



HAL
open science

Évolution et mécanismes d'évitement de la consanguinité chez un hyménoptère parasitoïde *Venturia canescens*

Marie Collet

► **To cite this version:**

Marie Collet. Évolution et mécanismes d'évitement de la consanguinité chez un hyménoptère parasitoïde *Venturia canescens*. Evolution [q-bio.PE]. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1338 . tel-01696129

HAL Id: tel-01696129

<https://theses.hal.science/tel-01696129>

Submitted on 30 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 : 2017LYSE1338

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale ED341
Évolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité de doctorat : Écologie Évolutive

Soutenue publiquement le 20/12/2017, par :
Marie Collet

Evolution et mécanismes d'évitement de la consanguinité chez un hyménoptère parasitoïde *Venturia canescens*

Devant le jury composé de :

Dechaume-Moncharmont François-Xavier, Maître de conférences HDR,
Université de Bourgogne Franche-Comté, Dijon
Charpentier Marie, Directrice de Recherche,
CEFE, Montpellier
Goubault Marlène, Maître de conférences HDR,
Université François Rabelais, Tours
Outreman Yannick, Professeur des Universités,
AgroCampus Ouest, Rennes

Rapporteur

Rapporteuse

Examinatrice

Examineur

Desouhant Emmanuel, Professeur des Universités,
Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon
Mouton Laurence, Maître de conférences HDR,
Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon

Directeur de thèse

Co-directrice de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

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. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE 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. Hassan 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 Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

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

Résumé

La consanguinité est connue par les biologistes pour diminuer la valeur sélective des individus en diminuant par exemple leur survie ou leur fertilité. De ce fait, la sélection naturelle devrait favoriser l'apparition de comportements permettant l'évitement des accouplements entre apparentés pour limiter les conséquences néfastes dues à la dépression de consanguinité. Cette dépression de consanguinité est particulièrement visible chez les Hyménoptères avec un système de détermination du sexe appelé *single-locus Complementary Sex Determination* (sl-CSD), où elle amène à la production de mâles diploïdes non viables ou stériles. Mon travail de thèse a ainsi consisté à étudier le phénomène d'évitement d'accouplements entre apparentés dans des populations naturelles d'un hyménoptère parasitoïde avec sl-CSD, *Venturia canescens*, ainsi que des signaux utilisés par les femelles pour déterminer l'apparentement qu'elles ont avec les individus qu'elles rencontrent. Nous avons d'abord étudié le lien unissant type d'habitat (continental, îles ou laboratoire), diversité génétique et production de mâles diploïdes dans 11 populations de *V. canescens*. En effet, un cadre théorique nommé "Vortex d'extinction dû aux mâles diploïdes" prédit une corrélation négative entre isolations des populations, diversité génétique et production de mâles diploïdes pouvant amener à l'extinction de populations d'Hyménoptères. Nous avons ainsi démontré une corrélation négative entre diversité génétique et production de mâles diploïdes dans les populations isolées de *V. canescens*. Ensuite, il a été montré précédemment que les femelles de cette espèce étaient capables de discriminer les mâles qui leur étaient apparentés et d'éviter les accouplements entre apparentés en laboratoire. Nous nous sommes ainsi intéressés à ce phénomène d'évitement d'accouplement entre apparentés dans des populations naturelles grâce au génotypage de 450 individus du terrain et leur descendants. Nous avons montré que les femelles toléraient les accouplements entre apparentés sur le terrain ainsi qu'en laboratoire en présence de plusieurs mâles, nous permettant de mettre en lumière l'importance des conditions environnementales sur le choix du partenaire sexuel. Nous nous sommes enfin concentrés sur le système de reconnaissance des apparentés au niveau mécanistique en étudiant les signaux chimiques utilisés par les femelles pour reconnaître leurs apparentés dans deux contextes écologiques différents, le choix du partenaire sexuel et l'évitement du superparasitisme lors de la ponte. Nous avons ainsi montré des similitudes entre les compositions chimiques de ces deux signaux mais aussi qu'ils n'étaient pas interchangeables entre les deux contextes écologiques étudiés. Au final, les résultats obtenus apportent un nouvel éclairage sur les conditions nécessaires à l'apparition d'un évitement d'accouplements entre apparentés dans des populations naturelles ainsi que sur les signaux utilisés lors de la reconnaissance de parentèle chez un hyménoptère parasitoïde.

Abstract

Inbreeding is well known by biologists to lower the fitness of individuals by for example decreasing survival or fertility. Therefore, natural selection should favour behaviours preventing the reproduction of genetically-related individuals or mitigating the harmful consequences, called inbreeding depression. Inbreeding depression is particularly visible in Hymenoptera with a sex-determination system called single-locus Complementary Sex Determination (sl-CSD), where it leads to the production of diploid males that are either unviable or sterile. My PhD work has thus been devoted to the study of sib-mating avoidance in natural populations of a parasitoid with sl-CSD, *Venturia canescens*, and to understand the cues used by females to recognize their kin. We first studied the link between habitat type (continental, island or captive), genetic diversity and diploid male production in 11 *V. canescens* populations. Indeed, a theoretical framework called "Diploid male extinction vortex" predict a negative correlation between populations' isolation, genetic diversity and diploid male production that could lead to the extinction of hymenopteran populations. We actually showed a negative correlation between genetic diversity and diploid male production in isolated populations. Previous studies have furthermore demonstrated kin discrimination and sib-mating avoidance by *V. canescens* females in the laboratory. We therefore studied the sib-mating avoidance behaviour in natural populations of this species by genotyping more than 450 wild individuals and their offsprings. We demonstrated that females tolerated inbreeding in the wild as well as in the laboratory when several males were present. We highlighted the importance of environmental conditions on mate choice. At last, we were interested in the kin recognition system and researched the chemical cues used by females in two ecological contexts, mate choice and superparasitism avoidance. This allowed us to identify similarities in the composition of the two chemical signals and find that they were not interchangeable between the two studied ecological contexts. In the end, the results we obtained shed new light on the necessary conditions for the apparition of sib-mating avoidance in natural populations, as well as on the cues used for kin recognition in a parasitoid.

Marie Collet

Doctorante

11 rue de Montbrillant

69003 Lyon

+33627354935

✉ marie.collet@univ-lyon1.fr

📄 <https://lbbe.univ-lyon1.fr/-Collet-Marie-.html>

Date de naissance : 14 12 1991 à Firminy (France)

Titulaire du permis B

Adresse professionnelle :

Université Claude Bernard Lyon 1

43 Bd du 11 Novembre 1918

Bat G. Mendel, 1er étage, Bureau 14

UMR CNRS 5558 Biométrie et Biologie Evolutive

69622 Villeurbanne Cedex, France

Doctorante en troisième année au Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive sous la direction d'Emmanuel Desouhant et Laurence Mouton après un Master de Biologie à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon, je m'intéresse actuellement aux phénomènes de sélection sexuelle et particulièrement l'évolution de l'évitement de la consanguinité. J'ai ainsi publié deux articles sur ce sujet et présenté mon travail à trois conférences nationales et internationales. J'ai de plus bénéficié d'une Activité Complémentaire d'Enseignement pendant mes trois années de doctorat, me permettant d'enseigner 192h en Travaux Dirigés et Travaux Pratiques dans l'équipe pédagogique Biométrie de l'université Claude Bernard Lyon 1. De plus, j'ai obtenu un demi-poste d'Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche à l'Université Claude Bernard Lyon 1 pour l'année 2017/2018 afin de terminer mon doctorat avec une demi-charge d'enseignement (96h/an).

Formation

- 2017-2018 **Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche, Demi-poste**, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, Département de Biologie, Équipe pédagogique Biométrie.
Evolution et mécanismes d'évitement de la consanguinité
- 2014-2017 **Doctorat en Biologie évolutive et Ecologie, en cours**, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, Sous la direction d'Emmanuel Desouhant et Laurence Mouton.
Evolution et mécanismes d'évitement de la consanguinité
- 2013-2014 **Master 2 de Biologie fondamentale, Mention Très bien**, Ecole Normale Supérieure de Lyon (ENS Lyon), Lyon, France.
Parcours Biologie Evolutive et Ecologie
- 2012 **Licence de Biologie fondamentale, Mention Bien**, Ecole Normale Supérieure de Lyon (ENS Lyon), Lyon, France.
2^e sur 48 étudiants
- 2009-2011 **Attestation du parcours de formation en Classe Préparatoire aux Grandes Ecoles, Mention Très Bien**, Lycée du Parc cursus CPGE, Lyon, France, Filière Biologie, Chimie, Physique, Sciences de la Terre (BCPST).
- 2009 **Baccalauréat, Mention Très Bien**, Lycée Léonard de Vinci, Monistrol sur Loire, France, Filière Scientifique Sciences de la Vie, Spécialité Physique Chimie.
Option facultative : Cinéma Audio-visuel

