables à l'établissement et à la prolifération d'espèces nouvellement introduites et permet également l'expansion naturelle des espèces à fort pouvoir de dispersion. Le moustique tigre, *Aedes albopictus*, est un bon exemple de l'implication des activités humaines dans ces processus invasifs. En 1967, son aire de répartition était restreinte à l'Asie, l'Inde et quelques îles du Pacifique. Depuis, cette espèce a colonisé l'Europe, le continent Américain, les caraïbes et l'Afrique, et plusieurs cas de Dengue et de Chickungunya, vectorisés par ce moustique, ont été recensés en Europe. Les transports maritimes de pneus sont suspectés d'être responsables indirectement de l'introduction de cette espèce alors que l'établissement et la colonisation des nouvelles aires auraient été largement facilités par la hausse des températures dans les régions tempérées (Caminade *et al.* 2012).

Parfois, ces invasions biologiques sont silencieuses, c'est-à-dire sans impact négatif, voire ont des effets positifs, et sont exploitées par l'Homme pour l'agriculture par exemple. Cependant elles peuvent aussi avoir des impacts directs négatifs sur l'environnement et sur les sociétés. D'un point de vue environnemental, de nouvelles interactions interspécifiques peuvent se mettre en place entre les espèces allochtones et autochtones ce qui peut modifier l'écosystème, telles que la prédation, la compétition pour l'espace et la ressource ou la modification des réseaux trophiques (Van Driesche & Hoddle 2009). D'un point de vue sociétal, des pathogènes, des vecteurs de maladies animales ou humaines, ou encore des ravageurs de cultures peuvent aussi mettre gravement en danger les communautés humaines que ce soit par des maladies ou par la réduction, voire la destruction, des ressources



alimentaires (FAO, 2008). Certaines espèces invasives peuvent avoir des impacts économiques liés aux dégâts directs engendrés par leur présence mais également aux moyens de lutte mis en place pour limiter leurs impacts. Pimentel, Zuniga & Morrison (2005) estiment à 120 milliards de dollars les pertes annuelles dues aux espèces invasives aux Etats-Unis, dont ~37 milliards dues aux mammifères, ~34 milliards dues aux plantes et ~20 milliards dues aux arthropodes parmi lesquels 13.5 milliards seraient dues aux phytoravageurs pour ne citer que les organismes les plus néfastes. Il a été proposé par Williamson & Fitter (1996) une règle quantitative des 4 étapes majeures de l'invasion, nommée « the ten rules », qui stipule que seulement 10% des espèces réussissent à franchir chaque étape: 10% des espèces introduites survivent, 10% des espèces qui survivent s'établissent et 10% des espèces établies ont un impact économique négatif. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons tout particulièrement aux phytoravageurs.

## **I.2. Les insectes ravageurs de cultures : méthodes de lutte**

La classe des insectes est divisée en une trentaine d'ordres qui, pour la majorité, rassemble des espèces potentiellement nuisibles pour les cultures, dont la nature et le type de dégâts occasionnés sont très divers. On peut citer les insectes piqueurs-suceurs exophages, appartenant principalement aux ordres des Hémiptères (pucerons, aleurodes, punaises, ...) et des thysanoptères (thrips) qui se nourrissent des composés internes de la plante et peuvent transmettre des organismes pathogènes, en particulier des virus. Il existe également des insectes défoliateurs de l'ordre des lépidoptères, des coléoptères, des hyménoptères et des orthoptères qui consomment les organes végétatifs. Il y a aussi des insectes endophytes, phytophages stricts, qui vivent à l'intérieur du végétal dont ils se nourrissent. Enfin, il y a des insectes ravageurs des organes végétatifs souterrains, appelés ravageurs hypogés.

La majorité des grands ravageurs de cultures ont été récemment introduits par l'activité agricole et l'amplification des échanges commerciaux. On peut citer par exemple le cas du phylloxéra de la vigne (*Daktulosphaira vitifoliae*) en France, un insecte piqueur-suceur apparenté au puceron. Cet insecte, de par sa piqûre au niveau des feuilles et des racines, engendre la formation de tubérosités et de galles et conduit à la mort du pied. Décrite pour la première fois en France en 1863, cette maladie serait la conséquence de l'importation dès 1850 de vignes américaines porteuses de cet insecte pour lutter contre l'oïdium (Legros & Argeles 1993).



Cette introduction a provoqué une grave crise du vignoble européen à partir de 1864 qui aura duré plus de 30 ans. De nombreux autres exemples existent dans la littérature illustrant le lien entre la présence de ravageurs de cultures et l'histoire des activités humaines.

Dans un contexte de changements globaux, le contrôle des populations d'insectes va devenir de plus en plus difficile de par la hausse des températures moyennes qui devrait augmenter leur taux de survie durant l'hiver, leur taux de reproduction et leur nombre de générations par an (Porter *et al.* 1991; Pryor *et al.* 2014). Les méthodes de lutte pour limiter les dégâts liés à la présence des insectes ravageurs sont nombreuses: chimique, biologique, mécanique (piégeages, protection des cultures), psychique (confusion sexuelle, épandage de phéromones) ou encore culturale. Plusieurs facteurs vont déterminer le moyen de lutte le plus adéquat: l'aire de la surface infestée, la durée et le coût du contrôle, le cycle biologique de l'insecte et le type de culture (Van Driesche & Hoddle 2009). Si l'objectif est de contrôler de manière permanente une espèce à l'échelle d'un paysage entier, la lutte biologique semble être la plus adaptée alors que les luttes mécanique et chimique sont plus adaptées à l'échelle d'une surface agricole (Van Driesche & Hoddle 2009). La lutte chimique reste cependant la plus utilisée dans les pays industrialisés avec une augmentation constante de l'épandage de pesticides. Aux Etats-Unis, 10 fois plus d'insecticides étaient répandus en 2000 qu'en 1945, avec en plus une perte d'efficacité de ces produits chimiques au cours du temps (+6% de pertes agricoles) (Pimentel *et al.* 1991). En France, entre 2011 et 2014, l'utilisation de produits phytosanitaires a connu une hausse annuelle moyenne de 5.8%, avec une accélération ces dernières années (9.4% entre 2013 et 2014) (Plan Ecophyto II). Même si la lutte chimique peut être efficace, l'épandage de ces produits synthétiques a des conséquences considérables et irréversibles sur l'environnement et la santé humaine à travers la pollution des sols, des cours d'eau, des nappes phréatiques et des impacts sur des espèces non ciblées. L'utilisation des produits phytosanitaires va également contribuer à l'augmentation en fréquence des allèles de résistance dans les populations et nuire à l'efficacité de ces produits sur le long terme. En conséquence, la lutte intégrée prend une place de plus en plus importante dans le paysage agricole. Elle se définit comme « l'application rationnelle d'une combinaison de mesures biologiques, biotechnologiques, chimiques, physiques, culturelles ou intéressant la sélection des végétaux dans laquelle l'emploi de produits phytopharmaceutiques est limité au strict nécessaire pour maintenir la présence des organismes nuisibles en dessous du seuil à partir duquel apparaissent des dommages ou une perte économiquement inacceptables » (directive communautaire 91/414/CEE).

### **Encadré 1: La lutte biologique dans le domaine agronomique**

Lutte biologique au sens restreint ou lutte par entomophage: l'organisme antagoniste du ravageur est un animal (Vertébré, Insecte, Nématode). On distingue ici les prédateurs (consommation de plusieurs proies au cours du développement) des parasitoïdes (consommation d'une proie à la fin du développement).

Lutte microbiologique: l'organisme antagoniste est un microorganisme (Champignon, Bactérie, Virus, Protozoaire).

Lutte biologique par acclimatation: l'organisme antagoniste peut se développer et se maintenir aux dépens de l'espèce cible sans nécessiter une nouvelle intervention de l'Homme.

Lutte biologique inondative: l'organisme antagoniste doit être lâché ou inoculé à chaque fois que l'effectif du ravageur croît dangereusement.

Lutte autocide: elle repose sur l'introduction (en grand nombre) dans une population naturelle d'individus mâles modifiés (rendus stériles).

La lutte biologique que nous allons davantage détailler dans les parties suivantes est une composante essentielle de cette lutte intégrée.

### I.2.1. La lutte biologique

La lutte biologique est basée sur l'exploitation par l'Homme, et pour son profit, d'une relation naturelle entre deux êtres vivants (International Organisation for Biological and Integrated Control; IOBC). L'objectif est de supprimer ou diminuer les densités de populations du ravageur, temporairement ou de manière permanente. La lutte biologique englobe plusieurs sous-niveaux qui vont directement dépendre du type d'organisme utilisé (agent de lutte) et de la technique employée. Ainsi, plusieurs grands types de lutte biologique sont définis (encadré n°1): lutte biologique au sens restreint ou lutte par entomophagie, lutte microbiologique, lutte biologique inondative et lutte autocide (encore nommée lutte par mâles stériles). Cette dernière va particulièrement nous intéresser dans le cadre de cette thèse.

Dans sa définition stricte, la lutte biologique fait uniquement référence à l'utilisation d'ennemis naturels tels que des prédateurs ou des parasitoïdes. La suppression d'un ravageur par l'introduction d'un ennemi naturel provenant de l'aire d'origine de l'espèce cible a été réalisée pour la première fois en 1855 par Asa Fitch, premier entomologiste employé par un état Américain. Ce dernier a suggéré l'introduction du parasitoïde de la cécidomyie du blé, *Sitodiplosis mosellana*. En 2002, plus de 100 espèces d'insectes invasifs étaient contrôlées par l'introduction d'ennemis naturels (Van Driesche & Hoddle 2009). Contrairement à la lutte chimique, la lutte biologique au sens strict permet d'avoir des effets permanents sans interventions humaines régulières et peut persister d'année en année sans coûts supplémentaires. Cependant, l'introduction de nouvelles espèces dans l'environnement peut avoir des impacts sur des espèces non cibles et ainsi modifier l'écosystème. Trois types d'effets négatifs indirects ont été décrits. (1) Un remplacement écologique: l'espèce introduite impacte les populations de proies nécessaires à d'autres espèces autochtones ; (2) une réponse compensatoire: l'attaque par des ennemis naturels peut avoir des effets stimulants sur l'espèce invasive qui devient davantage compétitive que d'autres espèces autochtones ; (3) un changement des niveaux trophiques par une modification de la chaîne alimentaire (Pearson & Callaway 2005).

La lutte autocide, qui repose sur l'introduction de mâles rendus stériles, offre une réelle alternative aux moyens de contrôle classiquement utilisés.



En effet, elle garantit une parfaite spécificité et ne requiert pas l'introduction d'une nouvelle espèce dans l'environnement. Il est intéressant de noter que l'utilisation de mâles stériles ne rentre pas dans la définition stricte de la lutte biologique qui ne fait appel qu'à l'emploi d'ennemis naturels. Dans ce cas, l'utilisation de mâles stériles ou stérilisants est une composante du contrôle génétique des populations, qui se définit comme « la dissémination, l'accouplement ou l'hérédité de facteurs qui réduisent les dommages de l'espèce cible » (Alphey 2014). Nous allons voir dans la partie suivante que le contrôle génétique des populations peut reposer sur des mécanismes très variés.

### I.2.2. Contrôle génétique des populations

Le contrôle génétique des populations peut être séparé en deux grandes catégories. Celle dite de « self-limiting » vise à diminuer la densité de la population, et la modification génétique tend à disparaître de la population ciblée dès l'arrêt des lâchers (uniquement composés de mâles). Celle dite de « self-sustaining » vise à remplacer les populations naturelles par des individus porteurs d'une modification génétique qui tend à augmenter en fréquence dans les populations (Alphey 2014). Cette dernière a l'avantage de ne pas laisser de niche vacante, d'être moins coûteuse, moins contraignante logistiquement (très peu d'individus relâchés) et surtout elle ne nécessite pas de système de sexage à grande échelle. Cependant, puisque la modification génétique tend à envahir les populations, le système est soumis à la sélection naturelle et les conséquences de l'évolution de l'interaction entre l'hôte et la modification génétique n'est plus sous contrôle.

Nous verrons plus loin que la bactérie *Wolbachia pipientis*, centre d'intérêt de nos recherches, peut être utilisée dans ces deux grandes catégories. Elle est la base de la Technique de l'Insecte Incompatible (TII) qui repose sur des lâchers de mâles uniquement, rendus stérilisants par l'infection par *Wolbachia*. Elle est également utilisée dans une technique visant à remplacer les populations de vecteurs de pathogènes par des individus infectés dont la compétence vectorielle est largement diminuée par la présence de cette bactérie. Dans le cadre de cette thèse nous nous intéresserons plus particulièrement aux stratégies de « self-limiting », c'est pourquoi, mis à part le cas de la bactérie *Wolbachia*, les stratégies de « self-sustaining » ne seront pas abordées.



Les stratégies de « self-limiting » se basent sur l'utilisation de mâles stériles (ou lutte autocide). Les agents de lutte sont alors des mâles d'une lignée de laboratoire de l'espèce cible. L'objectif est de réaliser des lâchers inondatifs de mâles stériles dans les populations. La réussite de ces techniques est dépendante de plusieurs facteurs dont les principaux sont : (i) la taille de la population cible, (ii) le ratio mâle stériles / mâles résidents, (iii) le taux de stérilisation et (iv) la compétitivité des mâles stériles. Plusieurs types d'approches ont été développés pour permettre l'obtention de mâles stériles. Nous allons les détailler dans les sous-parties suivantes.

### La Technique de l'Insecte Stérile (TIS)

La TIS a été la première technique à se baser sur l'utilisation de mâles stériles. Dans le cadre de cette technique, la stérilisation est induite par l'exposition à des rayonnements ionisants. L'effet de l'irradiation sur la reproduction a été démontré pour la première fois chez la Vrille du tabac en 1916, chez qui l'exposition à de fortes doses de rayons X rendait incapable la reproduction (Runner 1916). L'effet des rayons sur l'apparition de mutations létales a ensuite été documenté par Muller (1928). L'objectif de la technique est d'exposer les individus aux rayons X, généralement au stade pré-adulte (stade nymphe chez le moustique par exemple), puis de réaliser des lâchers de ces mâles en nombre important et ce de manière fréquente afin de stériliser les femelles en milieu naturel, ce qui a pour conséquence de diminuer la taille des populations ciblées (Dyck *et al.* 2005). Des produits chimiques stérilisants ont été proposés et couramment utilisés dans les années 1950 et 1960 pour ne pas à avoir recours à l'irradiation. Cependant, leur utilisation a été limitée à cause de leurs effets néfastes sur la santé humaine et l'environnement (Campion 1972). La TIS a connu son premier succès dans les années 1950 pour lutter contre la lucilie bouchère, *Cochliomyia hominivorax*, un parasite du bétail. Les mâles et les femelles étaient irradiés au stade pupal avec une dose de rayons gamma induisant une mutation dominante et létale dans le sperme et l'infertilité chez les femelles. Les premiers lâchers (composés de mâles et de femelles) ont été effectués en Floride en juillet 1958 avec 155 à 1160 mouches stériles lâchées par km/semaine (correspondant à des lâchers de 2 à 14 millions/semaine) (Dyck *et al.* 2005). Les derniers cas dûs à la présence de ce parasite ont été recensés en février 1959 et les lâchers ont été stoppés en novembre 1959.

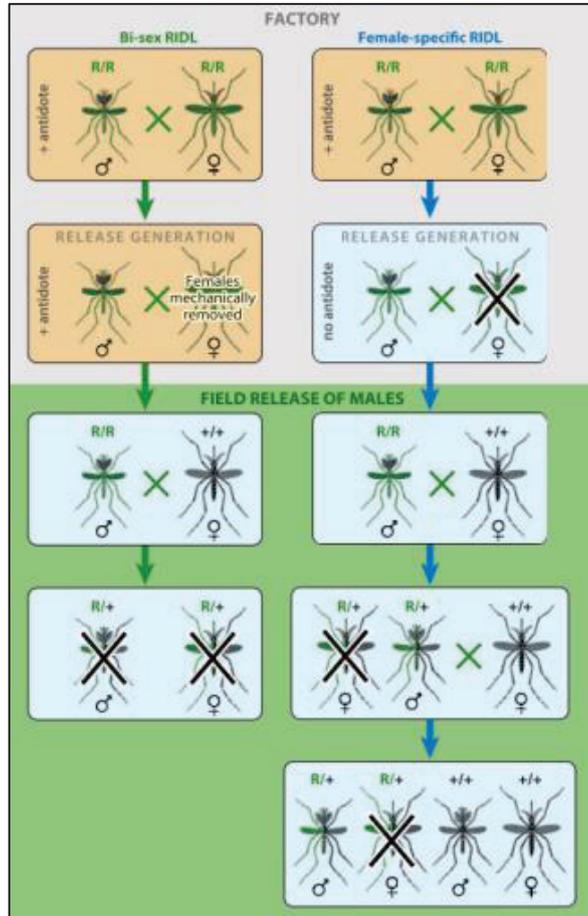


Face à cette réussite, des lâchers ont également été réalisés avec succès au Mexique, en Amérique centrale, en Afrique du Nord et dans les Caraïbes. Par la suite, la TIS a été utilisée pour lutter principalement contre des mouches des fruits comme par exemple pour stopper l'invasion de *Ceratitidis capitata* d'Amérique central vers le sud du Mexique (Hendrichs *et al.* 1983), et contre la mouche du melon *Bactrocera cucurbitae* dans les années 1980 et 1990 au Japon (Itô *et al.* 2003). Des programmes ont également été initiés en Afrique pour lutter contre la mouche tsétsé (Vreysen *et al.* 2000). Plus récemment la TIS était à l'étude en Italie pour lutter contre le moustique tigre, *Aedes albopictus*, dans quatre localités différentes, avec des lâchers d'environ 1000 moustiques/ha/semaine. Ces lâchers ont eu un impact significatif sur la taille de la population pour seulement 2 sites sur 4 (Bellini *et al.* 2013b).

D'autres projets ont été menés sur différentes espèces de moustiques, notamment dans le genre *Anopheles*, mais ont fait face à deux difficultés majeures. La première était liée aux effets secondaires causés par l'irradiation. En effet plusieurs études ont rapporté que l'exposition aux rayons X pouvait affecter la compétitivité sexuelle des mâles. Cela a été observé dans le genre *Anopheles* (Dyck *et al.* 2005; Helinski & Knols 2008; Helinski *et al.* 2009) alors que les coûts semblent moindres dans le genre *Aedes* (Bellini *et al.* 2013a; b; Atyame *et al.* 2016). La seconde est liée à la capacité de séparer massivement les mâles des femelles. Dans les exemples précédents les deux sexes étaient relâchés mais dans le cas d'insectes de type piqueur-suceur comme le moustique, même si les femelles relâchées sont stériles, elles peuvent avoir un repas sanguin et transmettre des pathogènes. Sans recourir à la manipulation génétique, seul un sexage mécanique est possible en se basant sur un dimorphisme de taille au stade nymphe avec des systèmes de tamis et une vérification finale à l'œil nu. Ces deux derniers points ont motivé des recherches alternatives, notamment génétiques, pour pallier les difficultés liées au sexage et à la baisse de la compétitivité sexuelle des mâles stériles.

### Insectes génétiquement modifiés

Dans le cadre de l'utilisation d'insectes génétiquement modifiés, un gène létal et dominant est introduit chez l'insecte. Cette technique est appelée « RIDL » (Release of Insects carrying a Dominant lethal).



**Fig 1.** Description du système de mâles stériles génétiquement modifiés. A gauche: « Bi-sex-lethal sterile male system » aboutit à la mort des deux sexes dans la descendance. A droite: « Female-killing system » fournit un sexage génétique par l’expression du transgène dans la descendance fille (Alphey 2014). R/R: homozygote pour le transgène R. (+/+): génotype sauvage.

Au laboratoire, des lignées homozygotes (R/R) pour le transgène RIDL (R) sont maintenues en présence d'un antidote (tétracycline) qui empêche le gène de s'exprimer (Alphey 2014). Dans le cas où les mâles et les femelles sont porteurs de ce gène, la technique est appelée « Bi-sex lethal sterile-male systems ». Lorsque les femelles sauvages (+/+) s'accouplent avec des mâles (R/R), la descendance, 100% hétérozygote (R/+), ne peut se développer en absence de l'antidote (théoriquement absent en milieu naturel) (Fig 1). La modification génétique apporte alors uniquement une nouvelle méthode de stérilisation, la séparation mâle/femelle se fait mécaniquement et ce sont les mâles R/R qui sont relâchés. Cette approche est donc réservée aux organismes diploïdes.

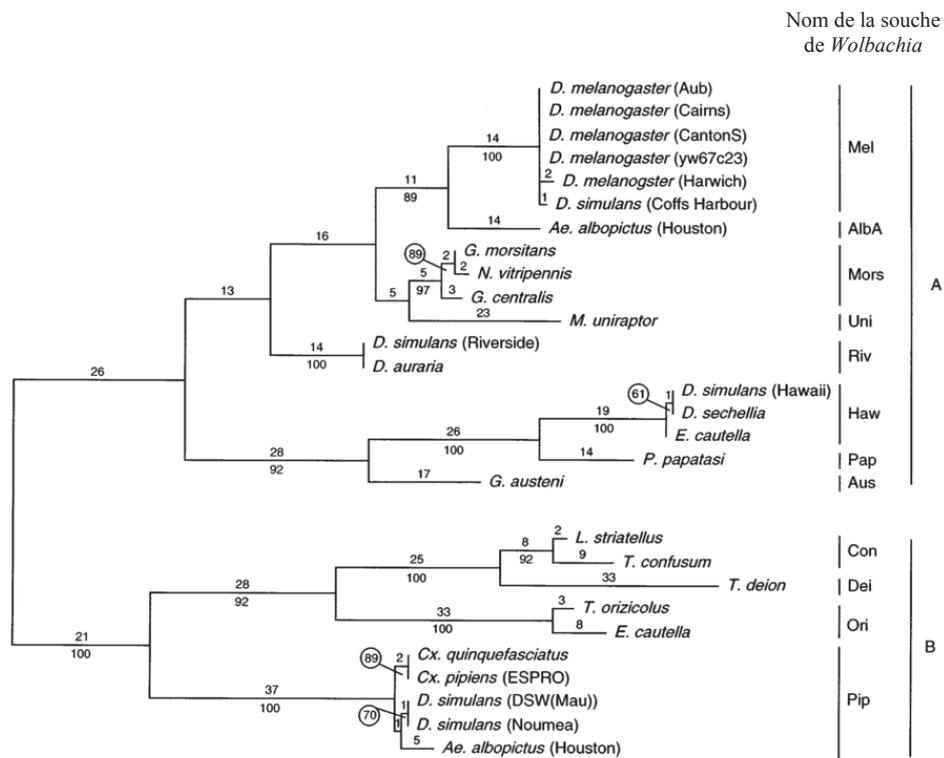
Il existe également un système appelé « Female-killing » qui va fournir un sexage génétique plutôt que mécanique, par l'expression du même gène létal mais porté cette fois-ci par le chromosome X. En absence d'antidote, le gène va s'exprimer uniquement dans la descendance filles des femelles « RIDL » et seuls les mâles peuvent se développer car ils possèdent une endonucléase dans le chromosome Y qui va spécifiquement couper le transgène présent dans le chromosome X (Fig 1). Pour son application, la technique « RIDL » a surtout été approfondie pour lutter contre le moustique *Aedes aegypti*. Des croisements en conditions de laboratoire ont montré que les mâles modifiés avaient une compétitivité sexuelle similaire à celle des mâles sauvages et une mortalité de 96.5% dans la descendance a été observée (Harris *et al.* 2011). Les premiers lâchers de mâles modifiés ont eu lieu dans les îles Caïman en 2010. Approximativement 3.3 millions de mâles ont été relâchés sur une période de 23 semaines, avec environ 4000 mâles par semaine et par hectare, représentant un ratio de 10 (mâle stérile) / 1 (mâle résident). Les résultats ont été plutôt convaincants car, après 4 à 6 semaines, cette espèce a été éradiquée dans un des sites et une forte diminution de la densité de population a été observée dans les trois autres sites de l'île (Harris *et al.* 2012). Des lâchers ont également été expérimentés en Malaisie en décembre 2010 dans des sites inhabités pour évaluer la capacité de dispersion et la survie des mâles R/R. Mais le projet a été abandonné par le ministère de la santé Malaisien car jugé trop coûteux et inefficace (Lacroix *et al.* 2012). Un essai pilote en milieu naturel a été réalisé au Brésil pour lutter contre *A. aegypti*: 185 000 mâles ont été lâchés en juin 2011, puis 540 000 au début de l'année 2012. Au mois de mai 2012 une diminution de 95% de la densité de population a été observée (Carvalho *et al.* 2015).



Des lignées d'insectes transgéniques de ravageurs de cultures ont également été produites ces dernières années chez la mouche de l'olive *Bactrocera oleae* (Ant *et al.* 2012; Harvey-Samuel *et al.* 2014), la mouche méditerranéenne des fruits *Ceratitidis capitata* (Leftwich *et al.* 2014) et la Teigne des choux *Plutella xylostella* (Jin *et al.* 2013). Des essais en cages à populations en condition de laboratoire et semi-naturelle ont montré des résultats prometteurs chez chacun de ces ravageurs en termes de taux de stérilisation et de compétitivité sexuelle des mâles modifiés.

L'utilisation d'organismes génétiquement modifiés semble être un outil puissant pour la lutte anti-vectorielle et les ravageurs de cultures mais plusieurs aspects peuvent limiter leurs développements. Premièrement, l'aspect purement moral et éthique de l'acceptation de la modification du vivant par l'Homme pour son propre profit. Deuxièmement un aspect plus pragmatique en lien avec les conséquences que peuvent avoir ces modifications sur le long terme si elles se répandent dans les populations. L'utilisation de ces lignées est actuellement interdite au sein de l'Union Européenne, ce qui limite considérablement l'emploi de cette technique.

Un système alternatif qui se base également sur l'utilisation de mâles stérilisants est la Technique de l'Insecte Incompatible (TII), qui repose sur l'utilisation d'un phénomène naturel, appelé incompatibilité cytoplasmique (IC), où l'agent stérilisant est la bactérie *Wolbachia pipientis*. C'est cette technique qui va nous intéresser dans la suite de ce manuscrit. Analogue à la TIS, elle se base également sur des lâchers inondatifs de mâles infectés par une souche de la bactérie *Wolbachia* induisant de l'IC lors de croisements avec des femelles sauvages. Cette IC se traduit par une mortalité embryonnaire très élevée qui va permettre de diminuer les densités de populations de l'espèce cible au cours du temps. Dans le but d'appréhender au mieux les possibilités d'exploitation de ces bactéries en recherche appliquée, le prochain sous-chapitre va porter sur la description de la bactérie *Wolbachia* et de ses diverses interactions avec ses hôtes.



**Fig 2.** Phylogénie des *Wolbachia* appartenant au groupe A et B basée sur la séquence du gène *wsp* (~600 pb). Les hôtes associés sont indiqués à l'extrémité des branches, puis le nom des souches de *Wolbachia* et le clade auquel elles appartiennent (Zhou *et al.* 1998).

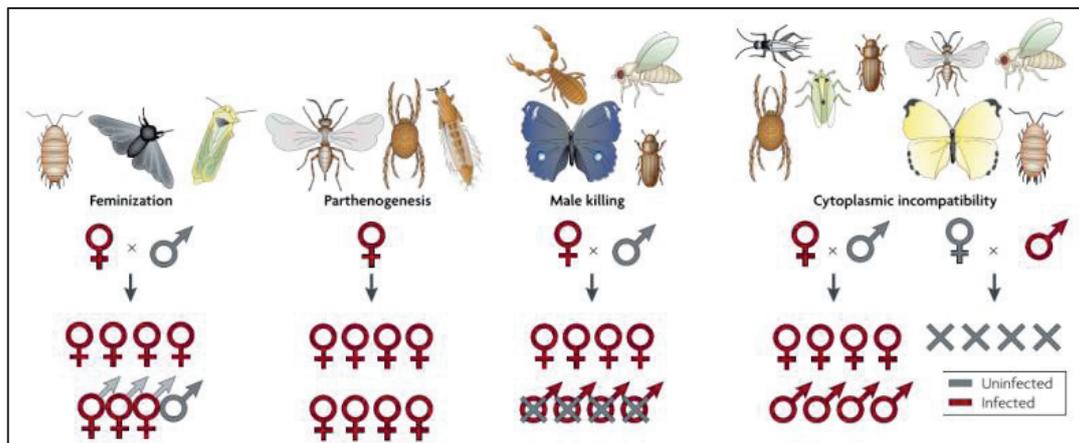
### **I.3. *Wolbachia pipientis***

#### **I.3.1. Description générale**

La bactérie *Wolbachia pipientis*, décrite pour la première fois par Hertig et Wolbach en 1924, appartient à l'ordre des Rickettsiales, un groupe de bactéries intracellulaires qui entretient avec ses hôtes des relations très variées, de type parasitisme, commensalisme et mutualisme (Hentschel *et al.* 2000). Elle infecte un éventail d'hôtes très divers, principalement des espèces d'arthropodes (d'après Weinert *et al.* (2015), 52% des espèces d'arthropodes sont infectées par *Wolbachia*), et des nématodes. Même si *Wolbachia* est transmise maternellement, c'est-à-dire de la mère à la descendance, l'absence de congruence entre les phylogénies de différentes espèce hôtes et de leurs *Wolbachia* montrent l'existence de transferts horizontaux entre espèces hôtes (Werren *et al.* 2008). Sur des bases moléculaires (le gène *Wolbachia surface protein*), les bactéries *Wolbachia* ont été classées en différents super-groupes : les clades A, B, E, F, G, H et I comprennent les *Wolbachia* infectant les arthropodes (les clades A et B étant les plus représentés) (Fig 2) et les clades C et D celles présentent chez les nématodes.

#### **I.3.2. Phénotypes associés à *Wolbachia***

La bactérie *Wolbachia* présente une grande diversité d'interactions avec ses hôtes. Il a été montré que la bactérie *Wolbachia* pouvait être un mutualiste obligatoire de la punaise de lit, *Cimex lectularius*, puisqu'elle fournit à son hôte de la vitamine B indispensable à sa survie (Hosokawa *et al.* 2010). Chez l'hyménoptère parasitoïde *Asobara tabida*, *Wolbachia* est nécessaire à l'ovogénèse (Dedeine *et al.* 2001). *Wolbachia* peut aussi être un mutualiste facultatif puisqu'elle est capable d'apporter des bénéfices directs pour la fitness de ses hôtes, comme par exemple augmenter la fécondité (Dobson *et al.* 2002b, 2004; Fry *et al.* 2004; Weeks *et al.* 2007; Unckless & Jaenike 2011), la longévité (Alexandrov *et al.* 2007; Toivonen *et al.* 2007; Gavotte *et al.* 2010; Brelsfoard & Dobson 2011) ou encore protéger ses hôtes contre des ennemis naturels, en particulier contre des infections virales. En effet, la présence de la bactérie *Wolbachia* peut diminuer très fortement la réplication des virus à ARN chez certaines espèces de drosophiles et de moustiques (Hedges *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 2008;

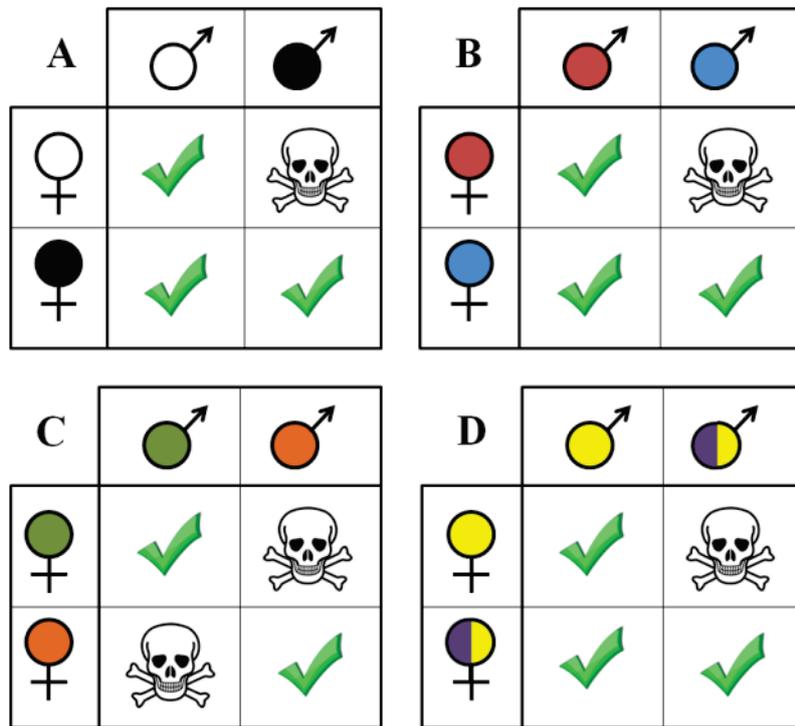


**Fig 3.** Les quatre grands types de manipulation de la reproduction induite par la bactérie *Wolbachia* (Werren *et al.* 2008).

Osborne *et al.* 2009; Bian *et al.* 2010; Glaser & Meola 2010; Blagrove *et al.* 2012; Cattel *et al.* 2016b). Il a par exemple été montré que les souches de *Wolbachia* naturellement présentes chez *Drosophila melanogaster*, nommées *wMel* et *wMelCS*, empêchaient la multiplication du Drosophila C virus (DCV) et conféraient un phénotype protecteur à son hôte (Chrostek *et al.* 2013). De par cette capacité à interférer avec la réplication virale, l'infection par certaines souches de *Wolbachia* va diminuer significativement la compétence vectorielle de plusieurs espèces de moustiques (Moreira *et al.* 2009). Ce phénotype s'étend même à d'autres pathogènes comme *Plasmodium* dans le genre *Anopheles*, où les femelles infectées par *Wolbachia* ont une quantité de sporozoïtes infectieux dans les glandes salivaires significativement inférieure aux femelles non infectées (Bian *et al.* 2013). Nous verrons plus loin que la capacité de *Wolbachia* à interférer avec la réplication virale est actuellement proposée pour limiter la transmission de virus tel que la Dengue chez le moustique *Aedes aegypti*.

Même si au cours de ces dernières années de nombreux phénotypes liés à l'infection par *Wolbachia* ont été découverts dans différents systèmes, la bactérie *Wolbachia* est davantage connue pour sa capacité à manipuler la reproduction de ses hôtes. Ces manipulations sont des conséquences de la transmission maternelle de la bactérie *Wolbachia*. Elles ont pour résultat de biaiser la sex-ratio en faveur des femelles ou de favoriser les femelles infectées aux dépens des compétiteurs non infectés. Quatre grands types de manipulation de la reproduction sont connus: la féminisation phénotypique, la parthénogénèse thélytoque, le male-killing et l'incompatibilité cytoplasmique (IC) (Fig 3) (Werren, Baldo & Clark 2008).

Dans le cas de la féminisation, les individus génétiquement mâles infectés par *Wolbachia* sont fonctionnellement femelles (Fig 3). La féminisation n'a été observée que chez des crustacés isopodes terrestres (Cordaux *et al.* 2004). Chez le cloporte *Armadillidium vulgare*, la bactérie *Wolbachia* va empêcher le développement des glandes androgènes responsables de la différenciation des caractères primaires et secondaires chez les mâles (Cordaux *et al.* 2011). Chez les espèces haplo-diploïdes, les femelles engendrent des mâles par reproduction asexuée et des femelles par reproduction sexuée (parthénogénèse arrhénotoque). Certaines souches de *Wolbachia* sont capables de diploïdiser les œufs non fécondés, induisant la production de femelles par parthénogénèse thélytoque sans fécondation (Pannebakker *et al.* 2004) (Fig 3). Pour ces deux types de manipulation, parthénogénèse thélytoque et féminisation, les individus non transmetteurs, à savoir les mâles, deviennent des



**Fig 4.** Les différents types d'incompatibilité cytoplasmique. Chaque couleur représente des infections par différentes souches de *Wolbachia*. A: IC unidirectionnelle entre mâle infecté et femelle non infectée. B: IC unidirectionnelle entre individus infectés par différentes souches de *Wolbachia*. C: IC bidirectionnelle entre individus infectés par différentes souches de *Wolbachia*. D: IC unidirectionnelle entre mâle bi-infecté et femelle mono-infectée.

individus capables de transmettre la bactérie. Le nombre d'individus transmetteurs (individus femelles) dans la population va donc augmenter, ce qui est intéressant pour la bactérie car les mâles sont des « culs de sac évolutifs ». *Wolbachia* peut également causer la mort des embryons mâles (male-killing), ce qui permet de diminuer la compétition frère-sœur et de diminuer les risques de consanguinité. La mort des embryons mâles serait due à une sur-régulation des gènes responsables de l'apoptose et de cassures de l'ADN dans le chromosome X uniquement chez le mâle (Harumoto *et al.* 2016). Enfin, l'incompatibilité cytoplasmique (IC), qui est le phénotype manipulateur de la reproduction de *Wolbachia* le plus répandu et sur lequel repose la TII.

### I.3.1. L'incompatibilité cytoplasmique (IC)

#### Description de l'IC

Ce n'est qu'en 1971, à l'aide de traitements antibiotiques, que la bactérie *Wolbachia* est désignée comme l'agent responsable de l'IC chez le moustique *Culex pipiens* (Yen & Barr 1971). Celle-ci peut survenir lors de croisements entre mâles infectés et femelles non infectées (Fig 4A) mais également entre individus infectés par différentes souches de *Wolbachia*. Chez les espèces diploïdes, l'IC aboutit à une mortalité embryonnaire anormalement élevée, pouvant aller jusqu'à 100% chez le moustique *Culex pipiens* par exemple (Atyame *et al.* 2011b). On parle d'IC unidirectionnelle si l'IC survient dans un seul sens de croisement (Fig 4B) et d'IC bidirectionnelle s'il y a mortalité embryonnaire dans les deux sens de croisements (Fig 4C).

Le croisement entre une femelle infectée et un mâle non infecté étant compatible, tout comme le croisement entre individus infectés par la même souche de *Wolbachia*, les femelles infectées sont fortement avantagées par rapport aux femelles non infectées puisqu'elles peuvent avoir des descendants viables avec les deux types de mâles alors que les femelles non infectées n'auront des descendants viables qu'avec les mâles non infectés. L'IC procure donc un avantage sélectif fort aux femelles infectées qui peuvent envahir les populations initialement non infectées (Engelstädter & Telschow 2009). Lorsque l'IC est bidirectionnelle, l'issue de la compétition entre les deux souches va dépendre de leurs fréquences respectives: la souche la plus fréquente va éliminer la plus rare et va ainsi envahir la population hôte (Rousset *et al.* 1991).



Dans le cas d'infections multiples, l'IC va conférer un avantage reproductif aux femelles multi-infectées par rapport aux femelles mono-infectées (Fig 4D), ce qui permet à ces individus d'envahir les populations (Riegler & Stauffer 2002). En conséquence, les multi-infections sont très fréquentes dans les populations naturelles.

### Les mécanismes de l'IC

Certains mécanismes cytologiques de l'IC ont été décrits chez *Drosophila simulans* et *Nasonia vitripennis* (Serbus *et al.* 2008). Dans les embryons issus de croisements incompatibles, les chromosomes paternels tardent à se condenser par rapport aux chromosomes maternels, et sont alors perdus lors de la première mitose de l'œuf (Callaini *et al.* 1996, 1997; Lassy & Karr 1996; Tram & Sullivan 2002; Tram *et al.* 2006). L'effet de *Wolbachia* sur les chromosomes paternels n'est pas causé par la présence directe des bactéries car celles-ci sont éliminées des spermatozoïdes avant la fin de la spermatogénèse (Clark *et al.* 2002; Riparbelli *et al.* 2007). Landmann *et al.* (2009) ont noté que chez *D. simulans* et *D. melanogaster*, le recrutement des histones par le pronucléus mâle est retardé avant la première division de l'œuf, ce qui perturbe le déroulement normal de la mitose. Il en résulte que, chez les espèces diploïdes, l'IC entraîne la mort des embryons incompatibles. Chez les espèces haplo-diploïdes, (où les œufs non fertilisés se développent en mâles), il existe deux conséquences de l'IC : soit elle cause la mort des œufs fécondés (mortalité femelles), soit *Wolbachia* cause l'haploïdie des œufs fécondés et l'embryon se développe en mâle (Breeuwer & Werren 1990). Chez *Leptopilina heterotoma*, une espèce d'Hyménoptère, l'IC induit la mort de tous les embryons fertilisés, suggérant qu'ils sont aneuploïdes (Vavre *et al.* 2000).

### Catégorisation phénotypique de l'IC

L'IC peut être décrite comme un système poison/antidote où *Wolbachia* va induire une modification chez le mâle durant la spermatogénèse qui peut être restaurée dans l'œuf si la femelle est infectée par la même souche de *Wolbachia* (Werren 1997). Afin de formaliser la caractérisation des souches de *Wolbachia* vis-à-vis de l'IC, Werren (1997) propose de décrire l'IC comme un système de modification/sauvetage, appelé « modification (*mod*) / rescue (*resc*) ».

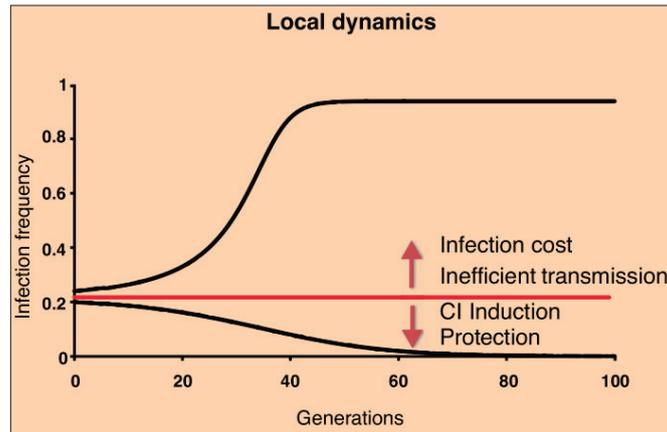


Ainsi 4 types de souches de *Wolbachia* ont été décrites, (i) *mod*<sup>+</sup>/*resc*<sup>+</sup> où la souche inductrice d'IC est capable de restaurer les modifications dont la sienne, (ii) *mod*<sup>-</sup>/*resc*<sup>-</sup> où la souche n'induit pas d'IC et n'est pas capable de sauver la modification induite par d'autres souches, (iii) *mod*<sup>-</sup>/*resc*<sup>+</sup>, où la souche est non inductrice d'IC mais capable de sauver celle induite par d'autres souches et enfin (iv) *mod*<sup>+</sup>/*resc*<sup>-</sup>, où la souche est incapable de restaurer sa propre modification, scénario dit suicidaire, encore jamais décrit en milieu naturel.

### Facteurs influent sur l'IC

L'expression des différents patrons d'IC, à la fois les fonctions *mod* et *resc*, sont très spécifiques car elles dépendent des génotypes hôtes et bactériens (Reynolds & Hoffmann 2002; Weeks *et al.* 2002). *D. simulans* est un modèle exemplaire pour montrer toute la complexité de l'expression de l'IC. Cette espèce est naturellement infectée par différentes souches de *Wolbachia*, certaines inductrices d'IC telle que *wRi*, *wNo* et *wHa*, et d'autres qui n'en induisent pas comme les souches *wAu* et *wMa* (Merçot & Charlat 2004). Des expériences de transferts de souches d'une espèce hôte à une autre ont permis de mettre en évidence un effet hôte sur l'expression de la fonction *mod*. C'est le cas de la souche *wMel* qui n'induit pas d'IC chez son hôte naturel *D. melanogaster* (Boyle *et al.* 1993) mais qui, après transfert chez *D. simulans*, induit un taux d'IC d'environ 90% (Poinsot *et al.* 1998). Il en est de même pour la fonction *resc* qui peut varier selon le génotype hôte et dont l'expression et l'intensité sont souche-spécifique. Par exemple, après transfert chez *D. simulans*, la souche *wYak*, est capable de sauver l'IC induite par *wRi* mais pas celle induite par *wMel* (Zabalou *et al.* 2008).

L'IC est connue pour décliner avec l'augmentation de l'âge des mâles (Turelli & Hoffmann 1995; Karr *et al.* 1998; Reynolds & Hoffmann 2002; Brennan & Anderson 2004; Weeks *et al.* 2007; Awrahman *et al.* 2014). Par exemple, chez *D. simulans*, les croisements avec des mâles âgés de 4 jours donnent un taux d'éclosion inférieur à 5%, qui passe à 27% avec des mâles âgés de 11 jours (Awrahman *et al.* 2014). Cependant ce patron n'est pas universel. Chez *A. albopictus* il n'y a pas d'effet de l'âge du mâle sur le taux d'IC (Moretti & Calvitti 2013). Cet effet de l'âge serait lié à la densité en *Wolbachia* dans les spermatozoïdes, qui serait plus faible chez les mâles âgés induisant peu d'IC (Bressac & Rousset 1993; Veneti *et al.* 2003).



**Fig 5.** Dynamique locale de l'épidémiologie de *Wolbachia*. Si le taux d'infection par *Wolbachia* est suffisant (au-dessus de la ligne rouge), le bénéfice procuré par l'IC aux femelles infectées est suffisant pour contrebalancer des coûts liés à l'infection ou une transmission maternelle imparfaite. La protection contre des pathogènes virulents réduit cette fréquence seuil et facilite le processus d'invasion (Vavre & Charlat 2012).

Par exemple, chez *D. simulans* le pourcentage de spermatocytes infectés par *Wolbachia* passe de 87% chez de jeunes mâles à 3% pour des mâles âgés d'un mois (Bressac & Rousset 1993). La densité et la localisation de *Wolbachia* sont donc des paramètres clés de l'intensité de l'expression de l'IC. Indirectement, la température va également jouer un rôle prépondérant sur les niveaux d'IC car la densité bactérienne est sensible aux variations de température. Par exemple, chez *Leptopilina heterotoma*, des mâles élevés à 26°C ont une densité en *Wolbachia* deux fois plus élevée que des mâles élevés à 18°C (Mouton *et al.* 2006). A l'inverse, dans le genre *Drosophila* la densité bactérienne est inversement corrélée à la température d'élevage (Clancy & Hoffmann 1998; Hurst *et al.* 2000), suggérant un effet important du génotype hôte et bactérien sur les conséquences des variations de températures sur la densité bactérienne (Mouton *et al.* 2006). Malgré son effet sur la densité bactérienne, chez *L. heterotoma* aucun effet de la température sur l'IC n'a été observé (Mouton *et al.* 2006) alors que chez *D. simulans*, l'augmentation de la température diminue le taux d'IC (Hoffmann *et al.* 1990; Clancy & Hoffmann 1998).

Le nombre d'accouplements influence également le taux d'IC. Des mâles vierges de *D. simulans* infectés par *wRi* et âgés de 11 jours induisent un taux d'IC d'environ 70% alors que des mâles du même âge, mais qui se sont déjà accouplés 1 à 3 fois par jour, induisent un taux d'IC de seulement 35% (Awraahman *et al.* 2014).