Activités de recherches

Expériences professionnelles

- Depuis octobre 2014 **Thèse de doctorat**, *Equipe Ecologie du Comportement et Dynamique des populations*, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, Sous la direction d'Emmanuel Desouhant et Laurence Mouton.
Evolution et mécanismes d'évitement de la consanguinité
- Février-Mai 2014 **Stage de recherche**, *Equipe Bases Génétiques de l'Adaptation (GBA)*, Laboratoire d'Ecologie Alpine, UMR CNRS 5553, Université Joseph Fourier, Grenoble, France, Sous la direction de Laurence Desprès.
Evolution de la résistance au Bti et réponses immunitaires chez le moustique *Aedes aegypti*
- Septembre - Décembre 2013 **Stage de recherche**, *Animal Ecology Team*, Department of Ecology and Genetics, Evolutionary Biology Centre, University of Uppsala, Uppsala, Suède, Sous la direction d'Elina Immonen et Göran Arnqvist.
Effects of mito-nuclear interactions on reproductive senescence in a seed beetle, *Callosobruchus maculatus* (Effets des interactions mito-nucléaires sur la sénescence reproductive chez la bruche *Callosobruchus maculatus*)
- Février - Juin 2013 **Stage de recherche**, *Equipe Bioinformatique et Génomique Evolutive*, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France, Sous le direction de Laurent Duret.
Influence de la conversion génique biaisée vers GC sur l'évolution de l'expression des gènes
- Juin - Juillet 2012 **Stage de recherche**, *Equipe Paléogénomique et Evolution Moléculaire*, Institut de Génomique Fonctionnelle de Lyon (IGFL), UMR 5242, Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France, Sous la direction de Catherine Hänni.
Histoire des mouflons chypriotes : une approche paléogénétique

Contrats

- 2017-2018 **Obtention d'un contrat d'Attachée Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)**, *Département de Biologie, Équipe pédagogique de Biométrie*, Université Claude Bernard Lyon 1.
- 2014-2017 **Obtention d'un contrat doctoral ministériel**, *École doctorale E2M2, ED341*, Université Claude Bernard Lyon 1.
1^{re} sur liste principale
- 2014-2017 **Obtention d'une Activité Complémentaire d'Enseignement (ACE)**, *Département de Biologie, Équipe pédagogique de Biométrie*, Université Claude Bernard Lyon 1.

Compétences de recherche

Techniques de laboratoire

- Biologie moléculaire Extraction ADN et ARN, Génotypage microsatellites, Séquençage Illumina, Travail en salle blanche sur ADN ancien, PCR monoplex et multiplex
- Écologie chimique Extraction solvant, GC-MS (création de séquences, lecture et analyse)
- Modèle Insecte Gestion d'élevage, Dissections, Etudes de comportement, Microinjections, Bio-essais
- #### Analyse de données
- Statistiques Logiciel R, Modèles linéaires, Modèles linéaires mixtes généralisés, Modèles de survie, Analyses multivariées

Données moléculaires Lecture de chromatogrammes microsatellites (GENEMARKER), Analyse de données RNA-Seq (package edgeR et NOISeq sous R), Blast (NCBI)

Données comportementales Analyse de séquence comportementales (JWATCHER)

Langues

Anglais **Avancé** Niveau C1 du Cadre européen commun de références pour les langues

Allemand **Scolaire** Niveau B2 du Cadre européen commun de références pour les langues

Compétences Informatiques

Logiciels Microsoft Office, R, GeneMarker, Langage Python
JWatcher, L^AT_EX

Production scientifique

Publications dans des revues à comité de lecture

- [1] Elina Immonen, **Marie, Collet**, Julieta Goenaga, and Göran Arnqvist. Direct and indirect genetic effects of sex-specific mitonuclear epistasis on reproductive ageing. *Heredity*, 116(3) :338–347, January 2016. **Recommandé par John Tower sur F1000 Prime (2 étoiles : Very Good)**.
- [2] **Marie, Collet**, Isabelle Amat, Sandrine Sauzet, Alexandra Auguste, Xavier Fauvergue, Laurence Mouton, and Emmanuel Desouhant. Insects and incest : field evidence for dangerous liaisons in a parasitoid wasp. *Peer Community in Evolutionary Biology*, soumis.
- [3] **Marie, Collet**, Chloé Vayssade, Alexandra Auguste, Laurence Mouton, Emmanuel Desouhant, Thibaut Malausa, and Xavier Fauvergue. Diploid male production correlates with genetic diversity in the parasitoid wasp *Venturia canescens* : a genetic approach with new microsatellite markers. *Ecology and Evolution*, 6(18) :6721–6734, September 2016.

Publications en préparation

- [1] **Marie, Collet**, Guillaume Meiffren, Isabelle Amat, Gilles Comte, Laurence Mouton, and Emmanuel Desouhant. Do parasitoid wasps use the same cues to inform on kinship during host and mate choice ? en préparation.

Posters

2016 **Choix du partenaire sexuel en conditions naturelles : Vers un évitement des apparentés ?**, Doctorales E2M2.
Primé

Présentations orales

2016 **Mate choice in the field : sib-mating avoidance ?**, Colloque de Biologie de l’Insecte (CBI), Tours, France.

2017 **Être reconnu comme apparenté dans deux contextes écologiques : nécessité d’émettre d’une ou deux informations ?**, Les Entomophagistes, Lyon, France.
Prix de la Société Entomologique de France

2017 **Information used to be recognized as a kin differ between ecological contexts**, Animal Behaviour, Lisbonne, Portugal.

■ Activités pédagogiques

Enseignement

- Mathématiques pour les Sciences de la Vie, TP informatique, niveau L1
- Culture Numérique, TP informatique, niveau L1
- Génétique 2, TD de génétique des populations, niveau L2
- Génétique 2, TP de biologie moléculaire, niveau L2
- Biodiversité et Évolution, TP de biologie moléculaire, niveau L3
- Biostatistiques, TP informatique, niveau L3
- Evolution Moléculaire, TP informatique, niveau M1

Encadrement

2016 Matthieu Marfoggia, L2

Remerciements

L'écriture des remerciements de thèse, ou l'art d'essayer de clôturer trois ans de travail en quelques lignes, en restant le plus juste possible et sans oublier personne. C'est cependant un exercice délicat que de remercier les gens qui vous ont entourés pendant plusieurs années en respectant l'impact qu'ils ont eu au cours ces trois dernières années en particulier et tout au long de ma vie pour certains. Délicat, parce que chargé d'émotions et de souvenirs face à trois années intenses qui m'ont vue changer et que rendre hommage reste un travail d'équilibre subtil.

Je voudrais tout d'abord remercier mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'avoir bravé le froid hivernal en cette presque veille de Noël pour m'écouter. Ce travail de thèse n'aurait cependant jamais vu le jour sans les personnes qui m'ont accompagnée et guidée pendant ces trois années, et je ne peux que remercier du fond du cœur mes deux directeurs de thèse. Manu déjà, pour m'avoir rencontrée en avril 2013 suite à un mail et m'avoir proposé de travailler avec toi sur un projet qui réunissait tout ce que je cherchais (à ce moment vainement) dans un projet de thèse. J'ai eu la chance de travailler avec quelqu'un comme toi, toujours disponible pour des discussions et bienveillant dans tes remarques (plus à l'oral qu'à l'écrit d'ailleurs, mais tu compensais toujours quand on en rediscutait ensuite), et surtout à l'écoute, même dans les moments plus difficiles que j'ai pu traverser. Je t'assure qu'en en discutant avec d'autres ami(e)s thésards, j'ai mesuré cette chance face à des récits parfois compliqués sur ces années particulières que sont les années de thèse. Évidemment, mon encadrement n'aurait pas été complet sans ta présence Laurence, qui, en plus de m'intégrer à une seconde équipe, a constitué une balance dans chacun de mes projets. Ton implication dans mon sujet, qui ne recouvrait pas toujours ce que tu fais au quotidien, m'a poussée à toujours m'interroger sur les bases de mon travail et le bien fondé de mes hypothèses (et de faire attention à la hiérarchie de mes points dans mes présentations). Ton regard extérieur a été très précieux tout au long de mon travail et m'a forcée à aborder ce travail d'explicitation continuelle, si nécessaire pour avancer, mais au combien difficile et parfois ingrat. Tu as toujours su me soutenir et me guider lors de mes premiers pas devant les étudiants et ton aide m'aura été précieuse pour progresser en enseignement. Vous avez formé un équipe d'encadrement formidable, complémentaire, (et assez peu contradictoire, ce qui est parfois une gageure lors d'un encadrement multiple) et je ne serais certainement pas ici sans vous.

Merci à toutes les équipes qui m'ont accueillie en leur sein pour des durées plus ou moins longues. Merci à l'équipe d'Ecologie Evolutive, à Isa pour ses conseils et sa participation à mon travail, et aux autres, qui bien qu'ils soient restés un peu "les gens du fond du couloir", m'ont permis de sortir un peu de mes insectes et de voir des plus grosses bêtes de temps en temps. Merci en particulier à Timothée, avec qui j'ai partagé les galères de la CG-MS et d'analyses chimiques, ainsi que quelques cafés (ou plutôt clémentines) qui remontent le moral. Merci à l'équipe GEIHP, avec qui j'ai

passé le plus clair de mon temps bien que je ne sois pas tout à fait dans le bon domaine de recherche. Merci donc à Fabrice, Patricia, Sylvain, Julien, Natacha et Hélène pour les débats plus ou moins scientifiques, les échanges et la vie dans cette équipe que vous créez qui m'a permis de m'épanouir dans le laboratoire. Merci bien sûr à tous les étudiants en thèse passés ou présents qui ont partagés une partie de cette expérience avec moi : merci Marie C (la brune), Gabriel, David, Julien, Olivier, Pierre et Alexis. Un merci tout particulier à Christophe, qui dès que j'ai débarqué dans son bureau le 1er octobre 2014, a pris soin de m'initier aux arcanes de la vie au labo, ainsi qu'au jonglage entre deux équipes de deux départements. Sans toi, mon début de thèse aurait été bien plus complexe et nos discussions m'ont bien manqué depuis que tu es parti pour de nouveaux horizons, le bureau 114 est bien vide sans toi ! Merci aussi à tous les stagiaires qui sont passés par là et qui ont contribué à animer la science à tout moment. Merci à toutes les personnes que j'ai côtoyées depuis 3 ans au LBBE, que ce soit en réunion ou simplement en salle café ou dans les couloirs et avec qui les échanges sont toujours enrichissants. Un grand merci au pôle administratif, Nathalie, Odile et Laëtitia, pour nous permettre de travailler dans d'aussi bonnes conditions et éviter (au maximum) tous les tracasseries administratifs. Merci aussi à toutes les personnes qui m'ont permis de manipuler dans de bonnes conditions et sans qui cette thèse majoritairement expérimentale aurait été sûrement ratée : Sandrine pour m'avoir initiée à *Venturia* et ses mystères, ton expérience m'a cruellement manqué après ton départ, Elsa, sans qui mes dernières manipulations auraient été encore plus compliquées, Natacha, pour toutes les galères de CO₂ et Hélène pour tous tes conseils quand j'en avais besoin, surtout quand ils concernent des manipulations de BET...

Mais les équipes du LBBE n'ont pas été les seules à nourrir à ma thèse. Je suis très reconnaissante envers toute l'équipe BPI de l'INRA Sophia Antipolis (ou quel que soit le nom maintenant que la COMUE existe), et en particulier envers Xavier, Aurélie et Alexandra sans qui une bonne partie de mes résultats ne seraient pas là aujourd'hui. Merci Xavier de m'avoir accueillie lors de ma première année, et de m'avoir fait confiance pour reprendre des données plus anciennes et les valoriser. Les discussions scientifiques sur mes projets et les articles ont eu beaucoup d'impact sur mon travail, malgré des visions parfois décourageantes de papiers de toutes couleurs sauf le noir après ton passage... Merci aussi pour ce nouveau projet qui s'ouvre et que j'ai hâte de démarrer. Je voudrais aussi chaleureusement remercier Gilles et Guillaume du CESN, qui ont accompagné mes premiers pas plus qu'hésitants en écologie chimique et qui m'ont permis d'enrichir cette thèse d'un domaine que je ne connaissais pas.

Cette thèse a bien évidemment été un travail formidablement intéressant, mais épuisant, et je ne serais vraisemblablement pas allée jusqu'au bout sans toutes les personnes qui ont partagées mon quotidien d'étudiante en thèse. Merci, merci, merci à mes 852 préférés, dont l'amitié ne faillit pas depuis 5 ans. Nos retrouvailles, bien que souvent brèves, ont été des véritables bouffées d'oxygène et de folies dans mon quotidien. La distance, bien que de plus en plus conséquente, ne viendra pas à bout des Agros, Forts & Verts en toutes circonstances. Merci pour les soirées, les réveillons dans l'odeur de furets au milieu des chiens et des perroquets. Merci pour LA Maladie et les fous rires. Merci pour les thèses, les achats de maisons, et les mariages à venir qui sont de tellement bonnes raisons de se revoir. Merci à mon kharré Yoann un peu fou, qui m'a sûrement transmis une partie de sa passion, pour le piano, la recherche, et les longues études (j'ai dit une partie seulement !). Un merci du fond du cœur à mes co-trinômes de khôlle adorées, PGR et Louise, avec qui j'ai commencé la "vraie" science : "C'est pour pêcher quoi vos vers de terre ?" "Euh, pour disséquer, vous n'avez pas plus gros ?" Merci

au sacrifice de tous les Jean-Etienne qui m'ont valu d'être inscrite au fichier client de Chasse Pêche et Nature, et à la chorégraphie des pompes à protons (ou canaux ioniques), sans qui je ne serais pas là aujourd'hui. Merci à vous pour ces années folles et votre soutien. On se revoit très vite en juillet avec plein de choses à fêter ! Merci à tous mes amis plus ou moins récents qui ont mis du bonheur et de la musique dans ma vie. Merci à ceux de l'ENS pour les discussions et les soirées plus ou moins sérieuses. Merci surtout à celle de toujours, qui aura vraiment tout connu. Merci Astrid, mon chaton, d'être toujours là depuis 25 ans, malgré nos différences. Merci pour ta folie et ta bonne humeur, les soirées vin blanc et... vin blanc (mais ça c'était avant), les poulets rôtis à Paris et les tisanes. Merci pour ton mariage en pleine rédaction surtout, mais qui redonne foi en l'avenir. Merci pour tout le passé, et un milliard de mercis pour l'avenir... Selon la phrase éculée, "On n'est riche que de ses amis". Dans des années aussi intenses que celles de la thèse, vos amitiés m'ont été indispensables pour maintenir le cap et garder le moral.

Je ne suis cependant pas grand-chose sans ma famille. Merci donc à ma belle-famille de m'avoir adoptée et laisser trouver un refuge sur Lyon quand j'en avais besoin. Merci Cathy et Christophe, Camille, Lucille et Thibault, de cette certitude que j'avais de pouvoir compter sur vous toutes ces années (et les précédentes). Merci à la belle-famille agrandie un peu barrée, avec qui j'ai eu certains de mes plus gros fous rires. Et bien évidemment, merci à mes proches. Ma maman, sans qui je ne serais peut-être jamais remontée dans ce foutu TER une rentrée de janvier 2010 pour retourner en prépa. Tu as toujours été là, à me soutenir dans tous mes projets, et à croire en moi même quand je n'y croyais plus. Je ne te remercierai jamais assez pour tout et je suis extrêmement heureuse de commencer cette nouvelle page (presque) pas loin de toi. Il n'y a pas de mots pour décrire ton amour et ton soutien, et j'espère être une aussi bonne mère pour Jean-Marc que tu ne l'es pour moi et mes sœurs. Merci à Sylvain, d'être là et de partager ces aventures aux côtés de ma mère. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, tes conseils, les discussions sur tout et ton goût assez incroyable. Je suis extrêmement flattée que nos discussions sur l'évolution t'aient amené à modifier ta façon de l'enseigner à tes élèves, c'est une grosse reconnaissance de mon travail et de ma vie actuelle. Merci évidemment à mes deux sœurs chéries, qui même loin, m'apportent tellement. Merci à toi, Cloé, ma Crotte de Bison égarée dans la Plaine, pour ta force, ton courage et ta persévérance qui fait de toi un exemple merveilleux, même si c'était mon rôle de grande sœur. Merci aussi d'avoir écrit un mémoire merveilleux pour ton diplôme d'archi et de m'avoir foutu une pression monstrueuse pour faire aussi bien avec celui-ci. Merci à Manon, Carotte agile bis, d'être si différente de moi. Merci pour toutes ces discussions semi-ésotériques qui me rendent dubitatives, merci pour ton ouverture d'esprit et ta vision du monde, un gros coup de vent dans mon esprit cartésien. Merci à mes beaux-frères et gare à vos fesses si vous ne vous occupez pas bien de mes sœurette. Merci à mes grand-mères, chez qui je peux toujours me ressourcer. J'ai une pensée particulière pour Grand-Père, qui j'en suis sûre, aurait adoré être là et discuter pendant des heures de mon travail.

La thèse permet aussi de faire un point sur sa vie et d'éprouver les liens les plus forts. Choisir ce qui est bon pour soi et comprendre ce qui est important fait à la fois partie du travail de la chercheuse et de la femme que je suis aujourd'hui. Ces années m'ont aussi permis de me rendre compte à quel point tu m'étais indispensable. Merci donc enfin à toi, Aurèl, mon amour, qui partage ma vie depuis bien plus longtemps que le début de cette thèse. Ces années ont été faites de hauts et de bas, et même de très bas parfois. Pour autant, on ne s'est jamais lâchés et on ressort tellement grandis. Merci à

toi d'être toujours là, de m'avoir supportée depuis si longtemps et surtout ces quatre (cinq ? six ?) derniers mois difficiles de rédaction, en jonglant avec brio entre coup de pieds aux fesses et mots de réconfort. Je ne serais assurément pas là sans toi aujourd'hui et certainement pas la même. Ta force et ton amour restent les piliers de ma vie en toutes circonstances et je suis fière d'être ta conjointe.