### Dynamique d'invasion de *Wolbachia*

Comme nous l'avons vu précédemment, l'IC permet à la bactérie *Wolbachia* d'envahir les populations hôtes. La sélection sur l'IC est fréquence-dépendante: plus la fréquence de la souche qui induit de l'IC est élevée et plus la vitesse à laquelle cette souche va envahir sera rapide. Les modèles mathématiques indiquent que plusieurs paramètres vont influencer la fréquence d'une souche incompatible dans les populations : (1) l'intensité de l'IC, (2) le taux de transmission maternelle et (3) le coût de l'infection sur la fitness des femelles (Hoffmann *et al.* 1990). Ces modèles théoriques permettent de prédire la fréquence au-dessus de laquelle la souche incompatible va envahir les populations et au-dessous de laquelle cette souche peut disparaître (Engelstädter & Telschow 2009) (Fig 5). Ainsi, si la souche de *Wolbachia* n'affecte pas la fitness de son hôte et que le taux de transmission et d'IC sont élevés, le seuil d'invasion sera faible.



La fixation de *Wolbachia* dans les populations (100% d'individus infectés) s'observe uniquement dans le cas où la transmission à la descendance est parfaite ou que l'IC est totale. En théorie, dans le cas de mono-infection, la coexistence de différentes souches incompatibles est impossible car elles sont supposées s'éliminer, sauf dans le cas où les populations sont structurées (Engelstädter & Telschow 2009). Cette capacité à envahir les populations grâce à l'IC a déjà été observée dans plusieurs systèmes en laboratoire (Dobson *et al.* 2002a) et en milieu naturel (Turelli & Hoffmann 1995). Par exemple, chez la mouche de la cerise, *Rhagoletis cerasi*, les individus bi-infectés par *Wolbachia* ont envahi les populations mono-infectées en Europe (Riegler & Stauffer 2002).

La théorie montre également que la protection contre des ennemis naturels peut entraîner l'invasion de symbiotes potentiellement coûteux et transmis verticalement sans manipulation de la reproduction (Lively *et al.* 2005; Jones *et al.* 2007). Certaines souches de *Wolbachia* inductrices d'IC sont également capables de protéger leurs hôtes contre des ennemis naturels (Martinez *et al.* 2015). Dans ce cas, le bénéfice lié à la protection va faciliter l'invasion en diminuant le seuil au-dessus duquel la souche peut envahir les populations (Fenton *et al.* 2011). L'invasion sera d'autant facilitée que le pathogène est virulent et en prévalence élevée (Vavre & Charlat 2012).

#### **I.4. *Wolbachia* au service de l'humain: du fondamental à l'appliqué**

A partir des années 1960, il a été imaginé par la communauté scientifique que, parmi les diverses interactions que pouvait avoir la bactérie *Wolbachia* avec ses hôtes, certaines pourraient être d'utilité publique. Trois approches principales ont été proposées jusqu'à maintenant, toutes se basant uniquement ou partiellement sur l'utilisation de l'IC, avec deux stratégies bien distinctes: (i) remplacer les populations d'hôtes résidentes par des individus dont la compétence vectorielle est affectée par la présence de la bactérie *Wolbachia*, (ii) diminuer la taille des populations de l'espèce cible par la stérilisation. La première approche n'est donc exploitable que sur des espèces vecteurs de pathogènes. Ces deux stratégies sont détaillées dans les sous-parties suivantes.



### I.4.1. Remplacement des populations

L'approche de remplacement des populations a été étudiée uniquement chez des moustiques vecteurs de pathogènes pour l'Homme, en particulier le moustique *Aedes aegypti*. L'objectif de cette approche est de remplacer les populations de l'espèce ciblée par une lignée de laboratoire qui possède des caractéristiques intéressantes conférées par *Wolbachia* pour la lutte anti-vectorielle. Le but est d'utiliser le pouvoir invasif de *Wolbachia* conféré par l'IC pour que la nouvelle population remplace la résidente (O'Neill *et al.* 1997). Le principe consiste à introduire dans l'espèce cible une souche de *Wolbachia* induisant de l'IC puis à relâcher des mâles et des femelles infectés par cette nouvelle souche afin qu'ils envahissent la population. En plus de générer des taux d'IC élevés avec les femelles sauvages, la souche de *Wolbachia* nouvellement introduite va induire des phénotypes potentiellement exploitables pour diminuer la compétence vectorielle de l'espèce cible. Deux principales stratégies ont été imaginées et développées ces dernières années pour diminuer la capacité du vecteur à transmettre des virus.

#### Stratégie du « Life-Shortening »

Certaines souches de *Wolbachia* peuvent être virulentes pour leurs hôtes. La souche de *Wolbachia* wMelPop par exemple (proche de wMel), présente dans des lignées de *D. melanogaster* (uniquement en laboratoire) affecte significativement la survie des individus (Min & Benzer 1997). Ce coût sur la fitness est due à une prolifération excessive de la bactérie dans le cerveau, les muscles et la rétine et cause une dégénérescence des tissus (Min & Benzer 1997). Cette multiplication bactérienne excessive serait due à une amplification d'une région du génome, appelée octomom, présente en 7 copies chez wMelPop alors qu'une seule est retrouvée chez wMel (Chrostek *et al.* 2013). Il a été proposé que cette souche pourrait être utilisée afin de diminuer l'espérance de vie des populations de moustiques (Handler & James 2000), l'objectif étant que les femelles meurent avant de pouvoir transmettre des virus nouvellement acquis après un repas sanguin. Chez *Aedes aegypti*, la période d'incubation extrinsèque, c'est-à-dire le temps de latence entre l'ingestion du virus de la Dengue et sa capacité à le transmettre est d'environ 2 semaines (Watts *et al.* 1987). Pour tester cette approche, la souche wMelPop a été transférée chez le moustique *Aedes aegypti*.



Les croisements ont révélé 100% d'IC unidirectionnelle (McMeniman *et al.* 2009), permettant théoriquement à *wMelPop* d'envahir les populations. De plus, l'infection par *wMelPop* réduit significativement la survie des femelles infectées qui survivent en moyenne 25 jours au lieu de 43 jours pour les non infectées (McMeniman *et al.* 2009; Yeap *et al.* 2011). D'autres traits d'histoire de vie ont également été mesurés afin d'évaluer si l'infection par *wMelPop* induisait des coûts supplémentaires qui pourraient nuire à son invasion dans les populations. Une diminution du taux d'éclosion, en particulier après une période de dessiccation des œufs (Yeap *et al.* 2011, 2014), et une perte de fécondité (McMeniman & O'Neill 2010; Yeap *et al.* 2011) ont été observées. Malgré un taux d'IC et une transmission maternelle élevée, il semble que la dynamique d'invasion d'une souche virulente soit complexe et trop dépendante des conditions écologiques du milieu pour une application concrète (McMeniman & O'Neill 2010; Yeap *et al.* 2011).

#### Diminution de la compétence vectorielle

Chez le moustique ce sont des expériences de transferts de souches de *Wolbachia* d'une espèce à une autre qui ont pu mettre en évidence que cette bactérie pouvait réduire la capacité du moustique à transmettre différents pathogènes (Kambris *et al.* 2009; Moreira *et al.* 2009; Bian *et al.* 2010, 2013; Walker & Moreira 2011; Blagrove *et al.* 2012). Les bactéries *Wolbachia* appartenant au groupe *wMel* (*wMel*, *wMelPop*, *wAlbB*) ont été particulièrement étudiées car elles interfèrent avec une large diversité de pathogènes tels que les virus du Chikungunya ou de la Dengue mais également contre des nématodes filaires (Kambris *et al.* 2009; Andrews *et al.* 2012) et des *Plasmodium* (Moreira *et al.* 2009; Bian *et al.* 2013).

Les principaux efforts de recherche concernant cette technique ont été menés chez le moustique *A. aegypti*, naturellement non infecté par *Wolbachia*, et chez lequel la souche *wMel* a été introduite. La présence de cette souche de *Wolbachia* chez les femelles réduit significativement la réplication virale au sein des glandes salivaires, ce qui diminue fortement la capacité des femelles à transmettre le virus de la Dengue (Moreira *et al.* 2009). De plus, les mâles infectés par *wMel* induisent un taux d'IC très élevé lors de croisements avec des femelles non infectées. Des tests en cages à populations en conditions naturelles (placées en extérieur) ont montré que cette souche pouvait envahir une population composée de moustiques sauvages (Walker *et al.* 2011). Suite à ces expériences les autorités australiennes ont autorisé des lâchers dans deux localités dans le nord-est de l'Australie.



En l'espace de 10 semaines, environ 150 000 moustiques ont été lâchés sur chaque site: une fixation de *Wolbachia* a été obtenue dans un des sites et, dans le second, 90% des individus étaient infectés 5 semaines après la fin des lâchers (Hoffmann *et al.* 2011). Un programme à l'échelle mondiale, nommé « eliminate dengue » a été initié en 2014 avec des lâchers sur quatre sites en Australie, un au Vietnam, deux en Indonésie, un en Colombie et un au Brésil ([www.eliminatedengue.org](http://www.eliminatedengue.org)). Contrairement aux méthodes de suppression des populations qui reposent uniquement sur des lâchers de mâles, le grand avantage de cette approche est qu'elle ne nécessite pas de méthode de sexage à grande échelle. Cependant ici le ménage à trois entre le moustique, la bactérie *Wolbachia* et le virus est soumis à la sélection naturelle. Cela pose des questions sur la coévolution entre les différents partenaires, notamment sur l'évolution de la virulence du virus et de sa capacité à contourner la « barrière *Wolbachia* ». De plus, cette approche ne se limite qu'à des organismes vecteurs.

#### I.4.2. Suppression des populations

Analogue à la TIS, la Technique de l'Insect Incompatible (TII) repose sur des lâchers fréquents et inondatifs exclusivement composés de mâles, infectés par une souche de *Wolbachia* induisant de l'IC lors de croisements avec les femelles présentes dans la population cible, avec pour même objectif de diminuer les densités de populations (Boller *et al.* 1976; Riegler & Stauffer 2002). Cette technique avait été utilisée avant que le lien soit fait entre l'IC et l'infection par *Wolbachia*, à Okpo en Birmanie pour lutter contre le moustique *Culex quinquefasciatus*. En effet, Laven (1967) avait remarqué que les relations de compatibilité variaient en fonction des origines géographiques des moustiques. Par exemple, les mâles échantillonnés à Paris induisaient des taux d'IC très élevés lors de croisements avec des femelles présentes à Myanmar. Il s'en est suivi des lâchers journaliers de 5000 mâles pendant 3 mois alors que la taille de la population cible était estimée entre 1000 et 2000 individus. A la fin de l'expérimentation, stoppée par l'arrivée des moussons, le nombre d'œufs pondus ainsi que les pourcentages des taux d'éclosion avaient très nettement diminué, faisant de cette expérience la première démonstration de l'efficacité de la TII en milieu naturel (Laven 1967).

Depuis le système *Culex-Wolbachia* a largement été étudié. Nous savons que la *Wolbachia* infectant *Culex pipiens*, nommée wPip est fixée dans les populations et qu'il existe cinq souches (nommées wPip-I à V) (Atyame *et al.* 2011a) avec des relations



d'incompatibilité complexes. L'utilisation de la TII pour lutter contre les populations de *C. pipiens* est toujours d'actualité, principalement dans les îles du sud-ouest de l'Océan Indien. Des croisements individuels ont montré que des mâles infectés par la souche *wPip-IV* (provenant de Turquie) induisaient des taux d'IC proches de 100% lors de croisements avec des femelles infectées par *wPip-I*, la seule souche présente dans les différentes îles ciblées (Atyame *et al.* 2011b). La technique, évaluée en cages à populations et en conditions semi-naturelles, a montré d'excellents résultats (Atyame *et al.* 2015), proposant une alternative concrète aux insecticides pour lutter contre ce moustique dans cette région du globe.

Le système *Culex-Wolbachia* est particulier car il est le seul où l'on retrouve une telle diversité de souches de *Wolbachia*, avec certaines capables d'induire de l'IC qui n'est pas sauvée par d'autres. Dans la majorité des autres cas soit l'espèce cible est naturellement non infectée par *Wolbachia*, soit infectée par une ou plusieurs souches n'induisant pas ou trop peu d'IC pour l'application de la TII. Dans ces systèmes, l'introduction de souches de *Wolbachia* exogènes (connues pour induire de l'IC) dans l'espèce cible est nécessaire. Cette introduction s'effectue via des microinjections de cytoplasme d'un embryon infecté à un autre (Hughes & Rasgon 2014), ou par l'introgression du génotype de l'espèce cible dans une espèce proche et naturellement infectée par une souche inductrice d'IC (croisements sur plusieurs générations entre des mâles de l'espèce cible et des femelles infectées par la souche inductrice d'IC). Cela a été expérimenté chez le moustique *Aedes polynesiensis*, naturellement infecté par une souche de *Wolbachia* n'induisant pas d'IC, dans lequel le génome nucléaire a été introduit par introgression avec *Aedes riversi*, espèce infectée par une souche de *Wolbachia* exprimant de l'IC (Brelsfoard *et al.* 2008). Suite à l'obtention de cette nouvelle lignée, des croisements ont montré que de l'IC bidirectionnelle avec des taux proches de 100% était exprimée et que les mâles stérilisants avaient une compétitivité sexuelle similaire à celle des mâles sauvages en conditions de laboratoire (Brelsfoard *et al.* 2008) et semi-naturelle (Chambers *et al.* 2011). Des essais pilotes ont été menés dans des îles de Polynésie française avec des lâchers de 3 800 mâles par semaine pendant 30 semaines, représentant un total d'environ 37% de la population de mâles résidents durant les phases de lâchers. Les densités de populations ont été suivies sur trois sites, deux sites contrôles (sans lâcher) et un site expérimental (avec lâchers), et une diminution significative de la taille des populations a été observée sur le site expérimental (O'Connor *et al.* 2012).

D'autres expériences ont été menées dans le genre *Aedes*, chez le moustique *Aedes albopictus*, vecteur de la Dengue et du chikungunya, et naturellement infecté par deux



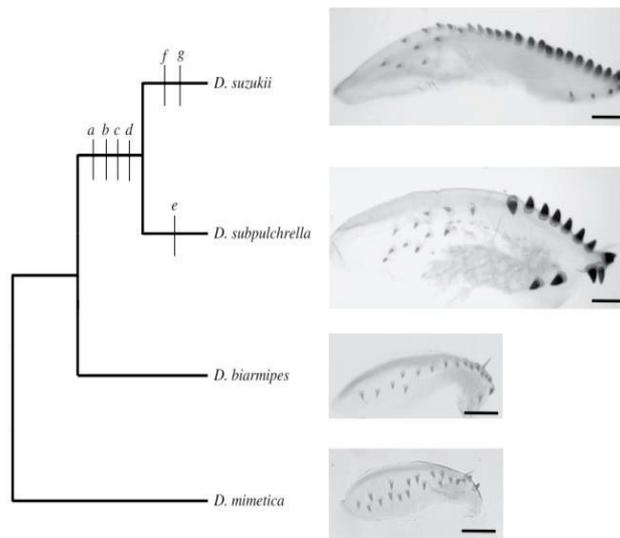
souches de *Wolbachia*. Cette fois des microinjections ont été réalisées dans le but d'introduire la souche *wPip* (provenant de *Culex pipiens molestus*) dans une lignée de ce moustique non infectée (traitée aux antibiotiques) (Calvitti *et al.* 2010). Des taux d'éclosions compris entre 0 et 1% ont été observés lors des croisements entre les mâles infectés par *wPip* et les femelles bi-infectées par leurs souches naturelles (Calvitti *et al.* 2010; Atyame *et al.* 2016). De plus, une IC bidirectionnelle partielle a été observée, à savoir que lors de croisements entre les femelles AR*wP* et les mâles bi-infectés, seulement 20% de la descendance était viable (Calvitti *et al.* 2012). La probabilité de remplacement des populations en cas de lâchers accidentels de femelles était donc ici très faible. L'ensemble de ces résultats font de la TII une approche prometteuse pour lutter contre *A. albopictus* en Europe. Cependant, à l'heure actuelle aucun projet en conditions naturelles n'a été lancé.

Bien que les moustiques soient les acteurs privilégiés du développement de l'utilisation de mâles stériles, la TII a également été envisagée pour lutter contre des espèces ravageurs de cultures. Boller *et al.* (1976) ont initié des travaux sur la mouche de la cerise, *Rhagoletis cerasi*. Plusieurs populations ont été échantillonnées en Europe, et différentes combinaisons de croisements ont montré qu'il existe des relations de compatibilités différentes selon l'origine géographique des individus, à savoir que les mâles des populations du sud de l'Europe sont capables de stériliser les femelles des populations localisées plus au nord. Cette approche fait totalement écho aux travaux menés par Laven (1967) chez le moustique *Culex fatigans*. Alors que la bactérie *Wolbachia* venait tout juste d'être reconnue comme responsable de l'expression de l'IC en 1971, plusieurs hypothèses avaient été proposées par Boller *et al.* (1976) pour expliquer ces patrons d'incompatibilités : (1) incompatibilité génétique, (2) incompatibilité cytoplasmique, (3) incompatibilité induite par des microorganismes. Quelques années plus tard, avec l'avènement de la biologie moléculaire, l'association *R. cerasi-Wolbachia* a été plus précisément décrite. En accord avec les observations de Boller *et al.* (1976), Riegler & Stauffer (2002) ont montré que les populations de *R. cerasi* localisées plus au nord étaient mono-infectées par *wCer1* et que les populations localisées plus au sud étaient bi-infectées par *wCer1* et *wCer2*. La présence de *wCer2* chez les mâles serait donc la cause de l'incompatibilité observée dans les populations européennes dans les années 1970 (Boller *et al.* 1976; Riegler & Stauffer 2002). Au vu des taux d'IC induits par *wCer2*, il a été suggéré que cette souche pouvait être intéressante dans le cadre de la TII, notamment pour lutter contre la mouche méditerranéenne des fruits, *Ceratitis capitata*, naturellement non infectée par *Wolbachia*.

A



B



**Fig 5.** A: Photographies d'adultes de *D. suzukii*. Le mâle à ailes tachetées à gauche et la femelle à droite (Crédit photo: Thibault Andrieux). B: Morphologie des ovipositeurs des espèces proches de *D. suzukii* (échelle: 50 $\mu$ m) (Atallah *et al.* 2014).

Les souches *wCer2* et *wCer4* (décrite par Zabalou *et al.* 2004) infectant naturellement *R. cerasi* ont été transférées chez *Ceratitis capitata*. Les croisements entre les mâles infectés par *wCer2* ou *wCer4* et les femelles non infectées ont abouti à 100% de mortalité embryonnaire (Zabalou *et al.* 2004). Des expériences en cages à populations ont ensuite montré que ces mâles pouvaient induire une suppression de la population à partir d'un ratio 1:50 (mâles non infectés : mâles infectés par *wCer2*) (Zabalou *et al.* 2004). Le même processus expérimental a été mené chez *Bactrocera oleae*, un ravageur majeur de l'olivier naturellement non infecté par *Wolbachia*, où le transfert de *wCer2* a également abouti à des taux d'IC très élevés (Apostolaki *et al.* 2011).

La TII a également été explorée chez la pyrale de l'amande, *Cadra cautella*. Des expérimentations en laboratoire (Brower 1979) et en conditions semi-naturelles dans des cages de 12m<sup>2</sup> (Brower 1980) ont montré que cette technique pouvait être efficace pour lutter contre ce ravageur.

La TII a été initiée sur plusieurs modèles d'intérêts, à impact sanitaire ou économique, et a majoritairement donné des résultats prometteurs. Cependant, la plupart des projets n'ont jamais dépassé le stade « laboratoire » et, à l'heure actuelle, cette technique n'est pas utilisée en milieu naturel. Au cours de cette thèse nous avons cherché à savoir si la TII pouvait être utilisée pour lutter contre *Drosophila suzukii*, une espèce invasive et ravageur de cultures. La partie suivante va s'attacher à la description de cette espèce et faire le point sur les méthodes de lutte envisagées et utilisées à l'heure actuelle pour limiter les dégâts qu'elle induit.

## **I.5. *Drosophila suzukii*, la mouche à ailes tachetées**

### I.5.1. Biologie et Ecologie de l'espèce

#### Taxonomie et morphologie

*Drosophila suzukii* (Diptera, Drosophilidae) est une drosophile de 2 à 3 mm de long aux yeux rouges, au corps marron jaune avec de légères stries noires sur l'abdomen (Fig 5A). Au niveau phylogénétique *D. suzukii* fait partie du groupe melanogaster et du sous-groupe suzukii. Des erreurs d'identification peuvent être commises en Asie car certaines espèces proches comme *D. subpulchrella* et *D. biarmipes* présentent des caractéristiques similaires (Fig 5B).



Un dimorphisme sexuel très marqué est présent chez *D. suzukii*: le mâle possède une tâche noire à l'extrémité de chacune de ses ailes et la femelle à un ovipositeur sclérotinisé (Walsh *et al.* 2011) (Fig 5B).

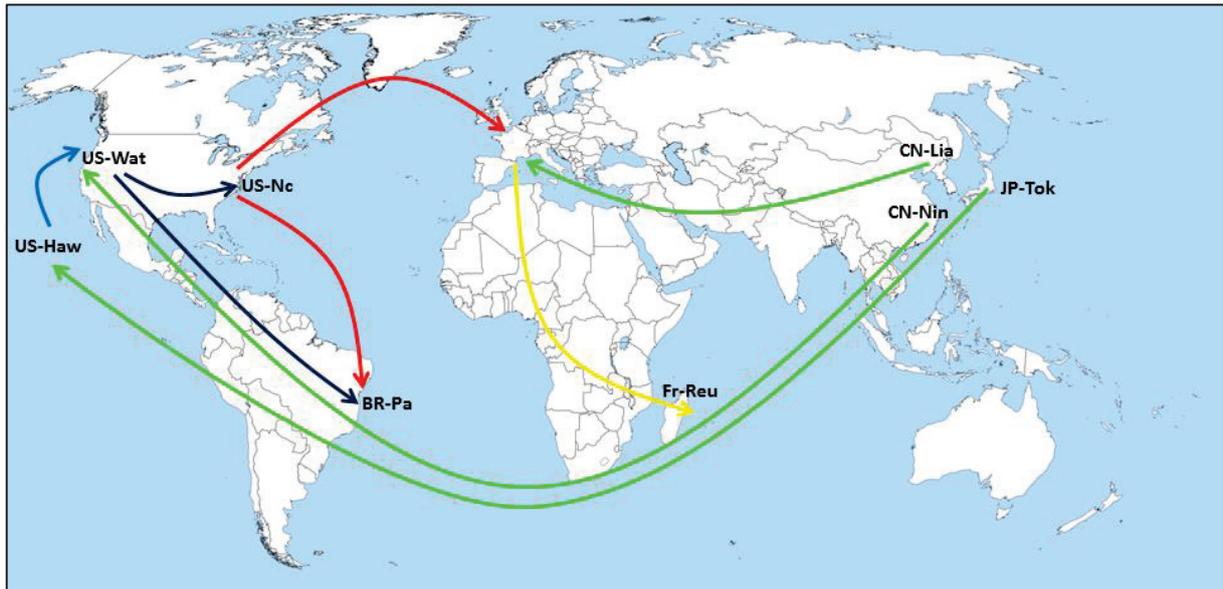
### Cycle de développement

Le cycle de vie de *D. suzukii* comprend 4 stades principaux : œuf, larve (L1 à L3), puppe et adulte. A 22°C le cycle entier chez la femelle dure environ 14 jours, et peut aller de 79 jours à 10°C à 12 jours à 30°C (Tochen *et al.* 2014). 10 et 30°C représentent l'intervalle de températures pour lequel des cycles entiers peuvent être encore réalisés (Dalton *et al.* 2011; Tochen *et al.* 2014) même si les mortalités sont conséquentes pour ces extrêmes, seulement 10% à 10°C et 2% à 30°C des individus survivent du stade œuf à adulte (Tochen *et al.* 2014). De plus, une fécondité nulle des femelles a été observée pour ces températures extrêmes. Les différentes études sur la fécondité réalisées en laboratoire à 21°C montrent des résultats contrastés, entre 1 et 3 œufs pondus par jour (Mitsui *et al.* 2006), 5 (Asplen *et al.* 2015) ou 20 (Tochen *et al.* 2014). Il semble difficile d'avoir une idée précise de la fécondité tant le milieu de ponte et le stade de maturité du fruit peuvent avoir une influence importante (Mitsui *et al.* 2006).

Bien que la fécondité de *D. suzukii* soit plus faible que celle d'autres espèces proches comme *D. melanogaster* par exemple (jusqu'à 60 œufs pondus par femelle par jour à 25°C) (David & Croissant 1956), les femelles sont capables de pondre de 10 à 59 jours, environ 400 œufs peuvent ainsi être pondus au cours d'une vie. Le temps de génération étant assez court (de 8 à 15 jours), on estime qu'il pourrait y avoir entre 7 et 15 générations dans l'année, ce qui peut conduire, avec des conditions climatiques favorables, à une explosion de la taille des populations (Mitsui *et al.* 2006; Walsh *et al.* 2011).

### I.5.2. Historique de son invasion

*D. suzukii* est originaire de l'Asie du sud-est où elle a été identifiée dans de nombreux pays entre les années 1930 et 2000, notamment dans la partie est de la Chine, à Taiwan, en Corée du Nord et du Sud, au Pakistan, à Myanmar, en Thaïlande, à l'est de la Russie et en Inde (Cini *et al.* 2012). *D. suzukii* a ensuite été détectée à Hawaï en 1980 puis en Europe et aux Etats-Unis en 2008 (Calabria *et al.* 2012; Cini *et al.* 2012).

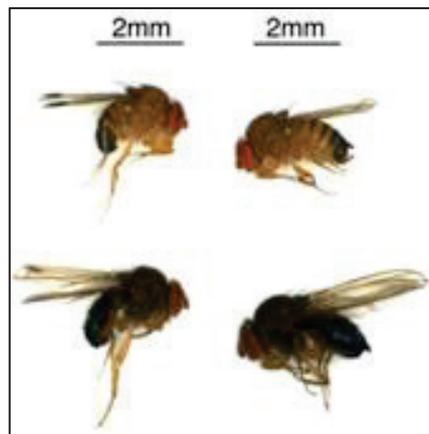


**Fig 6.** Scénarios possibles des routes d'invasions mondiales de *D. sukii* à partir de données de microsatellites et des dates de premières observations. Les données moléculaires incluent un total de 684 individus collectés dans 23 sites géographiques différents et génotypés sur 25 marqueurs microsatellites. Pour chaque site, les dates de premières observations sont indiquées en italique. Les codes couleurs correspondent aux différents groupes génétiques identifiés après « clustering » (carte adaptée de Fraimout et al. en révision).

En Europe, elle aurait été observée pour la première fois en Espagne et en Italie en 2008, puis dans le sud de la France en 2009. Elle a ensuite été détectée dans de nombreux pays européens en 2011 (Slovénie, Croatie, Suisse, Autriche) et en 2012 (Allemagne, Belgique, Pays-Bas, Royaume-Unis, Hongrie) (Cini, Ioriatti & Anfora 2012; Asplen *et al.* 2015). Aux Etats-Unis, elle a été identifiée pour la première fois en 2008 en Californie, puis en 2009 en Oregon, du sud de la Californie jusqu'en Colombie britannique ainsi qu'au Canada (Asplen *et al.* 2015). Elle est désormais présente sur l'ensemble du continent Nord-Américain. *D. suzukii* a également été retrouvée en Amérique du sud, au Brésil en 2013 (Deprá *et al.* 2014) et plus récemment sur l'île de La Réunion par la Fédération Départementale des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles (FDGDON).

L'invasion rapide et à grande échelle de *D. suzukii* a probablement eu lieu par le transport de marchandises contaminées. Les œufs et les jeunes larves sont généralement indétectables facilitant son transport par l'Homme. Suite à l'invasion de *D. suzukii* en Europe, les volumes d'importation de fruits ont été corrélés aux points probables d'introduction et il semblerait que le pays méditerranéen le plus à risque soit la France (Cini *et al.* 2014).

Des marqueurs microsatellites ont été développés (Fraimout *et al.* 2015) pour permettre de réaliser des études de génétique des populations et déterminer les routes d'invasions de cette espèce à l'échelle mondiale (Fraimout *et al.* en révision). Au total 23 populations ont été étudiées (6 d'Asie, 1 d'Hawaï, 3 de l'ouest et 4 de l'est des Etats-Unis, 7 d'Europe, 1 du Brésil et 1 de La Réunion). Les résultats indiquent qu'il existe une faible différenciation au sein des populations de l'aire d'origine ainsi qu'au sein des populations européennes contrairement aux populations américaines qui sont davantage différenciées. La comparaison des populations intercontinentales montre que les invasions en Europe et aux Etats-Unis sont survenues de manière indépendante et que ces populations ont une richesse allélique moindre que les populations asiatiques, ce qui suggère un goulot d'étranglement important durant les phases d'invasion. Plusieurs routes d'invasion probables ont ainsi pu être définies. Les populations de l'ouest des Etats-Unis (zone d'introduction suspectée) proviendraient soit de l'est de la Chine, soit d'individus provenant du Japon et préalablement établis à Hawaï (Fig 6). Les populations de l'est seraient des populations qui ont migré de l'ouest. Quant aux populations européennes, deux scénarios sont possibles. En effet, les populations du sud de la France et du nord de l'Italie seraient plus proches génétiquement des populations de l'est de la Chine, alors que deux populations localisées plus au nord (nord de la



**Fig 7.** Variation phénotypique de *D. suzukii* en conditions de laboratoire. Les morphes estivaux (plus clairs) se sont développés à 20°C (16h:8h de photopériode) et les morphes hivernaux (plus sombres) à 10°C (12h:12h de photopériode) (Shearer *et al.* 2016).

France et Allemagne) seraient plus proches génétiquement des populations de l'est des Etats-Unis (Fig 6).

### Dynamique des populations

Les paramètres qui impactent le plus la dynamique des populations de *D. suzukii* sont la température, l'humidité (Shearer *et al.* 2016; Tochen *et al.* 2016) et la disponibilité en ressources (Kimura 2004; Mitsui *et al.* 2006; Lee *et al.* 2015). Selon la localisation des populations étudiées et les années, il peut y avoir un ou deux pics des populations au cours d'une année, un en début de printemps et un au début de l'automne (Harris *et al.* 2014; Asplen *et al.* 2015; Wang *et al.* 2016). En Asie *D. suzukii* est préférentiellement trouvée à des altitudes et des latitudes plus élevées que certaines espèces proches (Ometto *et al.* 2013). Au Japon, des observations de femelles sexuellement immatures durant l'hiver montrent qu'elles sont capables de rentrer en diapause reproductive (Kanzawa 1939; Mitsui *et al.* 2010).

De plus, des piégeages sur le long terme montrent que les adultes peuvent être encore en activité durant l'hiver (Rossi-Stacconi *et al.* 2016; Wang *et al.* 2016). D'autres hypothèses ont également été avancées concernant le passage de l'hiver de *D. suzukii*: les populations américaines et européennes seraient capables de résister aux conditions hivernales en exploitant des milieux anthropiques (Kimura 2004; Dalton *et al.* 2011; Jakobs *et al.* 2015) ou encore en développant des morphes hivernaux (Fig 7) (Asplen *et al.* 2015; Shearer *et al.* 2016).

Les morphes hivernaux ont une meilleure survie à des températures plus faibles que les morphes estivaux (Stephens *et al.* 2015). Des piégeages en Oregon ont montré que la taille des ailes et le degré de mélanisation étaient des traits variables d'une saison à l'autre avec une augmentation de la taille des ailes à l'approche de l'hiver, résultats confirmés en conditions de laboratoire (Shearer *et al.* 2016).

### Polyphagie et ravages sur cultures

Contrairement à la majorité des autres espèces de drosophiles qui pondent leurs œufs sur des substrats en décomposition, *D. suzukii* est capable de pondre ses œufs dans des fruits sains avant la récolte à l'aide de son ovipositeur sclérotinisé (Fig 5B) (Atallah *et al.* 2014).



Des échantillonnages de baies provenant d'une forêt du nord de la France ont montré que *D. suzukii* était capable de se développer sur 33 espèces de plantes différentes (Poyet *et al.* 2015). Au Japon, elle pond préférentiellement ses œufs sur cerise, pêche, prune, kaki, fraise et raisin mais elle peut aussi être opportuniste et se développer sur d'autres types de fruits (Kanzawa 1939). En Europe et aux Etats-Unis *D. suzukii* est un problème majeur surtout pour les cultures de fruits rouges où les dégâts les plus importants ont été répertoriés dans les exploitations de framboise, fraise, cerise, mûre et myrtille (Lee *et al.* 2011). *D. suzukii* peut aussi engendrer des dégâts sur prune, pêche, abricot, kiwaï et figue. Elle peut également accomplir un cycle de développement complet sur raisin même si ce fruit ne fait pas parti de ses hôtes préférentiels (Bellamy *et al.* 2013; Ioriatti *et al.* 2015). En plus des dégâts directs causés par la ponte dans des fruits sains, elle peut être également vectrice de bactéries du genre *Acetobacter*, responsable de la pourriture acide dans les vignes (Ioriatti *et al.* 2015).

Les pertes économiques dues à la présence de *D. suzukii* en Californie, en Oregon et dans l'état de Washington ont été estimées en 2008 à 33.4 millions de dollars sur fraise, 56.7 sur myrtille, 156.6 sur framboisier et 174.8 sur cerise (Bolda *et al.* 2010). Ces coûts sont potentiellement sous-estimés car la baisse de production peut engendrer une augmentation des prix de vente (Goodhue *et al.* 2011). Dans les Alpes-Maritimes il y aurait eu 80% de pertes en 2010 en culture de fraise et 30 à 40% de pertes en Italie sur les principales cultures de fruits rouges. En 2013, il y aurait eu 35% de pertes dans la production de cerise liées à la présence de *D. suzukii*. En 2016, la perte en cerise liée à la présence de *D. suzukii* dans les Coteaux-du-lyonnais est estimée à 1 million d'euros sur un chiffre d'affaire total de 8 millions d'euros. Cette drosophile est placée sur la liste rouge de l'organisation européenne et méditerranéenne de protection des plantes depuis 2011 et de nombreux travaux de recherche ont été menés pour proposer des réponses aux professionnels du secteur des fruits rouges.

### Méthodes de luttés

#### *Utilisation de produits phytosanitaires*

Au Japon les populations de *D. suzukii* sont d'abord contrôlées par l'utilisation de pesticides (Lee *et al.* 2011). Aux Etats-Unis la première réponse face à l'invasion a été de mettre en place des systèmes de piégeage mais également de recourir aux produits phytosanitaires (Lee *et al.* 2011).



Plusieurs études ont testé l'efficacité de différentes familles d'insecticides via des bio-essais en conditions de laboratoire sur des lignées américaines. La pulvérisation de pyréthriinoïdes, d'organophosphorés et de spinosad chez l'adulte induit une mortalité de 100% 24h après application (Beers *et al.* 2011; Bruck *et al.* 2011; Van Timmeren & Isaacs 2013). Les résidus de pesticides sur les fruits ont également un effet significatif sur la survie des adultes 5 à 14 jours après l'application (Bruck *et al.* 2011). Ces études s'accordent à dire que les néonicotinoïdes ne donnent pas de résultats satisfaisants. *D. suzukii* pond ses œufs sur des fruits matures, donc peu de temps avant la récolte. Cependant, aucun traitement ne doit être appliqué sur les fruits 7 jours avant la récolte, ce qui peut limiter la protection des cultures par le biais de la lutte chimique contre *D. suzukii*.

### *Les parasitoïdes*

Les parasitoïdes sont des auxiliaires de lutte classiquement utilisés en lutte biologique. En population naturelle, la proportion de larves et de pupes de drosophiles infestées par des parasitoïdes démontre l'importance de ce type d'organismes dans la régulation des populations de drosophiles (Fleury *et al.* 2004). Plusieurs études ont été menées chez *D. suzukii* pour tester l'efficacité de différentes espèces de parasitoïdes présentes dans les aires nouvellement colonisées, mais les taux de succès parasitaire sont nettement inférieurs à ceux observés lors d'infestations par des parasitoïdes présents dans l'aire d'origine (Kacsoh & Schlenke 2012; Rossi Stacconi *et al.* 2015; Daane *et al.* 2016). En effet, les parasitoïdes larvaires présents en Europe, tels que *Leptopilina boulardi*, *L. heterotoma* et *Asobara tabida* ont montré une faible capacité à se développer sur *D. suzukii*. Les infestations par ces parasitoïdes induisent une forte réponse immunitaire et un taux d'encapsulation des œufs élevé chez *D. suzukii* (Chabert *et al.* 2012; Kacsoh & Schlenke 2012; Poyet *et al.* 2013). Les parasitoïdes de pupes locaux ont montré de meilleurs résultats. Par exemple, l'utilisation de *Trichopria cf drosophilae* a donné des taux de succès compris entre 40 et 85% en conditions de laboratoire (Chabert *et al.* 2012). Le parasitoïde *Pachycrepoideus vindemmiae* est également capable de se développer sur *D. suzukii*, avec des taux de succès parasitaire d'environ 60% (Chabert *et al.* 2012; Rossi Stacconi *et al.* 2013). Des échantillonnages en Italie et en Oregon ont mis en évidence que ce parasitoïde était capable d'infester des pupes de *D. suzukii* même si la présence de cette espèce ne semble pas suffisante pour réguler les populations (Rossi Stacconi *et al.* 2013; Miller *et al.* 2015).



Cependant, des projets sont en cours pour tester l'utilisation d'augmentarium, structure à maillage particulier, dont l'objectif est de produire massivement des parasitoïdes en extérieur pour augmenter les densités de populations de parasitoïdes.

En Asie, plusieurs espèces de parasitoïdes larvaires généralistes qui se développent sur *D. suzukii* ont été identifiées tels que *Asobara Japonica*, *A. tabida*, *Ganaspis xanthopoda*, *Leptopilina japonica* (Ideo *et al.* 2008; Mitsui *et al.* 2010; Novković *et al.* 2011; Kasuya *et al.* 2013; Nomano *et al.* 2014). *A. japonica*, par exemple, a un taux de succès parasitaire de 79% en laboratoire (Kacsoh & Schlenke 2012). Des échantillonnages de fruits infestés dans la nature ont permis d'identifier récemment de nouvelles espèces de parasitoïdes spécialistes de *D. suzukii* appartenant au genre *Asobara* et une lignée particulière de *G. xanthopoda* (Kasuya *et al.* 2013; Nomano *et al.* 2014). Des expériences en conditions de laboratoire ont montré que cette dernière avait un taux de succès parasitaire d'environ 30% sur des larves se nourrissant sur cerise et de 0% sur des larves placées sur un milieu artificiel (Kasuya *et al.* 2013).

La description récente de ces parasitoïdes spécialistes en Asie ouvre des pistes intéressantes dans l'optique d'utilisation de ces ennemis naturels. La lutte biologique par l'utilisation de ces parasitoïdes, si elle doit être mise en place en Europe et en Amérique du

Nord, nécessitera donc l'introduction d'une espèce exotique dans l'environnement. Dans ce cas, l'espèce introduite devra se développer spécifiquement sur *D. suzukii* pour ne pas impacter les populations locales de drosophiles telles que *D. melanogaster* et *D. simulans*.

### *Les prédateurs*

Woltz *et al.* (2015) ont évalué l'efficacité de la punaise *Orius insidiosus* et du Coléoptère *Dalotia coriaria*. Ces organismes sont utilisés en lutte biologique en cultures maraîchères pour leur capacité à se nourrir de tous les stades de thrips et d'autres insectes dont l'aleurode et le puceron mais ne sont pas des prédateurs naturels de drosophiles. Pour ces deux agents de lutte biologique, aucun effet significatif sur la survie larvaire et adulte de *D. suzukii* n'a été observé. Des essais menés sur le champignon entomo-pathogène *Beauveria bassiana*, utilisé depuis de nombreuses années en lutte biologique contre des organismes très variés, n'ont donné aucun résultat probant, tout comme les espèces de nématodes appartenant au genre *Steinernema*, parasites obligatoires d'insectes (Gargani *et al.* 2013; Cuthbertson *et al.* 2014; Woltz *et al.* 2015).



### *Piégeages massifs*

De nombreux produits en mélange ont été développés pour réaliser du piégeage massif: mélanges de liquides fermentés (vin, vinaigre, jus de fruits) et attractifs volatils avec diffuseurs. Cependant il n'y a pour l'instant aucune preuve que le piégeage massif soit efficace pour lutter contre *D. suzukii* puisqu'aucune réduction significative des dégâts sur les cultures n'a été observée en présence des pièges.

Mise à part l'utilisation de produits phytosanitaires, les différentes techniques de lutte semblent compliquées à mettre en place et n'ont pas donné de résultats convaincants à l'heure actuelle. Sans recourir aux pesticides, l'utilisation de filets « insect-proof » semble être la solution la plus efficace. Cependant, sa mise en place est coûteuse, contraignante et non applicable à toutes les cultures. L'ensemble des approches de lutte respectueuses de l'environnement méritent donc d'être optimisé sur cette espèce.



## I.6. Problématique & objectifs de la thèse

L'objectif principal de cette thèse a été de proposer un nouvel outil pour contrôler les populations de *D. sukuzii* et, plus précisément, de déterminer si la Technique de l'Insecte Incompatible était une approche envisageable. Puisqu'aucun travail n'avait encore été mené sur l'association *D. sukuzii*-*Wolbachia*, plusieurs étapes ont été planifiées afin de mener à bien ce projet de recherche.

Dans un premier temps, il était nécessaire d'avoir une vision globale de l'association entre *D. sukuzii* et *Wolbachia*. Pour cela, une étude descriptive à l'échelle européenne a été réalisée pour déterminer la prévalence de *Wolbachia* et sa diversité génétique. Parallèlement, la capacité de cette souche à manipuler la reproduction de son hôte a été analysée (Chapitre 1).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes interrogés sur les types d'interactions entre *wSuz* et *D. sukuzii* qui peuvent expliquer son maintien dans les populations naturelles (Chapitre 2).

Dans un troisième temps, la volonté a été d'analyser les patrons d'incompatibilité entre la souche naturellement présente chez *D. sukuzii* et d'autres souches de *Wolbachia* connues pour induire de l'incompatibilité cytoplasmique. Cette analyse a d'abord été réalisée chez *D. simulans* puis les résultats ont été confirmés chez *D. sukuzii* et ont permis de sélectionner des souches de *Wolbachia* candidates pour l'application de la TII (Chapitre 3).

Plusieurs paramètres sont indispensables pour que la TII soit applicable: (1) un taux de stérilisation très élevé, (2) une transmission maternelle de *Wolbachia* proche de 100% et (3) une compétitivité des mâles stérilisants vis-à-vis des femelles similaire à celle des mâles sauvages. C'est pourquoi dans un quatrième temps les différents traits d'histoires de vie ont été mesurés dans les lignées transinfectées sélectionnées précédemment (Chapitre 4).

Enfin, en discussion générale nous évoquerons les différentes expériences qu'il reste à mener à court et moyen terme pour confirmer l'utilisation de la TII pour lutter contre *D. sukuzii*, puis nous aborderons les principaux verrous techniques à lever pour son application en milieu naturel.



## II. L'interaction *Drosophila suzukii*-*Wolbachia*

### Chapitre 1: Description générale de l'association

#### *D. suzukii*-*Wolbachia*



## Introduction

Au début de cette thèse, en octobre 2013, la littérature concernant l'association *D. sukuzii-Wolbachia* rapportait uniquement la détection de *Wolbachia* dans une population Japonaise de *D. sukuzii* (Cordaux *et al.* 2008). Une première analyse de son génome a montré que la souche étudiée, appelée *wSuz*, était proche de la souche *wRi* (souche présente naturellement chez *D. simulans*) (*wRi* et *wSuz* présentent 98% de similarité) (Siozios *et al.* 2013). Aucune donnée concernant sa prévalence dans les aires d'introduction (Europe ou Etats-Unis), sa diversité génétique, ou encore le phénotype associé à son infection n'était disponible. Or, pour le développement de la TII, ces données sont nécessaires et la description de l'association naturelle entre *Wolbachia* et l'espèce cible était une étape indispensable car elle détermine les types d'expériences qui doivent être menées pour évaluer sa faisabilité.

Plusieurs scénarios sont envisageables: (1) dans le cas où la souche de *Wolbachia* présente dans l'espèce cible induit de l'IC à un taux élevé, elle peut être exploitable seulement si cette souche n'est pas fixée dans les populations, et que les individus présents dans la population cible ne sont pas infectés, ou s'il existe une diversité génétique de la *Wolbachia* présente naturellement (comme chez le moustique *Culex pipiens* par exemple). Dans ce cas, une homogénéisation du génome nucléaire via des introgressions pourra permettre de tester s'il existe de l'IC entre les différentes souches présentes chez l'hôte ciblé et validé l'utilisation d'une association naturelle pour la mise en place de la TII. (2) Dans le cas où la (les) souche(s) de *Wolbachia* naturellement présentes chez *D. sukuzii* n'induisent pas ou trop peu d'IC, elles seront inexploitables pour la mise en place de la TII. Des *Wolbachia* exogènes devront alors être introduites chez *D. sukuzii*. Le transfert et le suivi de la transmission maternelle des *Wolbachia* nouvellement introduites sont alors des étapes cruciales. Dans le cas où il existe un polymorphisme d'infection de *Wolbachia* en milieu naturel (individus infectés ou non par la souche naturelle), l'expression de l'IC doit alors être confirmée via des croisements avec des femelles infectées et non infectées.

Ainsi les caractéristiques de l'association naturelle déterminent les étapes expérimentales à suivre pour le développement de cette technique. Une étude descriptive de l'association entre *Wolbachia* et *D. sukuzii* à l'échelle européenne a donc été réalisée avec trois questions principales : (i) Quelle est la prévalence de *Wolbachia* dans les populations européennes ? (ii) Existe-t-il différents variants de *Wolbachia* ? (iii) *Wolbachia* induit-elle de l'IC dans son hôte naturel ?



Pour répondre à ces différentes questions, des individus provenant de 23 populations européennes ont été échantillonnés, ce qui correspond à un total de 561 individus pour lesquels nous avons vérifié le statut d'infection afin de déterminer la prévalence de *Wolbachia* dans les populations européennes de *D. sukuzii*. Parallèlement, la diversité génétique de *Wolbachia* a été étudiée par Multi Locus Sequence Typing (MLST). L'expression de l'IC a été mesurée en utilisant des lignées de laboratoires ayant un même fond génétique mais infectées ou non par *Wolbachia*.

L'ensemble des résultats sont décrits dans l'article 1, intitulé « *Wolbachia* in European Populations of the Invasive Pest *Drosophila sukuzii* : Regional Variation in Infection Frequencies » publié dans le journal PLoS One le 25 janvier 2016.