Enfin, merci à toi, qui n'est pas encore né, mais qui connaît déjà intérieurement les affres de la rédaction et de la soutenance de thèse. Cette thèse est aussi la tienne.

Ne baisse pas les bras, tu risquerais de le faire deux secondes avant le miracle.

Proverbe arabe.

Table des matières

Curriculum vitæ	iii
Remerciements	vii
Table des matières	xiii
Liste des figures	xv
Liste des tableaux	xvii
Liste des encadrés	xix
I Introduction	1
1 Synthèse bibliographique	3
1.1 Sélection sexuelle et consanguinité	4
1.2 La reconnaissance de parentèle	13
1.3 Préférence et choix d'un partenaire sexuel	25
2 La guêpe hyménoptère parasitoïde <i>Venturia canescens</i>	29
2.1 Biologie descriptive	30
2.2 Un modèle comportemental	34
3 Objectifs de la thèse	37
II Résultats	41
4 Populations isolées et mâles diploïdes : un « je t'aime moi non plus », entre perte de diversité allélique et risque d'extinction	43
4.1 Introduction	44
4.2 Article 1 : Diploid male production correlates with genetic diversity in the parasitoid wasp <i>Venturia canescens</i> : a genetic approach with new microsatellite markers (Publié)	48
4.3 Discussion	63
5 Tolérance à l'accouplement entre apparentés sur le terrain	67
5.1 Introduction	68
5.2 Article 2 : Insect and incest : field evidence for dangerous liaisons in a parasitoid wasp (en révision)	70
5.3 Discussion	93

6 Mécanismes chimiques de reconnaissance des apparentés	95
6.1 Introduction	96
6.2 Article 3 : Do parasitoid wasps use the same cues to inform on kinship during host and mate choice? (en préparation)	97
6.3 Discussion	115
III Conclusion et perspectives	117
7 Discussion générale et perspectives	119
7.1 Résumé des résultats principaux	120
7.2 Bases génétiques de la reconnaissance de parentèle	121
7.3 Sélection sexuelle et le paradoxe du sexe chez <i>Venturia canescens</i>	127
7.4 Evolution des phéromones sexuelles	131
IV Annexes	I
A Review de l'article 2	III
B Matériels et Méthodes de l'expérience préliminaire de transcriptomique	XVII
B.1 Extraction d'ARN et séquençage	XVII
B.2 Analyses statistiques	XVII
C Tableau des gènes différentiellement exprimés entre les conditions "Femelle avec un mâle apparenté et "Femelle avec un mâle non apparenté"	XIX

Liste des figures

1.1	La queue du paon bleu, un exemple de caractère extravagant sélectionné par une préférence des femelles	4
1.2	Mécanisme d'emballage fisherien	5
1.3	Photo de mandrille, <i>Mandrillus sphinx</i>	7
1.4	Trajectoires d'extinctions après des générations de consanguinité entre des populations avec une histoire évolutive de sélection sexuelle forte ou faible	8
1.5	Succès d'éclosion des œufs chez <i>Gryllus bimaculatus</i> selon l'apparementement des partenaires.	10
1.6	Continuum entre préférence et évitement de la consanguinité chez les animaux	11
1.7	Structures sociales animales	12
1.8	Proportion des mâles issus d'ouvrières comparé aux mâles issus de la reine selon leurs apparementements respectifs dans les colonies de 90 espèces d'Hyménoptères sociaux	15
1.9	Utilisation de signaux multimodaux par la reinette verte.	17
1.10	Exemple de marqueurs faciaux visuels utilisés par <i>Polistes fuscatus</i> lors de la reconnaissance de ses congénères	18
1.11	Schéma simplifié de la production des CHC chez les insectes	20
1.12	Stratégies d'échantillonnage d'un partenaire sexuel	26
2.1	<i>Venturia canescens</i> sur son hôte <i>Ephestia kuehniella</i> (Lepidoptera, Pyralidæ)	30
2.2	Cycle de ponte chez <i>Venturia canescens</i>	31
2.3	Répartition des modes de reproduction de <i>Venturia canescens</i> dans la région Sud-Est de la France	32
2.4	Régulation de la détermination du sexe chez <i>Apis mellifera</i> via un mécanisme de sl-CSD	33
2.5	Accouplement de <i>V. canescens</i>	35
4.1	Vortex d'extinction des mâles diploïdes.	47
4.2	Démographie d'une population de parasitoïdes et de son hôte.	48
5.1	Décisions d'accouplements, chemin et processus.	69
7.1	Modèles génétiques de la dépression de consanguinité	122
7.2	Patrons des données d'expression des gènes femelles selon la présence et le type de mâles.	124
7.3	Nombre de gènes femelles différentiellement exprimés selon l'apparementement avec son partenaire potentiel	126

Liste des tableaux

1.1	Mécanismes d'évitement de la consanguinité	9
7.1	Nombre de gènes différentiellement exprimés selon les contrastes et la méthode statistique utilisée.	125

Liste des encadrés

1 Calcul du nombre d'allèles au locus <i>csd</i>	46
--	----

*Avant donc que d'écrire, apprenez à penser.
Selon que notre idée est plus ou moins obscure,
L'expression la suit, ou moins nette, ou plus pure.
Ce que l'on conçoit bien s'énonce clairement,
Et les mots pour le dire arrivent aisément.*

Nicolas BOILEAU, *L'Art Poétique*, 1674.

*"But I don't want to go among mad people," Alice remarked.
"Oh, you can't help that," said the Cat : "we're all mad here. I'm mad.
You're mad."
"How do you know I'm mad?" said Alice.
"You must be," said the Cat, "or you wouldn't have come here."*

Lewis CARROL, *Alice's Adventures in Wonderland*, 1865.

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

*« Hâtez-vous lentement, et sans perdre
courage,
Vingt fois sur le métier remettez votre
ouvrage,
Polissez-le sans cesse, et le repolissez,
Ajoutez quelquefois, et souvent effacez. »*

Nicolas BOILEAU, *L'Art Poétique*

Sommaire

1.1	Sélection sexuelle et consanguinité	4
1.1.1	La sélection sexuelle : un cadre théorique	4
1.1.2	Consanguinité	8
1.2	La reconnaissance de parentèle	13
1.2.1	La sélection de parentèle	14
1.2.2	Comportements associés à la reconnaissance de parentèle . .	15
1.2.3	Mécanismes de la reconnaissance de parentèle	17
1.2.4	Bases génétiques de la reconnaissance de parentèle	24
1.3	Préférence et choix d'un partenaire sexuel	25

1.1 Sélection sexuelle et consanguinité

La sélection sexuelle est un des modes d'action de la sélection naturelle, qui se définit par la sélection de certains caractères en vertu de l'avantage qu'ils confèrent pour l'accès à la reproduction. Elle implique que les individus d'une population vont avoir un succès reproducteur variable, soit en étant plus attractifs, soit en préférant des meilleurs partenaires pour se reproduire. Dans cette partie, je présenterai tout d'abord les concepts associés à la sélection sexuelle. J'aborderai ensuite le phénomène de consanguinité et ses conséquences en terme de fitness¹ et de stratégies mises en place par les individus afin d'éviter les coûts liés à la consanguinité et à son évitement.

1.1.1 La sélection sexuelle : un cadre théorique

La théorie de la sélection sexuelle a été pour la première fois énoncée par Darwin dans son livre *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* en 1859. La présence de caractères sexuels secondaires inutiles voire coûteux en terme de fitness nécessitait une explication en marge de sa théorie de la sélection naturelle. Il émet ainsi l'hypothèse que ces traits différenciellement exprimés entre mâles et femelles, et parfois extravagants, peuvent accorder un avantage à leurs porteurs en leur permettant d'attirer plus de partenaires sexuels et/ou des partenaires de meilleure qualité. La qualité d'un partenaire peut s'exprimer de différentes manières : elle peut être physiologique (un partenaire sain sera de meilleure qualité qu'un partenaire malade) ou génétique. La queue du paon bleu mâle *Pavo cristatus* est vraisemblablement l'exemple le plus connu de caractères extravagant (Figure 1.1). La possibilité que les préférences des femelles (considérées comme étant le sexe sélectif) puissent agir sur des caractères mâles a cependant été longtemps négligée, avant une modélisation plus mathématique par Fisher dans les années 1930.