Article 1: “*Wolbachia* in European populations of the invasive pest *Drosophila suzukii*: regional variation in infection frequencies”

RESEARCH ARTICLE

# *Wolbachia* in European Populations of the Invasive Pest *Drosophila suzukii*: Regional Variation in Infection Frequencies

Julien Cattel<sup>1</sup>\*, Rupinder Kaur<sup>2,3</sup>\*, Patricia Gibert<sup>1</sup>, Julien Martinez<sup>4</sup>, Antoine Fraimout<sup>5</sup>, Francis Jiggins<sup>4</sup>, Thibault Andrieux<sup>1</sup>, Stefanos Siozios<sup>2,6</sup>, Gianfranco Anfora<sup>2</sup>, Wolfgang Miller<sup>3</sup>, Omar Rota-Stabelli<sup>2‡</sup>, Laurence Mouton<sup>1‡</sup>

**1** Université de Lyon, Université Lyon1, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France, **2** Chemical Ecology lab, Department of Sustainable Agro-ecosystems and Bio-resources, Fondazione Edmund Mach, San Michele all'Adige (TN), Italy, **3** Laboratory of Genome Dynamics, Department of Cell and Developmental Biology, Center for Anatomy and Cell Biology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria, **4** Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom, **5** Institut de Systématique, Évolution, Biodiversité ISYEB - UMR 7205 – CNRS, MNHN, UPMC, EPHE Muséum national d'Histoire naturelle, Sorbonne Universités 57 rue Cuvier, CP50F-75005, Paris, France, **6** Institute of Integrative Biology, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom



CrossMark  
click for updates

 OPEN ACCESS

**Citation:** Cattel J, Kaur R, Gibert P, Martinez J, Fraimout A, Jiggins F, et al. (2016) *Wolbachia* in European Populations of the Invasive Pest *Drosophila suzukii*: Regional Variation in Infection Frequencies. PLoS ONE 11(1): e0147766. doi:10.1371/journal.pone.0147766

**Editor:** Wolfgang Arthofer, University of Innsbruck, AUSTRIA

**Received:** October 6, 2015

**Accepted:** January 7, 2016

**Published:** January 25, 2016

**Copyright:** © 2016 Cattel et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was funded partly by CNRS (IFR41-UMR5558) and Office National de l'Eau est des Milieux Aquatiques (ONEMA) (Ecophyto project) for France, and FEM Accordo di Programma Provincia Autonoma di Trento and research funds for GrandiProgetti, Project LExEM (Laboratory of excellence for epidemiology and modeling, <http://www.lexem.eu>), Italy. Julien Cattel is the recipient of a PhD studentship from the Rhône-Alpes region ("ARC Program" Grant) and Rupinder Kaur has obtained a

\* These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

\* [juliencattel@gmail.com](mailto:juliencattel@gmail.com) (JC); [rupinderkaur@fmach.it](mailto:rupinderkaur@fmach.it) (RK)

## Abstract

The invasive pest *Drosophila suzukii* is characterized by a specific fresh-fruit targeting behavior and has quickly become a menace for the fruit economy of newly infested North American and European regions. *D. suzukii* carries a strain of the endosymbiotic bacterium *Wolbachia*, named *wSuz*, which has a low infection frequency and no reproductive manipulation capabilities in American populations of *D. suzukii*. To further understand the nature of *wSuz* biology and assess its utility as a tool for controlling this pest's populations, we investigated the prevalence of *Wolbachia* in 23 European *D. suzukii* populations, and compared our results with those available in American populations. Our data showed a highly variable infection frequency with a mean prevalence of 46%, which is significantly higher than the 17% found in American populations. Based on Multilocus Sequence Typing analysis, a single *wSuz* strain was diagnosed in all European populations of *D. suzukii*. In agreement with American data, we found no evidence of cytoplasmic incompatibility induced by *wSuz*. These findings raise two questions: a) why *Wolbachia* is maintained in field populations of *D. suzukii* and b) what are the selective forces responsible for the variation in prevalence within populations, particularly between European and American continents? Our results provide new insights into the *D. suzukii*-*Wolbachia* association and highlight regional variations that await further investigation and that should be taken into account for using *Wolbachia*-based pest management programs.

PhD fellowship from the FIRS>T (FEM International Research School-Trentino) programme at Fondazione Edmund Mach, Italy.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

*Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera: Drosophilidae), first described in Japan in the early 1900s [1], is an invasive pest of Southeast Asian origin. Since its early detection in California (USA), Spain and Italy (Europe) in 2008, *D. suzukii* has rapidly spread through these two continents aided by global trading and absence of niche competitors [2,3,4,5,6]. Although the vast majority of *Drosophila* species are not fruit pests (larvae developing only in damaged or rotten fruits), *D. suzukii* is able to lay eggs on healthy ripening fruits thanks to female's serrated ovipositor [7]. A wide range of soft and stone fruits including raspberry, strawberry, blueberry, plums and grapes come under *D. suzukii*'s damage range [4,8]. Damage is caused by developing larvae inside the fruit, leading to millions of dollars of annual economic losses worldwide [9,10]. Control of *D. suzukii* populations in the field mainly relies on the use of chemical pesticides, a practice with serious drawbacks because of its use close to harvest and the consequent risk of high residues left on fruits. Management agendas are therefore in permanent search for alternative strategies including those based on bio-control [4,11,12,13,14,15].

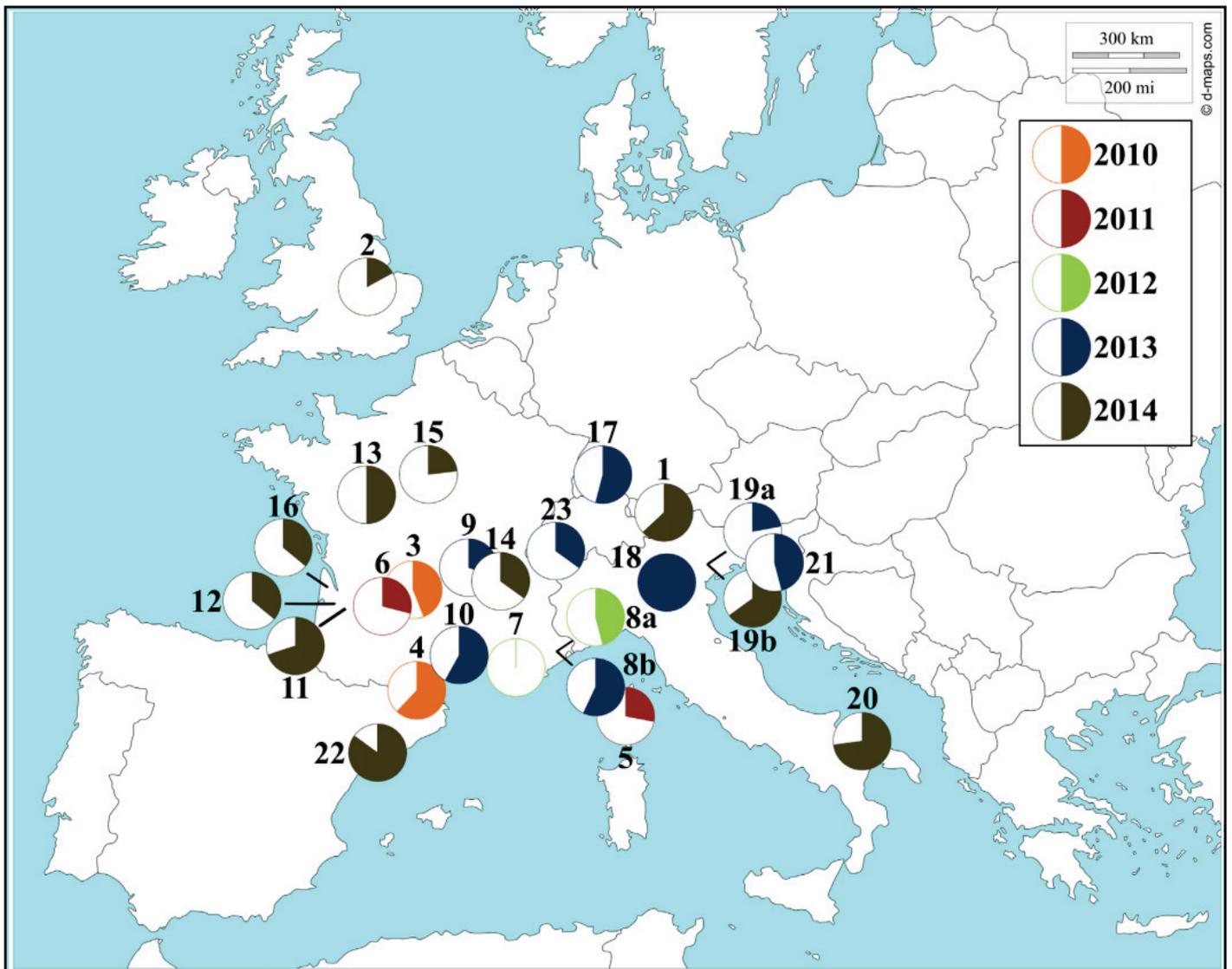
Previous studies revealed the presence of the bacterium *Wolbachia* in *D. suzukii* (strain named *wSuz*) [16,17,18,19,20] but of no other heritable bacterial symbionts [21]. This is not surprising since *Wolbachia* is widespread among terrestrial arthropods with an estimate of 52% of species infected at variable prevalence [22]. *Wolbachia* is a maternally inherited bacterium that has established a wide range of relationships with their hosts, from mutualism to parasitism. It is particularly known for its ability to manipulate host reproduction through different strategies to maximize its spread and maintenance in host populations [23]. The most common strategy is cytoplasmic incompatibility (CI), a sperm-egg incompatibility expressed in crosses between infected males and uninfected females leading to the death of embryos in diploid species, thereby facilitating *Wolbachia* to spread throughout host populations [24,25]. However, in the absence of CI or other means of reproductive manipulation, *Wolbachia* can also provide direct host fitness benefits (e.g. increasing survival time, enhancing reproduction, provisioning nutrition or protection against viruses), which may sometimes allow infected individuals to outcompete uninfected counterparts [26]. For example, in *D. mauritiana*, *Wolbachia* infection leads to a decrease of apoptosis and an increase of mitotic divisions in germ line stem cells of infected female ovaries, resulting in more eggs produced than in uninfected ovaries [27]. Lack of any of the suggested effects on the host can potentially lead to loss of infection from a population [28,29,30]. Overall, the infection dynamics of *Wolbachia* depend on the bacterial strain, host species, genetic background, environmental conditions and interactions among these factors [31]. Recently, a field survey in North America indicated a low prevalence of *Wolbachia* in field populations of *D. suzukii* from four localities sampled over two years (prevalence ranged between 7 to 58%), with a mean infection rate of 17% [19]. This study showed no signs of CI or any other reproductive phenotype induced by *wSuz* in *D. suzukii*. Moreover, the imperfect transmission of *Wolbachia* from wild-caught females to their offspring (20 to 95%) suggested possible direct fitness benefits provided by *wSuz* to its American *D. suzukii* host but the phenotypic nature of these benefits has not yet been determined.

In order to improve our understanding of the global infection dynamics of *wSuz* in natural *D. suzukii* populations and thereby assess the utility of *Wolbachia* as a tool for controlling this insect pest population in the field, we investigated the prevalence of *Wolbachia* in 23 localities among eight European countries, typed *Wolbachia* strains through a Multilocus Sequence Typing approach and performed mating experiments on two different European populations.

## Materials and Methods

### Field sampling

561 individuals were sampled between 2010 and 2014 in 23 locations from eight different countries (Austria, France, Germany, Italy, Slovenia, Spain, Switzerland and United Kingdom) of the European continent (Fig 1 and Table 1). Adults were caught directly in orchards or from attractive traps, placed alive in ethanol (96%) and stored at -20°C until DNA extraction. For *Wolbachia* screening, we gave priority to females because they are known to be responsible for *Wolbachia* transmission.



**Fig 1. *Wolbachia* prevalence and collection sites for *D. sukuzii* individuals.** A number was assigned for each sampling site and details for each locality are given in the Table 1. Reprinted from <http://d-maps.com> under a CC BY license, with permission from Daniel Dalet, original copyright 2007–2016.

doi:10.1371/journal.pone.0147766.g001

**Table 1. Sampling information and percentage of individuals infected by *Wolbachia*.**

	Country	Locality	Collection period	Total No. (M+F)	No. of infected individuals	Infection rate (95% CI)
1	Austria	Neustift am Walde	Oct, 2014	19 (6+13)	12	0.63 (0.38–0.84)
2	United Kingdom	East Malling	Sep, 2014	24 (6+18)	4	0.17 (0.05–0.37)
3	France	Montauban	Aug, 2010	9 (7+2)	4	0.44 (0.14–0.79)
4	France	Finestret	Sep, 2010	13 (10+3)	8	0.62 (0.32–0.86)
5	France	Santa Maria Poggio	Jan, 2011	43 (25+18)	12	0.28 (0.15–0.44)
6	France	Mirabel	Aug, 2011	21 (15+6)	6	0.29 (0.11–0.52)
7	France	Bellegarde	Oct, 2012	17 (0+17)	0	0.00 (0.00–0.20)
8a	France	Mougins	Oct, 2012	13 (0+13)	6	0.46 (0.19–0.75)
8b	France	Mougins	Oct, 2013	28 (0+28)	16	0.57 (0.37–0.76)
9	France	Chaussan	Oct, 2013	10 (0+10)	3	0.30 (0.07–0.65)
10	France	Montpellier	Oct, 2013	19 (0+19)	11	0.58 (0.33–0.80)
11	France	Sauternes	Jan, 2014	30 (0+30)	21	0.70 (0.51–0.85)
12	France	Prignonieux	Jan, 2014	44 (0+44)	16	0.36 (0.22–0.52)
13	France	Concourson sur Layon	Jun, 2014	8 (0+8)	4	0.50 (0.16–0.84)
14	France	Gotheron	Jul, 2014	17 (5+12)	6	0.35 (0.14–0.62)
15	France	Carrière sur Seine	Jan, 2014	35 (15+20)	8	0.23 (0.10–0.40)
16	France	Saint Germain d'Esteuil	Jan, 2014	22 (0+22)	8	0.36 (0.17–0.59)
17	Germany	Dossenheim	Oct, 2013	41 (0+41)	22	0.54 (0.37–0.59)
18	Italy	Vigolo Vattaro	Sep, 2013	16 (0+16)	16	1.00 (0.79–1.00)
19a	Italy	San Michele	Sep, 2013	9 (0+9)	2	0.22 (0.15–0.59)
19b	Italy	San Michele	Sep, 2014	20 (8+12)	13	0.65 (0.41–0.85)
20	Italy	Bari	Feb, 2014	11 (0+11)	8	0.73 (0.39–0.94)
21	Slovenia	Izola	Oct, 2013	35 (0+35)	16	0.46 (0.29–0.63)
22	Spain	Girona	Mar, 2014	37 (3+34)	29	0.85 (0.62–0.90)
23	Switzerland	Gottfrey	Oct, 2013	20 (0+20)	7	0.35 (0.15–0.59)

The sample number corresponds to the code of the sampling indicated in Fig 1. CI: 95% confidence interval.

doi:10.1371/journal.pone.0147766.t001

### DNA extraction and *Wolbachia* detection by Polymerase Chain Reaction (PCR)

DNA from whole individuals was extracted using the Nucleo Spin Tissue kit (Macherey-Nagel). The quality of extraction was checked by PCR targeting the arthropod-specific locus Internal Transcribed Spacer *ITS2* gene (*Its2U/Its2L*) [32]. *Wolbachia* detection was performed using *Wolbachia* specific primers for two different genes: *ftsZ*, a bacterial cell division gene (F2/R2) [33], and *wsp* (*Wolbachia surface protein*) (81F/691R) [34]. PCR reactions were performed in 25 µL volumes containing 100 µM dNTP, 200 nM primers, 20mM Dream Taq Green Buffer, 0.5 IU *Taq* DNA polymerase (Eurobio) and 1µL of DNA template. Cycling conditions were 94°C (2 min), 94°C (30 sec), 55°C (*ITS2* and *ftsZ* primers) or 52°C (*wsp* primers) (30 sec), 72°C (45 sec), 72°C (10 min) for 34 cycles. All the primer sequences were indicated in S1 File. PCR products were visualized in 1% agarose gels. An individual was considered infected when the two *Wolbachia*-specific primers produced fragments of the appropriate size. To reduce the possibility of false negatives, all samples for which we failed to amplify *Wolbachia* signal with normal PCR were verified by a more sensitive real-time quantitative PCR method using the *wsp* primers 81F/691R. The 10µL reaction mixture contained 200 nM of each primer, 5 µL of Light Cycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) and 1 µL of DNA sample. The amplification consisted of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 10 sec at 95°C, 20 sec at 53°C and 30 sec at

72°C. Only for two individuals, *Wolbachia* infection was not detected by classic PCR but detected by real-time quantitative PCR.

## MLST approach

PCRs targeting six genes of *Wolbachia* (*wsp*, *gatB*, *coxA*, *hcpA*, *ftsZ*, *fbpA*) [34,35] were carried out on two randomly selected *wSuz*-infected samples per locality (Fig 1 and Table 1). All PCR reactions were performed as described before. Annealing temperature was 55°C except for *wsp* (52°C) and all the PCR products were sequenced. Sequences were aligned using MUSCLE [36] algorithm implemented in CLC DNA Workbench 6.9.1. (CLC Bio) and inspected by eye. On an average, we sequenced and compared approximately 3200 nucleotides per individual (between 470 and 610 nt per gene). All primers used in this study are presented in S1 File.

## Cytoplasmic Incompatibility (CI) assays

Two different populations of *D. sukuzii* were used for CI experiments, one from France (Compiègne) and another from Italy (Valsugana). The French population was sampled in 2011 and reared in mass population in Lyon on a cornmeal diet (agar: 1%, dextrose: 8.75%, maize: 8.75%, yeast extract: 2%, nipagin: 3%) under constant lab conditions of  $21\pm 1^\circ\text{C}$  temperature with a 12 hours light/dark cycle at 70% relative humidity. The Italian population was established from individuals collected in Valsugana region in 2011, and subsequently reared in laboratory at San Michele all'Adige on standard corn meal diet at a temperature of  $23\pm 1^\circ\text{C}$ , 65% relative humidity with a 12:12 light/dark cycle. Maternal transmission of *Wolbachia* in the laboratory-established lines was perfect and thus the infection was stably maintained in the lab. Before starting the CI experiment, both lines were acclimatized under the same laboratory conditions for three generations in Cambridge Lab at a constant temperature of  $22^\circ\text{C}$  and 65% relative humidity with 12:12 light/dark cycle, thereby avoiding any bias due to lab environments.

To obtain *Wolbachia*-infected and uninfected fly lines with the same genetic background, antibiotic treatments were performed on infected lines using  $0.25\text{mg mL}^{-1}$  tetracycline for three consecutive generations in mass populations. After treatments, flies were fed on normal standard diet for two further generations to recover them from any side effect caused by antibiotic treatment. Due to different lab practices, flies from Italian populations were further allowed to feed on natural fecal material from infected individuals to re-acquire their loss of gut-associated microbiota but flies from France were not gut-flora restored. Ten isofemale lines were established and the presence of *Wolbachia* was checked by PCR in mothers after laying eggs. The absence of *Wolbachia* was re-confirmed by real-time PCR as described above. This was repeated for three generations and then, for each population, one isofemale line was retained for crossing experiments. Their infection status was also checked and confirmed just before the CI assays ( $n = 20$  for each line), which were performed on the 10<sup>th</sup> generation after antibiotic treatments were stopped.

All types of crosses (infected female x infected male, infected female x uninfected male, uninfected female x infected male and uninfected female x uninfected male) were performed for each genetic background at Cambridge. Freshly hatched individuals were sexed and placed separately into cornmeal diet tubes to ensure the virginity of flies. A 3-days old virgin male and a 5-days old virgin female were allowed to mate in food vial for 24h. Females were then individually allowed to oviposit for 48h on grape-juice agar petri dish. Every 48h, females were transferred to a new petri dish, following 48h period for oviposition, and the total number of eggs along with the number of hatched larvae per female were recorded. Experiment was performed in replicates for each type of cross as mentioned in Table 2. The incompatibility relationship

**Table 2. Cytoplasmic incompatibility assays for *D. sukuzii* from France and Italy.**

Origin	Female	Male	N	Number of eggs laid	Mean hatch rate (±sd)
France	UN	UN	21	1113	0.691 (±0.041) b
	UN	IN	13	763	0.404 (±0.087) a
	IN	UN	15	588	0.573 (±0.075) ab
	IN	IN	15	795	0.718 (±0.069) b
Italy	UN	UN	28	1199	0.634 (±0.059) α
	UN	IN	38	2000	0.502 (±0.044) α
	IN	UN	25	1606	0.505 (±0.064) α
	IN	IN	27	1370	0.729 (±0.045) α

doi:10.1371/journal.pone.0147766.t002

was determined by the rate of eggs that hatched. Females that laid less than 10 eggs were not included in the analysis (percentages are indicated in [S2 File](#)).

### Statistical analysis

We tested the difference in *Wolbachia* prevalence between American and European continents by fitting a generalized linear model with a quasi-binomial error (data for North America was taken from [19]). Samples originated from the same population but collected in several years were pooled. We tested for the existence of differences between samplings by using Fisher's exact test. Estimates of the mean prevalence on each continent were transformed from logits into percentages. Statistical analysis of the CI data was done using a generalized linear model (quasi-binomial family). An ANOVA was done on this model and Tukey's (HSD) tests were used for two by two comparisons. R 3.2.2 version [37] was used to perform all the analysis.

### Ethics Statement

Sampling of *D. sukuzii* was carried out on private lands with owners' permission. All individuals were sampled in experimental stations and did not require specific permission. The field studies did not involve endangered or protected species.

## Results

### Variable *w*Suz infection frequencies in *D. sukuzii* populations

We detected *Wolbachia* in 22 populations out of 23 surveyed from eight European countries ([Fig 1](#)). Out of the 561 *D. sukuzii* flies tested, 258 were found infected with *Wolbachia* ([Table 1](#)). We found a highly variable infection prevalence (from 0 to 100%) between localities ( $\chi^2 = 192$ , d.f = 42,  $P < 0.001$ ). The two extreme values (0 and 100) have been observed only in two populations (Bellegarde in France and Vigolo Vattaro in Italy respectively); in all the other localities, prevalence ranged between 15% and 85% with a mean of 46%.

In two European localities, Mougins (in France) and San Michele (in Italy), we sampled for two consecutive years at the same period (October, 2012–13 and September, 2013–14 respectively) and found an increasing trend of the *Wolbachia* prevalence over time for both localities (Mougins: from 0.46 to 0.57; San Michele: from 0.22 to 0.65; [Table 1](#)) though the trend was not significant (Fisher's exact test,  $P = 0.74$  and  $P = 0.05$  respectively).

Hamm [19] screened 929 individuals sampled from four American localities of *D. sukuzii* over two years and found infection frequencies ranging from 7 to 58% with a mean of 17%. Therefore, in both continents, the prevalence of *w*Suz is highly variable. Overall, the European

infection frequencies is found almost three times significantly higher than the ones in North America (GLM:  $t = 4.54$ ,  $d.f = 26$ ,  $P < 0.001$ ).

### European *D. sukuzii* flies carry one single sequence type of *Wolbachia* “wSuz”

MLST analysis, assayed from two individuals per population (Fig 1 and Table 1), indicated that all European *D. sukuzii* individuals carry the same *Wolbachia* sequence type (100% nucleotides identity for all genes). Sequences were identical to those of wSuz previously found and characterized in *D. sukuzii* individuals originated from Italy [18] and North America [19]. The sequences obtained in the present study are recorded in Genbank as KS308222-7.

### Cytoplasmic incompatibility assays

To test whether wSuz is able to induce CI, which could facilitate its spread throughout European *D. sukuzii* populations, we performed mating experiments on flies originating from France and Italy (Table 2). In diploid species, CI leads to the death of embryos when infected males mate with uninfected females; therefore in case of wSuz induced CI expression, we expected a lower egg hatch rate in these crosses. We found a significant effect of the type of cross on the hatching rates only for the French population ( $F = 3.86$ ,  $d.f = 3$ ,  $P = 0.01$ ; for Italian populations:  $F = 2.14$ ,  $d.f = 3$ ,  $P = 0.10$ ). Globally, the hatching rate was higher in crosses that involved individuals of the same infection status (control crosses) than that of different infection status (infected and uninfected). The “incompatible” crosses (infected male x uninfected female) tended to have the lowest hatching rate. For the French population, the difference was significant only when the incompatible cross was compared to the two control crosses: infected male and female (Tukey HSD test,  $P = 0.02$ ) and uninfected male and uninfected female (Tukey HSD test,  $P = 0.01$ ). For the Italian population there is no significant difference between the incompatible cross and the three others. Therefore, like in the American populations, these results do not allow us to conclude that wSuz can induce CI in European *D. sukuzii* populations.

Mean eggs hatch rate (only females that lay at least 10 eggs)  $\pm$  standard deviation (sd). N: number of crosses. IN: infected with *Wolbachia*, UN: uninfected. Statistical analysis was performed on lines from the two origins separately. One-way ANOVA indicated that the hatching rate differed significantly between the mating types. One-way ANOVA was followed by Tukey’s test to compare between crossing types (means marked with the same letter are not significantly different;  $P = 0.05$ ).

### Discussion

We found that the *Wolbachia* infection in *D. sukuzii* is highly variable in European populations with a mean prevalence of 46%. This infection rate differs significantly from the one found in the North America (17% in average) [19]. Several parameters could explain this variability such as the efficiency of vertical transmission or the costs/benefits of infection, which might differ between continents. Moreover, variability can also be due to differences in the host and/or *Wolbachia* genetic backgrounds as indicated in other insect species by trans-infection experiments using a given *Wolbachia* strain injected into different hosts (for example, see [38]). Apart from different host-*Wolbachia* association dynamics, the variability can also be dependent on environmental factors (*i.e.* temperature, diet, larvae density. . .) [39,40,28,41,42] that might vary locally and across time with their colonization dynamics, hence providing higher fitness advantage for *Wolbachia* persistence in European *D. sukuzii* populations than in the American ones. If this is true, we should expect persistence at most/all localities to a certain

infection rate representing the fitness advantage based on that particular locality's environmental and habitat specificity. Although we found a (non-significant) increasing trend for the *Wolbachia* prevalence in two localities, more sampling time points over longer durations are needed to draw a clearer picture.

Infection dynamics of vertically transmitted symbionts depend on the phenotypic effect induced on the host, the fitness cost and/or benefits of the infection, and how reliably symbionts are inherited. Our results clearly showed that *wSuz* is not fixed in *D. sukuzii* populations as otherwise expected in cases of obligatory mutualism. We did not detect any significant evidence for CI induction by *wSuz* in Italian or French *D. sukuzii* population. An imperfect vertical transmission of endosymbiotic bacteria (20 to 95% in American populations) [19] associated with an absence of strong reproductive manipulation would theoretically lead to elimination of the symbiont from host populations unless it provides the other host fitness advantages [29]. The stable presence of *wSuz* in all but one of the populations studied in America and Europe would thus suggest that *wSuz* may provide direct benefits to its host allowing its maintenance in natural populations of *D. sukuzii*. Another possibility would be frequent intraspecific horizontal transfers of *Wolbachia* [43]. However, we favored the first hypothesis because the second one would imply that horizontal transfers occur in all populations from two continents, which seems unlikely. In addition, *Wolbachia* are also known as a mutualist in insects [44] providing beneficial effects to their native hosts, such as an increase of host survival [45] or fecundity under nutritional stress [46], or protection against viral, microbial, and fungal pathogens [47,48,49,50,51,52]. While no fitness benefits have been detected in American populations [19], a recent study suggested a beneficial effect of *Wolbachia* infection on female fecundity in an Italian population of *D. sukuzii* [53]. Since both of the studies used different protocols to perform the assays, different lab practices might impair the significance of this difference. For example, Hamm [19] crossed native *Wolbachia* infected and uninfected flies from the wild: thereby we cannot exclude the confounding effect of different host genetic backgrounds on the fly fecundity. On the other hand, Mazzetto [53] compared infected individuals to uninfected ones that were immediately obtained after antibiotic treatments. Therefore the reduced fecundity of uninfected females can also be explained by side effects of the antibiotics on mitochondria and/or host metabolism [54]. Although with caution, excluding any of these confounding factors suggest that the beneficial effect induced by *wSuz* may depend on the fly genetic background and/or that *D. sukuzii* from Europe and North America are infected by different *Wolbachia* strains. Highly sophisticated approaches, for example, Next Generation Sequencing (NGS) based tools are needed to have more insights into the *Wolbachia* strain diversity in *D. sukuzii* populations. Moreover, future experiments involving exchange or introgression of European and American *Wolbachia* strains to study the life history traits of host organisms in the presence and absence of *Wolbachia* would help to unveil whether differences in *wSuz*-mediated fitness benefits in different continental *D. sukuzii* populations are *Wolbachia* strain-dependent or host dependent.

There is a growing interest in exploring symbiotic microorganisms for biocontrol management programs [55,56,57]; in the case of *Wolbachia*, the idea is to exploit its capability to induce CI to control natural populations of arthropod pests in an Incompatible Insect Technique (IIT) fashion [58,59], where males infected with a CI-inducing strain of *Wolbachia* are released in the field to mate with incompatible females leading to embryo mortality and ultimate population suppression. This procedure is somewhat analogous to the Sterile Insect Technique (SIT), a species-specific method of insect control that relies on the release of large numbers of sterile males instead of incompatible males [60], but the advantage is that insects do not have to be irradiated or genetically modified before release. The inconvenience is, however, that IIT and SIT require solid methods allowing efficient males and females separation,

but *D. sukuzii* males are easily recognizable because of their spotted wings [1]. Considerable research efforts have already demonstrated that *Wolbachia*-inducing CI could be used as a tool for population control [61,62,63]. However, it might be more complicated if *Wolbachia* naturally infects the insect pest like in the case of *D. sukuzii* since it would require finding an incompatible CI-inducing *Wolbachia* strain, which is not rescued by *wSuz* in its original host. Hamm [19] and our results are concordant in showing that *D. sukuzii* is infected by only one strain of *Wolbachia*, which is present in almost all populations screened and does not induce CI. Transinfection experiments using closely related *Wolbachia* strains such as the highly CI-inducing *wRi* strain from *D. simulans* will thus be needed to assess modification and rescue capabilities of different strain combinations towards a bidirectional CI-based control strategy.

## Supporting Information

**S1 File. Primers used in this study.**  
(PDF)

**S2 File. Percentage of excluded females that laid less than 10 eggs in crosses experiment.**  
(PDF)

## Acknowledgments

We thank Fabrice Vavre and Sylvain Charlat for useful discussion and H el ene Henri for help in molecular biology. We thank Adriana Escudero (Spain), Gabrijel Seljak (Slovenia), Marco Valerio Rossi Stacconi (Italy), Darren Obbard (UK), Traude Kehrer (Austria), Heidrum Vogt, Serge Fischer, Lionel Delbac, Nicolas Ris, Christophe Plantamp and the CTIFL from Lanxade and Balandran for providing us *D. sukuzii* from the field. We are also grateful to the INRA centre of Gotheron and to the landowners who allowed us to collect insects in their orchards.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JC RK PG JM FJ SS WM ORS LM. Performed the experiments: JC RK JM TA. Analyzed the data: JC RK JM FJ ORS. Contributed reagents/materials/analysis tools: PG FJ SS WM ORS LM AF GA. Wrote the paper: JC RK PG JM FJ SS WM ORS LM.

## References

1. Kanzawa T. Studies on *Drosophila sukuzii* mats. Rev Appl Entomol. 1936; 24:315.
2. Hauser M. A historic account of the invasion of *Drosophila sukuzii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. Pest Manag Sci. 2011; 67:1352–1357. doi: [10.1002/ps.2265](https://doi.org/10.1002/ps.2265) PMID: [21898759](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21898759/)
3. Calabria G, M aca J, B achli G, Serra L, Pascual M. First records of the potential pest species *Drosophila sukuzii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. J Appl Entomol. 2012; 136(1):139–147.
4. Cini A, Ioriatti C, Anfora G. A review of the invasion of *Drosophila sukuzii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. Bull Insectology. 2012; 65(1):149–160.
5. Rota-Stabelli O, Blaxter M, Anfora G. *Drosophila sukuzii*. Curr Biol. 2013; 23(1):R8–R9. doi: [10.1016/j.cub.2012.11.021](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.11.021) PMID: [23305672](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23305672/)
6. Cini A, Anfora G, Escudero-Colomar LA, Grassi A, Santosuosso U, Seljak G, et al. Tracking the invasion of the alien fruit pest *Drosophila sukuzii* in Europe. J Pest Sci. 2014; 87:559–566.
7. Mitsui H, Takahashi KH, Kimura MT. Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. Popul Ecol. 2006; 48(3):233–237.
8. Dreves A, Walton V, Fisher G. A New Pest Attacking Healthy Ripening Fruit in Oregon. Oregon Univ Serv. 2009; EM 8991:1–6.

9. Goodhue RE, Bolda M, Farnsworth D, Williams JC, Zalom FG. Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs. *Pest Manag Sci.* 2011; 67(11):1396–1402. doi: [10.1002/ps.2259](https://doi.org/10.1002/ps.2259) PMID: [21815244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21815244/)
10. Lee JC, Bruck DJ, Dreves AJ, Ioriatti C, Vogt H, Baufeld P. In focus: spotted wing drosophila, *Drosophila sukuzii*, across perspectives. *Pest Manag Sci.* 2011; 67:1349–1351. doi: [10.1002/ps.2271](https://doi.org/10.1002/ps.2271) PMID: [21990168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21990168/)
11. Chabert S, Allemand R, Poyet M, Eslin P, Gibert P. Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila sukuzii*. *Biol Control.* 2012; 63(1):40–47.
12. Gargani E, Tarchi F, Frosinini R, Mazza G, Simoni S. Notes on *Drosophila sukuzii* Matsumura (Diptera Drosophilidae): field survey in Tuscany and laboratory evaluation of organic products. *Redia.* 2013; 96:85–90.
13. Poyet M, Havard S, Prevost G, Chabrierie O, Doury G, Gibert P, et al. Resistance of *Drosophila sukuzii* to the larval parasitoids *Leptopilina heterotoma* and *Asobara japonica* is related to haemocyte load. *Physiol Entomol.* 2013; 38(1):45–53.
14. Cuthberston AGS, Collins DA, Blackburn LF, Audsley NA, Bell HA. Preliminary screening of potential control products against *Drosophila sukuzii*. *Insects.* 2014; 5:488–498. doi: [10.3390/insects5020488](https://doi.org/10.3390/insects5020488) PMID: [26462696](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26462696/)
15. Woltz JM, Donahue KM, Bruck DJ, Lee JC. Efficacy of commercially available predators, nematodes and fungal entomopathogens for augmentative control of *Drosophila sukuzii*. *J Appl Entomol.* 2015. doi: [10.1111/jen.12200](https://doi.org/10.1111/jen.12200)
16. Cordaux R, Pichon S, Ling A, Pérez P, Delaunay C, Vavre F, et al. Intense transpositional activity of insertion sequences in an ancient obligate endosymbiont. *Mol Biol Evol.* 2008; 25(9):1889–1896. doi: [10.1093/molbev/msn134](https://doi.org/10.1093/molbev/msn134) PMID: [18562339](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18562339/)
17. Ometto L, Cestaro A, Ramasamy S, Grassi A, Revadi S, Siozios S, et al. Linking genomics and ecology to investigate the complex evolution of an invasive *Drosophila* pest. *Genome Biol Evol.* 2013; 5(4):745–757. doi: [10.1093/gbe/evt034](https://doi.org/10.1093/gbe/evt034) PMID: [23501831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23501831/)
18. Siozios S, Cestaro A, Kaur R. Draft genome sequence of the *Wolbachia* endosymbiont of *Drosophila sukuzii*. *Genome Announc.* 2013; 1(1):1–2.
19. Hamm CA, Begun DJ, Vo A, Smith CCR, Saelao P, Shaver AO, et al. *Wolbachia* do not live by reproductive manipulation alone: infection polymorphism in *Drosophila sukuzii* and *D. subpulchrella*. *Mol Ecol.* 2014; 23:4871–4885. doi: [10.1111/mec.12901](https://doi.org/10.1111/mec.12901) PMID: [25156506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25156506/)
20. Tochen S, Dalton DT, Wiman N, Hamm C, Shearer PW, Walton VM. Temperature-Related Development and Population Parameters for *Drosophila sukuzii* (Diptera: Drosophilidae) on Cherry and Blueberry. *Environ Entomol.* 2014; 43(2):501–510. doi: [10.1603/EN13200](https://doi.org/10.1603/EN13200) PMID: [24612968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24612968/)
21. Chandler JA, James PM, Jospin G, Lang JM. The bacterial communities of *Drosophila sukuzii* collected from undamaged cherries. *PeerJ.* 2014; 2:e474. doi: [10.7717/peerj.474](https://doi.org/10.7717/peerj.474) PMID: [25101226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25101226/)
22. Weinert LA, Araujo EV, Ahmed MZ, Welch JJ. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proc R Soc B.* 2015; 282:1807. doi: [10.1098/rspb.2015.0249](https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0249)
23. Werren JH. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol.* 1997; 42(124):587–609.
24. Dobson SL, Marsland EJ, Rattanadechakul W. Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics.* 2002; 160(3):1087–1094. PMID: [11901124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11901124/)
25. Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol.* 2008; 6(10):741–751. doi: [10.1038/nrmicro1969](https://doi.org/10.1038/nrmicro1969) PMID: [18794912](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18794912/)
26. Schneider EL, Miller WJ, Riegler M. Arthropods shopping for *Wolbachia*. *Manipulative Tenants: Bacteria Associated with Arthropods.* CRC Press. 2011; 149–174.
27. Fast EM, Toomey ME, Panaram K, Desjardins D, Kolaczyk ED, Frydman HM. *Wolbachia* enhance *Drosophila* stem cell proliferation and target the germline stem cell niche. *Science.* 2011; 334:990–992. doi: [10.1126/science.1209609](https://doi.org/10.1126/science.1209609) PMID: [22021671](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22021671/)
28. Weeks AR, Turelli M, Harcombe WR, Reynolds KT, Hoffmann AA. From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biol.* 2007; 5(5):0997–1005.
29. Hoffmann AA, Hercus M, Dagher H. Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* 1998; 148(1):221–31. PMID: [9475734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9475734/)
30. Turelli M, Hoffmann AA. Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics.* 1995; 140(4):1319–1338. PMID: [7498773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7498773/)
31. Jaenike J. Coupled population dynamics of endosymbionts within and between hosts. *Oikos.* 2009; 118(3):353–362.
32. Campbell HD, Schimansky T, Claudianos C, Ozsarac N, Kasprzak AB, Cotsell JN, et al. The *Drosophila melanogaster* flightless-I gene involved in gastrulation and muscle degeneration encodes gelsolin-like

- and leucine-rich repeat domains and is conserved in *Caenorhabditis elegans* and humans. *Proc Natl Acad Sci of the U S A*. 1993; 90(23):11386–11390.
33. Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Boulétreau M. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol*. 1999; 16(12):1711–1723. PMID: [10605113](#)
  34. Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O'Neill SL. Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol*. 1998; 180(9):2373–2378. PMID: [9573188](#)
  35. Baldo L, Hotopp JCD, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, et al. Multilocus Sequence Typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72(11):7098–7110. PMID: [16936055](#)
  36. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32(5):1792–1797. PMID: [15034147](#)
  37. R Core Team. R: a language and environment for statistical computing. 2013.
  38. Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ. The *wMel* *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*. 2011; 476:450–453. doi: [10.1038/nature10355](#) PMID: [21866159](#)
  39. Reynolds KT, Hoffmann AA. Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. *Genet Res*. 2002; 80(2):79–87. PMID: [12534211](#)
  40. Mouton L, Henri H, Bouletreau M, Vavre F. Effect of temperature on *Wolbachia* density and impact on cytoplasmic incompatibility. *Parasitology*. 2006; 132(1):49–56.
  41. Yamada R, Floate KD, Riegler M, O'Neill SL. Male development time influences the strength of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 2007; 177(2):801–808. PMID: [17660578](#)
  42. Pontier SM, Schweisguth F. A *Wolbachia*-sensitive communication between male and female pupae controls gamete compatibility in *Drosophila*. *Curr Biol*. 2015; 25(18):2339–2348. doi: [10.1016/j.cub.2015.07.052](#) PMID: [26344089](#)
  43. Morrow JL, Frommer M, Royer JE, Shearman DCA, Riegler M. *Wolbachia* pseudogenes and low prevalence infections in tropical but not temperate Australian tephritid fruit flies: manifestations of lateral gene transfer and endosymbiont spillover? *BMC Evol Biol*. 2015; 15(202).
  44. Zug R, Hammerstein P. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. *Biol Rev*. 2015; 90:89–111. doi: [10.1111/brv.12098](#) PMID: [24618033](#)
  45. Fry AJ, Rand DM. *Wolbachia* interactions that determine *Drosophila melanogaster* survival. *Evolution*. 2002; 56(10):1976–1981. PMID: [12449484](#)
  46. Brownlie JC, Johnson KN. Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends in Microbiol*. 2009; 17(8):348–354.
  47. Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*. 2008; 322(5902):702. doi: [10.1126/science.1162418](#) PMID: [18974344](#)
  48. Teixeira L, Ferreira Á, Ashburner M. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*. 2008; 6(12):2753–2763.
  49. Osborne SE, Leong YS, O'Neill SL, Johnson KN. Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathog*. 2009; 5(11):e1000656. doi: [10.1371/journal.ppat.1000656](#) PMID: [19911047](#)
  50. Glaser RL, Meola MA. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to west Nile virus infection. *PLoS One*. 2010; 5(8):e11977. doi: [10.1371/journal.pone.0011977](#) PMID: [20700535](#)
  51. Ferreira ÁG, Naylor H, Esteves SS, Teixeira L. The Toll-Dorsal pathway is required for resistance to viral oral infection in *Drosophila*. *PLoS Pathog*. 2014; 10(12):e1004507. doi: [10.1371/journal.ppat.1004507](#) PMID: [25473839](#)
  52. Martinez J, Longdon B, Bauer S, Chan Y-S, Miller WJ, Bourtzis K, et al. Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of *Wolbachia* strains. *PLoS Pathog*. 2014; 10(9):e1004369. doi: [10.1371/journal.ppat.1004369](#) PMID: [25233341](#)
  53. Mazzetto F, Gonella E, Alma A. *Wolbachia* infection affects female fecundity in *Drosophila sukuzii*. *Bull Insectology*. 2015; 68(1): 153–157.
  54. Ballard JWO, Melvin RG. Tetracycline treatment influences mitochondrial metabolism and mtDNA density two generations after treatment in *Drosophila*. *Insect Mol Biol*. 2007; 16(6):799–802. PMID: [18093008](#)

55. Douglas AE. Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control. *Trends in Biotechnol.* 2007; 25(8):338–342.
56. Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep.* 2011; 12(6):508–518. doi: [10.1038/embor.2011.84](https://doi.org/10.1038/embor.2011.84) PMID: [21546911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21546911/)
57. Bourtzis K. *Wolbachia*-based technologies for insects pest population control. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 627:104–113. doi: [10.1007/978-0-387-78225-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-0-387-78225-6_9) PMID: [18510018](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18510018/)
58. Boller EF, Russ K, Vallo V, Bush GL. Incompatible races of European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae), their origin and potential use in biological control. *Entomol Exp Appl.* 1976; 20(3):237–247.
59. Riegler M, Stauffer C. *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Mol Ecol.* 2002; 11(11):2425–2434. PMID: [12406252](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12406252/)
60. Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS. *Sterile Insect Technique: principles and practice in area-wide integrated pest management.* Springer. 2005; 978:4020–4051.
61. Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M, Stauffer C, Savakis C, Bourtzis K. *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(42):15042–15045. PMID: [15469918](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15469918/)
62. O'Connor L, Plichart C, Sang AC, Brelsfoard CL, Bossin HC, Dobson SL. Open release of male mosquitoes infected with a *Wolbachia* biopesticide: field performance and infection containment. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(11):e1797. doi: [10.1371/journal.pntd.0001797](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001797) PMID: [23166845](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23166845/)
63. Atyame CM, Cattel J, Lebon C, Flores O, Dehecq J-S, Weill M, et al. *Wolbachia*-based population control strategy targeting *Culex quinquefasciatus* mosquitoes proves efficient under semi-field conditions. *Plos One.* 2015; 10(3):e0119288. doi: [10.1371/journal.pone.0119288](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119288) PMID: [25768841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25768841/)

**Table S1.** Primers used in this study

Gene target	Primer name	Sequence (5'-3')	fragment size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>wsp</i>	81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	610	52
	691R	AAAAATTAACGCTACTCCA		
<i>ftsZ</i>	ftsZ-F2	TTGCAGAGCTTGGACTTGAA	480	55
	ftsZ-R2	CATATCTCCGCCACCAGTAA		
<i>Its2</i>	Its2U	TGTGAACTGCAGGACACATG	500	55
	Its2L	AATGCTTAAATTTAGGGGGTA		
<i>coxA</i>	coxA-F1	TTGGRGCRATYAACTTATAG	486	55
	coxA-R1	CTAAAGACTTTKACRCCAGT		
<i>gatB</i>	gatB-F1	GAKTTAAAYCGYGCAGGBGTT	470	55
	gatB-R1	TGGYAAAYTCRGGYAAAGATGA		
<i>hcpA</i>	hcpA-F1	GAAATARCAGTTGCTGCAAA	514	55
	hcpA-R1	GAAAGTYRAGCAAGYTCTG		
<i>ftsZ</i>	ftsZ-F1	ATYATGGARCATATAAARGATAG	629	55
	ftsZ-R1	TCRAGYAAATGGATTRGATAT		
<i>fbpA</i>	fbpA-F1	GCTGCTCCRCRRGGYWTGAT	508	55
	fbpA-R1	CCRCCAGARAAAAYYACTATTC		

**Table S2.** Percentage of excluded females that laid less than 10 eggs in crosses experiment.

Origin	Female	Male	Total no. of crosses setup N	Number of females laid <10 eggs	Percentage of females excluded from crosses %
<b>France</b>	UN	UN	31	10	32.25
	UN	IN	17	4	23.52
	IN	UN	23	8	34.78
	IN	IN	23	8	34.78
<b>Italy</b>	UN	UN	28	0	0
	UN	IN	41	3	7.31
	IN	UN	33	8	24.24
	IN	IN	33	6	18.18



## Discussion

Dans cet article nous avons mis en évidence que *D. suzukii* est infectée par une seule souche de *Wolbachia*, *wSuz*, qui montre des prévalences très variables dans les populations européennes. En effet, sur les 23 populations étudiées, 21 présentaient des prévalences intermédiaires. Cela signifie que dans la majorité des populations européennes, des individus infectés et non infectés sont présents. De plus nous avons montré que *wSuz* n'induit pas ou très peu d'IC dans son hôte naturel. Des résultats très similaires ont été obtenus par Hamm *et al.* (2014) dans différentes populations nord-américaines de *D. suzukii*, où des prévalences de 7 à 58% ont été trouvées et aucune manipulation de la reproduction n'a été mise en évidence. De plus, les auteurs ont montré une transmission maternelle imparfaite de femelles (de 20 à 95%) piégées dans la nature.