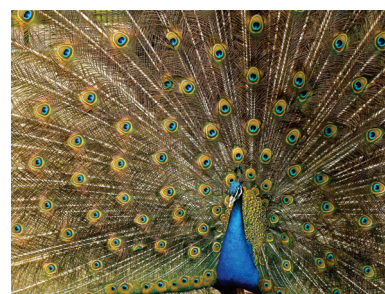


FIGURE 1.1 – La queue du paon bleu, un exemple de caractère extravagant sélectionné par une préférence des femelles. Photo par Jébulon, licence CC-BY 3.0.

La théorie de Fisher : les "sexy sons" (Fisher, 1930)

L'hypothèse de l'évolution de caractères extravagants est parfois appelée l'hypothèse des "sexy sons" parce que le choix par une femelle d'un mâle avec des caractères extravagants ne va pas influencer sa reproduction mais va augmenter la fitness de ses fils en accroissant leur attractivité (Kokko et al., 2006). Cette rétroaction positive nécessite uniquement une variabilité dans l'expression des traits mâles et des préférences femelles selon un processus fisherien, où va se produire un processus d'emballement avec une exagération du trait mâle (Figure 1.2). L'augmentation de l'attractivité des mâles va ainsi compenser la diminution de survie due au caractère extravagant sélectionné. Cependant, cet emballement peut être contrebalancé par les capacités sensorielles des

¹La fitness (traduit par valeur sélective en français) apparaît pour la première fois dans les écrits de Darwin, *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* : "Nor ought we to marvel if all the contrivances in nature be not, as far as we can judge, absolutely perfect; and if some of them be abhorrent to our idea of fitness". Ce terme décrit la capacité d'un individu à transmettre ses gènes à la génération suivante. Elle se mesure ainsi classiquement comme le nombre de descendants arrivant à maturité sexuelle d'un individu (sens que j'utiliserai ici) et est l'indicateur le plus communément utilisé pour l'étude de la sélection naturelle.

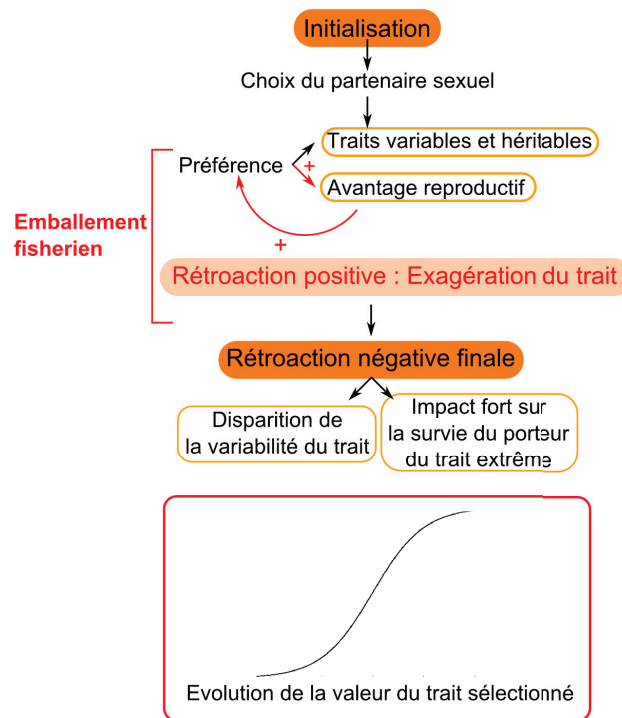


FIGURE 1.2 – **Mécanisme d'emballement fisherien.** Le processus de Fisher est une sélection indirecte sur la préférence des femelles lié à un déséquilibre de liaison avec les ornements mâles, qui sont eux directement sélectionnés. Il nécessite une préférence des femelles pour un caractère héritable qui va conférer à ses fils un avantage reproductif en augmentant leur attractivité. Cette boucle de rétroaction positive va être contrée par deux processus dans la nature : la variabilité du trait soumis à sélection peut disparaître, par exemple par l'existence de biais sensoriels chez les femelles, ou parce que l'impact sur la survie du trait extravagant va dépasser les bénéfiques de l'augmentation d'attractivité des mâles. De ce fait, l'évolution de la valeur du trait sélectionnée est modélisée par une fonction logistique, avec l'atteinte d'un plateau correspondant à la fin du processus d'emballement.

femelles. En effet, ce mécanisme n'est possible qu'à condition que les femelles soient capables de différencier entre deux "états d'extravagance" du trait. La production du trait extravagant étant coûteux pour les mâles, si les femelles ne peuvent pas discriminer entre deux états, le mâle avec le trait le plus extravagant aura un coût d'expression du trait supérieur à celui d'un mâle moins extravagant, sans augmenter son succès reproducteur (Kokko, 2001; Grether, 2010). Les biais sensoriels sont donc des freins potentiels importants à l'évolution de la préférence d'un partenaire sexuel selon l'hypothèse des sexy sons.

La théorie des bons gènes : indicateur de viabilité et théorie du handicap

Dans le cadre de la théorie des "sexy sons", les caractères sexuels secondaires sur lesquels s'effectuent le choix du partenaire sexuel ne représentent pas forcément la qualité génétique des mâles porteurs du caractère. En effet, cette préférence des femelles peut évoluer grâce à l'exploitation d'un biais sensoriel préexistant chez les femelles par les mâles (Grether, 2010). Chez le poisson porte-glaive *Xiphophorus helleri*, les femelles préfèrent les mâles avec un glaive (leur nageoire caudale est allongée en forme de pointe) aux mâles sans glaive dans le cadre du choix du partenaire sexuel (Basolo, 1990). Cependant, cette préférence disparaît lorsque l'image du mâle sans glaive est agrandie jusqu'à atteindre la taille d'un mâle avec un glaive. De ce fait, la préférence des fe-

nelles pour les mâles ayant un glaive est un biais sensoriel pour un choix des plus grands mâles (Rosenthal and Evans, 1998). De plus, la production d'un glaive est vraisemblablement un mécanisme moins coûteux pour paraître plus grand que d'investir dans la taille du corps (Basolo, 1998). La production d'un long glaive pourrait ainsi refléter l'exploitation par les mâles d'un biais sensoriel des femelles en limitant leur investissement. *A contrario*, la théorie des bons gènes stipule que le choix du partenaire sexuel, et de fait l'action de la sélection sexuelle, s'effectue sur un caractère reflétant la qualité génétique de l'individu porteur et ainsi des bénéfices génétiques directs pour ses descendants, en terme de survie et/ou de fécondité. La qualité d'un individu va pouvoir être estimée par sa capacité à supporter le poids d'un caractère handicapant, puisque seuls les individus de haute qualité vont pouvoir assumer un tel coût (Zahavi, 1975; Hamilton and Zuk, 1982; Zahavi and Zahavi, 1999). Cette théorie du handicap énonce ainsi que pour qu'un signal soit honnête, c'est à dire reflétant fidèlement la qualité génétique de son porteur, il faut qu'il lui soit coûteux. De ce fait, les femelles gagnent à préférer les mâles arborant les caractères les plus extravagants et cette théorie explique le maintien des signaux handicapants par la sélection sexuelle. Chez deux espèces de dendrobatidés, des grenouilles qui arborent des couleurs vives signalant leur toxicité aux prédateurs, le succès reproducteur et la viabilité de leurs descendants sont fortement corrélés avec la complexité et la durée des vocalisations des mâles (Forsman et al., 2006). Or les vocalisations des mâles les exposent à un risque de prédation plus grand et les mâles capables de produire des vocalisations longues et complexes sont de ce fait dotés de capacité de survie importante reflétant leur qualité génétique.

L'accumulation de mutations ou des variations de pressions sélectives dues à des changements environnementaux ont été proposés comme des mécanismes permettant de maintenir une variabilité génétique des traits handicapants sélectionnés (Andersson, 1994; Hamilton and Zuk, 1982).

La théorie des bons gènes et celle des "sexy sons" diffèrent sur l'action de la variation génétique du trait préféré par les femelles : dans le cadre de la théorie des sexy sons, elle affecte uniquement l'attractivité des descendants mâles tandis que dans la théorie des bons gènes, elle touche d'autres composantes de la fitness des descendants de la femelle sélective. Cependant, ces deux théories s'appuient sur des bénéfices indirects pour la femelle sélective et peuvent ainsi être unifiées dans un seul modèle d'évolution de la sélection sexuelle (Kokko et al., 2006).

La théorie de la complémentarité

Les deux théories précédentes supposent que toutes les femelles préfèrent le même mâle sur la discrimination entre différents états d'un phénotype. Pourtant, chaque individu a son propre génotype et n'a donc potentiellement pas les mêmes besoins. La théorie de la complémentarité part de ce constat et fait l'hypothèse que le partenaire sexuel optimal dépend du génotype de la femelle (Tregenza and Wedell, 2000). La présence d'allèles récessifs délétères peut expliquer le choix d'un partenaire complémentaire. Un accouplement avec un partenaire possédant lui aussi le même allèle récessif délétère que soi augmente le risque de produire des descendants avec une fitness réduite due à l'homozygotie à ce locus. Une autre possibilité est la présence d'hétérosis (*i.e.* la vigueur hybride) dans une population qui peut sélectionner un mécanisme de complémentarité dans le cadre du choix du partenaire sexuel. Le choix d'un partenaire complémentaire sous-entend qu'un individu soit capable à la fois d'identifier son propre génotype, ceux de ses partenaires potentiels et de les comparer afin de sélectionner un partenaire complémentaire.



FIGURE 1.3 –
Photo de Mandrill, *Mandrillus sphinx*. Photo par I. Malena, licence CC BY 2.5

Cette complémentarité a été très utilisée pour expliquer le choix du partenaire sexuel basé sur le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), le système immunitaire de reconnaissance du soi chez les Vertébrés (Yamazaki et al., 1976). Le choix au CMH repose sur un choix de la dissimilarité, et est expliqué par le maintien d'une hétérozygotie sur ce complexe avec un avantage aux allèles rares. En effet, les individus hétérozygotes seraient capables de reconnaître et de combattre un plus grand nombre de pathogènes, leur donnant un avantage face aux individus homozygotes. Par exemple, chez le mandrill (*Mandrillus sphinx*, Figure 1.3), les femelles choisissent de s'accoupler avec des mâles dissimilaires à elles-mêmes au CMH (Setchell et al., 2010).

Il est cependant important de ne pas confondre le choix d'un partenaire complémentaire avec le choix pour l'hétérozygotie. En effet, le choix du partenaire le plus hétérozygote se fait indépendamment du génotype de l'individu sélectif et s'apparente ainsi à la théorie des "bons gènes" évoquée au paragraphe précédent. Pour pouvoir expliquer l'évolution de ce choix du partenaire par la théorie de la complémentarité, le génotype de l'individu sélectif doit être évalué et comparé au génotype de son partenaire potentiel. La différence entre choix d'un partenaire complémentaire et celui du plus hétérozygote est cependant souvent difficile à détecter en conditions expérimentales (Tregenza and Wedell, 2000).

La sélection sexuelle comporte deux aspects fondamentaux : la sélection intrasexuelle, où les individus du même sexe sont en compétition pour l'accès à des partenaires, comme les combats de mâles pour l'accès aux femelles ou la compétition spermatique, et la sélection intersexuelle. Pour cette dernière, le choix d'un partenaire par un sexe exerce une pression sur les caractéristiques du sexe choisi. Dans cette introduction, je me suis concentrée uniquement sur la sélection intersexuelle puisque mon intérêt principal réside dans l'étude de l'évitement de la consanguinité, entre autre grâce à la sélection du choix du partenaire sexuel. La sélection intrasexuelle est évidemment une part intégrante et importante de l'évolution de la sélection sexuelle, et son absence de traitement est uniquement un choix rédactionnel.

La sélection sexuelle, comme vu précédemment, a des conséquences directes sur le génotype des descendants dues à un choix du partenaire sexuel à la génération précédente. L'impact de la sélection sexuelle a cependant été assez peu étudié en termes de dynamique des populations (mais voir Bompard et al. (2016)). Des expériences d'évolution expérimentale réalisées sur des populations du ver de la farine *Tribolium castaneum* montrent les conséquences de la sélection sexuelle sur la viabilité des populations (Lumley et al., 2015). Quatre populations ont été comparées : une population où le sex-ratio est biaisé vers les mâles, une avec un sex-ratio biaisé vers les femelles (Figure 1.4a), une population monogame et une polyandre (Figure 1.4b). Les populations ont évolué de ce fait sous des régimes de sélection sexuelle différents sur plus de six ans. Les populations dans lesquelles agissait la sélection sexuelle étaient résilientes à l'extinction même après 20 générations de consanguinité frères-sœurs, contrairement aux populations avec une histoire évolutive de sélection sexuelle faible ou nulle (Figure 1.4). Les auteurs proposent de ce fait de nouvelles perspectives à l'étude de la sélection sexuelle en dynamique des populations, comme par exemple dans le cadre de la conservation de petites populations isolées ou captives. En effet, une sélection sexuelle forte, par exemple dans un système d'appariement polyandre ou due à un

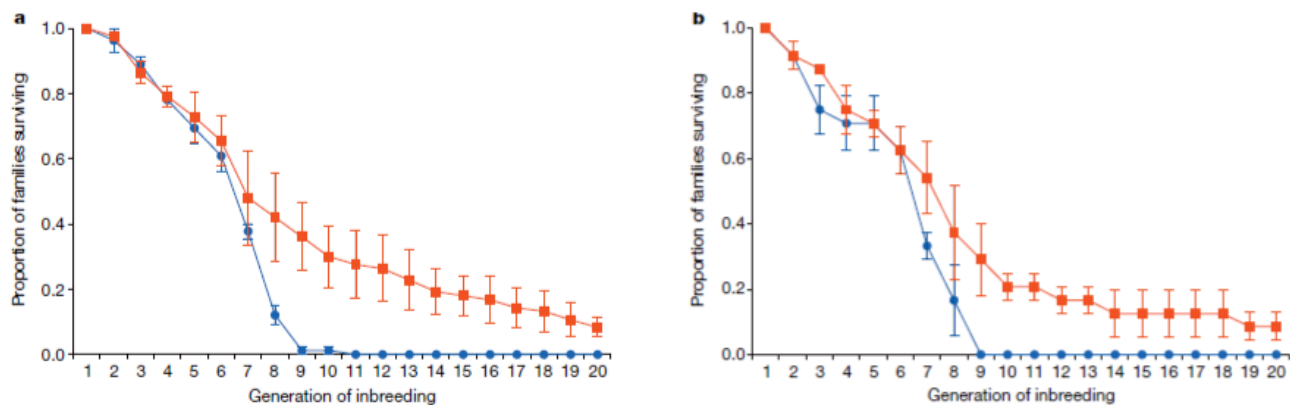


FIGURE 1.4 – **Trajectoires d’extinctions après des générations de consanguinité entre des populations avec une histoire évolutive de sélection sexuelle forte ou faible.** Les populations soumises à une sélection sexuelle forte sont représentées par les carrés rouges tandis que celles soumises à une sélection sexuelle faible sont représentées par les cercles bleus. a) Sex-ratio biaisé vers les mâles (en rouge) et biaisé vers les femelles (en bleu). b) Régime polyandre (en rouge) versus régime monogame (en bleu). Tiré de Lumley et al. (2015).

changement de sex-ratio, pourrait expliquer le maintien de populations isolées sujettes à de fortes pressions de consanguinité en limitant leur extinction.

1.1.2 Consanguinité

La consanguinité, c’est à dire la résultante de l’accouplement entre deux individus apparentés, et ses effets sont étudiés par les biologistes depuis plus d’une centaine d’années (Darwin, 1859). Les effets délétères de la consanguinité, ou dépression de consanguinité, se traduisent par la baisse de valeur sélective des individus consanguins. Ils ne sont évidemment pas limités aux animaux et touchent aussi les végétaux (Husband and Schemske, 1996; Kelly, 2005; Angeloni et al., 2011). Cependant, nous nous limiterons dans cette thèse aux études sur les animaux. Ces effets délétères sont dus à l’augmentation de l’homozygotie d’allèles récessifs et délétères ainsi qu’à la perte d’hétérosis (la "vigueur hybride") des croisements consanguins (Charlesworth and Charlesworth, 1987; Pusey and Wolf, 1996; Keller and Waller, 2002). Des exemples de dépression de consanguinité existent dans de nombreux taxons, que ce soit chez les vertébrés, comme les marmottes, où les juvéniles consanguins survivent moins longtemps (Olson et al., 2012), les oiseaux comme le pigeon, où le nombre de jeunes par portée est impacté négativement par l’apparentement des individus parentaux (Jacob et al., 2016), ou les insectes comme les papillons, où le taux d’éclosion de œufs diminue lors de croisements consanguins (Haikola et al., 2001).

En réponse à ces effets délétères, la sélection naturelle devrait avoir favorisé des mécanismes permettant l’évitement de la consanguinité (Pusey and Wolf, 1996; Szulkin et al., 2013). Ces mécanismes peuvent être classés en deux catégories : les mécanismes pré-copulatoires et les mécanismes post-copulatoires (Tableau 1.1).