L'ensemble de ces résultats indiquent que cette souche est inexploitable pour le développement de la TII. Il est donc nécessaire de trouver des souches de *Wolbachia* induisant un très fort taux d'IC chez *D. suzukii* et d'étudier la fonction *resc* de *wSuz* dans son hôte naturel, c'est-à-dire sa capacité à sauver l'IC induite par cette souche exogène lorsque *wSuz* est présente chez les femelles de *D. suzukii* (voir chapitre 3).

Malgré son absence de manipulation de la reproduction observée chez *D. suzukii* et sa transmission verticale imparfaite, les suivis temporels montrent que *wSuz* se maintient dans les populations naturelles, que ce soit aux Etats-Unis ou en Europe (Hamm *et al.* 2014; Cattel *et al.* 2016a). Cela suggère que pour se maintenir dans ces populations, *wSuz* doit procurer un avantage sélectif aux femelles qu'elle infecte (survie, fécondité, protection,...) pour contrebalancer cette transmission imparfaite (Hoffmann & Turelli 1997). Des mesures de traits d'histoire de vie réalisées sur des lignées américaines n'ont montré aucun effet positif lié à l'infection par *wSuz* (Hamm *et al.* 2014). Nous avons donc cherché à déterminer si *wSuz* pouvait être un mutualiste facultatif, en testant d'autres phénotypes liés à l'infection, qui pourraient expliquer son maintien en prévalence intermédiaire dans les populations (Chapitre 2).



## **Chapitre 2 : $w$ Suz, un mutualiste facultatif**



## Introduction

L'étude descriptive de l'association entre *D. suzukii* et *Wolbachia* montre que *wSuz* ne manipule pas ou peu la reproduction de son hôte (IC) et présente un polymorphisme d'infection dans l'ensemble des populations américaines et européennes échantillonnées (Hamm *et al.* 2014; Cattel *et al.* 2016a). Plusieurs souches de *Wolbachia* sont connues pour se maintenir à des fréquences importantes dans les populations en manipulant la reproduction de leurs hôtes. Nous avons vu en introduction générale que certaines souches, non inductrices d'IC, peuvent se maintenir en apportant des bénéfices directs à leurs hôtes (fécondité, longévité, protection contre des ennemis naturels). C'est par exemple le cas des souches *wAu* chez *D. simulans* (Hoffmann *et al.* 1996) et *wMel* chez *D. melanogaster* (Hoffmann 1988), connues pour conférer à leur hôte une protection antivirale (Teixeira *et al.* 2008; Martinez *et al.* 2014). Cependant, même si théoriquement ces bénéfices contexte-dépendants pourraient participer au maintien de *Wolbachia* dans les populations naturelles, aucune démonstration n'en a encore fait le lien direct. La protection antivirale a été mise en évidence pour plusieurs souches de *Wolbachia*, notamment les *Wolbachia* appartenant au super-groupe A (Martinez *et al.* 2014), groupe auquel appartient *wSuz* (Siozios *et al.* 2013). L'objectif de cette étude était d'évaluer si *wSuz* pouvait être un symbiote mutualiste facultatif. Pour cela nous avons fait le choix de tester si *wSuz* pouvait conférer un phénotype protecteur contre des virus. Des expériences ont été réalisées dans le but de répondre à deux questions principales : (i) les femelles infectées par *wSuz* ont-elles une meilleure survie que les femelles non infectées suite à des infections virales ? (ii) et si oui, cette protection est-elle liée à une diminution du titre viral ?

Puisque l'effet du génotype hôte est déterminant dans l'expression des phénotypes liés à l'infection par *Wolbachia* (Kondo *et al.* 2005; Mouton *et al.* 2007), notamment pour ce phénotype (Martinez *et al.* 2014), la survie et la répllication virale ont été mesurées sur 2 lignées japonaises et 2 lignées françaises, avec, pour chaque fond génétique, des individus non infectés et infectés par *wSuz*. Ce phénotype protecteur a été testé sur deux virus à ARN connus pour induire de la mortalité dans le genre *Drosophila*: Drosophila C Virus (DCV), virus naturel de Drosophiles et Flock House Virus (FHV), un virus isolé chez un Coléoptère.



L'ensemble des résultats sont décrits dans l'article 2, intitulé « *Wolbachia*-mediated protection against viruses in the invasive pest *Drosophila suzukii* » publié dans le journal *Insect Molecular Biology* le 6 septembre 2016.

Article 2: «*Wolbachia*-mediated protection against viruses in the invasive pest  
*Drosophila suzukii*»

# ***Wolbachia*-mediated protection against viruses in the invasive pest *Drosophila suzukii***

J. Cattel<sup>\*1</sup>, J. Martinez<sup>†1</sup>, F. Jiggins<sup>†</sup>, L. Mouton<sup>\*</sup> and P. Gibert<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Univ Lyon, Université Claude Bernard, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR CNRS 5558, Villeurbanne, France; and

<sup>†</sup>Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge, UK

## **Abstract**

The maternally inherited bacterium *Wolbachia* is well known for spreading in natural populations by manipulating the reproduction of its arthropod hosts, but can also have mutualist effects that increase host fitness. In mosquitoes and *Drosophila* some *Wolbachia* strains can lead to an increase in survival of virus-infected insects, and in most cases this is associated with reduced accumulation of the virus in host tissues. We investigated if the *Wolbachia* strain *wSuz*, which naturally infects *Drosophila suzukii*, is able to confer protection against *Drosophila C* virus and Flock House virus in different host genetic backgrounds. We found that this strain can increase host survival upon infection with these two viruses. In some cases this effect was associated with lower viral titres, suggesting that it confers resistance to the viruses rather than allowing the flies to tolerate infection. Our results indicate that, in *D. suzukii*, the antiviral protection provided by *Wolbachia* is not correlated to its density as found in other *Drosophila* species. This study demonstrates a phenotypic effect induced by *wSuz* on its native host which could explain its maintenance in natural populations of *D. suzukii*.

**Keywords:** *Drosophila suzukii*, *Wolbachia*, viruses, protection.

First published online 4 May 2016.

Correspondence: Julien Cattel, Université de Lyon, Université Lyon1, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, 43 Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France; e-mail: juliencattel@gmail.com and Julien Martinez, Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge, UK; e-mail: jtm35@cam.ac.uk

<sup>1</sup>These authors are co-first authors.

## **Introduction**

*Drosophila suzukii* (Matsumura, 1931) (Diptera: Drosophilidae), the spotted-wing *Drosophila*, is an invasive species native to South-East Asia (Kanzawa, 1936). It was originally described in Japan in 1916 and, within the last decade, it has been observed for the first time in California (Hauser, 2011), in Spain and Italy (Calabria *et al.*, 2012) in 2008, and then quickly spread throughout North America and Europe (Cini *et al.*, 2012) and more recently Brazil (Deprá *et al.*, 2014). In contrast to the vast majority of *Drosophila* species, *D. suzukii* is an agricultural pest because its serrated ovipositor allows it to lay eggs on healthy ripening fruits still attached to the plant (Mitsui *et al.*, 2006). Damage is caused by larvae feeding on the pulp inside the fruits and berries. As a consequence *D. suzukii* can have severe economic impacts, such as in the western USA where it causes losses of up to US\$500 million per year (Goodhue *et al.*, 2011). Because of its remarkable invasive success and impact on agricultural production, *D. suzukii* is currently subject to intense research from both fundamental and applied perspectives.

Until now little was known about the symbiotic community of *D. suzukii*, despite maternally inherited symbionts being common and important components of arthropod biology and ecology (Zchori-Fein & Bourtzis, 2011). Some studies revealed that *D. suzukii* naturally harbours *Wolbachia* (Cordaux *et al.*, 2008; Siozios *et al.*, 2013; Hamm *et al.*, 2014; Cattel *et al.*, 2016), which is the most common endosymbiont in arthropods with an estimation of 52% of arthropod species infected (Weinert *et al.*, 2015). Only one strain of *Wolbachia* has been identified in field populations of *D. suzukii* based on Multilocus Sequence Typing (MLST) markers, at least in North America and in Europe, which is closely related to *wRi* (Siozios *et al.*, 2013; Hamm *et al.*, 2014; Cattel *et al.*, 2016). In many associations, the spread of *Wolbachia* in the host populations is achieved through their capacity to manipulate host reproduction either by biasing the host's sex ratio towards the production of

females or, more commonly, by impeding the reproduction of uninfected females through a sterility phenomenon called cytoplasmic incompatibility (CI) (Werren *et al.*, 2008). Theory predicts that the spread of CI-inducing *Wolbachia* in a population is under positive frequency-dependence and that their maintenance depends on their transmission efficiency and on the intensity of CI (Turelli & Hoffmann, 1995). *Wolbachia* can also successfully invade host populations by bringing direct fitness benefits to infected individuals such as increasing fecundity (Dobson *et al.*, 2002, 2004; Fry *et al.*, 2004; Weeks *et al.*, 2007; Unckless & Jaenike, 2012), longevity (Gavotte *et al.*, 2010; Brelsfoard & Dobson, 2011; Alexandrov *et al.*, 2007; Toivonen *et al.*, 2007) or provisioning nutrients (Brownlie & Johnson, 2009; Hosokawa *et al.*, 2010; Unckless & Jaenike, 2012). In addition, *Wolbachia* can protect its host against viruses (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Glaser & Meola, 2010; Blagrove *et al.*, 2012). Such benefits could explain the presence in natural populations of *Wolbachia* strains that do not appear to rely on reproductive manipulation to spread. For example, the strain *wMel*, which induces a very low level of CI (Hoffmann *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1998), might be maintained in populations of *Drosophila melanogaster* because of positive effects such as the protection it confers against several RNA viruses (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008). Similarly, *wAu*, which naturally infects *Drosophila simulans*, does not induce CI but confers strong protection against viruses (Osborne *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2014). This antiviral protection, which has been observed only in *Drosophila* and mosquitoes, has been shown to be highly variable according to the host species and the *Wolbachia* strain (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2009; Osborne *et al.*, 2009; Mousson *et al.*, 2010; Chrostek *et al.*, 2013; Chrostek *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2014).

Previous studies found that the prevalence of *wSuz* is highly variable in populations of *D. sukukii* from North America (7 to 58%) and Europe (0 to 100%) (Hamm *et al.*, 2014; Cattel *et al.*, 2016) and, until now, there is no indication that this strain can induce strong reproductive manipulations in *D. sukukii* such as CI or male killing (Hamm *et al.*, 2014; Cattel *et al.*, 2016). Moreover, in North American populations, it has been shown that *wSuz* is imperfectly vertically transmitted by wild-caught *D. sukukii* females, which would cause the bacterium to be lost from the population in the absence of any selection (Hamm *et al.*, 2014). All these results suggest that *wSuz* may bring a fitness advantage to *D. sukukii* but as yet no effect has been found on fecundity, starvation tolerance or resistance to desiccation (Hamm *et al.*, 2014). *wSuz* belongs to the supergroup A (Siozios *et al.*,

2013), which contains several *Wolbachia* strains known to induce antiviral protection (Martinez *et al.*, 2014). In the present study, we thus tested whether *wSuz* can protect *D. sukukii* against viruses. Four host lines were compared, two from France, a country that was recently invaded by *D. sukukii*, and two from Japan, its native range (Cini *et al.*, 2012; Asplen *et al.*, 2015). Two RNA viruses were tested, *Drosophila C virus* (DCV; highly pathogenic *Drosophila* virus) and the Flock House virus (FHV; isolated from a beetle) (Scotti *et al.*, 1983; Huszar & Imler, 2008). We found that *wSuz* is able to protect *D. sukukii* against these two viruses but that the antiviral protection is very variable amongst the host lines. This beneficial effect could explain its maintenance in natural populations.

## Results

### *Wolbachia protects D. sukukii against DCV infection*

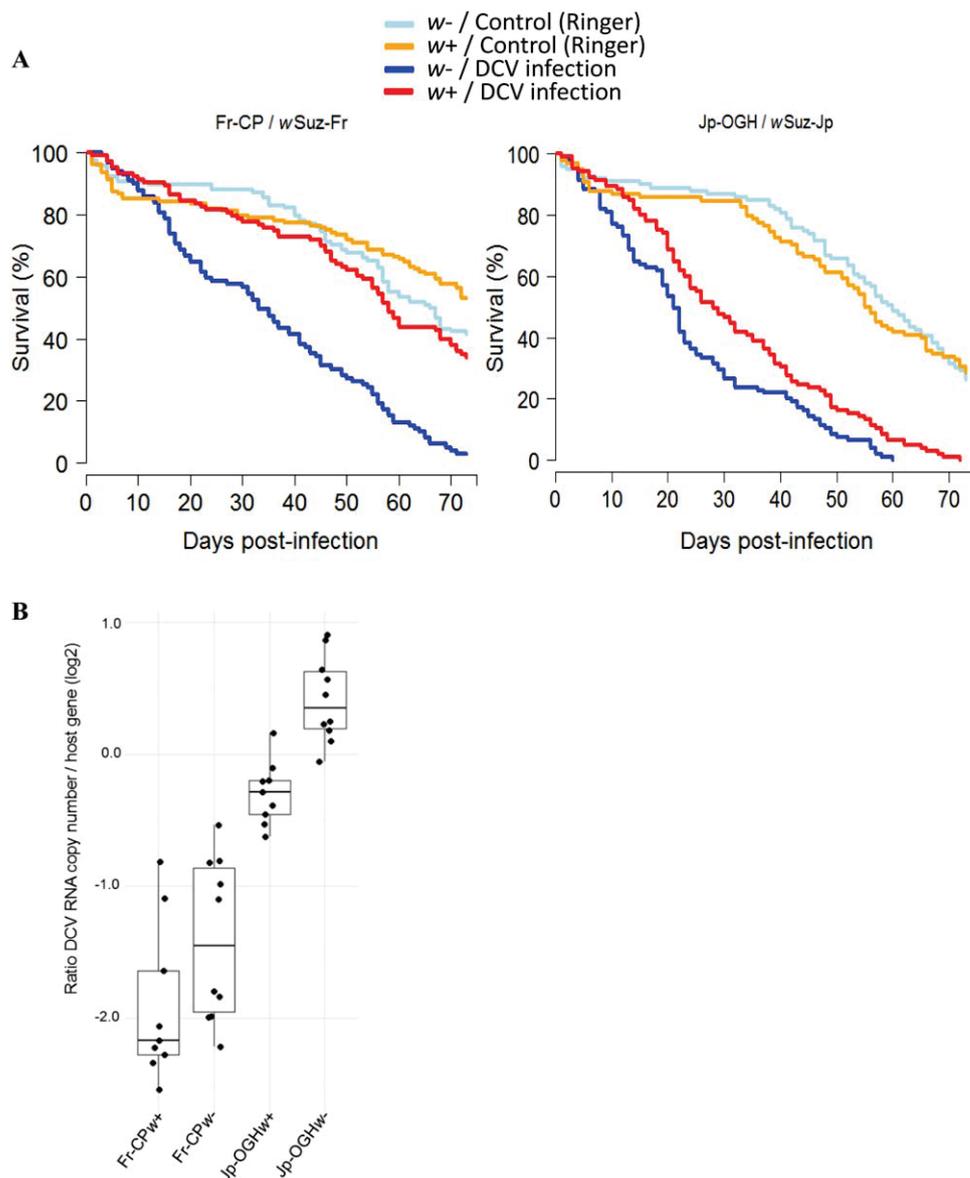
We measured the survival of French line-antibiotic treated (Fr-CP) and Japanese line-introgressed line (Jp-OGH) flies infected or uninfected, respectively, with a French and Japanese *Wolbachia* isolate after inoculation with DCV (400 flies) or saline solution (Ringer, 400 flies) (Fig. 1A). In the mock-infected flies (Ringer's control treatment), the survival of *Wolbachia*-free and *Wolbachia*-infected individuals was not significantly different, indicating that there is no intrinsic effect of *Wolbachia* on the fly survival (Cox's mixed effect model; main effect *Wolbachia*:  $\chi^2 = 0.92$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.337$ ; host genotype  $\times$  *Wolbachia* interaction:  $\chi^2 = 1.57$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.210$ ). However, the Fr-CP line had higher survival than the Jp-OGH line (Cox's mixed effect model;  $\chi^2 = 8.78$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.003$ ).

We found that *Wolbachia* increased the survival of flies infected with DCV (Cox's mixed effect model:  $\chi^2 = 21.74$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 1A) but the effect was significant for the Fr-CP line only (Cox's mixed effect model, host genotype  $\times$  *Wolbachia* interaction:  $\chi^2 = 4.1$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.043$ ; Tukey's test,  $P < 0.001$  for Fr-CP and  $P = 0.99$  for Jp-OGH). As Fr-CP and Jp-OGH lines differ in both the host and bacterial genotypes, either of these may be causing the difference.

The DCV titre was lower in *Wolbachia*-infected flies than in uninfected ones [two-way analysis of variance (ANOVA),  $F = 15.22$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 1B], and this effect of *Wolbachia* did not depend on the line (two-way ANOVA, *Wolbachia*  $\times$  host interaction:  $F = 0.45$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.509$ ; Fig. 1B).

### *Wolbachia effect on FHV infection*

Given the difference in the degree to which *wSuz* increases the survival of *D. sukukii* after DCV infection amongst lines we then investigated the effect of *wSuz*

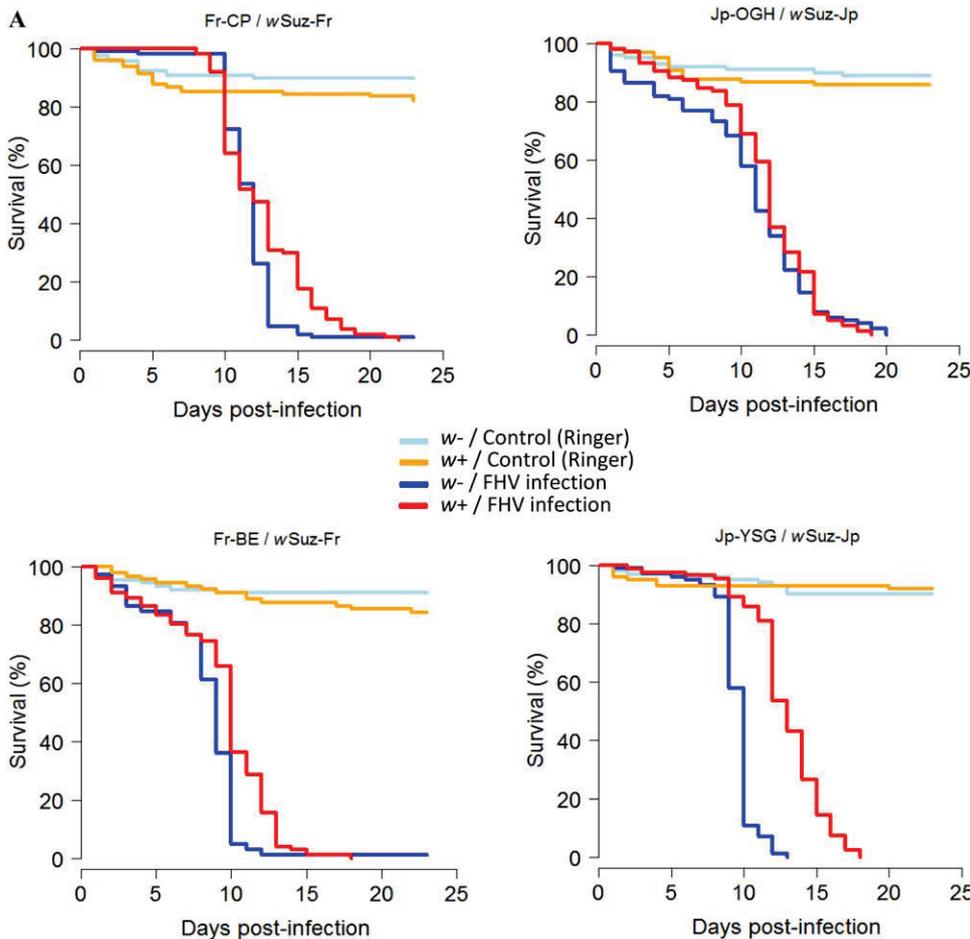


**Figure 1.** Effect of *Wolbachia* on fly survival and RNA copy number upon *Drosophila C virus* (DCV) infection with two *Wolbachia* isolates in different genetic backgrounds. (A) Survival of flies infected with DCV (dark blue and red lines) or Ringer's solution (light blue and orange lines). Dark blue and light blue lines indicate *Wolbachia*-free flies. Orange and red lines indicate *Wolbachia*-infected flies. (B) DCV RNA copy number infection 2 days post-infection in flies with two *Wolbachia* isolates in different genetic backgrounds. RNA copy number is expressed by the copy number of viral RNA relative to the host gene *Rpl32*.

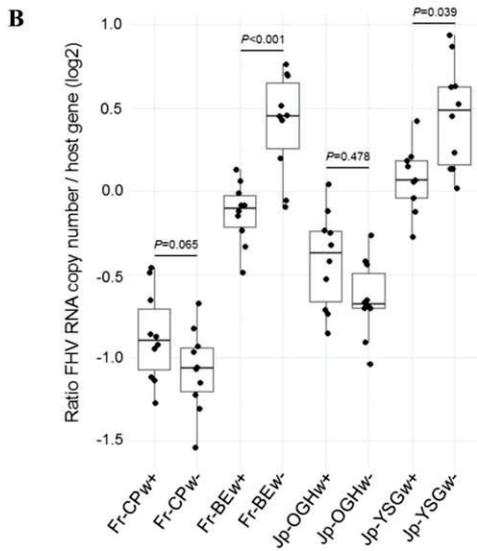
on FHV infection in four genetic backgrounds: the effect of the French *Wolbachia* isolate, *wSuz-Fr*, in two French backgrounds Fr-CP and Fr-Bellegarde (BE), and the effect of the Japanese isolate, *wSuz-Jp*, in two Japanese backgrounds Jp-OGH and Jp-Yamagata (YSG). A total of 800 flies were stabbed with FHV and 800 others with Ringer's solution (Fig. 2A). In the absence of viral infection neither *Wolbachia* nor the host genetic background affected survival (Ringer control treatment, Cox's mixed effect model, *Wolbachia* effect:  $\chi^2 = 1.83$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.180$ ; host effect:  $\chi^2 = 1.43$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.7$ ; *Wolbachia*  $\times$  host interaction:  $\chi^2 = 1.22$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.750$ ).

In FHV-infected flies, survival was significantly affected by the *Wolbachia* infection ( $\chi^2 = 31.88$ ,  $df = 4$ ,  $P < 0.001$ ) and by the host genetic background ( $\chi^2 = 39.55$ ,  $df = 6$ ,

$P < 0.001$ ), and there was a significant interaction between these two factors ( $\chi^2 = 14.99$ ,  $df = 3$ ,  $P = 0.002$ ). Because we could not exclude the possibility that the French and the Japanese lines are infected by a different *Wolbachia* isolate (*wSuz-Fr* and *wSuz-Jp*, respectively), we also tested the *Wolbachia* and the host genetic background effects on infected flies' survival for the French and Japanese lines separately. The French lines' survival was significantly affected by the *Wolbachia* infection ( $\chi^2 = 17.75$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.001$ ) and by the host genetic background ( $\chi^2 = 34.14$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.001$ ) but there was no significant interaction between these two factors ( $\chi^2 = 3.73$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.053$ ). In the Japanese lines, the survival rate was affected by the *Wolbachia* infection ( $\chi^2 = 14.18$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.001$ ) and by the host genetic



— *w*- / Control (Ringer)  
 — *w*+ / Control (Ringer)  
 — *w*- / FHV infection  
 — *w*+ / FHV infection



**Figure 2.** Effect of *Wolbachia* and host genetic background on fly survival and RNA copy number upon Flock House virus (FHV) infection. (A) Survival of flies infected with FHV (dark blue and red lines) or Ringer's solution (light blue and orange lines). Dark blue and light blue lines indicate *Wolbachia*-free flies. Orange and red lines indicate *Wolbachia*-infected flies. (B) Effect of *Wolbachia* and line on FHV RNA copy number 5 days post-infection. RNA copy number is expressed by the copy number of viral RNA relative to the host gene *Rpl32*. Tukey's honestly significant difference tests were performed for pairwise comparisons.

background ( $\chi^2 = 10.54$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.005$ ), and we detected a significant interaction between these two factors ( $\chi^2 = 8.41$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.004$ ). By comparison with the uninfected lines, the *wSuz* infection significantly

increased the survival of the Fr-BE and the Jp-YSG backgrounds [Tukey's honestly significant difference (HSD),  $P = 0.012$  and  $P < 0.001$ , respectively] whereas it did not affect the survival of the Fr-CP and the Jp-OGH

backgrounds (CP line,  $P = 0.191$ ; OGH line,  $P = 0.849$ ) (Fig. 2A).

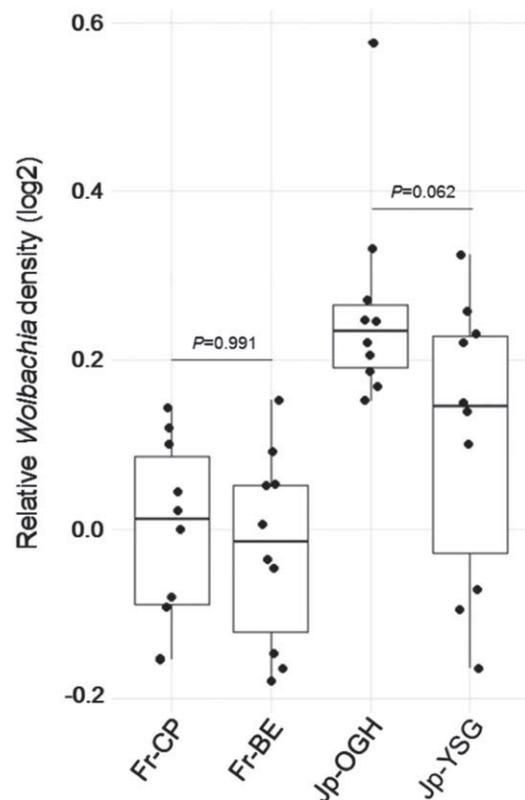
As for DCV, we also measured FHV titres and we found a significant effect of both the *Wolbachia* infection status (two-way ANOVA,  $F = 5.04$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.03$ ) and the host genetic background (two-way ANOVA,  $F = 98.88$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ) on the RNA copy number (Fig. 2B), with a significant interaction between these two factors (two-way ANOVA,  $F = 11.54$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ). As for the survival data analysis, we tested the influence of the presence of *Wolbachia* and the host genetic background for the French and the Japanese lines separately. For the French lines the RNA copy number was affected by *Wolbachia* infection (two-way ANOVA,  $F = 4.32$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.045$ ) and by the host genetic background (two-way ANOVA,  $F = 189.82$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ), with a significant interaction between these two factors (two-way ANOVA,  $F = 21.01$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ). For the Japanese lines, we also found a significant interaction between the *Wolbachia* infection and the host genetic background (two-way ANOVA,  $F = 13.18$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ) and a significant effect of the host genetic background (two-way ANOVA,  $F = 88.80$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ), but we did not detect a significant effect of the *Wolbachia* infection (two-way ANOVA,  $F = 1.05$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.311$ ). More precisely, in the presence of *wSuz*, the RNA copy number significantly decreased (around 50% reduction; Fig. 2B) in the Fr-BE and Jp-YSG backgrounds infected with *wSuz*-Fr and *wSuz*-Jp isolates, respectively (Tukey's HSD,  $P < 0.001$  and  $P = 0.039$ , respectively), the two lines that exhibited a significant effect of *Wolbachia* on survival after FHV infection, and not in the two other lines (Tukey's HSD test, Fr-CP line,  $P = 0.665$ ; Jp-OGH line,  $P = 0.478$ ).

#### Wolbachia density

*Wolbachia* density is known to be a major determinant of antiviral protection, with higher densities being associated with higher levels of protection (Chrostek *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2014). We therefore measured *wSuz* density in the four lines and found significant differences (one-way ANOVA,  $F = 10.07$ ,  $df = 3$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 3): the two Japanese lines (Jp-OGH and Jp-YSG) showed a higher density than the two French backgrounds (Fr-CP and Fr-BE), but there was no significant difference between the two French lines (both infected by *wSuz*-Fr; Tukey's HSD,  $P = 0.991$ ) or between the two Japanese lines (both harbour the Japanese *Wolbachia* isolate; Tukey's HSD,  $P = 0.062$ ).

#### Discussion

We have found that *wSuz* can protect its host against RNA viruses. In certain lines individuals infected with *wSuz* had higher survival and lower viral titres after



**Figure 3.** Relative *Wolbachia* density in different *Drosophila suzukii* genetic backgrounds. The *Wolbachia* quantity was normalized to that of the *Fpl32* host gene. Tukey's honestly significant difference tests were performed for pairwise comparisons.

infection with DCV and FHV. It has been known since 2008 that *Wolbachia* can protect *Drosophila* against RNA viruses (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008), but this is the first time that it has been described in *D. suzukii*. In a recent study another direct fitness benefit of *Wolbachia* was observed in an Italian population of *D. suzukii*: infected females had higher fecundity than uninfected ones (Mazzetto *et al.*, 2015). These phenotypes can potentially explain the maintenance of *Wolbachia* strains in natural populations without reproductive manipulation (Fenton *et al.*, 2011), as has been found in North American and European populations of *D. suzukii* (Hamm *et al.*, 2014; Cattel *et al.*, 2016).

The variability in *wSuz* prevalence could be a consequence of heterogeneity in virus-induced selection similar to that observed in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. This species is protected against parasitoids by the symbiont *Hamiltonella defensa*, which has variable prevalence amongst populations and is thought to be maintained by negative-frequency dependent selection depending on the extent of parasitism pressure in the field (Oliver *et al.*, 2008). We found that *Wolbachia* mediated significant protection in *D. suzukii* (Fr-CP for DCV,

Fr-BE and Jp-YSG for FHV) and that this protection was associated with reduced viral titre. However, for DCV, the presence of *Wolbachia* correlated with a lower viral titre even when no effect on the flies' survival was detected (Jp-OGH line). It has been shown that antiviral protection is generally explained by a phenomenon of resistance that reduces the accumulation of virus but, in some cases, no differences in viral titres were observed despite the protective effect (Teixeira *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2009). In the latter case, it is possible that *Wolbachia* does not affect the replication of the virus but rather makes the host more tolerant to viral infection.

Experimental studies have shown that *Wolbachia*-mediated antiviral protection is a common phenomenon in *Drosophila* and mosquitoes (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2009; Osborne *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Chrostek *et al.*, 2013; Chrostek *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2014) but is strongly dependent on the *Wolbachia* strain (Hedges *et al.*, 2008; Osborne *et al.*, 2009; Chrostek *et al.*, 2013; Chrostek *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2014). For instance, Martinez *et al.* (2014) showed that amongst 19 *Wolbachia* strains (originating from 16 *Drosophila* species) transferred into the same *D. simulans* genotype, only half of them induced protection against DCV and FHV. The effect of host genetics on protection is less well understood. However, the protective phenotype is affected by the host species. For example, the strain wInn protects its natural host *Drosophila innubila* against FHV (Unckless & Jaenike, 2012) but has no effect in *D. simulans* (Martinez *et al.*, 2014). Here, we found that the level of antiviral protection varied amongst the lines we used. This difference was most dramatic in the DCV experiment, in which we found large increases in the survival of the French line but not the Japanese line. This difference could be caused by genetic differences between the *Wolbachia* isolates, the flies or both. In the FHV experiment we were able to compare the same *Wolbachia* isolates in two host genetic backgrounds. We found a host background effect for both the Japanese and the French lines, suggesting that host factors may affect the expression of the *Wolbachia*-mediated protection. However, we would caution that this needs further confirmation as we only had a single replicate line of each *Wolbachia* isolate in each genetic background, so we cannot rule out other possible differences (eg gut microbiota, or uncontrolled differences in the genetic background). *Wolbachia* density is known to influence the level of protection (Osborne *et al.*, 2009; 2012; Chrostek *et al.*, 2013; 2014; Martinez *et al.*, 2014). However, we did not find any clear association between the level of protection and the density of *Wolbachia*. The variation in antiviral protection could also be influenced

by tissue tropism of *Wolbachia* as Osborne *et al.* (2012) highlighted that this can partly explain variations in the level of protection. Therefore it is possible that, in the *D. sukuzii* lines used in our study, the tissue tropism of *Wolbachia* was different, despite showing very similar density at the whole fly level.

The importance of antiviral protection in natural populations of *D. sukuzii* is unknown. It has been estimated that *Wolbachia* would need to generate a fitness benefit of 20% to be maintained in populations (Hamm *et al.*, 2014). To achieve this RNA viruses would need to be causing significant harm to the flies in nature and *Wolbachia* would need to be mitigating much of this harm. The effects of the presence of *Wolbachia* on viral titre and survival that we observed were mostly smaller than in many previous studies (Hedges *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2008; Chrostek *et al.*, 2013; Chrostek *et al.*, 2014; Martinez *et al.*, 2014). However, it is not possible to extrapolate this to effects in nature without further work.

## Experimental procedures

### *D. sukuzii* lines and rearing

In this study, four lines of *D. sukuzii* were used, two originating from France and two from Japan. The French lines were collected in Compiègne (named Fr-CP) and in Bellegarde (named Fr-BE) in 2011 and 2012, respectively, and reared in large populations. The Japanese lines were obtained from the Ehime-fly Stock Center in 2011: they were sampled in Yamagata (named Jp-YSG; #E-15016 YSG-11) and Tokyo (named Jp-OGH; #E-15014OGH06-03) in 2006. These lines were chosen because two are free of *Wolbachia* (Fr-BE and Jp-OGH) and the two others (Fr-CP and Jp-YSG) are 100% infected with *Wolbachia* (see below for diagnostic PCR test). The flies were reared on a cornmeal diet (agar: 1%, dextrose: 8.75%, maize: 8.75%, yeast: 2%, nipagin: 3%) and maintained in an incubator at constant temperature (22°C) and humidity (70%) with a 12-h light/dark cycle. An MLST analysis performed on six genes [*ftsZ*, *fbpA*, *hcpA*, *coxA*, *gatB* and *Wolbachia* surface protein (*wsp*)] revealed the *Wolbachia* isolates from Fr-CP and Jp-YSG lines to be the same sequence type, with 100% identity between the sequences. The sequences obtained in the present study are recorded in GenBank as KS308222–7.

### Control of host genetic background and infection status

We used two different methods to obtain *Wolbachia*-infected and *Wolbachia*-free lines with similar genetic backgrounds: antibiotic treatments of the infected lines and introgression of *Wolbachia* into uninfected lines by back-crossing.

Antibiotic treatments were performed for three generations in Fr-CP and Jp-YSG lines. Larvae in each generation were fed on medium with 0.25 mg/ml tetracycline. After three generations, 10 isofemale lines were established from treated females and the presence of *Wolbachia* was checked by PCR as described below in mothers and then for three generations more. Only one isofemale line was retained for each nuclear

background (Fr-CP and Jp-YSG) and maintained for 12 generations before the experiments. The absence of *Wolbachia* in these lines was confirmed by real-time quantitative PCR (qPCR; see below). Using this approach, we obtained infected and cured lines with the same genetic background, Fr-CP or Jp-YSG.

To obtain infected and uninfected individuals with the same Fr-BE or Jp-OGH genetic backgrounds, back-crosses were performed for eight generations. Two males from the uninfected line (Fr-BE or Jp-OGH) were mated with single virgin females from the infected lines from the same country, ie Fr-CP and Jp-YSG, respectively. Backcrossing was performed for a total of eight generations, which led to an introgression of around 99.6% of the nuclear background assuming no selection on the nuclear genome. However, compared with the use of antibiotic treatments, lines obtained with this method have different mitochondrial backgrounds. These two lines were maintained for 15 generations before the experiments. The *Wolbachia* infection status of each line was verified by PCR just before the viral infection experiment.

#### Viral isolates

Two viruses, DCV and FHV, were used in this study. DCV is a highly pathogenic *Drosophila* virus, which belongs to the family Dicistroviridae (Huszar & Imler, 2008); FHV, which belongs to the Nodaviridae family, is not a natural pathogen of *Drosophila* species and was initially isolated from a beetle (Scotti *et al.*, 1983). Viruses were produced and titrated as described by Martinez *et al.* (2014). DCV was produced and titrated in Schneider's Line 2 cells and FHV was titrated in Schneider *Drosophila* Line 2 cells (<https://dgrc.bio.indiana.edu/cells/Catalog>). For each infection assay, one viral aliquot was defrosted just before the infection and diluted in Ringer's solution (Sullivan *et al.*, 2000) to reach a viral concentration of  $5 \times 10^8$ /ml 50% Tissue Culture Infective Dose (TCID<sub>50</sub>) for DCV and  $3.6 \times 10^{10}$ /ml TCID<sub>50</sub> for FHV.

#### Survival assay

In order to test for a potential protective effect of *wSuz*, we measured the survival of flies after infection with DCV, FHV or mock infection with Ringer's solution. To infect flies, a 0.1-mm diameter anodized steel needle (26002-15, Fine Science Tools, San Francisco, CA, USA) was bent, 0.25 mm from the end, dipped in viral solution and the bent part of the needle pricked into the pleural suture on the thorax of the flies (Longdon *et al.*, 2013). For DCV, we followed the survival of *Wolbachia*-free or *Wolbachia*-infected flies of the Fr-CP and Jp-OGH lines only. As, in that first experiment, we observed variation depending on the geographical origin of the flies, we performed the second experiment with FHV using all four genetic backgrounds (Fr-CP, Fr-BE, Jp-OGH and Jp-YSG). Survival of Ringer's controls was followed in parallel for these two experiments.

For each line 3-day-old females were collected. After being anaesthetized with CO<sub>2</sub>, they were inoculated with DCV, FHV or Ringer's solution by stabbing them as described above. Groups of 20 stabbed flies were immediately placed into a vial of fly cornmeal medium and stored at 22°C. Flies were transferred

into fresh vials of food every 3 days and the number of dead flies was recorded every day. The survival assay was replicated five times on independent cohorts of flies across multiple days, corresponding to a total of 100 flies for each *Wolbachia* infection status and virus infection treatment.

#### Diagnostic PCR

The *Wolbachia* infection status of individuals was verified by PCR for each line just before performing the experiments. DNA was extracted on pools of 10 individuals (one pool per line) homogenized in 200 µl 5% w/v Chelex resin in water (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with 4 µl proteinase K (20 mg/ml) and kept at 56°C for 3 h. After 15 min at 95°C, samples were centrifuged at 16 000 *g* for 4 min and stored at -20°C. Presence of *Wolbachia* was checked by amplifying the *wsp* gene using the primers *wsp81F* and *wsp691R* (Braig *et al.*, 1998; Table S1). PCR reactions were performed in 25 µl volumes containing 100 µM Désoxyribonucléotides (dNTP), 200 nM primers, 0.5 International Unit DreamTaq® DNA polymerase (Eurobio, Paris, France) and 1 µl DNA template. Cycling conditions were 94°C (2 min), 94°C (30 s), 52°C (30 s), 72°C (45 s), 72°C (10 min) for 35 cycles. PCR products were visualized in 1% agarose gels.

#### qPCR

The *Wolbachia* density, DCV and FHV RNA copy number were measured by qPCR on a Light Cycler™ system (Roche Life Science, USA) using the primers listed in Table S1. To estimate *Wolbachia* density, 10 pools of 10 3-day-old virus-free females for each line were prepared and the DNA extracted using a Gentra Pure gene Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). The *Wolbachia* density was measured by quantifying the copy number of the *Wolbachia* gene *ftsZ* relative to the host gene *Rpl32* using Sso Advanced Universal Probes Supermix (Bio-Rad; 2 min at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 95°C and 20 s at 60°C). The 10 µl of multiplex reaction mix contained 400 nM *Rpl32* primers, 200 nM *ftsZ* primers, 5 µl Sso Advanced Universal Probes Supermix, 200 nM of each probe and 2 µl of DNA sample. The *Wolbachia* density was estimated by dividing the copy number of the *ftsZ* gene by the copy number of the *Rpl32* host gene. The antiviral protection was also examined by measuring the RNA copy number after infection by both viruses. Three-day-old females were stabbed with DCV and FHV and frozen 5 and 2 days after infection, respectively. After homogenization in TRIzol Reagent (Ambion, Thermo Fisher Scientific, MA USA), RNA was extracted from 10 pools of 10 flies for each experimental treatment using an RNA Easy Mini® kit following the manufacturer's instructions (Qiagen). Reverse-transcription was carried out using a SuperScript® III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) including a 30 min DNase digestion step at 37°C. The copy number of the viral RNA was compared to that of the control gene *Rpl32*. The qPCR reactions for DCV, FHV and *Rpl32* were carried out separately under the same conditions (30 s at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 95°C and 20 s at 60°C). The 10 µl reaction mix contained 200 nM of each primer, 5 µl Sso Advanced Universal Probes Supermix SYBR Green Supermix and 1 µl DNA sample. The RNA copy number and the *Wolbachia* density

were estimated by calculating the ratio:  $\frac{E(\text{virus}/\text{Wolbachia})^{\Delta Ct}}{E(\text{host})^{\Delta Ct}}$  with  $\Delta Ct = Ct_{\text{flygene}} - Ct_{\text{virus}/\text{Wolbachia}}$  where  $E$  is the efficiency of the PCR reaction calculated from a dilution series for each set of primers  $\left[ E = 2 \left( \frac{1}{\text{linear regression slope}} \right) \right]$  and  $Ct$  is the cycle threshold (Pfaffl, 2001).

### Statistical analysis

Survival data were analysed with a Cox's proportional hazards mixed-effect model using the *coxme* package in R (R Core Team, 2013). The Cox's model estimates hazard ratios with the probability of a *Wolbachia*-infected fly dying at a given time-point divided by the probability of a *Wolbachia*-free fly dying. Flies that were alive at the end of the experiment were treated as censored data.

Survival data for DCV, FHV and their respective controls (Ringer) were analysed separately. For each virus, two models were fitted to test a potential effect of the *Wolbachia* infection and the genetic background on survival for the control treatment (Ringer) without virus or after infection with a virus. The first model allowed us to test whether *wSuz* infection modifies survival independently of viral infection and indirectly confirm that the survival of virus-infected flies cannot be explained by an inherent effect of *Wolbachia* on survival. The effects of *Wolbachia*, host genetic background and their interaction were considered as fixed effects and the replicate vials as a random effect. When a significant interaction was detected, differences between *Wolbachia*-free and *Wolbachia*-infected flies within each host genetic background were analysed using pairwise comparisons (Tukey's HSD test) (R package *multcomp*).

Viral titres and *Wolbachia* density were analysed on  $\log_2$ -transformed data. For viral titres, a two-way ANOVA allowed us to test for the effect of *Wolbachia*, the host genetic background and their interaction. A one-way ANOVA was conducted to test for the influence of the host genetic background on *Wolbachia* density. Pairwise comparisons (Tukey's HSD test) were also carried out if a global effect of *Wolbachia* was detected.

### Acknowledgements

This work was funded by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) (IFR41-UMR5558) and supported by office National de l'Eau et des milieux Aquatiques (Appel à Propositions de Recherche Biodiversité-Ecophyto). J. Cattell is the recipient of a PhD studentship from the Rhône-Alpes region ('Communautés Académiques de Recherche Program' Grant).

### References

Alexandrov, I.D., Alexandrova, M.V., Goryacheva, I.I., Rochina, N.V., Shaikevich, E.V. and Zakharov, I.A. (2007) Removing endosymbiotic *Wolbachia* specifically decreases lifespan of females and competitiveness in a laboratory strain of *Drosophila melanogaster*. *Russ J Genet* **43**: 1372–1378.

Asplen, M.K., Anfora, G., Biondi, A., Choi, D.S., Chu, D., Daane, K.M. et al. (2015) Invasion of spotted wing *Drosophila* (*Dro-*

*sophila suzukii*): a global perspective and future priorities. *J Pest Sci* **88**: 469–494.

Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y. and Xi, Z. (2010) The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* **6**: e1000833.

Blagrove, M.S.C., Arias-Goeta, C., Failloux, A.B. and Sinkins, S.P. (2012) *Wolbachia* strain *wMel* induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 255–260.

Braig, H.R., Zhou, W., Dobson, S.L. and O'Neill, S.L. (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J Bacteriol* **180**: 2373–2378.

Brelsfoard, C.L. and Dobson, S.L. (2011) *Wolbachia* effects on host fitness and the influence of male aging on cytoplasmic incompatibility in *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **48**: 1008–1015.

Brownlie, J.C. and Johnson, K.N. (2009) Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol* **17**: 348–354.

Calabria, G., Máca, J., Bächli, G., Serra, L. and Pascual, M. (2012) First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *J Appl Entomol* **136**: 139–147.

Cattell, J., Kaur, R., Gibert, P., Martinez, J., Fraimout, A., Jiggins, F. et al. (2016) *Wolbachia* in European populations of the invasive pest *Drosophila suzukii*: regional variation in infection frequencies. *PLoS One* **11**: e0147766.

Chrostek, E., Marialva, M.S.P., Esteves, S.S., Weinert, L.A., Martinez, J., Jiggins, F.M. et al. (2013) *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: a phenotypic and phylogenomic analysis. *PLoS Genet* **9**: e1003896.

Chrostek, E., Marialva, M.S.P., Yamada, R., O'Neill, S.L. and Teixeira, L. (2014) High anti-viral protection without immune upregulation after interspecies *Wolbachia* transfer. *PLoS ONE* **9**: 1–7.

Cini, A., Ioriatti, C. and Anfora, G. (2012) A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bull Insectol* **65**: 149–160.

Cordaux, R., Pichon, S., Ling, A., Pérez, P., Delaunay, C., Vavre, F. et al. (2008) Intense transpositional activity of insertion sequences in an ancient obligate endosymbiont. *Mol Biol Evol* **25**: 1889–1896.

Deprá, M., Poppe, J.L., Schmitz, H.J., De Toni, D.C. and Valente, V.L.S. (2014) The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. *J Pest Sci* **87**: 379–383.

Dobson, S.L., Marsland, E.J. and Rattanadechakul, W. (2002) Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* **160**: 1087–1094.

Dobson, S.L., Rattanadechakul, W. and Marsland, E.J. (2004) Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity* **93**: 135–142.

Fenton, A., Johnson, K.N., Brownlie, J.C. and Hurst, G.D.D. (2011) Solving the *Wolbachia* paradox: modeling the tripartite interaction between host, *Wolbachia*, and a natural enemy. *Am Nat* **178**: 333–342.

Fry, A.J., Palmer, M.R. and Rand, D.M. (2004) Variable fitness effects of *Wolbachia* infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* **93**: 379–389.

- Gavotte, L., Mercer, D.R., Stoeckle, J.J. and Dobson, S.L. (2010) Costs and benefits of *Wolbachia* infection in immature *Aedes albopictus* depend upon sex and competition level. *J Invertebr Pathol* **105**: 341–346.
- Glaser, R.L. and Meola, M.A. (2010) The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PLoS ONE* **5**: e11977.
- Goodhue, R.E., Bolda, M., Farnsworth, D., Williams, J.C. and Zalom, F.G. (2011) Spotted wing *Drosophila* infestation of California strawberries and raspberries: economic analysis of potential revenue losses and control costs. *Pest Manag Sci* **67**: 1396–1402.
- Hamm, C.A., Begun, D.J., Vo, A., Smith, C.C.R., Saelao, P., Shaver, A.O. *et al.* (2014) *Wolbachia* do not live by reproductive manipulation alone: infection polymorphism in *Drosophila suzukii* and *D. subpulchrella*. *Mol Ecol* **23**: 4871–4885.
- Hauser, M. (2011) A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera:Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. *Pest Manag Sci* **67**: 1352–1357.
- Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L. and Johnson, K.N. (2008) *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* **322**: 702.
- Hoffmann, A.A., Clancy, D.J. and Merton, E. (1994) Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **136**: 993–999.
- Hoffmann, A.A., Hercus, M. and Dagher, H. (1998) Population dynamics of the *Wolbachia* infection causing cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **148**: 221–231.
- Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.Y. and Fukatsu, T. (2010) *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 769–774.
- Huszar, T. and Imler, J.L. (2008) *Drosophila* viruses and the study of antiviral host-defense. *Adv Virus Res* **72**: 227–265.
- Kanzawa, T. (1936) Studies on *Drosophila suzukii* mats. *Rev Appl Entomol* **24**: 315.
- Longdon, B., Cao, C., Martinez, J. and Jiggins, F.M. (2013) Previous exposure to an RNA virus does not protect against subsequent infection in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* **8**: e73833.
- Martinez, J., Longdon, B., Bauer, S., Chan, Y.S., Miller, W.J., Bourtzis, K. *et al.* (2014) Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of *Wolbachia* strains. *PLoS Pathog* **10**: e1004369.
- Matsumura, S. (1931) *6000 Illustrated Insects of Japan-Empire*. Tokohshoin, Tokyo (in Japanese).
- Mazzetto, F., Gonella, E. and Alma, A. (2015) *Wolbachia* infection affects female fecundity in *Drosophila suzukii*. *Bull Insectol* **68**: 153–157.
- Mitsui, H., Takahashi, K.H. and Kimura, M.T. (2006) Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. *Popul Ecol* **48**: 233–237.
- Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M. *et al.* (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* **139**: 1268–1278.
- Mousson, L., Martin, E., Zouache, K., Madec, Y., Mavingui, P. and Failloux, A.B. (2010) *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. *Mol Ecol* **19**: 1953–1964.
- Oliver, K.M., Campos, J., Moran, N.A. and Hunter, M.S. (2008) Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proc Biol Sci B* **275**: 293–299.
- Osborne, S.E., Leong, Y.S., O'Neill, S.L. and Johnson, K.N. (2009) Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathog* **5**: e1000656.
- Osborne, S.E., Iturbe-Ormaetxe, I., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L. and Johnson, K.N. (2012) Antiviral protection and the importance of *Wolbachia* density and tissue tropism in *Drosophila simulans*. *Appl Environ Microbiol* **78**: 6922–6929.
- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: 2002–2007.
- R Core Team. (2013) R: a language and environment for statistical computing.
- Scotti, P., Dearing, S. and Mossop, D. (1983) Flock House Virus: a nodavirus isolated from *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Arch Virol* **75**: 181–189.
- Siozios, S., Cestaro, A. and Kaur, R. (2013) Draft genome sequence of the *Wolbachia* endosymbiont of *Drosophila suzukii*. *Genome Announc* **1**: e00032.
- Sullivan, W., Ashburner, M. and Hawley, R. (2000) *Drosophila Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Teixeira, L., Ferreira, Á. and Ashburner, M. (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol* **6**: 2753–2763.
- Toivonen, J.M., Walker, G.A., Martinez-Diaz, P., Bjedov, I., Drieger, Y., Jacobs, H.T. *et al.* (2007) No influence of Indy on lifespan in *Drosophila* after correction for genetic and cytoplasmic background effects. *PLoS Genet* **3**: 0973–0983.
- Turelli, M. and Hoffmann, A.A. (1995) Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics* **140**: 1319–1338.
- Unckless, R.L. and Jaenike, J. (2012) Maintenance of a male-killing *Wolbachia* in *Drosophila innubila* by male-killing dependent and male-killing independent mechanisms. *Evolution* **66**: 678–689.
- Weeks, A.R., Turelli, M., Harcombe, W.R., Reynolds, K.T. and Hoffmann, A.A. (2007) From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biol* **5**: 0997–1005.
- Weinert, L.A., Araujo, E.V., Ahmed, M.Z. and Welch, J.J. (2015) The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proc Biol Sci* **282**: 20150249.
- Werren, J.H., Baldo, L. and Clark, M.E. (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* **6**: 741–751.
- Zchori-Fein, E. and Bourtzis, K. (2011) Manipulative tenants. *Front Microbiol Ser.*

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Table S1.** Primers and probes used in this study.

**Table S1.** Primers and probes used in this study

Gene target	Primers and probes (5'-3')	Fragment size
<i>ftsZ</i>	ftsZ-F157 : CTGCCCACCGGATTCAAG	125 bp
	ftsZ-R282 : ATTCCTTGCGCACCTTTCAT	
	Probe: ACCGGAGAGGCAGAAGAAGA	
<i>Rpl32</i>	Rpl32Fdd : CTGCCCACCGGATTCAAG	91 bp
	Rpl32Rdd : CGATCTCGCCGAGTAAAC	
	Probe: CCTCCAGCTCGCGCACGTTG	
<i>Rpl32</i>	Rpl32F1 : TGCTAAGCTGTGCACAA	92 bp
	Rpl32R2 : GCTTGTTGATCCGTAAC	
	DCV_S : GACACTGCCTTTGATTAG	
<i>DCV</i>	DCV_AS : CCCTCTGGGAACTAAATG	135 bp
	FHV_S : GCACAAGATTTCCGTAATG	
	FHV_AS : CGGGTTAAAGGTGTGTAA	
<i>FHV</i>	81F : TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	132 bp
	691R : AAAAATTAACGCTACTCCA	
	<i>wsp</i>	

## Discussion

Nous avons montré dans cette étude que *wSuz* pouvait protéger son hôte contre des virus à ARN. En effet, après infection virale, les individus infectés par *wSuz* ont toujours une meilleure survie que les individus non infectés et ce pour les deux virus testés. De plus, nous avons mis en évidence que ce phénotype protecteur peut être associé à un phénomène de résistance puisqu'une réduction significative de la réplication virale a été observée chez les femelles infectées par *wSuz*. Ces résultats confirment l'hypothèse de départ, à savoir que *wSuz* pourrait être un symbiote mutualiste facultatif pour son hôte.

Une forte variabilité de l'intensité de ce phénotype protecteur a été observée selon les lignées de *D. sukii* utilisées dans cette étude. Elle est davantage marquée lors des infections par DCV, où les courbes de survie et les titres en virus diffèrent fortement selon les fonds génétiques de *D. sukii*, ce qui suggère une interaction génotype hôte / génotype bactérien forte sur l'expression de ce phénotype protecteur. L'utilisation de lignées de *D. sukii* génétiquement différentes mais porteuses d'une même souche de *Wolbachia* (Fr-CP/Fr-BE et Jp-OGH/Jp-YSG) nous a également permis de mettre en évidence un effet fort du génotype hôte au niveau intra-spécifique sur la régulation de la réplication virale.

Les génotypes hôtes et bactériens, les conditions environnementales, ainsi que la densité bactérienne jouent un rôle primordiale dans les interactions symbiotiques (Weeks *et al.* 2002; Mouton *et al.* 2007). Les études précédentes menées dans le genre *Drosophila* ont montré que l'intensité de la protection virale était positivement corrélée à la densité en *Wolbachia* (Osborne *et al.* 2012; Chrostek *et al.* 2013; Martinez *et al.* 2014, 2015; Chrostek & Teixeira 2015). Cependant la variabilité observée au sein des lignées Françaises et Japonaises ne peuvent s'expliquer par des différences de densité en *Wolbachia* car aucune différence significative n'a été observée. Le génotype hôte semble donc être déterminant dans l'intensité du phénotype protecteur exprimé par les individus infectés par *wSuz*.

L'importance du phénotype protecteur sur le maintien de *wSuz* dans les populations naturelles mérite d'être nuancée. En effet, une récente analyse en milieu naturel a montré que, sur un échantillon de 2 000 individus de populations naturelles des espèces *D. simulans* et *D. melanogaster*, aucun individu n'était infecté par DCV et qu'aucune corrélation positive n'existait entre les prévalences de *Wolbachia* et celles des différents virus détectés (N=14) dans les 17 populations échantillonnées à travers le globe (Webster *et al.* 2015).



Dans une perspective plus appliquée, il semble désormais important de prendre en compte et de vérifier le statut d'infection des lignées de *D. sukii* utilisées. En effet, suite aux résultats obtenus dans cette étude, on peut supposer que la présence de *wSuz* peut également modifier la réponse phénotypique suite à des interactions avec des ennemis naturels tels que des parasitoïdes, des champignons ou encore des prédateurs. Puisqu'il existe un polymorphisme d'infection de *wSuz* dans la majorité des populations naturelles, il semble pertinent de tester les deux statuts d'infection lors d'expérimentations qui visent à évaluer des réponses phénotypiques.



### **III. Développement de la Technique de l’Insecte Incompatible chez *Drosophila suzukii***

#### **Chapitre 3: Analyse des patrons d’incompatibilité cytoplasmique chez *D. suzukii***



## Introduction

L'étude descriptive de l'association naturelle entre *D. suzukii* et la bactérie *Wolbachia* wSuz détaillée dans le Chapitre 1 a permis de mettre en évidence que cette espèce est infectée par une seule souche de *Wolbachia*, qui présente des prévalences très variables, et qui induit un faible taux d'IC. Comme dans le cas de l'étude menée chez *Ceratitis capitata* par Zabalou *et al.* (2004) (voir introduction), le développement de la TII chez *D. suzukii* va nécessiter l'introduction d'une souche exogène de *Wolbachia* capable d'induire de l'IC. Cependant, l'originalité ici est que notre modèle biologique est naturellement infecté par une souche de *Wolbachia*. Or, certaines souches sont connues pour restaurer l'IC induite par d'autres souches même si elles n'en expriment pas dans leur hôte naturel (phénotype *mod-/resc+*).

Les souches de *Wolbachia* candidates pour le développement de la TII chez *D. suzukii* doivent donc répondre à trois critères fondamentaux: (i) être transmises parfaitement à la descendance, (ii) induire un fort taux d'IC chez *D. suzukii* (iii) qui ne doit pas être sauvée par wSuz quand elle est présente chez les femelles.

Afin d'étudier le phénotype *resc* de wSuz, nous avons fait le choix d'introduire wSuz chez *D. simulans*. Cette espèce est un modèle pertinent pour l'analyse des relations d'IC car il existe déjà, dans un même fond génétique, des lignées infectées par un grand nombre de souches de *Wolbachia* différentes (Martinez *et al.* 2014). Ainsi, avec une seule expérience de transfert, wSuz vers *D. simulans*, nous avons pu tester à l'aide de croisements en masses les patrons de compatibilité entre la souche wSuz et plusieurs souches de *Wolbachia*. Au total, 10 souches de *Wolbachia* connues pour induire de l'IC chez *D. simulans* ont pu être testées. L'analyse de la fonction *resc* de wSuz chez *D. simulans* via ces croisements nous a permis de sélectionner trois souches induisant de l'IC lors de croisements avec des femelles infectées par wSuz. Ensuite, nous avons réalisé des croisements individuels avec des mâles infectés par les différentes souches sélectionnées et des femelles non infectées et infectées par wSuz. Ces croisements nous ont permis de comparer les niveaux d'IC exprimés selon le statut d'infection des femelles et donc de mesurer l'intensité du phénotype *resc* de la souche wSuz.

Nous avons ensuite transféré les trois souches de *Wolbachia* identifiées comme candidates dans une lignée non infectée de *D. suzukii* afin de vérifier trois paramètres cruciaux, à savoir (1) que ces souches de *Wolbachia* s'établissent dans le nouvel hôte après transfert et se transmettaient à des taux élevés jusqu'à atteindre la fixation (100% de



transmission), (2) que ces souches étaient capables d'induire un taux d'IC important chez *D. suzukii* et (3) que la présence de *wSuz* chez la femelle ne modifiait pas l'intensité de l'IC. Les taux de transmission après transfert ont été suivis pendant plusieurs générations jusqu'à fixation des *Wolbachia* puis des croisements individuels ont pu être réalisés.

L'ensemble des résultats sont décrits dans l'article 3, soumis à *Journal of Applied Ecology* le 1<sup>er</sup> Août 2016 et intitulé « Back and forth *Wolbachia* transfers reveal efficient strains to control *Drosophila suzukii* populations ».

Article 3: « Back and forth *Wolbachia* transfers reveal efficient strains to control *Drosophila suzukii* populations »

# Back and forth *Wolbachia* transfers reveal efficient strains to control

## *Drosophila suzukii* populations

J. Cattel<sup>1</sup>; juliencattel@gmail.com  
T. Andrieux<sup>1</sup>; thibault.andrieux@hotmail.fr  
J. Martinez<sup>2</sup>; jtm35@cam.ac.uk  
F. Jiggins<sup>2</sup>; fmj1001@cam.ac.uk  
S. Charlat<sup>1</sup>; sylvaincharlat@gmail.com  
F. Vavre<sup>1</sup>; fabrice.vavre@univ-lyon1.fr  
P. Gibert<sup>1</sup>; patricia.gibert@univ-lyon1.fr  
L. Mouton<sup>1</sup>; laurence.mouton@univ-lyon1.fr

<sup>1</sup>Univ Lyon, Université Claude Bernard, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR CNRS 5558, F-69622 Villeurbanne, France

<sup>2</sup>Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

Corresponding authors: Julien Cattel, [juliencattel@gmail.com](mailto:juliencattel@gmail.com), (tel:+33786735362; fax: +33472431388); Laurence Mouton, [laurence.mouton@univ-lyon1.fr](mailto:laurence.mouton@univ-lyon1.fr) (fax: +33472431388)

**Key-words:** Cytoplasmic Incompatibility, Incompatible Insect Technique, Pest control, Spotted Wing *Drosophila*

Running title: IIT design against *D. suzukii*

Number of words: 6097

Number of tables and figures: 0 table, 3 figures

Number of references: 57

## Summary

1. Since its recent invasion of the European and American continents, the spotted wing *Drosophila* has become a major burden of the fruit industry. Armed with a highly sclerotized ovipositor, females can lay eggs in a wide variety of ripening and healthy fruits, in contrast to other *Drosophila* species. Economic losses due to *Drosophila suzukii* reach millions of dollars annually and methods to control natural populations in the field mainly rely on the use of chemical pesticides.

2. Here we test if *Wolbachia* bacteria can represent a potential ally to control this pest species. These symbionts are naturally present in many insects, and often induce a form of conditional sterility called Cytoplasmic Incompatibility (CI): the offspring of infected males die, unless the eggs are rescued by the same infection, inherited from the mother that protects the embryo against a yet unidentified toxin. As long recognized, a strategy called the Incompatible Insect Technique (IIT) makes use of the CI phenotype to control insect populations through the mass release of infected males. To implement this technique in *D. suzukii*, we used back and forth *Wolbachia* transfers between *D. suzukii* and *D. simulans* to identify *Wolbachia* strains that can fully sterilize *D. suzukii* females, despite the presence of *wSuz*, a natural *Wolbachia* infection in this species.

3. We identify two *Wolbachia* strains as potential candidates for developing IIT in *D. suzukii*. Both induce a very high level of CI in this pest which is not attenuated by the presence of *wSuz* in females.

4. *Synthesis and applications.* Although several critical steps still need to be tested and developed to achieve the control of *D. suzukii* using IIT, the most critical challenge has been met: *Wolbachia* can induce strong CI in this host, regardless of the presence of *wSuz* in females. Our experiments have led to the identification of two strong candidates, increasing the chances that at least one will pass all the remaining filters before practical implementation.

## Introduction

*Drosophila suzukii*, the spotted wing *Drosophila*, has become a major burden for fruit growers since its recent invasion of the European and American continents (Goodhue *et al.* 2011; Hauser 2011; Walsh *et al.* 2011; Calabria *et al.* 2012; Cini *et al.* 2012, 2014; Asplen *et al.* 2015). Although the vast majority of *Drosophila* species are not fruit pests, *D. suzukii* is able to lay eggs on a wide variety of healthy ripening fruits, thanks to a sclerotized ovipositor (Mitsui *et al.* 2006; Poyet *et al.* 2015). Internal larval feeding represents a direct damage that can also facilitate secondary infections by pathogens as fungi, yeasts or bacteria (Cini *et al.* 2012; Hamby *et al.* 2012; Rossi Stacconi *et al.* 2013; Ioriatti *et al.* 2015). Most damages are reported on red fruits, with an approximate \$500 million annual loss in the US (Goodhue *et al.* 2011). In France and in Northern Italy, up to 100% destruction was reported on cranberries, strawberries and sweet cherries (Cini *et al.* 2012; Weydert & Mandrin 2013). Control of *D. suzukii* populations in the field largely relies on chemical pesticides, a practice with serious drawbacks because of its use close to harvest and the consequent risk of high amount of residues left on fruits. In brief, there is an urgent need for developing effective, specific, and environmentally-friendly methods to fight against *D. suzukii*.

In this context, suppression of pest populations through the mass release of sterilizing males seems relevant, as it is highly specific, not polluting, and does not require the introduction of a new species into the environment (Bourtzis *et al.* 2014; Lees *et al.* 2015). In the conventional sterile-male-based strategy, males are sterilized by irradiation, and released for mating with wild females (named Sterile Insect Technique, SIT) (Knippling 1955). Although logistically heavy, and potentially limited by female multiple matings and a reduction of mating capacity of irradiated males, this approach has already shown its effectiveness against agricultural insect pests like the New World screw-worm fly (Lindquist *et al.* 1992). Alternative methods to the SIT have been developed such as the dominant lethal

genetic system (RIDL) where insects are transformed with a transgene whose product suppresses offspring production (Black *et al.* 2011) or the use of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis* (Hertig 1936), which we consider here.

The genus name “*Wolbachia*” designates a highly diverse clade of maternally transmitted intracellular symbionts of arthropods and nematodes, belonging to the  $\alpha$ -proteobacteria (Werren 1997). It is well known for its ability to manipulate host reproduction through different strategies that maximize its spread and maintenance in host populations. Among these, the most common appears to be Cytoplasmic Incompatibility (CI), a sperm-egg incompatibility occurring in crosses between infected males and uninfected females or between males and females infected by different *Wolbachia* strains, leading to the death of embryos (Werren *et al.* 2008). While the molecules involved are still unknown, CI can be understood as resulting from a modification/rescue system (*mod/resc*) where the *mod* function modifies the sperm nucleus during spermatogenesis and the *resc* function, expressed in the egg, rescues the embryo through an interaction with the modified sperm (Werren 1997). Depending on *Wolbachia* and host factors, some strains can both induce and rescue CI, while others express only the *resc* function, meaning that they do not induce CI, but can rescue the embryos against the *mod* function expressed by other *Wolbachia* strains (Merçot & Charlat 2004). CI has led to the proposal and development of the Incompatible Insect Technique (IIT), analogous to the SIT, where sterilization of the targeted populations is achieved by the release of *Wolbachia* infected males, incompatible with the resident females (Boller *et al.* 1976; Riegler & Stauffer 2002). The first successful application of IIT was achieved in Burma where the target population of *Culex pipiens*, vector of the filariasis, was almost eliminated (Laven 1967). Promising results were also obtained more recently in mosquito species under semi-field (Chambers *et al.* 2011; Moretti & Calvitti 2013; Atyame *et al.* 2015) and field (O’Connor *et al.* 2012) conditions. While initially limited to species where natural *Wolbachia*

infections allowed the expression of CI, this method came to the fore again within the last decade, thanks to the possibility to transfer *Wolbachia* strains between species (Hughes & Rasgon 2014). This approach has been successfully tested in the agricultural pest *Ceratitis capitata*, naturally uninfected, where the transfer of two *Wolbachia* strains from *Rhagoletis cerasi* led to the expression of a high level of CI (Zabalou *et al.* 2004b).

Here we aim at developing this promising approach in *D. suzukii*, where we face an additional challenge linked to the presence of *wSuz*, a natural *Wolbachia* strain, found in most *D. suzukii* populations but at variable frequencies (Hamm *et al.* 2014; Cattel *et al.* 2016a). Multi-Locus Sequence Typing and crossing experiments suggest that *wSuz* is the only natural infection in *D. suzukii* and does not induce strong CI (Hamm *et al.* 2014; Cattel *et al.* 2016a). These results indicate that the implementation of IIT in *D. suzukii* requires the introduction of a foreign *Wolbachia* strain that would induce a strong CI in *D. suzukii* and, crucially, a CI that would not be rescued by *wSuz*.

To identify such a strain, we first introduced *wSuz* in *Drosophila simulans*, where many *Wolbachia* infections are maintained. This allowed us to assess the rescue capacities of *wSuz* against multiple CI-inducing strains after a single trans-infection experiment. We thus selected three promising strains that were then introduced in *D. suzukii* leading to the identification of two strains that induce a nearly complete CI in this background, regardless of the presence of *wSuz* in females. We thus provide *D. suzukii* lines combining the properties required for an effective implementation of IIT.

## Materials and methods

### MICRO-INJECTIONS AND MATERNAL TRANSMISSION MEASUREMENT

Micro-injections were performed between *D. suzukii* and *D. simulans*, in both directions, using a micro-capillary needle to transfer the cytoplasm of infected embryos into uninfected ones, at the Fly Facility of the Department of Genetics of the University of Cambridge, following Poinot *et al.* (1998). Adult females emerging from the injected embryos (G0 females) were crossed with uninfected males of the same genetic background (line STCP in *D. simulans* and Fr-BE-Ø in *D. suzukii*) and allowed to lay eggs during 5 days. We checked the presence of *Wolbachia* by PCR in all G0 females and kept the offspring of the infected ones. This process was repeated until a perfect maternal transmission of *Wolbachia* was observed (which took 2 generations in *D. suzukii* and 3 generations in *D. simulans*). All injected lines were maintained in the lab for at least 8 generations before the beginning of crossing experiments.

### WOLBACHIA STRAINS, DROSOPHILA LINES AND REARING PROCEDURES

Crossing experiments in *D. simulans* involved 10 different *Wolbachia* strains, all belonging to the supergroup A (Martinez *et al.* 2015), 9 of which have been used in earlier studies (Poinot *et al.* 1998; Zabalou *et al.* 2008; Veneti *et al.* 2012; Martinez *et al.* 2014) (see Table S1). Except for *w*Ri (present in a fly line collected in 2012 from South Africa) all other *Wolbachia* strains are present in the STCP (STC-Pure) genetic background, previously obtained through six generations of brother-sister matings within the STC line, collected in the Seychelles and cured in 1998 from its natural infection (Poinot *et al.* 1998). Table S1 provides details on the method used to introduce each strain in this genetic background (either injection of embryos or backcrossing). The *Wolbachia* infection status of each line was verified by PCR and sequencing of the *wsp* gene (Braig *et al.* 1998), just before crossing experiments.

In *D. sukukii*, we used one isofemale line, named Fr-BE-Ø, naturally free of *Wolbachia*, collected in 2012 in Bellegarde (France) and maintained since as a mass population. The *wSuz* strain was introduced in the Fr-BE genetic background following 8 generations of back-crosses between two Fr-BE-Ø males and one female of the Fr-CP line (infected by *wSuz*, collected in 2013 in Compiègne, France, and maintained since in mass population) leading to the Fr-BE-*wSuz* line (see Cattel *et al.* 2016b). The Fr-BE-Ø and Fr-BE-*wSuz* lines were maintained for respectively ~50 and 40 generations before the crossing experiments. The Fr-BE-Ø line was also the recipient for injections of *Wolbachia* strains from *D. simulans*.

*D. simulans* and *D. sukukii* lines were reared on a cornmeal diet (agar: 1%, dextrose: 8.75%, maize: 8.75%, yeast: 2%, nipagin: 3%) and maintained in an incubator at constant temperature (22°C) and humidity (50%) with a 12-hours light/dark cycle.

## CROSSING EXPERIMENTS

To analyze the *resc* function of *wSuz* in *D. simulans* we first performed mass crosses using infected females carrying *wSuz* with males infected by each of the *Wolbachia* strains available, that is, 10 different types of males (see Table S1). Freshly emerged adults were sexed and placed separately into cornmeal diet tubes to ensure the virginity of flies. Ten virgin males (3 to 5-days old) and ten virgin females (5 to 6-days old) were allowed to mate in food vials for 24h. Females were then allowed to oviposit for 48h on grape-juice agar in a petri dish. The total number of hatched and unhatched eggs was recorded 48h after removal of the females. Six such mass crosses were performed for each *Wolbachia* strain tested.

Based on the results of mass crosses, three candidate strains were identified (*wRi*, *wTei* and *wHa*). To quantify more precisely the CI relationships between *wSuz* and these candidate *Wolbachia* strains, individual crosses were performed in *D. simulans* following the same protocol except that we used only 3-days old virgin males and 5-days old virgin females

and that the egg hatch rates were estimated individually. In *D. sukuzii* it was critical, for a conservative estimate of CI level, to eliminate any case of 0% hatching that could be due to an absence of mating. We thus followed the same protocol as above but made sure that mating had taken place for all the crosses considered: mating was either observed, confirmed by the hatching of at least one egg, or by the presence of sperm in the spermathecae. We also confirmed *D. sukuzii* female's virginity before mating by placing them individually in a petri dish for egg-laying during 48h. Only 13 of the 70 females tested laid eggs, but none of them hatched, confirming the virginity of these females. For all individual crosses, at least 20 repetitions were obtained, excluding females that laid fewer than 10 eggs.

#### DNA EXTRACTION, PCR AND SEQUENCING

DNA from single whole individuals was extracted using the Nucleo Spin Tissue kit (Macherey-Nagel). The quality of the DNA extract was checked by amplifying the Internal Transcribed Spacer *ITS2* (*Its2U/Its2L*) using arthropod-specific primers (Campbell *et al.* 1993). *Wolbachia* detection was performed using *Wolbachia* specific primers for two different genes: *ftsZ*, a bacterial cell division gene (F2/R2) (Vavre *et al.* 1999), and *wsp* (*Wolbachia surface protein*) (81F/691R) (Braig *et al.* 1998). PCR reactions were performed in 25  $\mu$ L volumes containing 100  $\mu$ M dNTP, 200 nM primers, 20mM Dream Taq Green Buffer, 0.5 IU *Taq* DNA polymerase (Eurobio) and 1 $\mu$ L of DNA template. Cycling conditions were 94°C (2 min), 94°C (30 sec), 55°C (*ITS2* and *ftsZ* primers) or 52°C (*wsp* primers) (30 sec), 72°C (45 sec), 72°C (10 min) for 34 cycles. All primer sequences are indicated in Table S2. PCR products were visualized in 1% agarose gels. The *Wolbachia* strain infecting each line was verified by sequencing the *wsp* gene (2 sequences per line) (Braig *et al.* 1998).

## STATISTICAL ANALYSIS

We used generalized linear models (quasi-binomial family) and ANOVA to analyse all CI data, followed by Tukey's HSD tests for multiple comparisons. Analysis were performed in R, version 3.3.0 (R Core Team 2013).

## Results

### INJECTION AND EXPRESSION OF CI RESCUE BY *WSUZ* IN *D. SIMULANS*

The cytoplasm of *D. sukukii* embryos infected by *wSuz* was injected into 234 *D. simulans* *Wolbachia*-free embryos. Of these, 121 (~52%) reached the first instar larvae and 48 (40%) became adults (25 males and 23 females). We used these 23 G0 females to create isofemale lines and seven proved to be infected by *Wolbachia*. New isofemale lines were started from the G1 females until some lines showed perfect maternal transmission (see Fig. S1). In G1, we tested the presence of *wSuz* in 67 females and 13 proved infected (19.4%). Maternal transmission then increased rapidly, with 56 out of 104 females infected in G2 (53.8%), and 84 of 88 in G3 (95.4%) (see Fig. S1). One isofemale line with a 100% transmission (20 individuals tested) was then selected for CI tests.

CI experiments were designed to select potential *Wolbachia* strains for the sterilization of *D. sukukii* populations; in other words, strains that would induce CI even when females carry *wSuz*. To this end, we performed crosses in *D. simulans* between males infected by candidate strains with females carrying *wSuz*. Crosses between males and females both infected by *wSuz*, where the hatch rate was 97.5%, were used as a control. Among the 10 *Wolbachia* strains tested, known to induce CI in this genetic background (STCP, Martinez *et al.* 2015), hatch rates were not significantly reduced in crosses involving the *wStv*, *wPro*, *wMelCS*, *wMel* and *wTri* strains compared to the control crosses (Fig. 1). This indicates that

*wSuz* does express a functional *rescue* in *D. simulans* against these strains, and discards them as potential candidates. On the contrary, reduced hatch rates were observed in crosses involving males carrying the other strains, the lowest rate being seen with *wRi* (40,75%  $\pm$ 12,75), *wHa* (19,25%  $\pm$ 14,16) and *wTei* (13,97%  $\pm$ 10,31).

Focusing on these three promising strains, we performed individual crosses between males carrying these strains and females either uninfected (used as control) or infected with *wSuz* to characterize more precisely the rescue capabilities of *wSuz*. We thus showed that the presence of *wSuz* in females partially rescues the CI induced by *wRi* (with a 30% increase in hatch rate) ( $P < 0.001$ ) and *wTei* (with a 20% increase in hatch rate) ( $P = 0.03$ ) but not *wHa* ( $P = 0.98$ ) (Fig. 2). At that stage, *wHa* thus appeared to be the most promising strain, but we nevertheless injected all the three strains into *D. sukukii*, in case host effects would change the rescue capabilities of *wSuz* in its natural host.

#### CI EXPRESSION OF *WOLBACHIA* CANDIDATES IN *D. SUZUKII*

The cytoplasm of *wRi*, *wHa* and *wTei* infected embryos of *D. simulans* was injected into respectively 209, 207 and 200 uninfected *D. sukukii* embryos. The following hatch rates were observed in G0: ~32% for *wRi*, ~48% for *wHa*, and ~33% for *wTei* (see Table S3). We then created 12 isofemales lines for *wRi* (9 were infected), 22 for *wHa* (11 were infected) and 11 for *wTei* (6 were infected). In G1 we found that ~45% of the females were infected in the *wRi*-injected group, ~23% in the *wHa* group, and ~24% in the *wTei* group. Again, transmission rates increased rapidly in G2, reaching 100% for *wRi*, 66% for *wHa* and 97% for *wTei* (see Table S3). For each *Wolbachia* strain, one isofemale line showing a perfect transmission rate (20 individuals tested) was selected for crossing experiments.

We then performed CI crosses to assess (i) if *w*Ri, *w*Ha and *w*Tei can induce CI in *D. suzukii* (infected males crossed with uninfected females) and (ii) if *w*Suz in its natural host is able to rescue these effects. We found that *w*Ha and *w*Tei induce strong CI when infected males are crossed with uninfected females in *D. suzukii* (3.9% and 3.4% hatch rates, respectively), in contrast to *w*Ri for which hatch rates were nearly as high as in the control compatible crosses (76.78%) (Fig. 3). In addition, the low CI induced by *w*Ri is fully rescued by the presence of *w*Suz in females, while the strong CI induced by *w*Ha and *w*Tei is not. When males infected by *w*Ha were crossed with females carrying *w*Suz, in total, only 34 eggs hatched out of the 960 observed (3.54%) and in 13 of the 30 individual crosses not a single egg hatched. For the *w*Tei strain, 33 eggs hatched out of the 842 eggs laid in whole crosses (3.92%), with 0% hatch rates in 25 out of the 33 individual crosses. In two crosses, higher hatch rates (94.7% and 54.6 %) were seen, suggesting the induction of CI may occasionally fails or that occasionally some males can be uninfected even if an infection rate of 100% has always been observed in each lines used here.

## **Discussion**

This study primarily aimed at identifying *Wolbachia* candidates for the control of *D. suzukii* populations through IIT. We achieved this goal in two steps. We first transferred *w*Suz, the natural infection of *D. suzukii*, into *D. simulans* to test its ability to rescue the CI induced by the many *Wolbachia* strains maintained in *D. simulans*. We thereby selected three *Wolbachia* candidates based on incompatibility with *w*Suz, injected them into *D. suzukii*, and validated two as highly promising for the development of IIT. In the course of these experiments, we also confirmed CI patterns described previously, namely a strong host effects affecting compatibility relationships in a strain specific manner. We will first discuss these

elements, relevant to basic research, before highlighting critical future developments for the effective implementation of IIT in *D. sukukii*.

Our results confirmed the previously established picture that both bacterial and host genotypes can affect CI expression (Reynolds & Hoffmann 2002; Weeks *et al.* 2002). We found strong variation in CI intensity (*mod* function) depending on host factors: *w*Ri induces only moderate CI in *D. sukukii* although it is well known to induce strong CI in its natural host *D. simulans* (Hoffmann *et al.* 1986; O'Neill & Karr 1990; Mercot *et al.* 1995, this study), but also after transfer in *D. melanogaster* (Poinsot *et al.* 1998; but see Boyle *et al.* 1993, who found reduced CI induction by *w*Ri after transfer into *D. melanogaster*). On the contrary, *w*Tei does not induce CI in its natural host, *D. teissieri* (Zabalou *et al.* 2004a) but induces a high level of CI in both *D. sukukii* (this study) and *D. simulans* (Zabalou *et al.* 2008; Martinez *et al.* 2015; this study). Micro-injections revealed *D. sukukii* is not generally refractory to new infections (all strains injected have settled easily, reaching a high transmission rate in just a few generations) or to the expression of CI (some strains can induce high CI in this species, although its natural infection induces only moderate CI; Hamm *et al.* 2014; Cattel *et al.* 2016). To complete the picture, we tested the ability of *w*Suz to induce CI in *D. simulans*, a host generally seen as permissive to the expression of CI. We first confirmed that *w*Suz induces very low albeit significant CI in its natural host (see Fig. S2A; 63.7% hatch rate, compared with 90% in the compatible control crosses), and observed the exact same pattern in *D. simulans*, with a hatch rate of 64.2% in incompatible crosses (see Fig. S2B). It is clear from these data that a given host should not be generally considered as permissive or refractory to *Wolbachia* infection and CI, given these strong host genotype-by-*Wolbachia* strain interactions. Moreover, the analysis of the CI relationship between *w*Suz and other *Wolbachia* strains in *D. simulans* and in *D. sukukii* reveals that not only the induction of CI (*mod* function) is host dependent, but also the ability to rescue CI (*resc* function).

The second and main point of this study was to identify *Wolbachia* strains that could be used as biological control of *D. sukuzii* populations through IIT. By performing back and forth *Wolbachia* transfers between *D. sukuzii* and *D. simulans*, we identify two candidates, *wHa* and *wTei*. Indeed, these two strains induce a very high level of CI in *D. sukuzii*, which is not attenuated by the presence of *wSuz* in females. Additional experiments and developments should now be envisaged to effectively implement the control of *D. sukuzii* populations. First, additional experiments are necessary to assess if old infected males still induce a strong CI, since a reduction in CI intensity with male age has been reported in some *Drosophila* species (Yamada *et al.* 2007). Second, we need to confirm that the newly transferred *Wolbachia* strains do not reduce the males' competitiveness for access to females. Here comes a strong potential advantage of IIT over SIT since *Wolbachia* infections are usually more benign than irradiations. Nevertheless, additional investigations should be conducted in semi-field conditions to validate this critical criterion. Third, an efficient IIT program must rely on efficient methods to avoid the release of fertile females which may result in population replacement rather than population suppression (Bourtzis *et al.* 2014). Notably, the fact that the *wHa* and *wTei* strains are mutually incompatible (Zabalou *et al.* 2008) means that one strain might still be used for population control, in case of accidental release and invasion of the first strain. In *D. sukuzii*, sexing strategies may also be developed using the strong sexual dimorphism (size and spotted wing) that could be used to automatically discriminate and sort males and females. Alternatively, or as a complement, IIT can be coupled with moderate irradiation (Brelsfoard *et al.* 2009; Bourtzis *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2015) that would be sufficient to sterilize females, while the released males would suffer little reduction of competition ability and be fully sterile due to the combined effects of *Wolbachia* and irradiation (Calvitti *et al.* 2012; Bourtzis *et al.* 2014). Finally, IIT relies on the massive

production of males, which seems achievable for such a small and polyphagous insect, but requires additional developments.

We note that seasonal variations in *D. sukuzii* population size should be considered to take the full benefit of the mass release of sterile males. It has been shown that the population dynamics of *D. sukuzii* are closely related to seasonal variation in temperature, with a population peak in the spring and another in the fall, in both North America and Europe (Dalton *et al.* 2011; Tochen *et al.* 2014; Asplen *et al.* 2015; Rossi-Stacconi *et al.* 2016). As proposed by Rossi-Stacconi *et al.* (2016), IIT should be planned for late winter and early spring to achieve the highest possible ratio of released-males to resident-males. An alternative would be to use IIT in confined cultures, such as in greenhouses or orchards equipped with insect-proof nets where population densities should be limited.

Although several critical steps still need to be made to achieve the control of *D. sukuzii* populations by using IIT, the most critical challenge has been met: some *Wolbachia* strains can induce strong CI in this host, regardless of the presence of *wSuz* in females. Our experiments have led to the identification of two strong candidates, *wHa* and *wTei*, increasing the chances that at least one will pass all the remaining filters before a practical implementation.

## **Acknowledgments**

This work was funded by the CNRS (IFR41-UMR5558) and supported by the ONEMA (APR Biodiversité-Ecophyto), the ANR (ANR-15-CE21-0017-01) and the FWF (I 2604-B25). J. Cattel is the recipient of a PhD studentship from the Rhône-Alpes region (“ARC Program” Grant). We also warmly thank Yuk Sang Chan at Cambridge University, for his invaluable competence on *Wolbachia* transinfections.

## References

- Asplen MK, Anfora G, Biondi A *et al.* (2015) Invasion biology of spotted wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. *Journal of Pest Science*, **88**, 469–494.
- Atyame CM, Cattel J, Lebon C *et al.* (2015) *Wolbachia*-Based Population Control Strategy Targeting *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes Proves Efficient under Semi-Field Conditions. *Plos One*, **10**, e0119288.
- Black WC, Alphey L, James AA. (2011) Why RIDL is not SIT. *Trends in Parasitology*, **27**, 362–370.
- Boller EF, Russ K, Vallo V, Bush GL (1976) Incompatible Races of European Cherry Fruit Fly, *Rhagoletis Cerasi* (Diptera-Tephritidae), Their Origin and Potential Use in Biological-Control. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **20**, 237–247.
- Bourtzis K, Dobson SL, Xi Z *et al.* (2014) Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica*, **132**, S150–S163.
- Boyle L, O’Neill SL, Robertson HM, Karr TL (1993) Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, **260**, 1796–1799.
- Braig HR, Zhou W, Dobson SL, O’Neill SL (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Journal of bacteriology*, **180**, 2373–2378.
- Brelsfoard CL, St Clair W, Dobson SL (2009) Integration of irradiation with cytoplasmic incompatibility to facilitate a lymphatic filariasis vector elimination approach. *Parasites & vectors*, **2**, 38.
- Calabria G, Máca J, Bächli G, Serra L, Pascual M (2012) First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *Journal of Applied Entomology*, **136**, 139–147.
- Calvitti M, Moretti R, Skidmore AR, Dobson SL (2012) *Wolbachia* strain wPip yields a pattern of cytoplasmic incompatibility enhancing a *Wolbachia*-based suppression strategy against the disease vector *Aedes albopictus*. *Parasites & vectors*, **5**, 254.
- Campbell HD, Schimansky T, Claudianos C *et al.* (1993) The *Drosophila melanogaster* flightless-I gene involved in gastrulation and muscle degeneration encodes gelsolin-like and leucine-rich repeat domains and is conserved in *Caenorhabditis elegans* and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 11386–11390.
- Cattel J, Kaur R, Gibert P *et al.* (2016a) *Wolbachia* in European Populations of the Invasive Pest *Drosophila suzukii*: Regional Variation in Infection Frequencies. *Plos One*, **11**, e0147766.

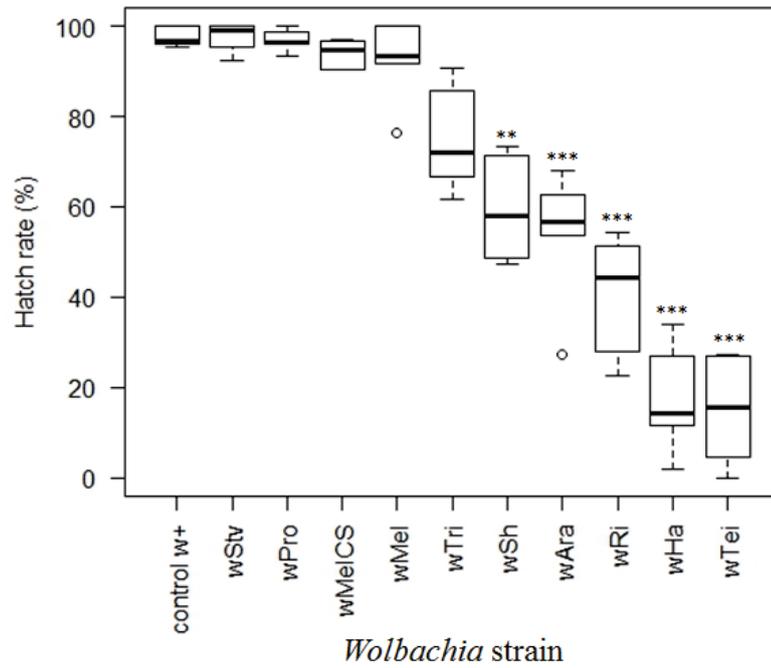
- Cattell J, Martinez J, Jiggins F, Mouton L, Gibert P (2016b) *Wolbachia*-mediated protection against viruses in the invasive pest *Drosophila suzukii*. *Insect Molecular Biology*, **00**.
- Chambers EW, Hapairai L, Peel BA, Bossin H, Dobson SL (2011) Male mating competitiveness of a *Wolbachia*-introgressed *Aedes polynesiensis* strain under semi-field conditions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **5**, 1–6.
- Cini A, Anfora G, Escudero-Colomar LA *et al.* (2014) Tracking the invasion of the alien fruit pest *Drosophila suzukii* in Europe. *Journal of Pest Science*, 559–566.
- Cini A, Ioriatti C, Anfora G (2012) A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bulletin of Insectology*, **65**, 149–160.
- Dalton DT, Walton VM, Shearer PW *et al.* (2011) Laboratory survival of *Drosophila suzukii* under simulated winter conditions of the Pacific Northwest and seasonal field trapping in five primary regions of small and stone fruit production in the United States. *Pest Management Science*, **67**, 1368–1374.
- Goodhue RE, Bolda M, Farnsworth D, Williams JC, Zalom FG (2011) Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: Economic analysis of potential revenue losses and control costs. *Pest Management Science*, **67**, 1396–1402.
- Hamby KA, Hernández A, Boundy-Mills K, Zalom FG (2012) Associations of yeasts with spotted-wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*; Diptera: Drosophilidae) in cherries and raspberries. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 4869–4873.
- Hamm CA, Begun DJ, Vo A *et al.* (2014) *Wolbachia* do not live by reproductive manipulation alone: infection polymorphism in *Drosophila suzukii* and *D. subpulchrella*. *Molecular Ecology*, **23**, 4871–4885.
- Hauser M (2011) A historic account of the invasion of *Drosophila suzukii* (Matsumura) (Diptera: Drosophilidae) in the continental United States, with remarks on their identification. *Pest Management Science*, **67**, 1352–1357.
- Hertig M (1936) The rickettsia, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp. n.) and associated inclusions in the mosquito, *Culex pipiens*. *Parasitology*, **28**, 453–486.
- Hoffmann AA, Turelli M, Simmons GM (1986) Unidirectional incompatibility between populations of *Drosophila simulans*. *Evolution*, 692–701.
- Hughes GL, Rasgon JL (2014) Transinfection: A method to investigate *Wolbachia*-host interactions and control arthropod-borne disease. *Insect Molecular Biology*, **23**, 141–151.
- Ioriatti C, Walton V, Dalton D *et al.* (2015) *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and Its Potential Impact to Wine Grapes During Harvest in Two Cool Climate Wine Grape Production Regions. *Journal of Economic Entomology*, **108**, 1148–1155.
- Knipling EF (1955) Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, **48**, 459–462.

- Laven H (1967) Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature, London*, **216**, 383–384.
- Lees RS, Gilles JRL, Hendrichs J, Vreysen MJB, Bourtzis K (2015) Back to the future: the sterile insect technique against mosquito disease vectors. *Current Opinion in Insect Science*, **10**, 156–162.
- Lindquist DA, Abusowa M, Hall MJ (1992) The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Medical and veterinary entomology*, **6**, 2–8.
- Martinez J, Longdon B, Bauer S *et al.* (2014) Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of *Wolbachia* strains. *PLoS Pathogens*, **10**, e1004369.
- Martinez J, Ok S, Smith S, Snoeck K, Day JP (2015) Should Symbionts Be Nice or Selfish? Antiviral Effects of *Wolbachia* Are Costly but Reproductive Parasitism Is Not. *PLoS Pathogens*, **11**, e1005021.
- Merçot H, Charlat S (2004) *Wolbachia* infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. *Genetica*, **120**, 51–59.
- Mercot H, Llorente B, Jacques M, Atlan A, Montchamp-Moreau C (1995) Variability within the Seychelles cytoplasmic incompatibility system in *Drosophila simulans*. *Genetics*, **141**, 1015–1023.
- Mitsui H, Takahashi KH, Kimura MT (2006) Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. *Population Ecology*, **48**, 233–237.
- Moretti R, Calvitti M (2013) Male mating performance and cytoplasmic incompatibility in a wPip *Wolbachia* trans-infected line of *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*). *Medical and Veterinary Entomology*, **27**, 377–386.
- O'Connor L, Plichart C, Sang AC *et al.* (2012) Open Release of Male Mosquitoes Infected with a *Wolbachia* Biopesticide: Field Performance and Infection Containment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, e1797.
- O'Neill SL, Karr TL (1990) Bidirectional incompatibility between conspecific populations of *Drosophila simulans*. *Nature*, **348**, 178–180.
- 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 Society of America*, **150**, 227–237.
- Poyet M, Le Roux V, Gibert P *et al.* (2015) The Wide Potential Trophic Niche of the Asiatic Fruit Fly *Drosophila suzukii*: The Key of Its Invasion Success in Temperate Europe? *PloS one*, **10**, e0142785.