Mécanismes précopulatoires. Les mécanismes d’évitement de la consanguinité ne sont pas synonymes de choix actifs des individus pour éviter leurs apparentés. Les mécanismes de dispersion (spatiale ou temporelle) par exemple, peuvent conduire à un évitement de la consanguinité (Greenwood et al., 1978; Szulkin and Sheldon, 2008) soit de manière passive, soit de manière active. Chez les termites *Neotermes chilensis*, la dispersion des formes ailées permet de manière passive l’évitement d’accouplement entre

TABLEAU 1.1 – Mécanismes d'évitement de la consanguinité

	Mécanismes	Exemples
Mécanismes pré-copulatoires	Dispersion spatiale	Termites (Aguilera-Olivares et al., 2015)
	Dispersion Sexe-biaisée	Chevreuril (Biosa et al., 2015)
	Dispersion temporelle	Araignée (Bukowski and Avilés, 2002)
	Choix du partenaire sexuel	Jardinier satiné (Reynolds et al., 2014)
Mécanismes post-copulatoires	Choix cryptique des femelles	Grillon (Bretman et al., 2004)
	Compétition avec les conspécifiques	Phylloecte de l'osier (Stephan et al., 2015)
	Polyandrie	Grillon (Tregenza and Wedell, 2002)
	Descendance hors couple	Marmottes (Cohas et al., 2008)
	Divorce	Marmottes (Lardy et al., 2011)

apparentés lors de la fondation de nouvelles colonies (Aguilera-Olivares et al., 2015). *A contrario*, une étude théorique montre que les décisions d'émigration peuvent aussi être sensibles aux densités locales de mâles et de femelles et ainsi être une décision active (Hovestadt et al., 2014). Chez l'outarde houbara d'Afrique (*Chlamydotis undulata*), les distances parcourues par les femelles augmentent lorsqu'elles sont relâchées avec des individus fortement apparentés par rapport à des expériences où elles sont relâchées avec des individus plus faiblement apparentés. Ceci suggère que la compétition intersexuelle influe sur leur dispersion (Hardouin et al., 2015). La dispersion différentielle entre les sexes comme chez l'outarde est un mécanisme très étudié dans le cadre de l'évitement de la consanguinité (Greenwood et al., 1978; Gandon, 1999; Roze and Rousset, 2005; Gros et al., 2008). Ce mécanisme a été détecté dans de nombreuses espèces d'insectes, que ce soit avec une dispersion uniquement mâle chez le carabe *Pterostichus oblongopunctatus* (Lagisz et al., 2010), ou une dispersion uniquement femelle chez un papillon, *Procllossiana eunomia* (Baguette et al., 1998). Chez la guêpe parasitoïde *Cotesia glomerata*, près d'un tiers de femelles dispersent de leur lieu d'émergence alors qu'aucun mâle ne disperse (Ruf et al., 2011). De plus, la proportion de femelles qui s'accouplent est significativement plus grande chez les femelles dispersantes que chez les femelles philopatriques en laboratoire. Les patchs d'hôtes ainsi que le nombre de conspécifiques étant identiques entre le patch d'émergence et le patch stimulus où se déroulait la dispersion, les auteurs ont conclu que la force pilotant la dispersion biaisée des femelles de leur lieu d'émergence était leur apparentement avec les individus du sexe opposé (Ruf et al., 2011). Une dispersion temporelle peut aussi limiter les opportunités de rencontre et donc d'accouplements entre individus apparentés. Par exemple, un temps de maturation sexuelle différent entre les sexes peut désynchroniser le timing de reproduction entre mâles et femelles. Chez l'araignée sub-sociale *Anelosimus cf. jucundus*, les mâles atteignent leur maturité et leur réceptivité sexuelles dix-sept jours avant les femelles, ce qui correspond à plus de 25% du temps de vie des mâles (Bukowski and Avilés, 2002). Les auteurs désignent cette forte différence comme un mécanisme d'évitement d'accouplements entre apparentés dans cette espèce qui ne disperse que très peu spatialement et qui souffre de dépression de consanguinité.

Le choix du partenaire sexuel reste la dernière étape précopulatoire d'évitement de la consanguinité. En effet, si un des critères de choix du partenaire est son degré d'apparentement, la mise en place de stratégies d'évitement d'accouplements entre apparentés devient possible. Cette question du choix du partenaire sexuel est une des

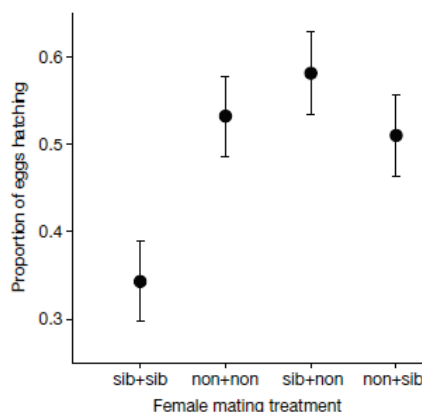


FIGURE 1.5 – **Succès d'éclosion des œufs chez *Gryllus bimaculatus* selon l'appariement des partenaires.** Les femelles s'accouplent avec deux mâles consécutivement : sib+sib, les femelles s'accouplent avec deux mâles apparentés, non+non, les femelles s'accouplent avec deux mâles non-apparentés, sib+non, les femelles s'accouplent d'abord avec un apparenté puis avec un mâle non apparenté (et vice versa pour non+sib). Tiré de Tregenza and Wedell (2002)

problématiques de ma thèse et sera ainsi développée plus spécifiquement dans une section ultérieure (voir la section 1.3).

Mécanismes post-copulatoires. Pour autant, l'accouplement ne signifie pas la fin des mécanismes possibles d'évitement de la consanguinité. De nombreuses espèces ont développé des stratégies d'évitement post-copulatoires à plusieurs niveaux. Les femelles peuvent en effet discriminer le sperme des mâles selon leur apparentement avec elle et choisir de féconder leurs œufs avec le sperme d'un (ou plusieurs) mâle(s) non apparenté(s), ou choisir de stocker différenciellement le sperme des mâles selon leur apparentement. Ce choix cryptique des femelles est souvent difficile à détecter puisqu'il se passe en interne, dans le tractus génital de la femelle. Cependant, des preuves de ce mécanisme existent par exemple chez le grillon provençal (*Gryllus bimaculatus*), où les femelles stockent significativement moins le sperme des individus qui leur sont apparentés, ce qui conduit à une diminution du nombre de descendants consanguins (Bretman et al., 2004, 2009). Une autre façon de limiter la consanguinité moyenne de ses descendants pour les femelles est de multiplier le nombre de pères. La polyandrie a ainsi été proposée comme une stratégie d'évitement de la consanguinité car elle permet de diminuer les coûts de la dépression de consanguinité en augmentant la diversité génétique de sa descendance (Arnqvist and Nilsson, 2000). Un exemple de l'utilisation de cette stratégie par les femelles provient des grillons, où les femelles accouplées avec deux mâles (un apparenté et un non-apparenté) évitent les coûts qui existent lors de l'accouplement avec un unique mâle apparenté (Tregenza and Wedell, 2002). En effet, lorsque qu'une femelle s'accouple avec un ou deux mâles apparentés, le succès d'éclosion des œufs est faible (autour de 35%), indiquant une dépression de consanguinité (Figure 1.5). Or, lorsque les femelles s'accouplent avec un mâle apparenté et un non-apparenté, le succès d'éclosion de leurs œufs est identique à celui d'une femelle s'étant accouplée avec deux mâles non-apparentés, et cela quel que soit l'ordre d'accouplement avec le mâle apparenté (apparenté puis non-apparenté et vice-versa) (Figure 1.5). Les femelles polyandres évitent ainsi les coûts de la consanguinité sans avoir besoin de discriminer leurs apparentés au moment de l'accouplement et l'évitement de la consanguinité pourrait de ce fait permettre de comprendre la prévalence de la polyandrie chez

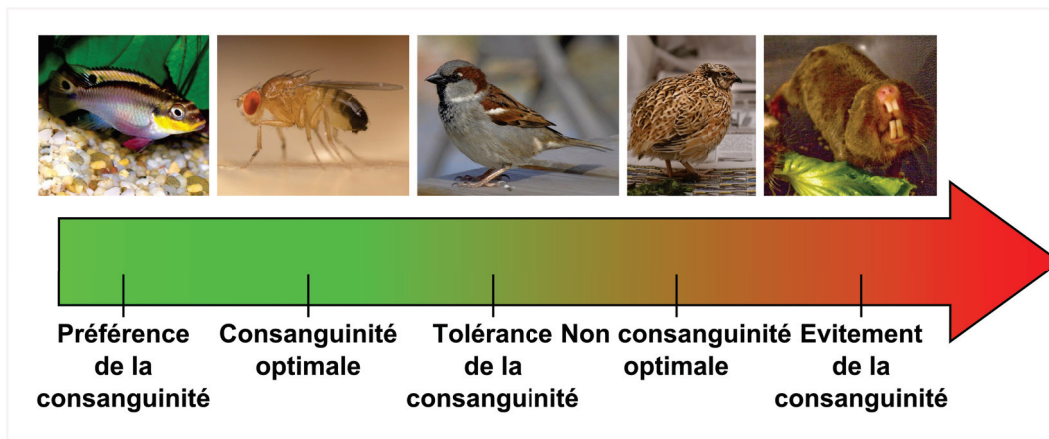


FIGURE 1.6 – **Continuum entre préférence et évitement de la consanguinité chez les animaux.** De gauche à droite : *Pelvicachromis taeniatus*, domaine public (Thünken et al., 2007), *Drosophila melanogaster*, Photo par Thibault Andrieux, (Robinson et al., 2012), *Passer domesticus*, Photo par Adamo, (Billing et al., 2012), *Coturnix japonica*, Photo par Ingrid Taylor (Bateson, 1983a) et *Cryptomys damarensis*, Photo par Shary Goldman, (Cooney and Bennett, 2000). Toutes les photos, sauf celle de *Drosophila melanogaster* qui bénéficie d'une autorisation spéciale de Thibault Andrieux, sont sous la licence CC BY.

les animaux.