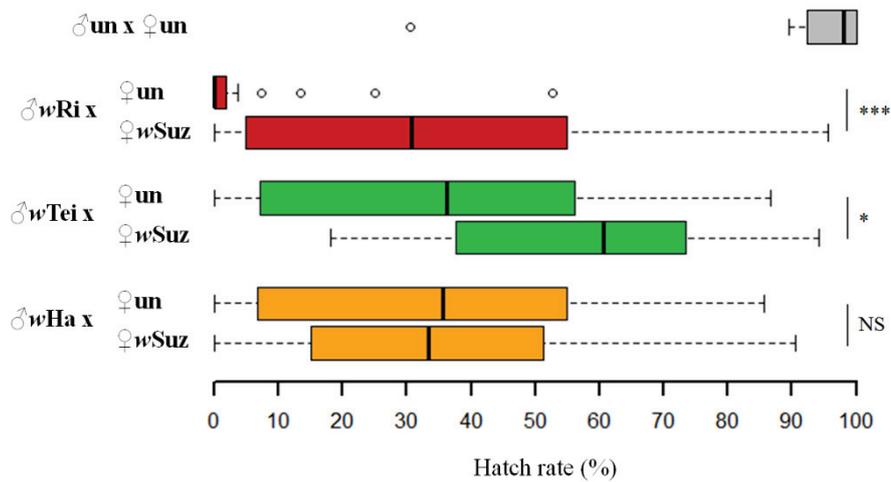
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013.
- Reynolds KT, Hoffmann AA (2002) Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted *Wolbachia*. *Genetical research*, **80**, 79–87.
- Riegler M, Stauffer C (2002) *Wolbachia* infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, **11**, 2425–2434.
- Rossi Stacconi MV, Grassi A, Dalton DT *et al.* (2013) First field records of *Pachycrepoideus vindemiae* as a parasitoid of *Drosophila suzukii* in European and Oregon small fruit production areas. *Entomologia*, **1**, 11–16.
- Rossi-Stacconi MV, Kaur R, Mazzoni V *et al.* (2016) Multiple lines of evidence for reproductive winter diapause in the invasive pest *Drosophila suzukii*: useful clues for control strategies. *Journal of Pest Science*.
- Tochen S, Dalton DT, Wiman N *et al.* (2014) Temperature-Related Development and Population Parameters for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on Cherry and Blueberry. *Environmental Entomology*, **43**, 501–510.
- Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Boulétreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular biology and evolution*, **16**, 1711–1723.
- Veneti Z, Zabalou S, Papafotiou G *et al.* (2012) Loss of reproductive parasitism following transfer of male-killing *Wolbachia* to *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Heredity*, **109**, 306–312.
- Walsh DB, Bolda MP, Goodhue RE *et al.* (2011) *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive Pest of Ripening Soft Fruit Expanding its Geographic Range and Damage Potential. *Journal of Integrated Pest Management*, **2**, 1–7.
- Weeks AR, Tracy Reynolds K, Hoffmann AA. (2002) *Wolbachia* dynamics and host effects: What has (and has not) been demonstrated? *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 257–262.
- Werren JH (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annual review of entomology*, **42**, 587–609.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature reviews. Microbiology*, **6**, 741–751.
- Weydert C, Mandrin JF (2013) Le ravageur *Drosophila suzukii*. *Point sur la situation en arboriculture fruitière et petits fruits. Infos CTIFL*, **279**, 45–52.
- Yamada R, Floate KD, Riegler M, O'Neill SL (2007) Male development time influences the strength of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **177**, 801–808.

- Zabalou S, Apostolaki A, Pattas S *et al.* (2008) Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain. *Genetics*, **178**, 2145–2160.
- Zabalou S, Charlat S, Nirgianaki A *et al.* (2004a) Natural *Wolbachia* infections in the *Drosophila yakuba* species complex do not induce cytoplasmic incompatibility but fully rescue the wRi modification. *Genetics*, **167**, 827–834.
- Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M *et al.* (2004b) *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 15042–15045.
- Zhang D, Zheng X, Xi Z, Bourtzis K, Gilles JRL (2015) Combining the sterile insect technique with the incompatible insect technique: I-impact of *Wolbachia* infection on the fitness of triple- and double-infected strains of *Aedes albopictus*. *PLoS ONE*, **10**, 1–13.

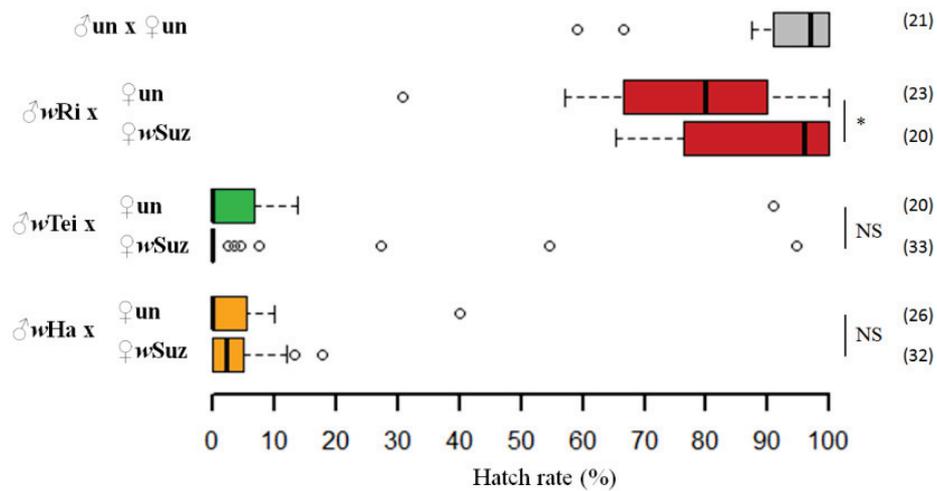
## Figures



**Fig .1.** Hatch rates after mass crosses in *D. simulans* between infected males (*Wolbachia* strains named on the horizontal axis) and females infected by *wSuz*. “Control w+” corresponds to mass crosses between males and females infected by *wSuz*. Tukey’s HSD tests were performed for multiple comparisons with the control crosses. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .



**Fig .2.** Assessment of the *resc* capabilities of *wSuz* in *D. simulans*. The *wRi*, *wHa* and *wTei* strains induce CI even in the presence of *wSuz* in females (hatch rates are reduced in comparison with the “♂unx♀un” involving only uninfected individuals). However, partial rescue is detected with *wRi* and *wTei* (hatch rates are significantly increased by the presence of *wSuz* in females) but not with *wHa*. ♂un: uninfected males, ♀un: uninfected females. 20 repetitions were performed for each type of cross.



**Fig .3.** Measure of the *mod* function of *wRi*, *wHa* and *wTei* and the *resc* function of *wSuz* in *D. sukukii*. The *wRi* strain induces virtually no CI in this background. On the contrary, *wHa* and *wTei* induce nearly complete CI, regardless of the presence of *wSuz* in females. ♂un: uninfected males, ♀un: uninfected females.

### Supporting information

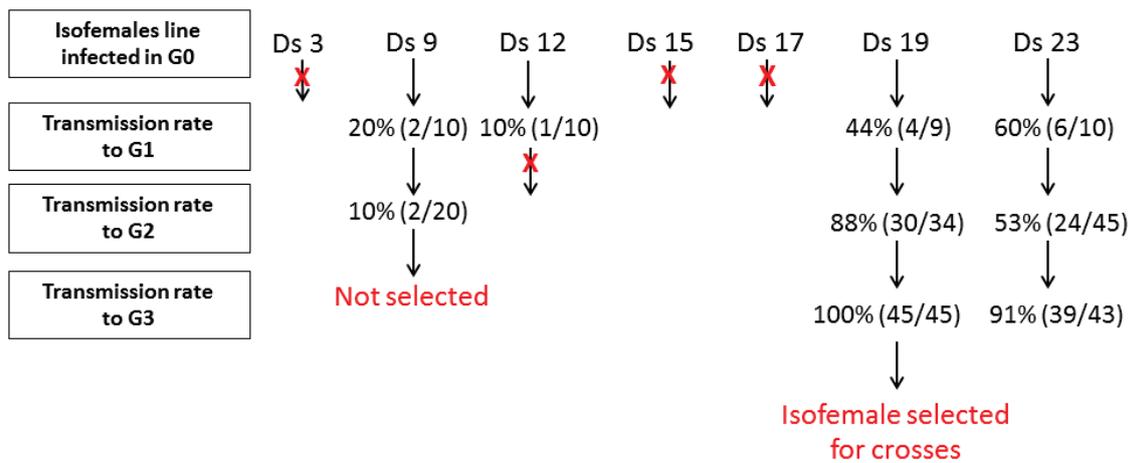
**Table S1.** Details of all *D. simulans* lines used in this study

**Table S2.** Primers used in this study

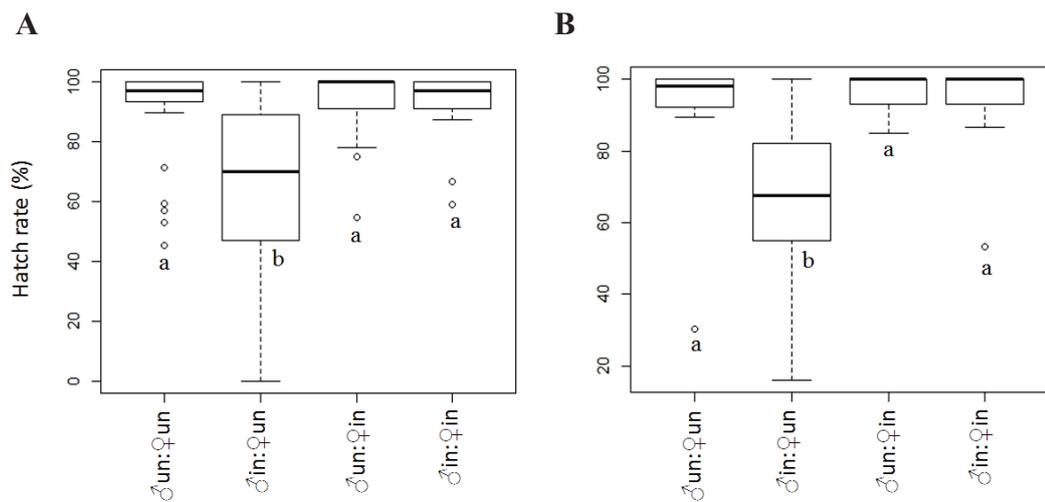
**Table S3.** Data of microinjections and maternal transmission of *D. sukukii*

**Fig. S1.** Details of the transmission rate of *wSuz* in *D. simulans*

**Fig. S2.** *wSuz* induced moderate CI both *D. sukukii* and *D. simulans*



**Fig S1.** Details of the transmission rate of *wSuz* in each isofemales lines infected in G0 after transinfection. Ds: *Drosophila simulans*. Red cross indicates that the *Wolbachia* infection had been lost from one generation to another.



**Fig S2.** *w*Suz induced moderate CI in both *D. sukukii* (A) and *D. simulans* (B).

Hatch rates are close to 100% in all crosses except those between infected males and uninfected females, where a 30% reduction is observed. in:in (infected males: infected females); in:un (infected males: uninfected females); un:in (uninfected males: infected females); un:un (uninfected males: uninfected females). One-way ANOVA was followed by Tukey's test for multiple comparisons.

**Table S1.** Details of all *D. simulans* lines used in this study

Lines	Original host species, line	<i>Wolbachia</i> strain
STCP (wAra) <sup>a,c</sup>	<i>D. arawakana</i> , 15182-2260.00 <sup>g</sup>	wAra
STCP (wMelCS) <sup>a,c</sup>	<i>D. melanogaster</i> , DrosDel w <sup>1118</sup> iso <sup>h</sup>	wMelCS
SCTP (wMel), KB179 <sup>a,d</sup>	<i>D. melanogaster</i> , KB101 <sup>d</sup>	wMel
STCP (wPro) <sup>a,c</sup>	<i>D. prosaltans</i> , WM0019 <sup>c</sup>	wPro
STCP (wSh) <sup>a,c</sup>	<i>D. sechellia</i> , 14021-0248.08 <sup>g</sup>	wSh
STCP (wHa), KB178 <sup>b,e</sup>	<i>D. simulans</i> , KB29 <sup>e</sup>	wHa
STCP (wStv) <sup>a,c</sup>	<i>D. sturtevantii</i> , 14043-0871.10 <sup>g</sup>	wStv
STCP (wTei), KB156 <sup>a,e</sup>	<i>D. teissieri</i> , 0257.0 <sup>e</sup>	wTei
STCP (wTri) <sup>a,c</sup>	<i>D. triauraria</i> , 14028-0651.00 <sup>g</sup>	wTri
STCP (wSuz) <sup>a,f</sup>	<i>D. sukuzii</i>	wSuz
Dsim 3 Af sud (wRi) <sup>f</sup>	<i>D. simulans</i>	wRi
STCP (Ø), KB171 <sup>d,e</sup>	<i>D. simulans</i>	uninfected

<sup>a</sup> microinjected lines

<sup>b</sup> introgressed lines

<sup>c</sup> (Martinez et al. 2014)

<sup>d</sup> (Poinsot et al., 1998)

<sup>e</sup> (Zabalou et al., 2008)

<sup>f</sup> this study

<sup>g</sup> (Mateos et al., 2006; San Diego Drosophila Species Stock Center)

<sup>h</sup> (Chrostek et al., 2013)

Table S2. Primers used in this study

Gene target	Primer name	Sequence (5'-3')	Fragment size (bp)	Annealing temperature (°C)
<i>wsp</i>	81F	TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC	610	52
	691R	AAAAATTAAACGCTACTCCA		
<i>ftsZ</i>	ftsZ-F2	TTGCAGAGCTTGGACTTGAA	480	55
	ftsZ-R2	CATATCTCCGCCACCAGTAA		
<i>Its2</i>	Its2U	TGTGAACTGCAGGACACATG	500	55
	Its2L	AATGCTTAAATTTAGGGGGTA		

Table S3. Data of microinjections and maternal transmission of *wRi*, *wHa* and *wTei* into *D. suzukii*

Donor		Recipient		
<i>D. simulans</i>		<i>D. suzukii</i> ( <i>wRi</i> )	<i>D. suzukii</i> ( <i>wHa</i> )	<i>D. suzukii</i> ( <i>wTei</i> )
G0	Injected embryos	209	207	200
	Hatched	66 (31.6%)	99 (47.8%)	65 (32.5%)
	Emerged	27 (12.9%) (15♂-12♀)	42 (20.3%) (20♂-22♀)	21 (10.5%) (10♂-11♀)
	Infected	9/12 (75%)	11/22 (50%)	6/11 (54.5%)
G1	Infected	32/71 (45.1%)	16/70 (22.9%)	15/63 (23.8%)
G2	Infected	85/85 (100.0%)	46/70 (65.7%)	74/76 (97.4%)

## Discussion

Les résultats présentés dans ce chapitre constituent le cœur des travaux de recherche de cette thèse. Initiés en décembre 2013 ils n'ont été finalisés qu'à la fin de l'année 2015. Le transfert de *wSuz* chez *D. simulans* nous a d'abord permis de faire un tri important parmi l'ensemble des souches de *Wolbachia* à notre disposition et connues pour induire de l'IC. Les transferts de *Wolbachia*, qui consistent à réaliser des microinjections dans des œufs, sont des expériences délicates car elles induisent des taux de mortalité très élevés et demandent un nombre de répétitions très important. L'existence d'une telle diversité de *Wolbachia* chez une même espèce a donc été un avantage majeur dans le cadre de cette thèse. Elle nous a permis d'analyser les relations d'IC entre *wSuz* et 10 autres souches en réalisant seulement un seul transfert de souche, *wSuz* vers *D. simulans*. De plus, le fait que toutes ces souches étaient déjà présentes chez *D. simulans* nous a évité d'avoir à manipuler et élever d'autres espèces porteuses de souches de *Wolbachia* potentiellement intéressantes. Les croisements réalisés chez *D. simulans* nous ont permis d'identifier 3 souches candidates.

Les transferts de *wRi*, *wHa* et *wTei* chez *D. sukukii* nous ont permis d'identifier et de retenir deux souches de *Wolbachia* candidates pour le développement de la TII chez ce ravageur, à savoir *wHa* et *wTei*. Les associations entre ces deux souches de *Wolbachia* et *D. sukukii* répondent parfaitement aux paramètres requis pour le développement de la TII. Premièrement, ces deux souches sont transmises parfaitement à la descendance. Deuxièmement, ces souches induisent un taux d'IC très élevé chez *D. sukukii*, avec un taux d'éclosion moyen de 3% lors de croisements entre mâles stérilisants et femelles non infectées ou infectées par *wSuz*. Enfin, nous avons montré que *wSuz*, dans son hôte naturel, n'était pas capable de sauver l'IC induite par *wHa* et *wTei*, ce qui a confirmé la possibilité d'exploiter ces souches pour le développement de la TII.

En plus de son intérêt pour la mise en place de la TII, le transfert de *wSuz* chez *D. simulans* nous a permis de tester si cette souche pouvait induire de l'IC après transfert dans un nouvel hôte. Nous avons observé une réduction de 30% du taux d'éclosion lors de croisements entre mâles infectés par *wSuz* et des femelles non infectées chez *D. simulans*.

Parallèlement, nous avons montré que dans les mêmes conditions expérimentales, *wSuz* induisait également 30% d'IC dans son hôte naturel, *D. sukukii*. Même si ce taux d'IC est relativement faible comparé à d'autres systèmes, la souche *wSuz*, en plus de conférer une protection à son hôte, peut manipuler sa reproduction.



Le mutualisme et la manipulation de la reproduction ne sont pas des phénotypes exclusifs et, dans un même hôte, un même symbiote peut en être responsable (Himler *et al.* 2011). Martinez *et al.* (2015) ont mesuré l'expression de ces phénotypes protecteurs et manipulateurs chez 16 souches de *Wolbachia* différentes dans un même fond génétique chez *D. simulans*. Parmi ces souches, 4 induisaient exclusivement un phénotype protecteur, 2 un phénotype manipulateur, 8 souches procuraient les deux phénotypes, et 2 souches aucun de ces deux phénotypes (mais induisaient une augmentation de la fécondité). Ainsi, ces résultats soulignaient la complexité de catégoriser une souche de *Wolbachia* par l'expression du phénotype associé à son infection, tant il est hôte dépendant et peut varier selon les conditions environnementales.

Cette étude nous a permis de valider la première étape du processus de développement de la TII chez *D. sukii*. Cependant, en plus d'induire un taux de stérilisation très élevé, il est indispensable de tester si la souche de *Wolbachia* nouvellement introduite n'affecte pas les traits d'histoires de vie des lignées transinfectées, notamment la survie et la compétitivité sexuelle des mâles stérilisants. C'est ce que nous avons cherché à vérifier dans la suite de ce travail de thèse (chapitre 4).



## **Chapitre 4: Etude de la compétitivité des mâles stérilisants et des traits d'histoire de vie des lignées transinfectées**



## Introduction

L'injection de différentes souches de *Wolbachia* chez *D. sukuzii* ainsi que l'étude de l'expression de la fonction *resc* de *wSuz* dans son hôte naturel nous a permis de sélectionner deux souches candidates pour le développement de la TII, *wHa* et *wTei*. Pour que celle-ci soit efficace il est indispensable que les mâles stérilisants: (1) induisent un taux d'IC très élevé et (2) aient une compétitivité similaire à celle des mâles sauvages afin qu'ils stérilisent efficacement le plus grand nombre de femelles et ce le plus longtemps possible. Le premier point a été validé dans le chapitre 3 dans lequel nous avons mis en évidence que les mâles stérilisants âgés de 3 jours induisaient un taux d'IC proche de 100%. Cependant, plusieurs articles rapportent qu'il existe une corrélation positive entre l'intensité de l'IC et la densité bactérienne dans les spermatozoïdes (Clancy & Hoffmann 1998; Veneti *et al.* 2003, 2004) et que la densité peut diminuer au cours de la vie du mâle, diminuant ainsi l'intensité de l'IC (Karr *et al.* 1998; Reynolds & Hoffmann 2002; Awrahman *et al.* 2014). Pour l'application de la TII, une forte diminution de l'IC avec l'âge des mâles stérilisants serait un problème majeur. En effet, si les mâles lâchés devenaient rapidement majoritairement fertiles, ils rentreraient directement en compétition avec les mâles stériles et cela augmenterait le nombre de partenaires sexuels disponibles et fertiles pour les femelles.

Le second point crucial est la compétitivité des mâles stérilisants qui se traduit par leur capacité à accéder à la reproduction et à survivre le plus longtemps possible. Ces paramètres vont directement dépendre des conséquences physiologiques liées à la présence des *Wolbachia* exogènes nouvellement introduites dans l'espèce cible. De nombreuses études rapportent que *Wolbachia* peut diminuer la fitness de son hôte en terme de survie, de fécondité, de taux d'éclosion, de développement larvaire et de compétitivité sexuelle et que ces coûts varient selon les génotypes hôtes, bactériens, et selon les conditions environnementales (Turelli 1994; Min & Benzer 1997; Weeks *et al.* 2007; Gavotte *et al.* 2010; McMeniman & O'Neill 2010; Almeida *et al.* 2011; Yeap *et al.* 2011; Suh & Dobson 2013; Turley *et al.* 2013; Hoffmann *et al.* 2014; Joshi *et al.* 2014). De tels coûts pourraient nuire à l'efficacité de la TII, que ce soit à travers une diminution de la compétitivité des mâles ou par des effets négatifs qui peuvent compromettre l'élevage et la production en masse de l'insecte.



L'objectif de ce chapitre était de mesurer plusieurs traits d'histoire de vie sur les mâles et les femelles transinfectés pour savoir s'il était réellement envisageable d'utiliser cette technique pour lutter contre les populations de *D. sukuzii*. De plus, comme deux souches de *Wolbachia* ont été identifiées comme candidates, le but était également de savoir si une des deux pouvait être plus intéressante que l'autre pour la suite du projet de développement de la TII.

Dans un premier temps, nous avons testé si les *Wolbachia* exogènes n'étaient pas trop coûteuses physiologiquement pour leurs hôtes. Pour cela nous avons mesuré, chez des individus infectés par *wHa* et *wTei*, plusieurs traits d'histoire de vie comme la survie, la fécondité, le taux d'éclosion des œufs et le succès de développement de l'œuf à l'adulte.

Dans un second temps, l'objectif était d'étudier l'évolution du taux d'IC induit par les mâles *wHa* et *wTei* au cours de leur vie.

Ensuite, nous avons mesuré la compétitivité sexuelle des mâles stérilisants, expérience qui, par manque de temps, n'a été réalisée que pour les mâles infectés par *wHa*.

Enfin, nous avons mis en place un plan d'évolution expérimentale afin de simuler la TII et de tester l'effet de lâchers réguliers de mâles stérilisants infectés par *wHa* sur la dynamique des populations en enceinte climatique.

## Matériel & Méthodes

### *Mesures de traits d'histoire de vie*

Les mesures de traits d'histoire de vie ont été réalisées sur quatre lignées de *D. sukuzii* génétiquement homogènes: non infectées ( $\emptyset$ ), infectées par *wSuz*, *wHa* ou *wTei*. Ces lignées ont été maintenues à 22°C et 50% d'humidité. Concernant les moyens mis en œuvre pour l'obtention de ces différentes lignées dans un même fond génétique, voir la partie matériel et méthodes des articles 2 et 3. Les conditions de développement larvaire des individus utilisés pour la mesure des traits d'histoire de vie ont été standardisées. 50 œufs de chacune des lignées ont été déposés sur une cape de milieu d'élevage classique (2mL) insérée dans un tube contenant du milieu gélosé sucré (10%). Les émergents ont ensuite été utilisés pour les différentes mesures. Au moins 12 tubes de 50 œufs ont été réalisés par lignée.



Puisqu'il existe un polymorphisme d'infection par *Wolbachia* dans les populations de *D. sukii*, l'ensemble des traits d'histoires de vie mesurés sur les lignées transinfectées ont été comparés à ceux des lignées non infectées mais également infectées par *wSuz*.

### *Longévité*

La longévité a été mesurée sur les deux sexes. 10 mâles et 10 femelles vierges ont été placés séparément dans des tubes gélosés sucrés (10%) juste après leur émergence. Cela a été répété 10 fois par sexe, représentant 200 individus par lignée (100 mâles et 100 femelles). Les individus ont été gardés dans les mêmes tubes tout au long de l'expérience et les mesures de survie ont été effectuées quotidiennement.

### *Fécondité & Taux d'éclosion*

10 femelles et 10 mâles vierges ont été placés juste après leur émergence dans des tubes contenant du milieu d'élevage (le même que celui utilisé pour l'accomplissement du cycle de développement) pendant 48h pour l'accouplement. Les femelles ont ensuite été mise individuellement dans des boîtes de pétri contenant du milieu gélosé à base de jus de raisin durant 48h pour la ponte. Le nombre d'œufs et le taux d'éclosion ont été comptabilisés 36h après. Au moins 18 répétitions ont été effectuées par lignée.

### *Survie pré-imaginale et mesure du Sex-ratio*

Tous les individus qui ont émergés des tubes ont été comptés et sexés. Cela nous a permis de calculer un taux de survie du stade œuf à l'adulte, tous sexes confondus, mais également d'avoir le nombre d'émergents par sexe. Une mesure de la sex-ratio par lignée a également pu être réalisée.

### *Effet de l'âge des mâles stérilisants sur l'intensité de l'IC*

Pour analyser l'effet de l'âge des mâles sur l'intensité de l'IC des croisements en masse ont été réalisés. Les mâles et les femelles fraîchement éclos ont été séparés et placés dans des tubes de milieu classique d'élevage (le même que celui utilisé dans les expériences



**Fig 8.** Cage à population utilisée pour la mesure de la compétitivité des mâles stérilisants.

précédentes) jusqu'à atteindre l'âge nécessaire pour les croisements. 10 femelles vierges âgées de 5-6 jours ont été placées dans des boîtes de ponte (Genesee Scientific, « embryo collection cage-small ») avec 10 mâles vierges âgés de 3-4 j, 7-8j ou 11-12j et ce pendant 48h avec, à disposition, du milieu classique d'élevage. Après 48h la boîte de pétri contenant le milieu d'élevage a été remplacée par une boîte de pétri contenant le milieu gélosé à base de jus de raisin pour permettre la ponte pendant 48h. Puis 36h après, le nombre d'œufs et le taux d'éclosion ont été comptabilisés. Pour chaque âge testé, 6 répétitions ont été réalisées. L'effet de l'âge des mâles sur l'intensité de l'IC a été testé chez les mâles infectés par *wHa* et *wTei* avec des femelles infectées ou non par *wSuz*. De plus, des croisements contrôles (mâles et femelles non infectés et mâles et femelles infectés par *wSuz*) ont été effectués pour mesurer l'effet de l'âge sur le taux d'éclosion indépendamment de l'effet de l'IC. Au total 96 croisements en masse ont été effectués.

#### *Mesure de la compétitivité sexuelle des mâles stérilisants*

L'objectif de cette expérience a été de confronter les mâles stérilisants infectés par *wHa* et les mâles infectés ou non par *wSuz* afin d'évaluer leur compétitivité sexuelle. Le taux d'éclosion des œufs a été utilisé comme un proxy pour mesurer cette compétitivité. En effet, si le taux d'éclosion est de 0% dans les croisements incompatibles, et de 100% dans les croisements compatibles, lorsque les deux types de mâles sont en même proportions, le taux d'éclosion attendu sous l'hypothèse d'une compétitivité sexuelle similaire est de 50%. Ces expériences ont été réalisées dans des cages à populations (30x30x30cm) (Fig 8) à 22°C, 50% d'humidité et une photopériode de 12h. Chaque cage contenait un nombre constant de femelles vierges âgées de 5-6 jours (soit infectées par *wSuz* ou non infectées) plus un nombre constant de mâles (vierges et âgés de 3-4 jours) mais avec des proportions différentes selon les statuts d'infection. Ainsi, différents ratio ont été testés: 0:1:1 (0♂*wHa*:40♂ø:40♀ø) ; 1:1:1 (20♂*wHa*:20♂ø:40♀ø) ; 5:1:1 (35♂*wHa*:7♂ø:40♀ø) ; 10:1:1 (40♂*wHa*:4♂ø:40♀ø) ; et 1:0:1 (40♂*wHa*:0♂ø:40♀ø). Ces 5 ratios ont aussi été testés en confrontant les mâles infectés par *wHa* avec des mâles et des femelles infectées par *wSuz*. Chaque ratio a été répété 4 fois, représentant au total 20 cages à populations.

Dans chacune des cages, les mâles et les femelles vierges ont été introduits simultanément pour une période de 48h afin de permettre l'accouplement. Chacune des cages contenait 2 pots de milieu classique d'élevage (50mL) et deux sources d'eau sucrée à 5% (50mL).



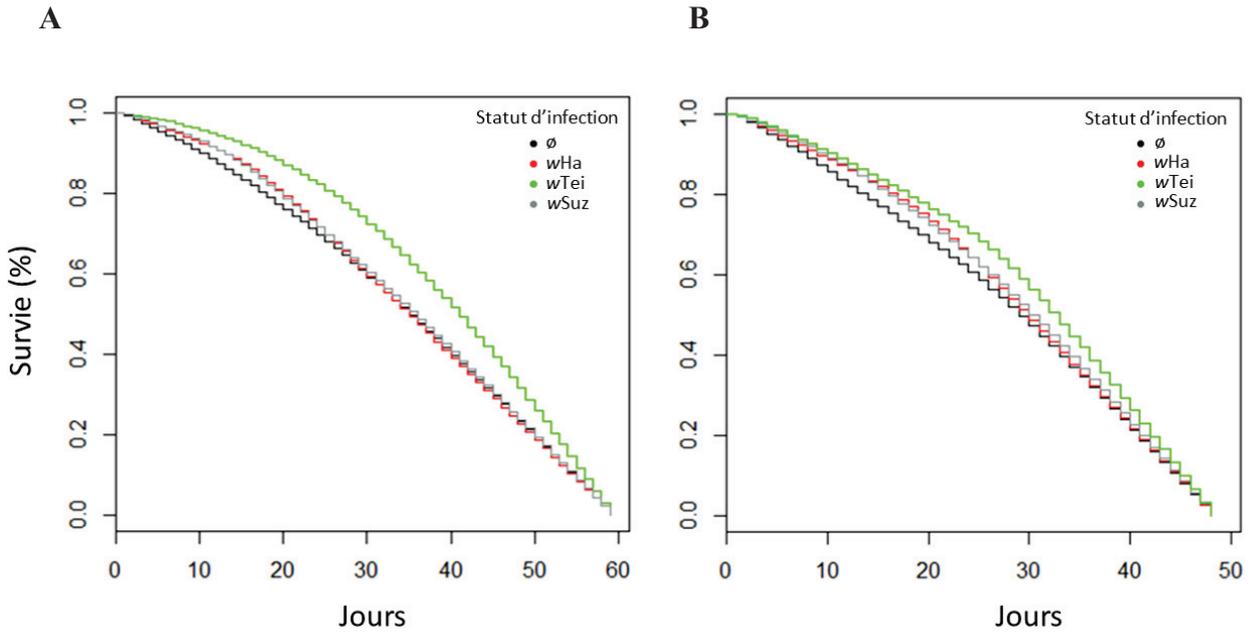
**Fig 9.** Cage à population utilisée pour l'évaluation de l'efficacité de la TII en enceinte climatique.

Deux boîtes de pétri (ø5.5 cm) de milieu gélosé sucré à base de jus de raisin ont ensuite été déposées dans la cage pour permettre la ponte durant 48h puis de nouveaux milieux de ponte ont été introduits 48h après, permettant d'obtenir des données sur les taux d'éclosion durant 4 jours. Les boîtes de ponte ont été conservées dans les mêmes conditions que celle utilisées pour l'expérimentation (22°C et 50% d'humidité) et le nombre d'œufs et les taux d'éclosion ont été mesurés 36h plus tard.

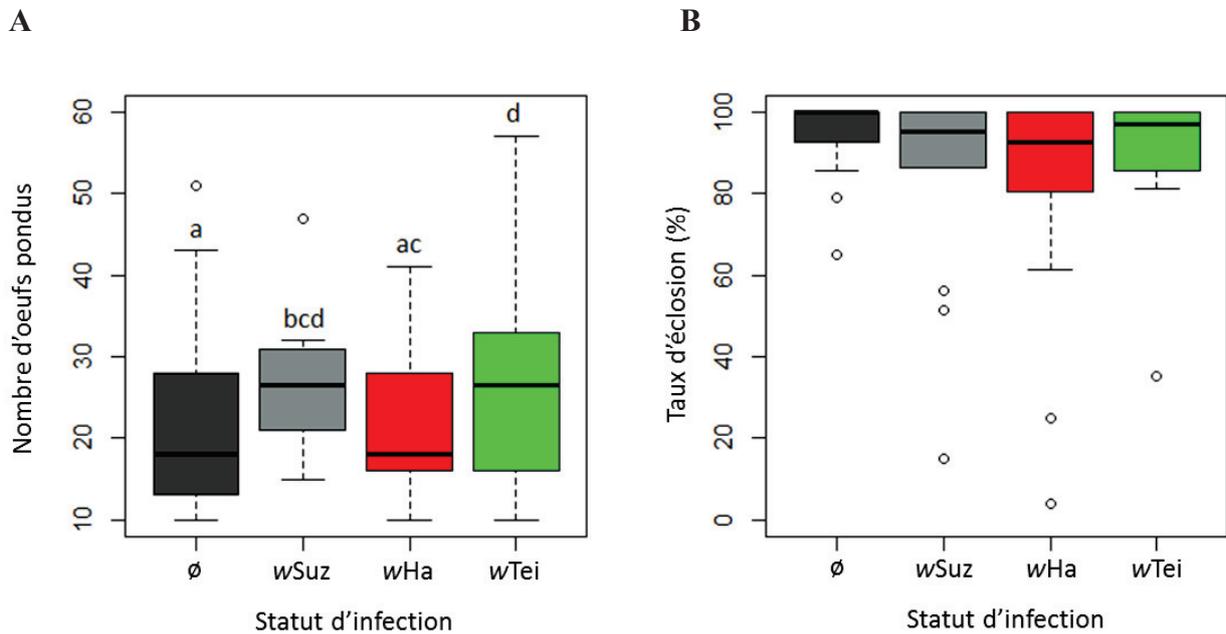
### *Evaluation de l'efficacité de la TII en enceinte climatique*

L'objectif de cette expérience était de simuler la TII dans des grandes cages placées dans des enceintes climatiques permettant de contrôler la température, l'humidité et la luminosité. La TII peut être utilisée pour diminuer la taille des populations mais également pour limiter l'introduction et l'explosion démographique d'une population et c'est ce dernier point qui a été examiné ici. Seule l'utilisation des mâles infectés par *wHa* a été évaluée dans cette expérience. Deux cages identiques de 3x3x2m (Fig 9) ont été placées séparément dans des enceintes climatiques aux conditions similaires, à savoir 22°C, 70% d'humidité et une photopériode de 12h. Dans chacune des cages ont été placées 6 bouteilles de 1L contenant 200 ml de milieu fruit rouge (mélange de fruits rouges: 50%, agar: 2.6%, levure: 12%, farine de maïs: 18%, sucre: 17%, nipagine: 0.4%) et 10 bouteilles (10 cl) d'eau sucrée à 5%. Dans la cage contrôle 20 femelles fécondées (10 non infectées et 10 infectées par *wSuz*) et 20 mâles (10 non infectés et 10 infectés par *wSuz*) âgés de 4 à 6 jours ont été introduits au début de l'expérimentation. Puis, tous les 7 jours, 20 femelles et 20 mâles (avec les mêmes proportions d'individus infectés ou non) ont été introduits dans la cage. Dans la cage « TII » la même procédure expérimentale a été réalisée sauf qu'en plus des 40 individus lâchés, 260 mâles stérilisants, infectés par *wHa* et âgés de 2 à 6 jours, étaient injectés dans la cage. Ainsi, un lâcher de mâles avec un ratio de 13:1 (260♂*wHa* : 20♂ (10♂*ø*+10♂*wSuz*)) a été réalisé chaque semaine. Le nombre de mâles stérilisants lâchés a été choisi en fonction de notre capacité à produire chaque semaine une quantité stable de mâles.

L'expérimentation a duré 62 jours, soit 9 semaines environ, ce qui correspond à 360 individus lâchés dans la cage contrôle et 2700 dans la cage « TII » (dont 2340 mâles stérilisants). L'objectif a été d'évaluer l'évolution de la taille des populations au cours du temps. Pour cela 6 sites de pontes (boîtes de pétri contenant du milieu gélosé à base du jus de raisin de taille 9cm) ont été introduits dans chaque cage 3 fois par semaine, sachant que chaque site était laissé 48h dans la cage.



**Fig 10.** Courbe de survie des individus infectés par wHa, wTei, wSuz ou non infectés. A: femelles. B: mâles. Pour chaque sexe et chaque lignée, la survie a été mesurée quotidiennement sur 10 tubes de 10 individus (N=100).



**Fig 11.** Fécondité (A) et taux d'éclosion (B) des œufs mesurés sur les lignées transinfectées par wHa et wTei et infectées ou non par wSuz.

Le nombre d'œufs pondus a été utilisé comme un proxy de la taille de la population. De plus le taux d'éclosion a pu être déterminé sur chacun des sites de ponte. Ainsi 26 relevés par cage ont pu être réalisés tout au long de l'expérience. A la fin de l'expérimentation tous les individus vivants ont été capturés et comptés.

## Résultats

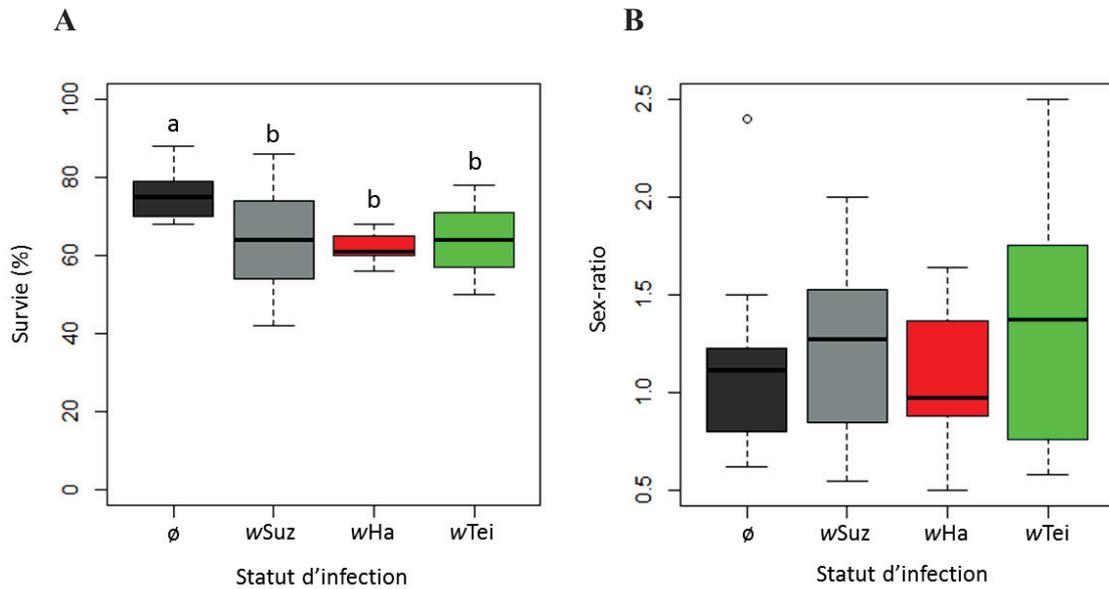
### *Mesure de traits d'histoire de vie des lignées transinfectées*

#### *Longévité*

La survie des mâles et des femelles transinfectées par *wHa* et *wTei* a été comparée à celles d'individus infectés et non infectés par *wSuz*. De façon générale, un effet significatif du statut d'infection a été observé sur la survie des adultes chez les femelles et chez les mâles (Régression paramétrique de modèle de survie, ♀:  $F=121.94$ ,  $d.f=3$ ,  $P<0.001$  ; ♂:  $F=38.97$ ,  $d.f=3$ ,  $P<0.001$ ): les individus infectés par *wTei* ont une survie significativement plus importante que l'ensemble des autres lignées (Fig 10A et 10B). Chez les femelles il n'existe aucune différence significative entre les trois autres lignées (individus non infectés, infectés par *wSuz* ou *wHa* (Fig 10A)) alors que chez les mâles, les individus infectés par *wSuz* ont une survie significativement supérieure à celle des individus non infectés ( $P=0.016$ ) (Fig 10B).

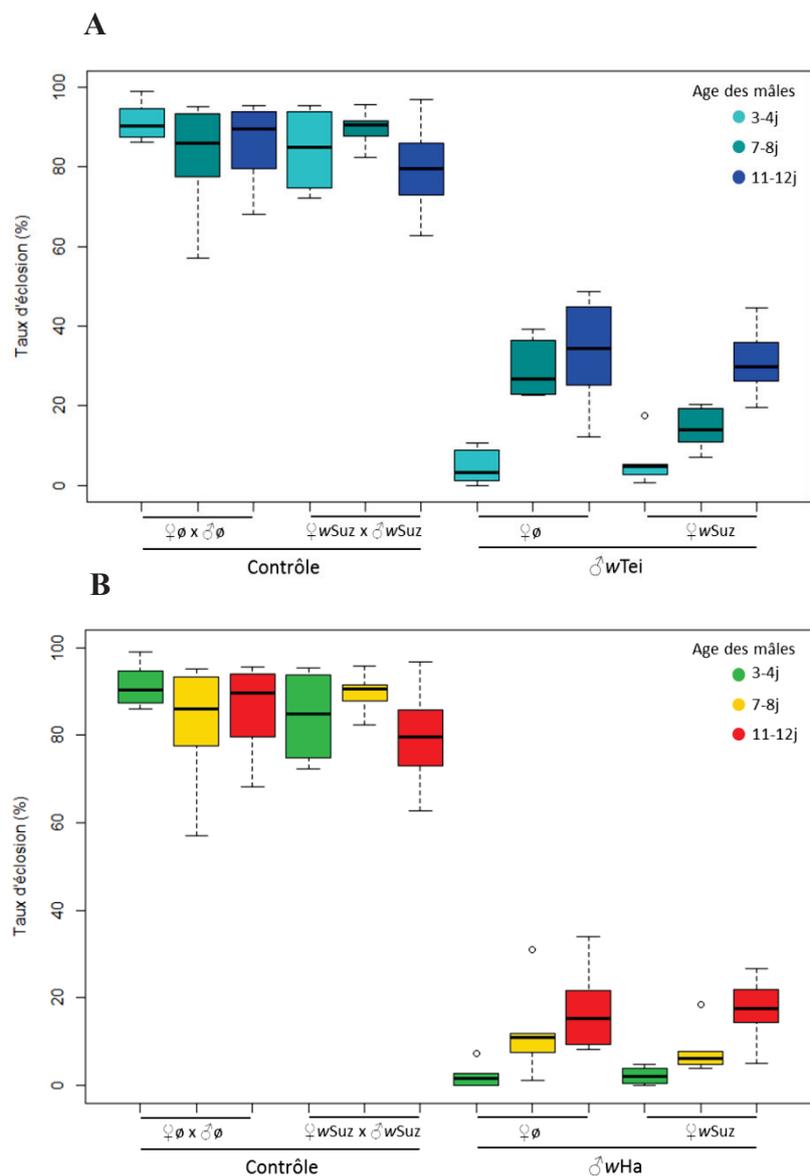
#### *Fécondité & Taux d'éclosion*

Le nombre d'œufs pondus par femelle pendant 48h est en moyenne de 21.15 ( $\pm 10.82$ ) pour les femelles non infectées ( $\emptyset$ ), 26.21 ( $\pm 8.17$ ) pour les femelles *wSuz*, 22.29 ( $\pm 9.14$ ) pour *wHa* et 26.39 ( $\pm 12.03$ ) pour *wTei*. Il existe un effet significatif du statut d'infection des femelles sur le nombre d'œufs pondus (ANOVA,  $F=286.39$ ,  $d.f=3$ ,  $P<0.001$ ), avec une fécondité significativement supérieure des femelles *wTei* comparée à celles des femelles  $\emptyset$  et *wHa* (Fig 11A). Aucun effet significatif du statut d'infection sur les taux d'éclosion n'a été observé (Fig 11B). Les taux d'éclosion obtenus pour les différentes lignées sont tous compris entre 80 et 100%, avec 94.59% ( $\pm 9.14$ ) pour la lignée  $\emptyset$ , 83.83% ( $\pm 25.36$ ) pour *wSuz*, 83.31% pour *wHa* ( $\pm 25.50$ ) et 91.33% ( $\pm 15.59$ ) pour *wTei*.



**Fig 12.** Taux de survie du stade œuf à l'adulte (A) et Sex-ratio des émergents (B) mesurés sur les lignées transinfectées et infectées ou non par *wSuz*.

**Fig 13.** Mesure du taux d'éclosion des œufs en fonction de l'âge des mâles infectés par *wTei* (A) et *wHa* (B) lors de croisements avec des femelles infectées ou non par *wSuz*. Pour chaque type de croisement, trois âges de mâles ont été testés : 3-4, 7-8 et 11-12 jours. Les croisements contrôles correspondent à des croisements entre individus non infectés ou infectés par *wSuz*. Chaque croisement correspond à des croisements en masse (10♂x10♀) et 6 répétitions ont été réalisées par type de croisement.



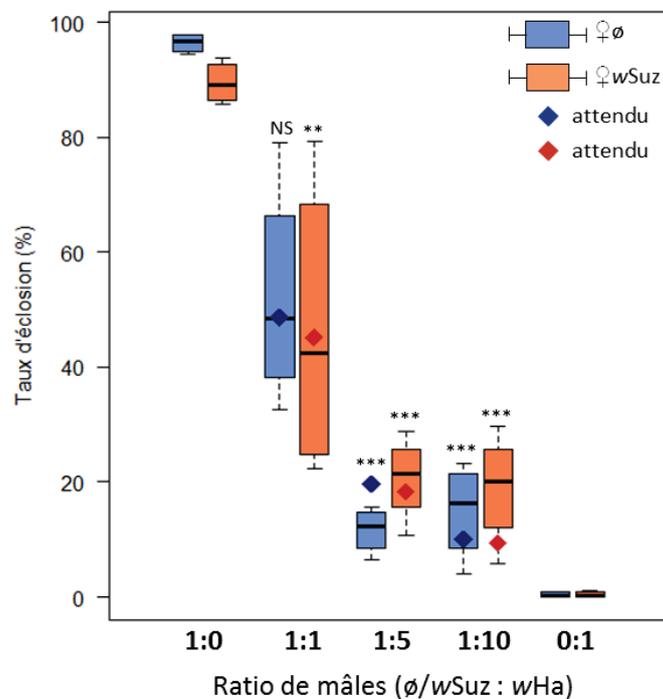
### *Survie pré-imaginale et mesure du Sex-ratio*

Il existe un effet significatif du statut d'infection sur les taux de survie du stade œuf à adulte ( $F=5.515$ ,  $d.f=3$ ,  $P=0.002$ ). Les résultats précédents ont montré qu'il n'y avait pas d'effet significatif du statut d'infection sur les taux d'éclosion. La différence significative observée ici serait donc due à une différence de survie du premier stade larvaire au stade adulte selon les statuts d'infection. Les individus non infectés par *Wolbachia* ont un taux de survie significativement plus élevé que ceux des autres lignées ( $\emptyset$ : 75.33% ( $\pm 6.34$ );  $wSuz$ : 64.38% ( $\pm 12.63$ );  $wHa$ : 62.17% ( $\pm 3.86$ );  $wTei$ : 64.00% ( $\pm 8.49$ )); alors qu'il n'existe aucune différence entre les lignées  $wSuz$ ,  $wHa$  et  $wTei$  (Fig 12A). La sex-ratio moyenne de chacune des lignées est proche de 1 (50:50) et aucun effet « lignée » n'a été observé ( $F=20.64$ ,  $d.f=3$ ,  $P=0.814$ ) (Fig 12B).

### *Effet de l'âge des mâles stérilisants sur l'intensité de l'IC*

L'objectif ici était de tester l'influence de l'âge des mâles  $wHa$  et  $wTei$ , sur les taux d'IC exprimés. Des croisements contrôles ont été réalisés ( $\sigma\emptyset \times \text{♀}\emptyset$  et  $\sigma wSuz \times \text{♀}wSuz$ ) pour évaluer l'effet de l'âge sur l'évolution des taux d'éclosion. Ces derniers montrent qu'il n'y a pas d'effet significatif de l'augmentation de l'âge des mâles sur les taux d'éclosion, que ce soit lors de croisements entre individus non infectés (Modèle linéaire généralisé (loi binomiale),  $F=10.98$ ,  $d.f=2$ ,  $P=0.60$ ) ou infectés par  $wSuz$  ( $F=9.96$ ,  $d.f=2$ ,  $P=0.69$ ) (Fig 13A et 13B).

Pour les croisements incompatibles, nous avons observé une augmentation globale du taux d'éclosion avec l'allongement de l'âge des mâles. Que ce soit lors de croisements avec des femelles infectées ou non, il existe une influence significative de l'âge des mâles  $wHa$  ( $\text{♀}\emptyset$ :  $F=91.45$ ,  $d.f=2$ ,  $P<0.001$ ;  $\text{♀}wSuz$ :  $F=162.72$ ,  $d.f=2$ ,  $P<0.001$ ) et des mâles  $wTei$  ( $\text{♀}\emptyset$ :  $F=68.74$ ,  $d.f=2$ ,  $P<0.001$ ;  $\text{♀}wSuz$ :  $F=54.10$ ,  $d.f=2$ ,  $P<0.001$ ) sur le taux d'éclosion (Fig 13). Le taux d'éclosion passe de 2.21% ( $\pm 2.77$ ) pour des mâles âgés de 3-4 jours à 17.33% ( $\pm 9.54$ ) pour des mâles âgés de 11-12 jours lors des croisements entre les mâles  $wHa$  et les femelles  $\emptyset$ , et de 2.21% ( $\pm 2.03$ ) à 17.17% ( $\pm 7.48$ ) lors de croisements avec des femelles  $wSuz$  (Fig 13B). Pour les croisements avec les mâles  $wTei$ , l'augmentation du taux d'éclosion est plus importante, il passe de 4.61% ( $\pm 4.31$ ) à 33.33% ( $\pm 13.85$ ) et de 6.05% ( $\pm 5.91$ ) à 30.99% ( $\pm 8.51$ ) lors de croisements avec des femelles  $\emptyset$  et  $wSuz$  respectivement (Fig 13A).



**Fig 14.** Diminution de la fertilité des femelles ø et wSuz avec l'augmentation de la proportion des mâles wHa par rapport aux mâles ø ou wSuz. Les boxplot en bleu et rouge indiquent les résultats obtenus lors des croisements avec des femelles respectivement non infectées et infectées par wSuz. Les losanges bleu et orange indiquent les taux d'éclosion attendus sous l'hypothèse d'une compétitivité sexuelle similaire entre les mâles wHa et les mâles non infectés (bleu) et infectés (orange) par wSuz. NS : pas de différence significative;  $P > 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , test binomial exact.

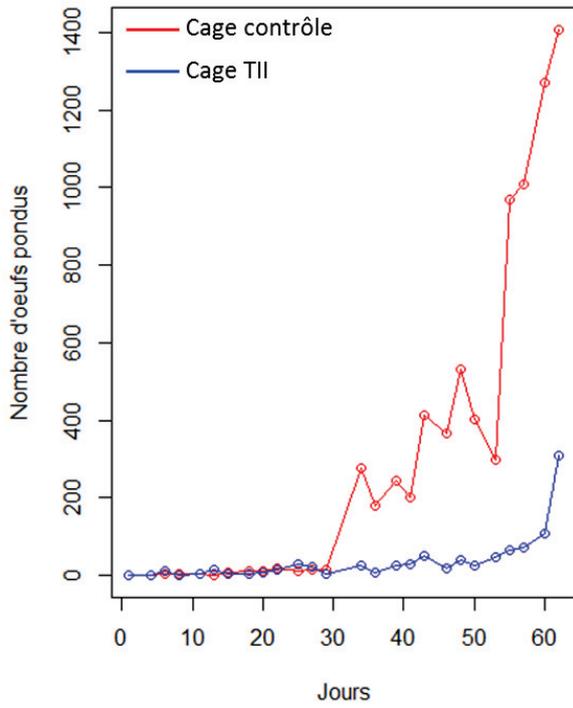
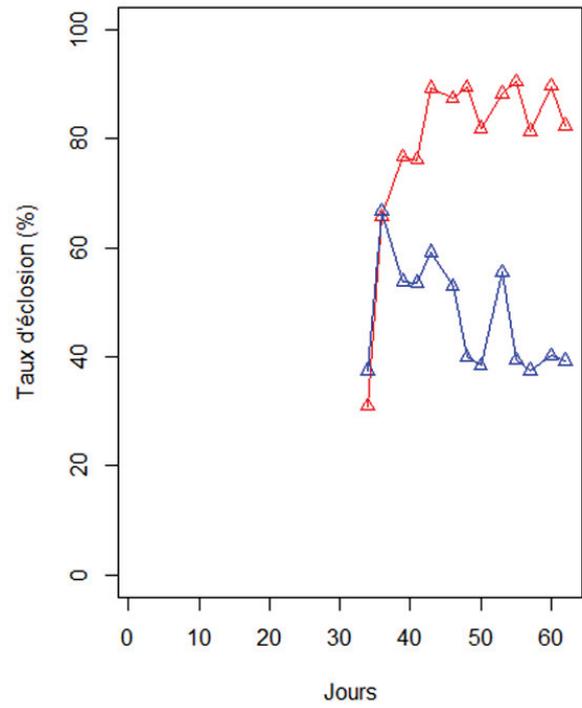
Les taux d'éclosion obtenus pour chacun des âges testés sont différents entre eux sauf lors des croisements entre les mâles *wTei* âgés de 7-8 et 11-12 jours et les femelles *wSuz* (test de Tukey,  $P=0.173$ ) (Fig 13A). Une augmentation de 4 jours de l'âge des mâles a donc une influence sur les taux d'IC exprimés même si ces taux restent élevés lors de l'utilisation de mâles âgés (11-12 jours), avec des taux d'IC compris entre 70 et 85%.

Par ailleurs, ces résultats confirment ceux obtenus précédemment, à savoir que les femelles ne sont pas capables de sauver l'IC induite par les mâles *wHa* et *wTei*, et ce indépendamment de l'âge des mâles car, quel que soit l'âge des mâles infectés, aucune différence n'a été observée entre les croisements avec les femelles  $\emptyset$  et infectées par *wSuz* (Fig 13A et 13B).

#### *Mesure de la compétitivité sexuelle des mâles transinfectés*

L'objectif de cette expérience a été de confronter les mâles stérilisants infectés par *wHa* avec des mâles non infectés ou infectés par *wSuz* et de comparer leur compétitivité sexuelle, à savoir leur capacité à accéder à la reproduction. Nous avons d'abord confirmé que les mâles *wHa* induisaient un taux d'IC proche de 100%, avec des taux d'éclosion moyens de 0.40% ( $\pm 1.74$ ) et 0.44% ( $\pm 0.56$ ) lors de croisements avec des femelles  $\emptyset$  et infectées par *wSuz* respectivement (Fig 14). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors des croisements individuels (chapitre 3) et confirment l'incapacité de la souche *wSuz* à sauver l'IC induite par *wHa*. La confrontation des mâles *wHa* avec les autres mâles ( $\emptyset$  et *wSuz*) avec des ratios 1:1, 1:5 et 1:10 a mis en évidence une diminution significative du taux d'éclosion avec l'augmentation de la proportion de mâles stérilisants ( $F=400.3$ ,  $d.f=4$ ,  $P<0.001$ ). De plus, aucun effet du statut d'infection des femelles n'a été observé tous ratio confondus ( $F=346.2$ ,  $d.f=1$ ,  $P=0.208$ ), ce qui confirme encore une fois que la présence de *wSuz* chez les femelles ne modifie pas les taux d'IC. Les comparaisons deux à deux montrent qu'il existe une différence significative entre chacun des ratios testés (statuts d'infection des femelles confondus), même entre les ratios 1:5 et 1:10 où les taux d'éclosions obtenus sont pourtant proches (Fig 14).

Les taux d'éclosion obtenus dans les croisements contrôles, 1:0 et 0:1 nous ont permis de calculer les taux d'éclosions attendus sous l'hypothèse d'une compétitivité sexuelle similaire entre les différents mâles pour les ratios 1:1, 1:5 et 1:10 (Fig 14). Pour chacun des ratios testés, il existe une différence significative entre le taux d'éclosion observé et celui

**A****B**

**Fig 15.** Evolution du nombre d'œufs pondus (A) et du taux d'éclosion (B) dans la cage contrôle (sans lâchers de mâles stérilisants) et dans la cage TII (avec lâchers massifs et répétitifs de mâles stérilisants infectés par *wHa*).

attendu, sauf pour le ratio 1:1 lors de la confrontation entre les mâles *w*Ha et les individus non infectés (Fig 14). Cependant, il est important de noter que malgré ces différences significatives, les taux d'éclosions observés sont pour chacun des ratios testés très proches des valeurs attendues (Fig 14).

#### *Evaluation de l'efficacité de la TII en enceinte climatique*

L'objectif de cette expérience était de savoir si des lâchers de mâles stérilisants infectés par *w*Ha pouvaient limiter l'augmentation de la taille de la population de *D. sukukii*. Pour cela, 40 individus (20 mâles et 20 femelles) ont été introduits dans chacune des cages pour fonder une population. Dans la cage contrôle, le nombre d'œufs pondus a très nettement augmenté 38 jours après les premiers lâchers (Fig 15A), durée qui correspond à environ deux générations. A ce moment-là de l'expérimentation, 100 femelles fécondées avaient déjà été introduites dans chacune des cages. Le nombre d'œufs pondus a ensuite constamment augmenté dans la cage contrôle jusqu'à atteindre à la fin de l'expérimentation 1408 œufs pondus en 48h (Fig 15A). Dans la cage dans laquelle a été introduite 260 mâles stérilisants par semaine (cage TII), le nombre d'œufs pondus est resté stable et compris entre 0 et 49 jusqu'au 53<sup>ème</sup> jour d'expérimentation puis a légèrement augmenté pour atteindre 308 à la fin de l'expérimentation (Fig 15A). L'utilisation de la TII a donc permis de maintenir la taille de la population à un niveau 4,6 fois inférieur à celui de la cage contrôle. De plus, les taux d'éclosion observés dans la cage TII étaient très inférieurs à ceux obtenus dans la cage contrôle (Fig 15B). Ainsi, sur les 308 œufs comptés lors du dernier relevé de l'expérience dans la cage TII, seulement 120 étaient viables (39%), comparé à 1150 sur 1408 dans la cage contrôle (82%).

En fin d'expérience, après 62 jours, les individus vivants ont été capturés, comptés et sexés dans chacune des cages. Dans la cage contrôle 2184 individus, dont 1194 femelles (54.7%) ont été récupérés alors que seulement 664 individus dont 275 femelles (41.4%) étaient vivants dans la cage TII. Le nombre de mâles stérilisants lâchés dans la cage TII était beaucoup plus important que les mâles  $\emptyset$  ou *w*Suz. La prise en compte du nombre de mâles pourrait donc biaiser la comparaison des tailles de population dans chacune des cages. Le nombre de femelle est un indicateur fiable. Ainsi, à la fin de l'expérience, il y avait 4,3 fois moins d'individus dans la cage TII que dans la cage contrôle, proportion similaire à celle obtenue par le comptage des œufs.



## Discussion

L'objectif principal de cette étude était de mesurer en conditions de laboratoire plusieurs paramètres jugés cruciaux avant de mettre en place des expériences à plus grande échelle. Les mesures des traits d'histoire de vie sur les lignées transinfectées n'ont pas mis en évidence de coûts liés à la présence des *Wolbachia* exogènes *wHa* et *wTei* chez *D. sukukii*. Mis à part des taux de survie du premier stade larvaire au stade adulte légèrement inférieur à ceux observés chez les individus non infectés par *wSuz*, la survie des femelles, la fécondité et les taux d'éclosion des œufs sont similaires voire supérieurs à ceux obtenus chez les lignées  $\emptyset$  et *wSuz*, ce qui est un point très positif par rapport à un éventuel élevage massif des lignées transinfectées. Les mesures de survie des différents types de mâles montrent que les mâles stérilisants, infectés par *wHa* et *wTei*, ont une survie similaire voire meilleure que les mâles  $\emptyset$  et *wSuz*, ce qui est une donnée importante dans la perspective d'utiliser ces mâles stérilisants pour le développement de la TII. L'infection par *Wolbachia*, qu'elle soit naturelle ou artificielle, n'affecte pas les principaux traits d'histoire de vie de *D. sukukii*.

L'effet de l'âge des mâles stérilisants sur les taux d'IC a également été testé. Malgré une diminution significative du taux d'IC avec l'augmentation de l'âge des mâles, les taux d'éclosion observés restent faibles et ne devraient pas compromettre la possibilité d'exploiter les lignées *wHa* et *wTei* pour la TII. Cependant, un travail de modélisation est nécessaire pour évaluer de manière pertinente l'impact de cette légère diminution de l'IC sur l'efficacité des lâchers de mâles stérilisants.

Les mesures de compétitivité sexuelle en cages à populations nous ont permis de montrer que les mâles *wHa* étaient autant capables d'accéder à la reproduction que les mâles  $\emptyset$  et *wSuz*. Cela indique que les mâles stérilisants ont une survie similaire aux mâles  $\emptyset$  et *wSuz*, au moins pendant les 48h d'accouplement qui ont suivi les lâchers. De plus, ces résultats montrent que les femelles, infectées ou non par *wSuz*, ne sont pas capables de discriminer les mâles stérilisants.

Ces résultats, pris dans leur ensemble, sont très encourageants pour la poursuite du développement de la TII chez *D. sukukii*. En effet, les mâles stérilisants induisent des taux d'IC élevés jusqu'à 12 jours après émergence, ont une compétitivité sexuelle et une survie similaire à celles des mâles  $\emptyset$  et *wSuz*, et les souches de *Wolbachia wHa* et *wTei* ne semblent pas être coûteuses pour leur hôte sur les traits d'histoire de vie mesurés dans cette étude.



Pour démontrer expérimentalement que la TII peut être efficace pour lutter contre *D. suzukii*, un dispositif permettant d'évaluer la dynamique de populations soumis ou non à des lâchers de mâles infectés par *wHa* a été mis en place. L'introduction et l'établissement d'une population dans une serre ont été simulés (correspondant aux grandes cages), avec des introductions fréquentes d'individus provenant de l'extérieur, dans le but de savoir si des lâchers massifs de mâles stérilisants pouvaient limiter l'augmentation de la taille de la population. Ces lâchers ont permis de limiter pendant 8 semaines l'augmentation de la densité de population et ce même avec l'introduction de femelles fécondées au cours de l'expérience. Au terme de l'expérience, la taille de la population dans la cage contrôle était 4,3 fois plus importante que dans la cage « TII ». Cette dernière expérience est la démonstration que la TII est une approche prometteuse et concrète pour lutter contre les populations de *D. suzukii*.

Un travail de modélisation mériterait d'être initié pour estimer la faisabilité de cette technique en prenant en compte l'ensemble des données acquises dans ce chapitre et les précédents. Des données telles que les taux d'IC, la survie larvaire et adulte, la fécondité pourraient être incorporées dans des modèles pour simuler l'évolution de la taille d'une population en faisant varier le nombre et la fréquence des mâles stérilisants par exemple. Ces modèles permettraient également de tester l'impact de la diminution de l'IC avec l'âge des mâles stérilisants, et de déterminer les paramètres à modifier (nombre de lâchers, fréquence, ...) pour contrecarrer ce potentiel effet négatif. La modélisation permettrait ainsi de connaître quelles sont les limites de cette technique comme par exemple la taille de la population cible à ne pas dépasser, ou au contraire, définir la fréquence et le nombre de mâles stérilisants à lâcher pour avoir un effet significatif sur la taille de la population ciblée.

Certaines expérimentations méritent d'être répétées pour valider les résultats obtenus dans ce chapitre. Premièrement, il est indispensable de mesurer la compétitivité des mâles *wTei* dans les mêmes conditions que celles utilisées pour mesurer celle des mâles *wHa*. Deuxièmement, l'efficacité de la TII en enceinte climatique mériterait d'être évaluée en utilisant d'autres ratios que celui utilisé ici. Il pourrait être aussi intéressant de tester si les lâchers de mâles stérilisants, en plus de pouvoir limiter l'augmentation de la taille d'une population, peuvent diminuer la taille d'une population déjà conséquente.

Nous verrons en discussion générale les futures expériences qui mériteraient d'être menées à plus grande échelle et les différents verrous techniques qui restent à lever pour que la TII soit un outil opérationnel pour lutter contre *D. suzukii*.



## **IV. Discussion générale**



Un des défis majeurs du XXI<sup>ème</sup> siècle pour nos sociétés sera de produire à l'échelle mondiale une quantité suffisante de ressources alimentaires tout en maintenant un niveau de productivité économique satisfaisant, et à faibles impacts sur la biodiversité. Or, les insectes ravageurs de cultures réduisent d'environ 30% les rendements agricoles (Bebber *et al.* 2013). Deux principaux phénomènes vont conduire à l'augmentation de l'introduction et de la distribution de nouvelles espèces potentiellement nuisibles: le dérèglement climatique et le commerce international. Les prédictions du dérèglement climatique à l'horizon 2050 prévoient une augmentation de 18% de l'aire de répartition des espèces invasives d'arthropodes connues actuellement (Bellard *et al.* 2013).

Dans l'optique d'une lutte durable et respectueuse de l'environnement contre ces ravageurs, il est indispensable de diversifier les méthodes de contrôle des populations pour proposer des alternatives concrètes aux produits phytosanitaires. C'est dans cette démarche que s'inscrivent mes travaux de recherche. L'objectif de cette thèse était de développer une nouvelle méthode de lutte pour contrôler les populations de *D. suzukii*. Plus précisément, il s'agissait de savoir si la Technique de l'Insecte Incompatible pouvait être une technique efficace pour diminuer les densités de populations de ce ravageur. Cette technique repose sur des lâchers inondatifs et fréquents de mâles infectés par *Wolbachia* afin qu'ils stérilisent, via l'IC, les femelles en populations naturelles.

Afin de répondre à cette problématique, nous avons acquis des données sur la biologie de cet insecte, en particulier sur ses interactions avec les bactéries *Wolbachia*. L'étude descriptive de l'association entre *D. suzukii* et *Wolbachia* à l'échelle européenne a été la première étape de ce projet de recherche (chapitre 1). Nous avons mis en évidence que les populations européennes de *D. suzukii* étaient infectées par une seule souche de *Wolbachia*, qui présente des prévalences intermédiaires dans la majorité des populations étudiées. De plus, nous avons montré que *wSuz* n'induisait pas une IC forte dans son hôte naturel. Cette étude descriptive a permis d'orienter les recherches à suivre pour le développement de la TII chez *D. suzukii*, mais également de participer à l'apport de connaissances sur les interactions hôte-*Wolbachia*. De plus, la description de cette association naturelle nous a conduit à nous interroger plus spécifiquement sur les interactions entre *D. suzukii* et sa seule souche de *Wolbachia*, *wSuz* (chapitre 2), notamment sur le maintien de ce symbiote en prévalence intermédiaire dans les populations mondiales. Nous avons pu mettre en évidence que *wSuz* pouvait être un symbiote mutualiste facultatif car elle peut conférer à son hôte une protection antivirale.



Le projet de développement de la TII a essentiellement pris forme grâce aux expériences conduites dans le chapitre 3, à savoir l'analyse des relations d'IC entre *wSuz* et d'autres souches de *Wolbachia* chez *D. simulans* puis chez *D. sukukii*. Cette analyse nous a permis de sélectionner deux souches de *Wolbachia* potentiellement intéressantes, *wHa* et *wTei*, qui induisent des taux d'IC proche de 100% lors de croisements avec des femelles infectées ou non par *wSuz*. De plus, cette étude nous a permis de confirmer les connaissances acquises sur les facteurs qui influencent l'expression de l'IC. Nous avons par exemple confirmé des résultats antérieurs tels que des effets forts du génotype hôte et bactérien sur l'expression et l'intensité de l'IC. Les transferts des différentes souches de *Wolbachia* réalisés dans cette étude permettent également de disposer de quatre souches de *Wolbachia*, *wSuz*, *wHa*, *wTei* et *wRi* dans deux hôtes différentes, *D. sukukii* et *D. simulans*. Des études comparatives pourraient être menées sur ces associations pour affiner nos connaissances sur les interactions hôte-*Wolbachia*.

Dans la dernière partie de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur les lignées de *D. sukukii* transinfectées sélectionnées dans le chapitre 3. Nous avons d'abord montré que les *Wolbachia* exogènes, *wHa* et *wTei*, n'affectent pas les traits d'histoire de vie de *D. sukukii*. Ensuite nous avons mis en évidence que les mâles stérilisants infectés par *wHa* et *wTei* induisent des taux d'IC élevés tout au long de leur vie. Enfin, nous avons montré que les mâles infectés par *wHa* ont une compétitivité sexuelle similaire à celle des mâles infectés ou non par *wSuz* et que des lâchers massifs et répétitifs des mâles stérilisants permettent de limiter l'augmentation de la taille d'une population dans une grande cage en enceinte climatique (chapitre 4).

En cumulant les résultats acquis dans chacun des chapitres de cette thèse, il est désormais possible de définir plus clairement les interactions entre *wSuz* et *D. sukukii*: une souche à prévalence intermédiaire qui n'a pas de coûts physiologiques forts sur son hôte (Hamm *et al.* 2014; Mazzetto *et al.* 2015; Cattel *et al.* 2016a) (chapitre 1 & 4), qui peut procurer un effet protecteur plus ou moins élevé selon le fond génétique (Cattel *et al.* 2016b) (chapitre 2) et induire une manipulation de la reproduction via l'IC, assez faible et potentiellement non détectable selon les lignées hôtes utilisées (Hamm *et al.* 2014; Cattel *et al.* 2016a) (chapitre 1 & 3), et avec une transmission imparfaite en milieu naturel (Hamm *et al.* 2014). L'ensemble des phénotypes induit par la présence de *wSuz* chez *D. sukukii* semblent varier selon les génotypes hôtes et les conditions environnementales.



Il semble donc complexe de définir précisément ce qui peut maintenir  $w_{Suz}$  dans les populations naturelles. Ce maintien est multifactoriel et doit dépendre d'une multitude d'autres effets encore jamais testé en laboratoire.

A mon sens, nous avons effectué les mesures suffisantes en laboratoire pour affirmer que la TII est un outil prometteur pour lutter contre *D. sukii*. En résumé, l'ensemble des expériences menées au cours de cette thèse nous ont permis d'obtenir des lignées de *D. sukii* infectées par des souches de *Wolbachia*: (1) qui ont un taux de transmission maternelle de 100%, (2) capables d'induire des taux de stérilisation proches de 100%, en présence ou non de la souche de *Wolbachia* native, (3) avec des mâles compétitifs, (4) dont l'infection par les *Wolbachia* exogènes n'induisent pas de coûts sur les traits d'histoire de vie de l'insecte, et (5) qui sont capables de limiter l'augmentation de la taille de population de *D. sukii* lors d'une simulation de la TII en cage à population.

Ces travaux de thèse ont permis d'initier le projet de développement de la TII chez *D. sukii* et de montrer que cette technique à un potentiel intéressant. Cependant, des recherches sont encore à mener et plusieurs verrous techniques devront être levés pour que la TII soit une alternative concrète aux moyens de lutte utilisés actuellement.

## **Perspectives de recherches pour l'application de la TII**

### *Expériences à court terme en conditions de laboratoire*

Pour que la TII soit efficace, les mâles stérilisants doivent avoir une compétitivité sexuelle similaire à celle des mâles sauvages. Des expériences en cages à population ont montré que les mâles infectés par  $w_{Ha}$  étaient autant compétitifs que les mâles infectés ou non par  $w_{Suz}$  (chapitre 4). Cependant, il est indispensable de vérifier également la compétitivité sexuelle des mâles infectés par  $w_{Tei}$ , seconde souche de *Wolbachia* potentiellement intéressante pour le développement de la TII. Cette expérience n'a pas été faite dans le cadre de cette thèse par manque de temps mais devrait être réalisé en 2017 par un stagiaire de Master II.

Les transferts de plusieurs souches de *Wolbachia* chez *D. sukii* nous ont permis d'obtenir deux souches de *Wolbachia* candidates,  $w_{Ha}$  et  $w_{Tei}$ . Chez *D. simulans*, ces deux souches montrent de l'IC bidirectionnelle (Zabalou *et al.* 2008), c'est-à-dire que les mâles infectés par  $w_{Ha}$  stérilisent les femelles infectés par  $w_{Tei}$  et inversement.



Il serait alors intéressant de vérifier si ce patron d'IC est identique chez *D. sukukii*. En effet, en cas de lâchers accidentels de femelles infectées par *wHa* ou *wTei* et de remplacement des populations, des lâchers de mâles infectés par l'autre souche pourraient être réalisés pour maintenir une pression sur la population cible.

D'autres expériences seraient intéressantes à développer. L'étude des systèmes d'accouplement de l'insecte par exemple, qui peuvent également jouer un rôle dans le succès de l'utilisation de mâles stériles, surtout quand il existe des comportements complexes pour le choix du partenaire sexuel: sélection active de la femelle, production de phéromones par le mâle ou encore présence de compétition entre mâles pour l'accès à la reproduction. Cela pourrait notamment être compromettant si la femelle choisit son partenaire sur des bases phénotypiques où de minimes différences entre les mâles sauvages et stériles auraient des conséquences importantes. Des comportements post-copulatoires pourraient également jouer un rôle majeur, s'il existe des accouplements multiples et que la femelle peut préférentiellement utiliser le sperme des mâles sauvages. Par exemple, chez *D. melanogaster*, le génotype de 4 à 6 mâles peuvent participer à la descendance d'une seule femelle (Imhof *et al.* 1998). Le système d'accouplement n'est pour le moment pas connu chez *D. sukukii*. Des croisements en laboratoire permettraient d'étudier la compétition entre les deux types de sperme. L'accouplement pourrait être vérifié entre une femelle et un mâle sauvage puis le mâle serait remplacé par un mâle stérilisant et inversement. Nous pourrions donc savoir, via les taux d'éclosion, si la femelle peut utiliser le sperme de plusieurs mâles et si oui, quel éjaculat prédomine.

#### *Expérimentations à court et moyen termes en conditions semi-naturelles*

Dans un premier temps, il serait intéressant de comparer la survie et la compétitivité des mâles stérilisants à celles des mâles sauvages lorsqu'ils sont soumis à des variations de température, d'humidité et de luminosité, dans de grandes cages à population. En effet, au cours de cette thèse, toutes les expériences ont été réalisées dans des conditions standards et stables.

De plus, la survie, la compétitivité sexuelle et la capacité des mâles stérilisants à induire de forts taux de stérilisation ont toujours été mesurées en utilisant des lignées de *D. sukukii* infectées ou non par *wSuz* maintenues au laboratoire depuis plusieurs années.



Pour les prochaines expérimentations, il semble important de confronter les mâles stérilisants à des mâles et des femelles sauvages. Pour cela des fruits infestés par *D. suzukii* pourraient être récupérés dans différentes cultures et les émergents seraient directement utilisés pour les expérimentations.

L'évaluation de l'efficacité de la TII en enceinte climatique a montré que des lâchers massifs et répétitifs de mâles stérilisants infectés par *wHa* pouvaient limiter l'augmentation de la taille de population de *D. suzukii*. Des expériences similaires pourraient être menées en conditions réelles, c'est-à-dire dans des serres avec des cultures de fraises par exemple, pour savoir si des lâchers de mâles stérilisants permettent de limiter les dégâts sur fruits.

### *Expérimentations à long terme en milieu naturel*

Il est fort probable que la TII pourrait être efficace dans un environnement clos tel que des serres ou des tunnels car les mâles stérilisants lâchés seraient cantonnés aux cultures et l'entrée d'individus provenant de l'extérieur serait limitée. Cependant, des expériences en milieu naturel permettraient de savoir si la TII pourrait s'étendre à des paysages ouverts comme les cultures de cerisiers, les plus impactées par *D. suzukii*. Pour cela, il serait intéressant de savoir comment se comporteraient les mâles stérilisants en milieu naturel. Des expériences de marquage, lâchers et captures pourraient être réalisées dans ce sens. Cela permettrait d'évaluer leur survie et leur capacité de dispersion en milieu naturel. Le marquage à l'albumine tout comme l'utilisation de poudres fluorescentes pourraient être utilisés, même si cette dernière ne semble pas être optimale chez *D. suzukii* (Klick *et al.* 2014).

*D. suzukii* est capable de s'orienter à large échelle spatiale vers des habitats plus chauds et tamponnés pour se protéger des températures les plus froides, tels que des forêts (Pelton *et al.* 2016) ou des bâtiments (Rossi-Stacconi *et al.* 2016). Le développement de la TII nécessite donc une approche multidisciplinaire avec notamment un apport de l'écologie du paysage et de la dynamique des populations afin, par exemple, de cibler plus précisément les zones refuges utilisées par *D. suzukii* durant la période hivernale. En effet, il semble opportun d'utiliser cette technique à la sortie de l'hiver, lorsque les tailles des populations sont les plus faibles (Harris *et al.* 2014; Wang *et al.* 2016). De plus, à cette période-là, la sex-ratio est biaisée en faveur des femelles puisqu'elles sont davantage résistantes au froid que les mâles (Jakobs *et al.* 2015; Zerulla *et al.* 2015). La compétition pour l'accès à la reproduction entre les mâles sauvages et les mâles stérilisants serait alors moindre.



Au vu des tailles de populations de *D. suzukii* atteintes lors de pics de populations au printemps et à l'automne, il est décisif de contrôler les populations à la sortie de l'hiver pour maintenir les densités de populations sous un seuil acceptable au moment des cultures. Ces conclusions sont également valables pour du piégeage massif ou pour l'utilisation d'ennemis naturels.

La capacité de l'insecte à se déplacer au sein et entre les différentes localités influence la taille des zones de lâchers, le besoin de zones « barrière » et tampon, et les moyens mis en œuvre pour les lâchers (Knippling 1979). Klick, Yang & Bruck (2015) ont montré que *D. suzukii* pouvait se déplacer entre des parcelles espacées d'une centaine de mètres, avec une dispersion de 67-87 mètres en 36h (Klick *et al.* 2016). Ces expériences préliminaires méritent d'être approfondies pour mieux comprendre les capacités de dispersion et l'influence de l'écologie du paysage sur les distributions des populations de *D. suzukii*. En effet, des immigrations d'un petit nombre de femelles fécondées ou d'un grand nombre de mâles dans une zone de lâchers pourrait potentiellement compromettre l'efficacité du programme.

L'ensemble des résultats prometteurs obtenus au cours de cette thèse montrent que la TII peut être un outil intéressant mais pour qu'elle soit utilisée, plusieurs expériences à grande échelle doivent être réalisées. Pour mettre en place ces futures expériences et pour que cette technique soit pertinente, plusieurs verrous techniques doivent être levés. Parmi eux, deux points majeurs : une méthode de sexage et un système de production en masse de l'insecte.

### *Production en masse*

La TII repose sur des lâchers fréquents et inondatifs de mâles stérilisants dans l'environnement. Un système d'élevage en masse doit donc être développé chez *D. suzukii*. Plusieurs composante très importantes doivent être optimisées: l'aspect économique, la conception des installations, le lieu de production, les préoccupations environnementales liées aux fuites d'insectes fertiles, la lignée de l'insecte choisit, la production et l'automatisation du système d'élevage (Parker 2005). L'élevage est une étape cruciale car les caractéristiques du milieu d'élevage comme les éléments nutritifs, les contaminants, l'humidité, la texture et le pH peuvent influencer la taille, la survie, la longévité, la capacité de vol et copulatoire, et la réactivité à la lumière (Lance & McInnis 2005). La production en masse peut aussi conduire à des différences génétiques entre les populations de laboratoire et naturelles (Cayol 2000).



Des traits peuvent être sélectionnés durant l'élevage en masse, comme des comportements d'accouplements inappropriés. Des renouvellements réguliers du patrimoine génétique par l'introduction d'individus piégés dans la nature doivent donc être réalisés. Plusieurs types de milieu d'élevage ont été testés dans notre équipe, milieu classique, à base de fruits rouges ou de carottes. L'ensemble de ces milieux d'élevage permettent à *D. sukuzii* d'accomplir correctement son cycle de développement et de maintenir les adultes en vie pendant plusieurs jours. Cependant, contrairement à *D. melanogaster* ou à *D. simulans*, l'amplification des lignées de *D. sukuzii* est plus compliquée, notamment à cause de la faible fécondité des femelles en conditions de laboratoire et des fortes variabilités de facilité d'élevage selon les lignées utilisées.

### *Méthode de sexage*

Contrairement à la TIS, la TII repose sur des lâchers massifs exclusivement composés de mâles, ce qui nécessite une méthode de sexage très efficace et à grande échelle. De nombreux projets ont été initiés afin de développer la TII contre des ravageurs de cultures comme *C. capitata* ou *B. oleae* mais cette technique n'est à l'heure actuelle pas utilisée en milieu naturel. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer cela, mais l'absence de techniques efficaces de sexage à grande échelle, sans avoir recours à la modification génétique est, selon moi, le point essentiel et charnière permettant de passer à des programmes de grandes envergures. Trois techniques différentes ont été développées pour différencier les mâles des femelles: mécanique, comportementale et génétique.

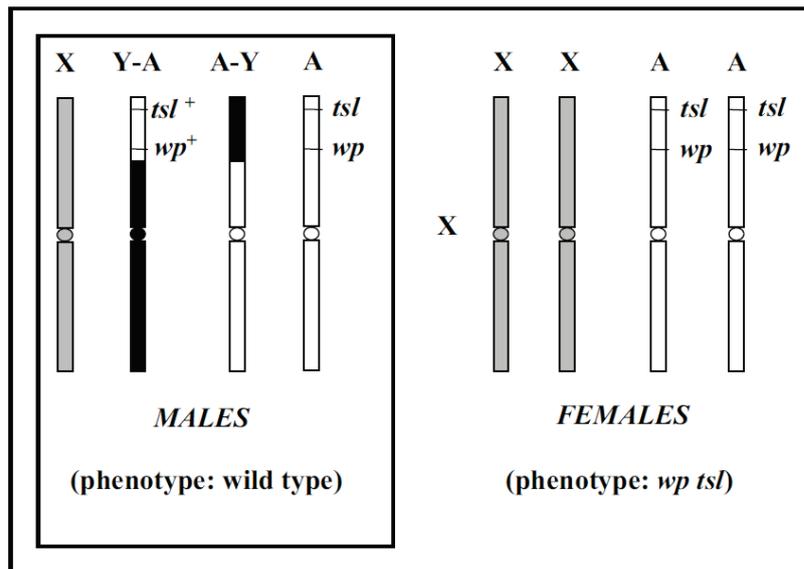
Dans sa forme la plus simple, le sexage mécanique est réalisé à l'œil nu au stade nymphal de l'insecte, mais dans un contexte de lâchers inondatifs, elle est insuffisante. Classiquement, le sexage mécanique se base sur un système automatisé de reconnaissance de dimorphisme sexuel à des stades particuliers du développement de l'insecte. Généralement le sexage est réalisé au stade nymphal où les nymphes sont d'abord séparées des larves en fonction de leur taille et ou de leur flottabilité (Benedict *et al.* 2009). Ce système a déjà été adapté chez le moustique dans lequel des tamis permettent de séparer les nymphes mâles des nymphes femelles. Le sexage mécanique peut être efficace en terme de sexage mais son défaut majeur est de réduire considérablement la quantité d'individus à la sortie des tris (Bellini *et al.* 2007). Pour combler ces pertes, la production d'insectes doit alors être augmentée, ce qui peut être logistiquement et économiquement non viable.



Le sexage mécanique a surtout été testé chez des espèces de moustiques, facilité par la phase aquatique des stades pré-adultes. Les systèmes de sexage basés uniquement sur des différences physiques ne sont soutenables que pour des programmes à petites échelles. Pour être efficaces, de tels systèmes doivent être séquentiels, c'est-à-dire que des tris à plusieurs stades de développement doivent avoir lieu (Papathanos *et al.* 2009). Chez *D. sukii*, on pourrait imaginer un système de sexage aux stades de larves, pupes et adultes, sachant que pour chacun de ces stades, il existe un dimorphisme sexuel. Un tel système n'a à ma connaissance jamais été développé chez des mouches des fruits mais mérite, il me semble, d'être discuté avec des professionnels de l'ingénierie.

Des manipulations du comportement peuvent aussi être exploitées. Chez le moustique par exemple, les femelles sont attirées par la mise à disposition de repas sanguin dans lequel a été introduit un insecticide. Ce système permet de tuer spécifiquement les femelles mais ne permet pas d'avoir une efficacité de sexage suffisante (Lowe *et al.* 1981). Cette approche est évidemment inexploitable chez *D. sukii* mais des systèmes d'attractifs composés de phéromones spécifiques pourraient être intéressants lors, par exemple, d'un dernier sexage post-tri mécanique. En plus d'avoir des efficacités variables, les sexages mécaniques et comportementaux peuvent être logistiquement et économiquement compliqués à mettre en œuvre. L'approche génétique apporte alors une alternative concrète.

Les lignées de sexage génétique, appelées dans la littérature GSS pour « Genetic Sexing Strain » se basent sur deux composantes bien distinctes: (1) une mutation sur un gène porté par un autosome qui peut être utilisée comme un marqueur sélectionnable pour la séparation des deux sexes et (2) une translocation pour lier ce gène au chromosome Y (Franz 2005). Il faut donc d'abord disposer d'une lignée mutante qui exprime un phénotype qui peut être exploité pour le sexage. La majorité des GSS créées se sont basées sur l'utilisation de lignées mutantes « *tsl* » pour « temperature-sensitive lethal » et « *wp* » pour « white pupae », gènes qui sont portés par un même autosome (Robinson 2002). Les individus de ces lignées mutantes sont homozygotes pour le gène « *tsl* », qui induit une forte mortalité au stade œuf après une exposition à 34°C durant 24h. Les pupes et les adultes sont sensibles de manière équivalente aux élévations de température mais les taux de mortalité sont moindres que ceux observés au stade œuf. Ces individus sont également homozygotes pour le gène « *wp* » qui comme son nom l'indique, va induire une coloration blanche des pupes.



**Fig 16.** Structure d'une Genetic Sexing Strain (GSS) avec translocation des allèles mutants dans le chromosome Y. *tsl*: temperature-sensitive lethal. *wp*: white pupae.

Pour la création de la GSS, l'objectif est de créer par l'irradiation, une translocation d'un allèle mutant de chaque gène dans le chromosome Y. Les mâles sont alors hétérozygotes pour les gènes « *tsl* » et « *wp* », alors que les femelles sont homozygotes (Fig 16).

Des GSS ont été développées sur une vingtaine d'espèces différentes (Papathanos *et al.* 2009). Chez *Anopheles albimanus* et *Ceratitis capitata* (Franz 2005) l'objectif était de combiner la TIS pour la stérilisation des mâles et l'approche génétique pour apporter un système de sexage (Papathanos *et al.* 2009). Chez la GSS de *C. capitata*, les embryons femelles sont homozygotes pour le gène « *tsl* », ce qui rend les rends sensibles à des fortes températures. De plus, la coloration blanche des pupes femelles permet d'avoir un indicateur visuel pour vérifier la stabilité et l'efficacité de la modification génétique (Franz 2005). Zabalou *et al.* (2009) ont proposé de combiner la TII et l'utilisation de GSS chez *C. capitata*. Comme lors des expériences menées quelques années auparavant (Zabalou *et al.* 2004) (détaillées en introduction générale), les souches *wCer2* et *wCer4* ont été transférées dans la GSS développée par Franz (2005). L'utilisation de la GSS donne un taux de succès de sexage de 99.75%, c'est-à-dire 1 femelle pour 400 mâles. Même si ce taux semble très satisfaisant, lors de lâchers inondatifs, c'est plusieurs milliers de mâles qui sont lâchés dans la nature. Cela correspondrait pour des lâchers d'un million de mâles, à 2 500 femelles relâchées, ce qui pourrait être suffisant pour un remplacement des populations (Zabalou *et al.* 2009). Un des avantages des GSS obtenus par mutagenèse, est qu'elles ne sont pas soumises à la réglementation sur les OGM, contrairement à la transgénèse, et peuvent être utilisées pour l'application en milieu naturel de la TIS ou de la TII. Cette approche de sexage génétique pourrait donc être une alternative crédible pour sexer efficacement les mâles et les femelles *D. sukii*.

Des approches transgéniques ont aussi été développées comme par exemple l'expression de protéines fluorescentes chez les mâles puis une séparation par un système de reconnaissance automatisé (Thompson *et al.* 2004), déjà mis en place chez plusieurs espèces dont *C. capitata* (Scolari *et al.* 2008). Il existe également la technique du « Female-killing », déjà décrit en introduction générale, qui consiste à introduire un gène létal qui va s'exprimer uniquement chez la femelle en absence d'antidote (tétracycline). Contrairement aux GSS, les individus porteurs de ces transgènes sont considérés comme des OGM et leur utilisation est actuellement interdite au sein de l'Union Européenne.



Une autre alternative serait de combiner l'irradiation à la TII (Zhang *et al.* 2015). Chez plusieurs insectes, les femelles sont stérilisées à de plus faibles doses d'irradiation que les mâles (Arunachalam & Curtis 1985). Cette combinaison permettrait de s'affranchir d'une technique de sexage car les femelles relâchées seraient stériles. Un projet ANR nommé « Suzukill », débuté en 2016, a pour objectif de combiner la TIS et la TII chez *D. sukukii*. Ce projet collaboratif entre équipes de recherche autrichiennes et françaises, dont la nôtre, s'inscrit pleinement dans la continuité de mes travaux de thèse. Les principaux objectifs de cette collaboration sont (1) de tester si la TIS peut être efficace chez *D. sukukii*, (2) de savoir si l'irradiation peut être couplée à la TII, (3) de mettre en place l'élevage massif de *D. sukukii* en explorant la tolérance au froid de l'insecte et les changements génétiques liés à sa domestication. De mon point de vue, la combinaison de l'irradiation et de la TII ne semble pas être une approche prometteuse et ce pour plusieurs raisons. La première est que l'effet de l'irradiation sur la stérilité des femelles est rarement de 100%, ce qui constitue un risque de lâcher de femelles fertiles dans l'environnement. Deuxièmement, il me semble que la combinaison des deux approches apporte plus de risques (remplacement des populations) que d'avantages. En effet, la TIS, qui se base sur des lâchers de mâles stérilisés par irradiation, a déjà montré son efficacité chez plusieurs espèces (Dyck *et al.* 2005). Si les mâles irradiés induisent des taux de stérilisation aussi importants que les mâles infectés par *Wolbachia*, et que la compétitivité des mâles n'est pas affectée par l'irradiation, l'utilisation de la bactérie *Wolbachia* n'apporte alors aucune plus-value. Enfin, il a été montré que des lâchers de mâles et de femelles sont moins efficaces que des lâchers exclusivement composés de mâles (McInnis *et al.* 1994; Rendon *et al.* 2000; Rendón *et al.* 2004). Une solution serait d'optimiser une combinaison de plusieurs techniques pour atteindre une efficacité de 100% en appliquant par exemple des faibles doses d'irradiation après des sexages mécaniques ou génétiques pour stériliser le peu de femelles restantes.

### **Risques associés à l'utilisation de la TII**

En absence de technique de sexage parfaite, des lâchers accidentels de femelles peuvent survenir lors des lâchers de mâles stérilisants. Dans certains cas, l'espèce cible est infectée naturellement par une ou plusieurs souches de *Wolbachia* qui exprime de l'IC bidirectionnelle avec la souche utilisée pour la TII. Ainsi, les mâles résidents sont capables de stériliser les femelles accidentellement relâchées, ce qui diminue la probabilité de remplacement des populations.



Cependant, ce n'est pas le cas pour notre modèle d'étude, car premièrement, on retrouve des individus non infectés par *Wolbachia* dans les populations naturelles, et deuxièmement, les mâles qui sont infectés par *wSuz*, ne sont pas capables d'induire des taux d'IC élevés. De plus, nous avons vu que les mâles stérilisants infectés par *wHa* et *wTei* induisent des taux d'IC proches de 100% et que la fitness des individus transinfectés est similaire à celle des individus non infectés ou infectés par la *Wolbachia* native. Des lâchers de femelles infectées par *wHa* ou *wTei* pourraient donc conduire à un remplacement rapide des populations, ce qui constitue à ma connaissance le seul risque lié à l'utilisation de la TII. Il est alors important de se demander quelles seraient les conséquences potentielles d'un remplacement des populations de *D. sukii* infectées ou non par *wSuz*, par une population infectée par *wHa* par exemple. Nous avons vu dans ce manuscrit que certaines souches de *Wolbachia* peuvent développer des interactions de type mutualiste avec leurs hôtes, comme conférer une protection contre des ennemis naturels ou une amélioration de la fitness. Un des risques serait donc que les individus porteurs de la *Wolbachia* envahissante aient une survie, une fécondité ou des résistances supérieures à celles des individus anciennement présents dans la population. Cela pourrait augmenter les dégâts sur cultures et compliquer davantage le contrôle des populations. Cependant, les traits d'histoire de vie mesurés sur les lignées transinfectées ne vont pas dans ce sens (chapitre 4).

Un autre point potentiellement négatif serait l'introduction d'une souche de *Wolbachia* dans une zone géographique où elle est absente. Plusieurs études ont mis en évidence que la bactérie *Wolbachia* peut être transmise horizontalement, notamment lors d'infestations de larves de drosophiles par des parasitoïdes (Vavre *et al.* 1999; Haine *et al.* 2005). Les souches de *Wolbachia* nouvellement envahissantes sont donc potentiellement transmissibles à d'autres espèces. Cependant, il est difficile d'imaginer comment des transferts horizontaux (qui sont un phénomène naturel) de souches de *Wolbachia* déjà naturellement présentes pourraient bouleverser le fonctionnement de l'écosystème.

Au final, à ma connaissance les risques liés à l'utilisation de la TII chez *D. sukii* semblent peu nombreux. De plus, en comparaison à d'autres techniques, comme l'utilisation de produits phytosanitaires ou l'introduction de parasitoïdes exotiques, la TII semble être la technique la moins à risques et la plus raisonnée en terme d'impacts sur l'environnement et les communautés. La première conséquence de lâchers accidentels de femelles serait que la TII ne soit plus efficace pour contrôler les populations de *D. sukii*.



Dans ce cas le processus de développement de la TII devrait être reconduit, c'est-à-dire à nouveau transférer des souches exogènes de *Wolbachia*, qui devraient exprimer de l'IC avec la souche qui vient d'envahir les populations. Une méthode de sexage très efficace est donc la clef pour initier et maintenir des programmes de stérilisation par la TII et limiter les risques secondaires liés à son utilisation.



## **V. Conclusion**



Nous avons vu que la TII a été initiée sur plusieurs modèles d'intérêts, à impacts sanitaire ou économique et a souvent donné des résultats très encourageants. Cependant la plupart des projets n'ont jamais dépassé le stade « laboratoire » et, à l'heure actuelle, cette technique n'est pas utilisée en milieu naturel. Plusieurs paramètres peuvent expliquer cela: (1) manque de volonté politique de mettre en œuvre des projets de concrétisation de stratégies alternatives, (2) manque de communication entre la recherche et le monde du privé, (3) nécessite une approche multidisciplinaire avec un apport de l'écologie du paysage, de la dynamique des populations, de l'ingénierie pour la production en masse qui peut être compliquée à mettre en place et (4) l'absence d'une technique de sexage 100% efficace à grande échelle sans recours à la transgénèse. Le dernier point est selon moi la limite de la TII. Sans parler des conséquences écologiques d'un remplacement des populations, l'absence de technique de sexage efficace nuit directement à l'efficacité de la TII. Les sexages mécaniques et comportementaux ne donneront jamais un taux de réussite de 100%. Il est donc selon moi impossible d'envisager d'utiliser la TII contre *D. sukii* sans avoir recours à l'ingénierie génétique comme la mutagenèse ou la transgénèse même si cette dernière est interdite au sein de l'Union Européenne. La création d'une GSS chez *D. sukii* ou de nouvelles approches de sexages mériteraient d'être mises en place en parallèle du développement de la production en masse de l'insecte.



## **VI. Bibliographie**

- Alam U, Medlock J, Brelsfoard C *et al.* (2011) Wolbachia symbiont infections induce strong cytoplasmic incompatibility in the Tsetse fly *Glossina morsitans*. *PLoS Pathogens*, **7**, e1002415.
- Alexandrov ID, Alexandrova MV, Goriacheva II *et al.* (2007) Removing endosymbiotic Wolbachia specifically decreases lifespan of females and competitiveness in a laboratory strain of *Drosophila melanogaster*. *Genetika*, **43**, 1372–1378.
- Almeida F, Moura AS, Cardoso AF *et al.* (2011) Effects of Wolbachia on fitness of *Culex quinquefasciatus* (Diptera; Culicidae). *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 2138–2143.
- Alphey L (2014) Genetic control of mosquitoes. *Annual review of entomology*, **59**, 24–205.
- Andrews ES, Crain PR, Fu Y, Howe DK, Dobson SL (2012) Reactive Oxygen Species Production and *Brugia pahangi* Survivorship in *Aedes polynesiensis* with Artificial Wolbachia Infection Types. *PLoS Pathogens*, **8**, e1003075.
- Ant T, Koukidou M, Rempoulakis P *et al.* (2012) Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BMC Biology*, **10**, 51.
- Apostolaki A, Livadaras I, Saridaki A *et al.* (2011) Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with Wolbachia: Towards a symbiont-based population control strategy. *Journal of Applied Entomology*, **135**, 546–553.
- Arunachalam N, Curtis CF (1985) Integration of radiation with cytoplasmic incompatibility for genetic control in the *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **22**, 648–653.
- Asplen MK, Anfora G, Biondi A *et al.* (2015) Invasion biology of spotted wing *Drosophila* (*Drosophila suzukii*): a global perspective and future priorities. *Journal of Pest Science*, **88**, 469–494.
- Atallah J, Teixeira L, Salazar R, Zaragoza G, Kopp A (2014) The making of a pest: the evolution of a fruit-penetrating ovipositor in *Drosophila suzukii* and related species. *Proceedings of the Royal Society B*, **281**.
- Atyame CM, Cattel J, Lebon C *et al.* (2015) Wolbachia-Based Population Control Strategy Targeting *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes Proves Efficient under Semi-Field Conditions. *Plos One*, **10**, e0119288.
- Atyame CM, Delsuc F, Pasteur N, Weill M, Duron O (2011a) Diversification of Wolbachia endosymbiont in the *Culex pipiens* mosquito. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2761–2772.
- Atyame CM, Labbé P, Lebon C *et al.* (2016) Comparison of irradiation and Wolbachia based approaches for sterile-male strategies targeting *Aedes albopictus*. *PLoS One*, **11**, 1–15.
- Atyame CM, Pasteur N, Dumas E *et al.* (2011b) Cytoplasmic incompatibility as a means of controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquito in the islands of the South-Western Indian Ocean. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **5**, 20–22.

- Awrahanman ZA, Champion de Crespigny F, Wedell N (2014) The impact of Wolbachia, male age and mating history on cytoplasmic incompatibility and sperm transfer in *Drosophila simulans*. *Journal of Evolutionary Biology*, **27**, 1–10.
- Bebber DP, Ramotowski MAT, Gurr SJ (2013) Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Climate Change*, **3**, 985–988.
- Beers EH, Van Steenwyk RA, Shearer PW, Coates WW, Grant JA (2011) Developing *Drosophila suzukii* management programs for sweet cherry in the western United States. *Pest Management Science*, **67**, 1386–1395.
- Bellamy DE, Sisterson MS, Walse SS (2013) Quantifying Host Potentials: Indexing Postharvest Fresh Fruits for Spotted Wing *Drosophila*, *Drosophila suzukii*. *PLoS ONE*, **8**, e61227.
- Bellard C, Thuiller W, Leroy B *et al.* (2013) Will climate change promote future invasions? *Global Change Biology*, **19**, 3740–3748.
- Bellini R, Balestrino F, Medici A *et al.* (2013a) Mating competitiveness of *Aedes albopictus* radio-sterilized males in large enclosures exposed to natural conditions. *Journal of Medical Entomology*, **50**, 94–102.
- Bellini R, Calvitti M, Medici A *et al.* (2007) Use of the sterile insect technique against *Aedes albopictus* in Italy: First results of a pilot trial. In: *Area-Wide Control of Insect Pests*, pp. 505–515.
- Bellini R, Medici A, Puggioli A, Balestrino F, Carrieri M (2013b) Pilot Field Trials With *Aedes albopictus* Irradiated Sterile Males in Italian Urban Areas. *Journal of Medical Entomology*, **50**, 317–325.
- Benedict MQ, Knols BGJ, Bossin HC *et al.* (2009) Colonisation and mass rearing: learning from others. *Malaria journal*, **8**, S4.
- Bian G, Joshi D, Dong Y *et al.* (2013) Wolbachia invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to Plasmodium infection. *Science (New York, N.Y.)*, **340**, 748–51.
- Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z (2010) The endosymbiotic bacterium Wolbachia induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS pathogens*, **6**, e1000833.
- Blackburn TM, Pysek P, Bacher S *et al.* (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution*, **26**, 333–339.
- Blagrove MSC, Arias-Goeta C, Failloux AB, Sinkins SP (2012) Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **109**, 255–260.
- Bolda MP, Goodhue RE, Zalom FG (2010) Spotted wing drosophila: potential economic impact of a newly established pest. *Agric Resour Econ Update*, **13**, 5–8.

- Boller EF, Russ K, Vallo V, Bush GL (1976) Incompatible Races of European Cherry Fruit-Fly, *Rhagoletis-Cerasi* (Diptera-Tephritidae), Their Origin and Potential Use in Biological-Control. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **20**, 237–247.
- Boyle L, O'Neill SL, Robertson HM, Karr TL (1993) Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, **260**, 1796–1799.
- Breeuwer JAJ, Werren JH (1990) Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature*, **346**, 558–560.
- Brelsfoard CL, Dobson SL (2011) *Wolbachia* effects on host fitness and the influence of male aging on cytoplasmic incompatibility in *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **48**, 1008–1015.
- Brelsfoard CL, Séchan Y, Dobson SL (2008) Interspecific hybridization yields strategy for South Pacific filariasis vector elimination. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **2**, 1–6.
- Brennan CA, Anderson KV (2004) *Drosophila*: the genetics of innate immune recognition and response. *Annual review of immunology*, **22**, 457–483.
- Bressac C, Rousset F (1993) The reproductive incompatibility system in *Drosophila simulans*: DAPI-staining analysis of the *Wolbachia* symbionts in sperm cysts. *Journal of invertebrate pathology*, **61**, 226–230.
- Brower JH (1979) Suppression of laboratory populations of *Ephestia cautella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) by release of males with cytoplasmic incompatibility. *Journal of Stored Products Research*, **15**, 1–4.
- Brower JH (1980) Reduction of almond moth populations in simulated storages by the release of genetically incompatible males. *Journal of Economic Entomology*, **73**, 415–418.
- Bruck DJ, Bolda M, Tanigoshi L *et al.* (2011) Laboratory and field comparisons of insecticides to reduce infestation of *Drosophila suzukii* in berry crops. *Pest Management Science*, **67**, 1375–1385.
- Calabria G, Máca J, Bächli G, Serra L, Pascual M (2012) First records of the potential pest species *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in Europe. *Journal of Applied Entomology*, **136**, 139–147.
- Callaini G, Dallai R, Riparbelli MG (1997) *Wolbachia*-induced delay of paternal chromatin condensation does not prevent maternal chromosomes from entering anaphase in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Journal of cell science*, **110**, 271–280.
- Callaini G, Riparbelli MG, Giordano R, Dallai R (1996) Mitotic defects associated with cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **67**, 55–64.

Calvitti M, Moretti R, Lampazzi E, Bellini R, Dobson SL (2010) Characterization of a New *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)–*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Symbiotic Association Generated by Artificial Transfer of the wPip Strain From *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, **47**, 179–187.

Calvitti M, Moretti R, Skidmore AR, Dobson SL (2012) *Wolbachia* strain wPip yields a pattern of cytoplasmic incompatibility enhancing a *Wolbachia*-based suppression strategy against the disease vector *Aedes albopictus*. *Parasites & vectors*, **5**, 254.

Caminade C, Medlock JM, Ducheyne E *et al.* (2012) Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *Journal of The Royal Society Interface*, **9**, 2708–2717.

Campion DG (1972) Insect chemosterilants: a review. *Bulletin of Entomological Research*, **61**, 577–635.

Carvalho DO, McKemey AR, Garziera L *et al.* (2015) Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **9**, 1–15.

Cattel J, Kaur R, Gibert P *et al.* (2016a) *Wolbachia* in European Populations of the Invasive Pest *Drosophila suzukii*: Regional Variation in Infection Frequencies. *Plos One*, **11**, e0147766.

Cattel J, Martinez J, Jiggins F, Mouton L, Gibert P (2016b) *Wolbachia*-mediated protection against viruses in the invasive pest *Drosophila suzukii*. *Insect Molecular Biology*, **25**, 595–603.

Cayol JP (2000) Changes in sexual behavior and life history traits of tephritid species caused by mass-rearing processes. *Fruit flies: phylogeny and evolution of behavior*, pp. 843–860.

Chabert S, Allemand R, Poyet M, Eslin P, Gibert P (2012) Ability of European parasitoids (Hymenoptera) to control a new invasive Asiatic pest, *Drosophila suzukii*. *Biological Control*, **63**, 40–47.

Chambers EW, Hapairai L, Peel BA, Bossin H, Dobson SL (2011) Male mating competitiveness of a *Wolbachia*-introgressed *Aedes polynesiensis* strain under semi-field conditions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **5**, 1–6.

Chrostek E, Marialva MSP, Esteves SS *et al.* (2013) *Wolbachia* Variants Induce Differential Protection to Viruses in *Drosophila melanogaster*: A Phenotypic and Phylogenomic Analysis. *PLoS Genetics*, **9**.

Chrostek E, Teixeira L (2015) Mutualism Breakdown by Amplification of *Wolbachia* Genes. *PLoS Biology*, **13**, 1–22.

Cini A, Anfora G, Escudero-Colomar LA *et al.* (2014) Tracking the invasion of the alien fruit pest *Drosophila suzukii* in Europe. *Journal of Pest Science*, 559–566.

- Cini A, Ioriatti C, Anfora G (2012) A review of the invasion of *Drosophila suzukii* in Europe and a draft research agenda for integrated pest management. *Bulletin of Insectology*, **65**, 149–160.
- Clancy DJ, Hoffmann AA (1998) Environmental effects on cytoplasmic incompatibility and bacterial load in *Wolbachia*-infected *Drosophila simulans*. *Entomologica Experimentalis et Applicata*, **86**, 13–24.
- Clark ME, Veneti Z, Bourtzis K, Karr TL (2002) The distribution and proliferation of the intracellular bacteria *Wolbachia* during spermatogenesis in *Drosophila*. *Mechanisms of Development*, **111**, 3–15.
- Cordaux R, Bouchon D, Grève P (2011) The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends in Genetics*, **27**, 332–341.
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T, Bouchon D (2004) Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity*, **93**, 78–84.
- Cordaux R, Pichon S, Ling A *et al.* (2008) Intense transpositional activity of insertion sequences in an ancient obligate endosymbiont. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1889–1896.
- Cuthbertson AGS, Collins DA, Blackburn LF, Audsley N, Bell HA (2014) Preliminary screening of potential control products against *Drosophila suzukii*. *Insects*, **5**, 488–498.
- Daane KM, Wang XG, Biondi A *et al.* (2016) First exploration of parasitoids of *Drosophila suzukii* in South Korea as potential classical biological agents. *Journal of Pest Science*, **89**, 823–835.
- Dalton DT, Walton VM, Shearer PW *et al.* (2011) Laboratory survival of *Drosophila suzukii* under simulated winter conditions of the Pacific Northwest and seasonal field trapping in five primary regions of small and stone fruit production in the United States. *Pest Management Science*, **67**, 1368–1374.
- David J, Croissant J (1956) Recherches sur la fécondité et la fertilité chez *Drosophila melanogaster*. *Ann. Univ. Lyon, Sect. C*, **9**, 73–128.
- Dedine F, Vavre F, Fleury F *et al.* (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.
- Deprá M, Poppe JL, Schmitz HJ, De Toni DC, Valente VLS (2014) The first records of the invasive pest *Drosophila suzukii* in the South American continent. *Journal of Pest Science*, **87**, 379–383.
- Dobson SL, Fox CW, Jiggins FM (2002a) The effect of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility on host population size in natural and manipulated systems. *Proceedings of The Royal Society B*, **269**, 437–45.

- Dobson SL, Marsland EJ, Rattanadechakul W (2002b) Mutualistic Wolbachia infection in *Aedes albopictus*: Accelerating cytoplasmic drive. *Genetics*, **160**, 1087–1094.
- Dobson SL, Rattanadechakul W, Marsland EJ (2004) Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in Wolbachia single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity*, **93**, 135–142.
- Van Driesche R, Hoddle M (2009) *Control of pests and weeds by natural enemies: an introduction to biological control*.
- Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS (2005) *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*.
- Engelstädter J, Telschow A (2009) Cytoplasmic incompatibility and host population structure. *Heredity*, **103**, 196–207.
- Fenton A, Johnson KN, Brownlie JC, Hurst GDD (2011) Solving the Wolbachia Paradox: Modeling the Tripartite Interaction between Host, Wolbachia, and a Natural Enemy. *The American naturalist*, **178**, 333–342.
- 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.
- Fraimout A, Loiseau A, Price DK *et al.* (2015) New set of microsatellite markers for the spotted-wing *Drosophila suzukii* (Diptera : Drosophilidae ): A promising molecular tool for inferring the invasion history of this major insect pest. *Eur. J. Entomol*, **112**, 1–5.
- Franz G (2005) Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. *Sterile Insect Technique*, pp. 427–451.
- Fry AJ, Palmer MR, Rand DM (2004) Variable fitness effects of Wolbachia infection in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, **93**, 379–389.
- Gargani E, Tarchi F, Frosinini R, Mazza G, Simoni S (2013) Notes on *Drosophila suzukii* Matsumura (Diptera Drosophilidae): Field survey in Tuscany and laboratory evaluation of organic products. *Redia*, **96**, 85–90.
- Gavotte L, Mercer DR, Stoeckle JJ, Dobson SL (2010) Costs and benefits of Wolbachia infection in immature *Aedes albopictus* depend upon sex and competition level. *Journal of Invertebrate Pathology*, **105**, 341–346.
- Glaser RL, Meola MA (2010) The native Wolbachia endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to west Nile virus infection. *PLoS ONE*, **5**.

- Goodhue RE, Bolda M, Farnsworth D, Williams JC, Zalom FG (2011) Spotted wing drosophila infestation of California strawberries and raspberries: Economic analysis of potential revenue losses and control costs. *Pest Management Science*, **67**, 1396–1402.
- Haine ER, Pickup NJ, Cook JM (2005) Horizontal transmission of Wolbachia in a *Drosophila* community. *Ecological Entomology*, **30**, 464–472.
- Hamm CA, Begun DJ, Vo A *et al.* (2014) Wolbachia do not live by reproductive manipulation alone: infection polymorphism in *Drosophila suzukii* and *D. subpulchrella*. *Molecular Ecology*, **23**, 4871–4885.
- Handler AM, James AA (2000) *Insect transgenesis: methods and applications*.
- Harris DW, Hamby KA, Wilson HE, Zalom FG (2014) Seasonal monitoring of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in a mixed fruit production system. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **17**, 857–864.
- Harris AF, McKemey AR, Nimmo D *et al.* (2012) Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nature*, **30**, 828–830.
- Harris AF, Nimmo D, McKemey AR *et al.* (2011) Field performance of engineered male mosquitoes. *Nature Biotechnology*, **29**, 1034–1037.
- Harumoto T, Anbutsu H, Lemaitre B, Fukatsu T (2016) Male-killing symbiont damages host's dosage-compensated sex chromosome to induce embryonic apoptosis. *Nature Communications*, **7**, 12781.
- Harvey-Samuel T, Ant T, Gong H, Morrison NI, Alphey L (2014) Population-level effects of fitness costs associated with repressible female-lethal transgene insertions in two pest insects. *Evolutionary Applications*, **7**, 597–606.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN (2008) Wolbachia and virus protection in insects. *Science (New York, N.Y.)*, **322**, 702.
- Helinski MEH, Knols BGJ (2008) Mating competitiveness of male *Anopheles arabiensis* mosquitoes irradiated with a partially or fully sterilizing dose in small and large laboratory cages. *Journal of medical entomology*, **45**, 698–705.
- Helinski MEH, Parker AG, Knols BGJ (2009) Radiation biology of mosquitoes. *Malaria journal*, **8**, S6.
- Hendrichs J, Ortiz G, Liedo P, Schwarz A (1983) Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala. *Fruit Flies of Economic Importance. AA Balkema Rotterdam*, 353–365.
- Hentschel U, Steinert M, Hacker J (2000) Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends in Microbiology*, **8**, 226–231.

- Himler AG, Adachi-Hagimori T, Bergen JE *et al.* (2011) Rapid spread of a bacterial symbiont in an invasive whitefly is driven by fitness benefits and female bias. *Science (New York, N.Y.)*, **332**, 254–256.
- Hoffmann AA (1988) Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **48**, 61–67.
- Hoffmann AA, Clancy D, Duncan J (1996) Naturally-occurring *Wolbachia* infection in *Drosophila simulans* that does not cause cytoplasmic incompatibility. *Heredity*, **76**, 1–8.
- Hoffmann AA, Iturbe-Ormaetxe I, Callahan AG *et al.* (2014) Stability of the wMel *Wolbachia* Infection following Invasion into *Aedes aegypti* Populations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**.
- Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J *et al.* (2011) Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*, **476**, 454–457.
- Hoffmann AA, Turelli M (1997) Cytoplasmic incompatibility in insects. *Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropods Reproduction*.
- Hoffmann AA, Turelli M, Harshman LG (1990) Factors Affecting the Distribution of Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila simulans*. *Genetics*, **126**, 933–948.
- Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, Meng X-Y, Fukatsu T (2010) *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 769–774.
- Hughes GL, Rasgon JL (2014) Transinfection: A method to investigate *Wolbachia*-host interactions and control arthropod-borne disease. *Insect Molecular Biology*, **23**, 141–151.
- Hurst GDD, Johnson AP, Schulenburg JHGVD, Fuyama Y (2000) Male-killing *Wolbachia* in *Drosophila*: A temperature-sensitive trait with a threshold bacterial density. *Genetics*, **156**, 699–709.
- Ideo S, Watada M, Mitsui H, Kimura MT (2008) Host range of *Asobara japonica* (Hymenoptera: Braconidae), a larval parasitoid of drosophilid flies. *Entomological science*, **11**, 1–6.
- Imhof M, Harr B, Brem G, Schlötterer C (1998) Multiple mating in wild *Drosophila melanogaster* revisited by microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **7**, 915–917.
- Ioriatti C, Walton V, Dalton D *et al.* (2015) *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) and Its Potential Impact to Wine Grapes During Harvest in Two Cool Climate Wine Grape Production Regions. *Journal of Economic Entomology*, **108**, 1148–1155.
- Itô Y, Kakinohana H, Yamagishi M, Kohama T (2003) Eradication of the Melon Fly, *Bactrocera cucurbitae*, from Okinawa, Japan, by Means of the Sterile Insect Technique, with Special Emphasis on the Role of Basic Studies. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **6**, 119–129.

- Jakobs R, Garipey TD, Sinclair BJ (2015) Adult plasticity of cold tolerance in a cool-temperate population of *Drosophila suzukii*. *Journal of Insect Physiology*, **79**, 1–9.
- Jin L, Walker AS, Fu G *et al.* (2013) Engineered female-specific lethality for control of pest lepidoptera. *ACS Synthetic Biology*, **2**, 160–166.
- Jones EO, White A, Boots M (2007) Interference and the persistence of vertically transmitted parasites. *Journal of Theoretical Biology*, **246**, 10–17.
- Joshi D, McFadden MJ, Bevins D, Zhang F, Xi Z (2014) Wolbachia strain wAlbB confers both fitness costs and benefit on *Anopheles stephensi*. *Parasites & vectors*, **7**, 336.
- Kacsoh BZ, Schlenke TA (2012) High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*. *PLoS ONE*, **7**.
- Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP (2009) Immune activation by life-shortening Wolbachia and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science (New York, N.Y.)*, **326**, 134–6.
- Kanzawa T (1939) Studies on *Drosophila suzukii* Mats. *Studies on Drosophila suzukii* Mats.
- Karr TL, Yang W, Feder ME (1998) Overcoming cytoplasmic incompatibility in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society B*, **265**, 391–395.
- Kasuya N, Mitsui H, Ideo S, Watada M, Kimura MT (2013) Ecological, morphological and molecular studies on *Ganaspis* individuals (Hymenoptera: Figitidae) attacking *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Applied Entomology and Zoology*, **48**, 87–92.
- Kimura MT (2004) Cold and heat tolerance of drosophilid flies with reference to their latitudinal distributions. *Oecologia*, **140**, 442–449.
- Klick J, Lee JC, Hagler JR, Bruck DJ, Yang WQ (2014) Evaluating *Drosophila suzukii* immunomarking for mark-capture research. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **152**, 31–41.
- Klick J, Yang WQ, Bruck DJ (2015) Marking *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) with Rubidium or <sup>15</sup>N. *Journal of Economic Entomology*, **108**, 1447–1451.
- Klick J, Yang WQ, Walton VM *et al.* (2016) Distribution and activity of *Drosophila suzukii* in cultivated raspberry and surrounding vegetation. *Journal of Applied Entomology*, **140**, 37–46.
- Knipling EF (1955) Possibilities of insect control or eradication through the use of sexually sterile males. *Journal of Economic Entomology*, **48**, 459–462.
- Knipling EF (1979) The basic principles of insect population suppression and management. *Agriculture Handbook*. USDA.

- Kondo N, Shimada M, Fukatsu T (2005) Infection density of Wolbachia endosymbiont affected by co-infection and host genotype. *Biology letters*, **1**, 488–491.
- Lacroix R, McKemey AR, Raduan N *et al.* (2012) Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS ONE*, **7**, 1–9.
- Lance DR, McInnis DO (2005) Biological basis of the sterile insect technique. In: *Sterile Insect Technique*, pp. 69–94.
- Landmann F, Orsi GA, Loppin B, Sullivan W (2009) Wolbachia-mediated cytoplasmic incompatibility is associated with impaired histone deposition in the male pronucleus. *PLoS Pathogens*, **5**, 1–9.
- Lassy CW, Karr TL (1996) Cytological analysis of fertilization and early embryonic development in incompatible crosses of *Drosophila simulans*. *Mechanisms of Development*, **57**, 47–58.
- Laven H (1967) Eradication of *Culex pipiens fatigans* through cytoplasmic incompatibility. *Nature, London*, **216**, 383–384.
- Lee JC, Bruck DJ, Dreves AJ *et al.* (2011) In Focus: Spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, across perspectives. *Pest Management Science*, **67**, 1349–1351.
- Lee JC, Dreves AJ, Cave AM *et al.* (2015) Infestation of wild and ornamental noncrop fruits by *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae). *Annals of the Entomological Society of America*, **108**, 117–129.
- Leftwich PT, Koukidou M, Rempoulakis P *et al.* (2014) Genetic elimination of field-cage populations of Mediterranean fruit flies. *Proceedings of the Royal Society B*, **281**, 20141372.
- Legros JP, Argeles J (1993) L'invasion du vignoble par le phylloxéra. *Bull. Acad. Sci.*, pp. 205–223.
- Lively CM, Clay K, Wade MJ, Fuqua C (2005) Competitive co-existence of vertically and horizontally transmitted parasites. *Evolutionary Ecology Research*, **7**, 1183–1190.
- Lowe RE, Fowler JEF, Bailey DL *et al.* (1981) Separation of sexes of adult *Anopheles albimanus* by feeding of insecticide-laden blood. *Mosquito News*, **41**, 634–638.
- Martinez J, Longdon B, Bauer S *et al.* (2014) Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of Wolbachia strains. *PLoS Pathogens*, **10**, e1004369.
- Martinez J, Ok S, Smith S, Snoeck K, Day JP (2015) Should Symbionts Be Nice or Selfish? Antiviral Effects of Wolbachia Are Costly but Reproductive Parasitism Is Not. *PLoS pathogens*, **11**, e1005021.
- Mazzetto F, Gonella E, Alma A, *et al.* (2015) Wolbachia infection affects female fecundity in *Drosophila suzukii*. *Bulletin of Insectology*, **68**, 153–157.

- McInnis DO, Tam S, Grace C, Miyashita D (1994) Population suppression and sterility rates induced by variable sex ratio, sterile insect releases of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) in Hawaii. *Annals of the Entomological Society of America*, **87**, 231–240.
- McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN *et al.* (2009) Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, **323**, 141–144.
- McMeniman, O'Neill SL (2010) A Virulent wolbachia infection decreases the viability of the dengue vector *aedes aegypti* during periods of embryonic quiescence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **4**, e748.
- Merçot H, Charlat S (2004) Wolbachia infections in *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*: polymorphism and levels of cytoplasmic incompatibility. *Genetica*, **120**, 51–59.
- Miller B, Anfora G, Buffington M *et al.* (2015) Seasonal occurrence of resident parasitoids associated with *Drosophila suzukii* in two small fruit production regions of Italy and the USA. *Bulletin of Insectology*, **68**, 255–263.
- Min KT, Benzer S (1997) Wolbachia, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 10792–10796.
- Mitsui H, Beppu K, Kimura MT (2010) Seasonal life cycles and resource uses of flower- and fruit-feeding drosophilid flies (Diptera: Drosophilidae) in central Japan. *Entomological Science*, **13**, 60–67.
- Mitsui H, Takahashi KH, Kimura MT (2006) Spatial distributions and clutch sizes of *Drosophila* species ovipositing on cherry fruits of different stages. *Population Ecology*, **48**, 233–237.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA *et al.* (2009) A Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, **139**, 1268–1278.
- Moretti R, Calvitti M (2013) Male mating performance and cytoplasmic incompatibility in a wPip Wolbachia trans-infected line of *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*). *Medical and Veterinary Entomology*, **27**, 377–386.
- Mouton L, Henri H, Bouletreau M, Vavre F (2006) Effect of temperature on Wolbachia density and impact on cytoplasmic incompatibility. *Parasitology*, **132**, 49–56.
- Mouton L, Henri H, Charif D, Boulétreau M, Vavre F (2007) Interaction between host genotype and environmental conditions affects bacterial density in Wolbachia symbiosis. *Biology letters*, **3**, 210–213.
- Muller HJ (1928) The production of mutations by X-Rays. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **14**, 714–726.

- Nomano FY, Mitsui H, Kimura MT (2014) Capacity of Japanese Asobara species (Hymenoptera; Braconidae) to parasitize a fruit pest *Drosophila suzukii* (Diptera; Drosophilidae). *Journal of Applied Entomology*, **139**, 105–113.
- Novković B, Mitsui H, Suwito A, Kimura MT (2011) Taxonomy and phylogeny of *Leptopilina* species (Hymenoptera: Cynipoidea: Figitidae) attacking frugivorous drosophilid flies in Japan, with description of three new species. *Entomological Science*, **14**, 333–346.
- O'Connor L, Plichart C, Sang AC *et al.* (2012) Open Release of Male Mosquitoes Infected with a *Wolbachia* Biopesticide: Field Performance and Infection Containment. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, e1797.
- O'Neill SL, Hoffman AA, Werren JH (1997) *Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford University Press.
- Ometto L, Cestaro A, Ramasamy S *et al.* (2013) Linking genomics and ecology to investigate the complex evolution of an invasive *Drosophila* pest. *Genome biology and evolution*, **5**, 745–757.
- Osborne SE, Iturbe-Ormaetxe I, Brownlie JC, O'Neill SL, Johnson KN (2012) Antiviral protection and the importance of *Wolbachia* density and: Tissue tropism in *Drosophila simulans*. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 6922–6929.
- Osborne SE, Leong YS, O'Neill SL, Johnson KN (2009) Variation in antiviral protection mediated by different *Wolbachia* strains in *Drosophila simulans*. *PLoS Pathogens*, **5**, e1000656.
- Pannebakker BA, Pijnacker LP, Zwaan BJ, Beukeboom LW (2004) Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae). *Genome*, **303**, 299–303.
- Papathanos PA, Bossin HC, Benedict MQ *et al.* (2009) Sex separation strategies: past experience and new approaches. *Malaria journal*, **8**, S5.
- Parker AG (2005) Mass-rearing for sterile insect release. *Sterile Insect Technique*, pp. 209–232. Springer.
- Pearson DE, Callaway RM (2005) Indirect nontarget effects of host-specific biological control agents: Implications for biological control. *Biological Control*, **35**, 288–298.
- Pelton E, Gratton C, Isaacs R *et al.* (2016) Earlier activity of *Drosophila suzukii* in high woodland landscapes but relative abundance is unaffected. *Journal of Pest Science*, DOI **10.1007/s10340-016-0733-z**.
- Pimentel D, McLaughlin L, Zepp A *et al.* (1991) Environmental and economic impacts of reducing U.S. agricultural pesticide use. *Handbook of pest management in agriculture*, **I**, 679–718.

- Pimentel D, Zuniga R, Morrison D (2005) Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecological Economics*, **52**, 273–288.
- 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 Society of America*, **150**, 227–237.
- Porter JH, Parry ML, Carter TR (1991) The potential effects of climatic change on agricultural insect pests. *Agricultural and Forest Meteorology*, **57**, 221–240.
- Poyet M, Havard S, Prevost G *et al.* (2013) Resistance of *Drosophila suzukii* to the larval parasitoids *Leptopilina heterotoma* and *Asobara japonica* is related to haemocyte load. *Physiological Entomology*, **38**, 45–53.
- Poyet M, Le Roux V, Gibert P *et al.* (2015) The Wide Potential Trophic Niche of the Asiatic Fruit Fly *Drosophila suzukii*: The Key of Its Invasion Success in Temperate Europe? *PloS one*, **10**, e0142785.
- Pryor SC, Scavia D, Downer C *et al.* (2014) Midwest. Climate change impacts in the United States: The third national climate assessment.
- Pyšek P, Richardson DM, Rejmánek M *et al.* (2004) Alien plants in checklists and floras: Towards better communication between taxonomists and ecologists. *Taxon*, **53**, 131–143.
- Rendon P, McInnis D, Lance D *et al.* (2000) Comparison of medfly male-only and bisexual releases in large scale field trials. *Area-wide control of fruit flies and other insect pests*, pp. 517–525.
- Rendón P, McInnis D, Lance D, Stewart J (2004) Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *Journal of Economic Entomology*, **97**, 1547–1553.
- Reynolds KT, Hoffmann AA (2002) Male age, host effects and the weak expression or non-expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* strains infected by maternally transmitted Wolbachia. *Genetical research*, **80**, 79–87.
- Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M *et al.* (2000) Naturalization and invasion of alien plants: Concepts and definitions. *Diversity and Distributions*, **6**, 93–107.
- Riegler M, Stauffer C (2002) Wolbachia infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, **11**, 2425–2434.
- Riparbelli MG, Giordano R, Callaini G (2007) Effects of Wolbachia on sperm maturation and architecture in *Drosophila simulans* Riverside. *Mechanisms of Development*, **124**, 699–714.
- Robinson AS (2002) Mutations and their use in insect control. *Mutation Research*, **511**, 113–132.

Rossi Stacconi MV, Buffington M, Daane KM *et al.* (2015) Host stage preference, efficacy and fecundity of parasitoids attacking *Drosophila suzukii* in newly invaded areas. *Biological Control*, **84**, 28–35.

Rossi Stacconi MV, Grassi A, Dalton DT *et al.* (2013) First field records of *Pachycrepoideus vindemiae* as a parasitoid of *Drosophila suzukii* in European and Oregon small fruit production areas. *Entomologia*, **1**, 11–16.

Rossi-Stacconi MV, Kaur R, Mazzoni V *et al.* (2016) Multiple lines of evidence for reproductive winter diapause in the invasive pest *Drosophila suzukii*: useful clues for control strategies. *Journal of Pest Science*, DOI 10.100.

Rousset F, Raymond M, Kjellberg F (1991) Cytoplasmic incompatibilities in the mosquito *Culex pipiens*: How to explain a cytotype polymorphism? *Journal of Evolutionary Biology*, **4**, 69–81.

Runner GA (1916) Effect of röntgen rays on the tobacco, or cigarette beetle and the results of experiments with a new form of röntgen tube. *Depart. of Agriculture*.

Scolari F, Schetelig MF, Bertin S *et al.* (2008) Fluorescent sperm marking to improve the fight against the pest insect *Ceratitis capitata* (Wiedemann; Diptera: Tephritidae). *New Biotechnology*, **25**, 76–84.

Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W (2008) The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annual review of genetics*, **42**, 683–707.

Shearer PW, West JD, Walton VM *et al.* (2016) Seasonal cues induce phenotypic plasticity of *Drosophila suzukii* to enhance winter survival. *BMC ecology*, **16**, 11.

Siozios S, Cestaro A, Kaur R (2013) Draft genome sequence of the *Wolbachia* endosymbiont of *Drosophila suzukii*. *Genome Announcements*, **1**, 1–2.

Stephens AR, Asplen MK, Hutchison WD, Venette RC (2015) Cold Hardiness of Winter-Acclimated *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) Adults. *Environmental Entomology*, **44**, 1619–1626.

Suh E, Dobson SL (2013) Reduced competitiveness of *Wolbachia* infected *Aedes aegypti* larvae in intra- and inter-specific immature interactions. *Journal of Invertebrate Pathology*, **114**, 173–177.

Teixeira L, Ferreira Á, Ashburner M (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, **6**, 2753–2763.

Thompson J, Graham P, Schedt P, Pulak R (2004) Sex Specific GFP-Expression in *Drosophila* Embryos and Sorting by COPAS™ Flow Cytometry Technique. *45th Annual Drosophila Research Conference*, **1**, 6–9.

- Van Timmeren S, Isaacs R (2013) Control of spotted wing drosophila, *Drosophila suzukii*, by specific insecticides and by conventional and organic crop protection programs. *Crop Protection*, **54**, 126–133.
- Tochen S, Dalton DT, Wiman N *et al.* (2014) Temperature-Related Development and Population Parameters for *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) on Cherry and Blueberry. *Environmental Entomology*, **43**, 501–510.
- Tochen S, Woltz JM, Dalton DT *et al.* (2016) Humidity affects populations of *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) in blueberry. *Journal of Applied Entomology*, **140**, 47–57.
- Toivonen JM, Walker GA, Martinez-Diaz P *et al.* (2007) No influence of Indy on lifespan in *Drosophila* after correction for genetic and cytoplasmic background effects. *PLoS Genetics*, **3**, 0973–0983.
- Tram U, Fredrick K, Werren JH, Sullivan W (2006) Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. *Journal of cell science*, **119**, 3655–3663.
- Tram U, Sullivan W (2002) Role of delayed nuclear envelope breakdown and mitosis in Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility. *Science (New York, N.Y.)*, **296**, 1124–1126.
- Turelli M (1994) Evolution of Incompatibility-Inducing Microbes and Their Hosts. *Evolution*, **48**, 1500–1513.
- Turelli M, Hoffmann AA (1995) Cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*: Dynamics and parameter estimates from natural populations. *Genetics*, **140**, 1319–1338.
- Turley AP, Zalucki MP, O'Neill SL, McGraw EA (2013) Transinfected Wolbachia have minimal effects on male reproductive success in *Aedes aegypti*. *Parasites & vectors*, **6**, 36.
- Unckless RL, Jaenike J (2011) Maintenance of a Male-Killing Wolbachia in *Drosophila Innubila* By Male-Killing Dependent and Male-Killing Independent Mechanisms. *Evolution*, doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01485.x, 678–689.
- Vavre F, Charlat S (2012) Making (good) use of Wolbachia: what the models say. *Current opinion in microbiology*, **15**, 263–268.
- Vavre F, Fleury F, Lepetit D, Fouillet P, Boulétreau M (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of Wolbachia in host-parasitoid associations. *Molecular biology and evolution*, **16**, 1711–1723.
- Vavre F, Fleury F, Varaldi J, Fouillet P, Boulétreau M (2000) Evidence for female mortality in Wolbachia-mediated cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects: epidemiologic and evolutionary consequences. *Evolution*, **54**, 191–200.
- Veneti Z, Clark ME, Karr TL, Savakis C, Bourtzis K (2004) Heads or tails: Host-parasite interactions in the *Drosophila*-Wolbachia system. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**, 5366–5372.

Veneti Z, Clark ME, Zabalou S *et al.* (2003) Cytoplasmic incompatibility and sperm cyst infection in different *Drosophila*-*Wolbachia* associations. *Genetics*, **164**, 545–552.

Vreysen MJB, Saleh KM, Ali MY *et al.* (2000) *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *Journal of economic entomology*, **93**, 123–135.

Walker T, Johnson PH, Moreira LA *et al.* (2011) A non-virulent *Wolbachia* infection blocks dengue transmission and rapidly invades *Aedes aegypti* populations. *Nature*, **476**, 450–455.

Walker T, Moreira LA (2011) Can *Wolbachia* be used to control malaria? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **106**, 212–217.

Walsh DB, Bolda MP, Goodhue RE *et al.* (2011) *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae): Invasive Pest of Ripening Soft Fruit Expanding its Geographic Range and Damage Potential. *Journal of Integrated Pest Management*, **2**, 1–7.

Wang X, Stewart TJ, Biondi A *et al.* (2016) Population dynamics and ecology of *Drosophila suzukii* in Central California. *Journal of Pest Science*, DOI 10.100.

Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, Nisalak A (1987) Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for Dengue 2 virus. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **36**, 143–152.

Webster CL, Waldron FM, Robertson S *et al.* (2015) The Discovery, Distribution, and Evolution of Viruses Associated with *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol*, **13**, e1002210.

Weeks AR, Tracy Reynolds K, Hoffmann AA (2002) *Wolbachia* dynamics and host effects: What has (and has not) been demonstrated? *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 257–262.

Weeks AR, Turelli M, Harcombe WR, Reynolds KT, Hoffmann AA (2007) From parasite to mutualist: Rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of *Drosophila*. *PLoS Biology*, **5**, 0997–1005.

Weinert LA, Araujo-Jnr EV., Ahmed MZ, Welch JJ (2015) The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society B*, **282**.

Werren JH (1997) Biology of *Wolbachia*. *Annual review of entomology*, **42**, 587–609.

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

Weydert C, Mandrin JF (2013) Le ravageur *Drosophila suzukii*. *Point sur la situation en arboriculture fruitière et petits fruits. Infos CTIFL*.

Williamson M, Fitter A (1996) The varying success of invaders. *Ecology*, **77**, 1661–1666.

- Woltz JM, Donahue KM, Bruck DJ, Lee JC (2015) Efficacy of commercially available predators, nematodes and fungal entomopathogens for augmentative control of *Drosophila suzukii*. *Journal of Applied Entomology*, doi: 10.11.
- Yeap HL, Axford JK, Popovici J *et al.* (2014) Assessing quality of life-shortening *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* mosquitoes in the field based on capture rates and morphometric assessments. *Parasites & vectors*, 7, 58.
- Yeap HL, Mee P, Walker T *et al.* (2011) Dynamics of the “popcorn” *Wolbachia* infection in outbred *Aedes aegypti* informs prospects for mosquito vector control. *Genetics*, 187, 583–595.
- Yen JH, Barr AR (1971) New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature*, 232, 657–658.
- Zabalou S, Apostolaki A, Livadaras I *et al.* (2009) Incompatible insect technique: Incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 132, 232–240.
- Zabalou S, Apostolaki A, Pattas S *et al.* (2008) Multiple rescue factors within a *Wolbachia* strain. *Genetics*, 178, 2145–2160.
- Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M *et al.* (2004) *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 15042–15045.
- Zerulla FN, Schmidt S, Streitberger M, Zebitz CPW, Zelger R (2015) On the overwintering ability of *Drosophila suzukii* in South Tyrol. *Journal of Berry Research*, 5, 41–48.
- Zhang D, Zheng X, Xi Z, Bourtzis K, Gilles JRL (2015) Combining the Sterile Insect Technique with the Incompatible Insect Technique: I-Impact of *Wolbachia* Infection on the Fitness of Triple- and Double-Infected Strains of *Aedes albopictus*. *Plos One*, 10, e0121126.
- Zhou W, Rousset F, O’Neil S (1998) Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proceedings of the Royal Society B*, 265, 509–515.

## Résumé

Depuis sa récente invasion des continents européen et américain, la drosophile à aile tachetées, *Drosophila suzukii*, entraîne des pertes économiques majeures dans les exploitations de fruits rouges. Contrairement aux autres espèces de drosophiles, *D. suzukii*, est capable de pondre ses œufs dans des fruits sains avant la récolte, à l'aide de son ovipositeur sclérotinisé. Les pertes économiques liées à la présence de *D. suzukii* s'élèvent annuellement à plusieurs millions de dollars. Le contrôle des populations se fait principalement par l'utilisation de pesticides. Ici, nous avons testé si la bactérie *Wolbachia* pouvait être efficace pour lutter contre cette espèce. Ce symbiote est présent chez de nombreuses espèces d'insectes et induit souvent de l'incompatibilité cytoplasmique (IC): les descendants des mâles infectés meurent, exceptés si l'œuf est sauvé par la même infection héritée de la mère et qui va protéger l'embryon contre cette toxine encore non identifiée. La Technique de l'Insecte Incompatible (TII) repose sur l'utilisation de l'IC pour contrôler les populations d'insecte par des lâchers de mâles infectés. Nous avons montré que *D. suzukii* est naturellement infectée par une souche de *Wolbachia*, nommée *wSuz*, qui montre des prévalences intermédiaires dans les populations naturelles et qui n'induit pas un taux d'IC élevé. Pour le développement de la TII chez *D. suzukii*, nous avons réalisé des transferts de souches de *Wolbachia* entre *D. simulans* et *D. suzukii* pour identifier des souches qui peuvent stériliser les femelles *D. suzukii*, en dépit de la présence de *wSuz*. Nous avons identifié deux souches de *Wolbachia* comme candidates pour le développement de la TII. Ces souches induisent des taux d'IC très élevés chez ce ravageur qui ne sont pas atténués par la présence de *wSuz* chez les femelles. Les mâles stérilisants ont une compétitivité sexuelle similaire à celle des mâles infectés ou non par *wSuz*, et sont capables d'induire des taux d'IC élevés tout au long de leur vie. Finalement nous avons montré que, dans de grandes cages à population, la TII pouvait être très efficace pour limiter l'augmentation de la taille des populations de *D. suzukii*. L'ensemble des résultats confirment que la TII est une approche prometteuse pour contrôler les populations de *D. suzukii* et mérite de dépasser le stade du laboratoire. Associée à une technique de sexage efficace, la TII peut être un outil puissant, spécifique et respectueux de l'environnement.

## Abstract

Since its recent invasion of the European and American continents, the spotted wing *Drosophila*, *D. suzukii* has become a major burden of the fruit industry. Armed with a highly sclerotized ovipositor, females can lay eggs in a wide variety of ripening and healthy fruits, in contrast to other *Drosophila* species. Economic losses due to *D. suzukii* reach millions of dollars annually and methods to control natural populations in the field mainly rely on the use of chemical pesticides. Here we test if *Wolbachia* bacteria can represent a potential ally to control this pest species. These symbionts are naturally present in many insects and often induce a form of conditional sterility called Cytoplasmic Incompatibility (CI): the offspring of infected males die, unless the eggs are rescued by the same infection inherited from the mother which protects the embryo against a yet unidentified toxin. As long recognized, a strategy called the Incompatible Insect Technique (IIT) makes use of the CI phenotype to control insect populations through the mass release of infected males. *D. suzukii* is naturally infected by a single *Wolbachia* strain, named *wSuz*, which has an intermediate prevalence in field populations and which does not induce a high level of CI. To implement IIT in *D. suzukii*, we used back and forth *Wolbachia* transfers between *D. suzukii* and *D. simulans* to identify *Wolbachia* strains that can fully sterilize *D. suzukii* females despite the presence of *wSuz*. We identified two potential candidates, both induce a very high level of CI in this pest which is not attenuated by the presence of *wSuz* in females. The transinfected males showed a similar competitiveness compared naturally infected and uninfected males and are able to induce a high level of CI during all their life. Finally we demonstrated that, in large population cages, the IIT can be very efficient to limit the *D. suzukii* population size. All these results confirmed that the IIT is a promising approach to control *D. suzukii* population and merit to go out the laboratory. Associate with a perfect sexing technique, IIT can be a powerful tool to fight against *D. suzukii*, which is not polluting and species specific.