Cependant, une étude récente interroge les conditions dans lesquelles la polyandrie peut avoir évolué pour limiter les conséquences de la dépression de consanguinité (Duthie et al., 2016). Cette étude théorique démontre que cette évolution nécessite une forte dépression de consanguinité, des coûts à la polyandrie faibles et de fortes restrictions sur la disponibilité des mâles. Ces conditions drastiques semblent restreindre fortement la possibilité d'évolution primaire de la polyandrie afin de limiter la dépression de consanguinité, mais n'exclut pas une utilisation secondaire de ce comportement dans le cadre de l'évitement de la consanguinité.

Les réponses des individus au risque de consanguinité sont fonction des bénéfices et des coûts associés à la dépression de consanguinité et à l'évitement de la consanguinité, et varie de fait entre les espèces et dans le temps (Figure 1.6). Les études théoriques comme celle de Duthie et al. (2016) sont ainsi nécessaires à la compréhension de l'évolution de ces mécanismes d'évitement de la consanguinité. En effet, comme tous les phénomènes biologiques, l'évolution de ces stratégies est conditionnée par l'environnement naturel des populations dans lequel elles apparaissent, ce qui influence la balance coûts/bénéfices (Kokko and Ots, 2006; Puurtinen, 2011; Szulkin et al., 2009, 2013). Les caractéristiques des populations naturelles comme l'organisation sociale, la viscosité, le sex-ratio opérationnel ou la densité des populations, influencent les probabilités de rencontre et d'accouplement entre les individus apparentés. Par exemple, dans une population où la dispersion sera coûteuse (population avec une viscosité forte (Hamilton, 1964a,b)), on s'attend à ce que les individus apparentés restent proches spatialement les uns des autres, augmentant ainsi leur probabilité de rencontre face à une population à la viscosité faible où l'émigration sera importante. Des exemples actuels de populations à forte viscosité proviennent des études des populations isolées à cause de la fragmentation de leur habitat par l'homme. Cette fragmentation limite ainsi les possibilités de dispersion des individus et la création de petites populations isolées augmente fortement le risque de perte de diversité génétique via des effets de fondations et de dérive, mais aussi via l'augmentation de la consanguinité (Frankham, 1998, 2005; Keller and Waller, 2002). Chez le bourdon *Bombus muscorum*, dont l'habitat a été fortement frag-

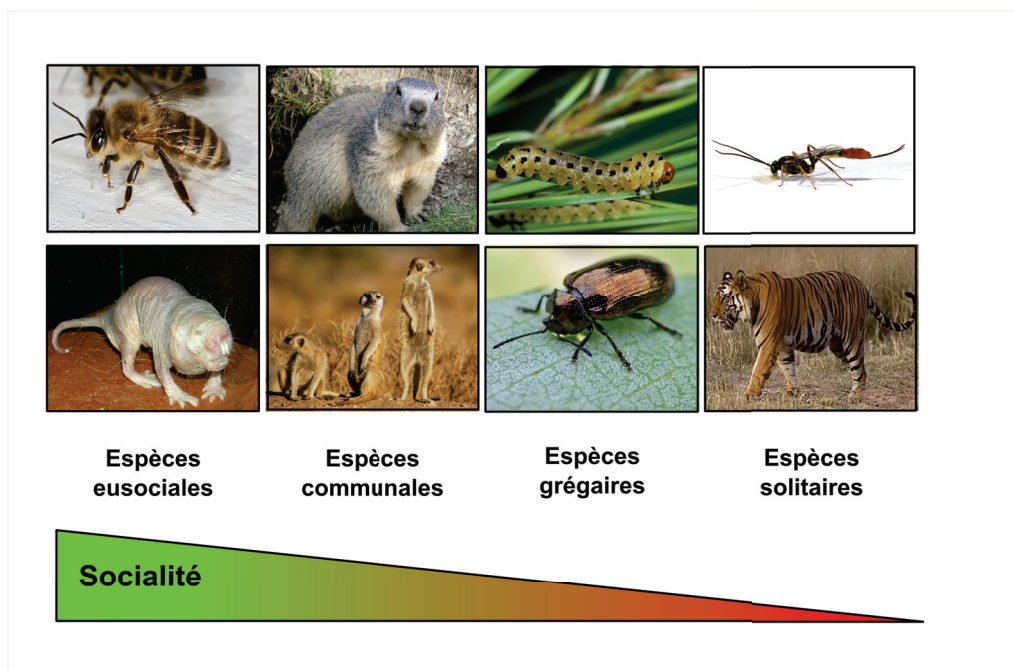


FIGURE 1.7 – **Structures sociales animales.** En haut, de gauche à droite : *Apis mellifera*, Photo de Richard Bartz, *Marmota marmota*, Photo de François Trazzi, *Neodiprion lecontei*, Photo de Gerald J. Lenhard et *Venturia canescens*, Photo de Thibault Andrieux. En bas, de gauche à droite : *Heterocephalus glaber*, Photo par Roman Klementschtz, *Suricata suricatta*, Photo par Sara Joachim Mebe, *Phratora vulgatissima*, Photo par ©entomart et *Panthera tigris tigris*, Photo par Anant Ramakrishnan. Excepté *V. canescens* qui bénéficie d’une autorisation spéciale de Thibault Andrieux et *P. vulgatissima*, toutes les photos sont sous licence CC BY.

menté au Royaume-Uni à cause de l’intensification de l’agriculture, une augmentation de la consanguinité des colonies s’accompagne de la production de mâles triploïdes stériles, posant le problème de la conservation des populations d’hyménoptères sociaux dans ces environnements fragmentés (Darvill et al., 2006, 2012).

La dispersion spatiale des individus peut aussi être limitée par la structure sociale de leur espèce (Figure 1.7). Chez les espèces sociales, avec par exemple une reproduction coopérative ("cooperative breeders"), il est fréquent que la dispersion soit différentielle selon le sexe, avec un sexe émigrant (généralement les mâles) et un sexe philopatrick (généralement les femelles, mais des exceptions existent, voir Lukas and Clutton-Brock (2011)) qui s’accouplera avec les émigrants d’autres colonies ou familles, évitant ainsi le risque d’un accouplement consanguin. Chez les suricates (*Suricata suricatta*), la reproduction est monopolisée par un couple de dominants, qui peuvent tuer les petits qui ne sont pas les leurs ou chasser un subordonné reproducteur. Cependant, des études ont montré que le frein principal à la reproduction des subordonnés était l’absence de partenaires non-apparentés dans le groupe social, et non la dominance du couple alpha, et que les subordonnés mâles prospectaient dans les familles avoisinantes durant la période de fertilité des femelles (O’Riain et al., 2000; Young et al., 2007). Ce mode de reproduction alternatif conduit à plus de 70% des portées issues de subordonnés, et cette étude démontre un rôle important de l’évaluation du risque de consanguinité sur les choix d’accouplements (Young et al., 2007). Enfin, la composition de la population peut elle aussi jouer un rôle primordial dans l’apparition ou non de stratégies d’évitements d’accouplements entre apparentés. Dans une population avec une densité faible, la probabilité de rencontre d’un partenaire est elle-même faible, et le coût d’une

reproduction avec un apparenté peut de fait être bien moindre devant la possibilité d'une absence totale d'accouplement si on le rejette (Kokko and Rankin, 2006; Duthie and Reid, 2016). Un phénomène de réduction de la préférence des femelles pour les mâles non-apparentés lorsque le taux de rencontre avec les mâles diminue a été observé dans plusieurs espèces comme le lézard *Zootoca vivipara* (Breedveld and Fitze, 2015) ou les élan *Alces alces* (Herfindal et al., 2014).

D'autres effets comme la rencontre simultanée ou séquentielle de partenaires peuvent influencer les stratégies d'évitement des femelles (Kokko and Rankin, 2006), et seront traités plus spécifiquement dans la section 1.3. Décrire les facteurs influençant l'évitement de la consanguinité est une vaste entreprise et ce travail de thèse ne peut évidemment pas se targuer d'être exhaustif. Un point central de la balance coûts/bénéfices de l'évitement de la consanguinité est pourtant souvent négligé malgré un nombre d'études croissant sur le sujet : le bénéfice net qui peut émerger de la consanguinité (Bengtsson, 1978; Bateson, 1982; Waser et al., 1986; Kokko and Ots, 2006; Puurtinen, 2011; Szulkin et al., 2009, 2013). En effet, la consanguinité permet de ne pas briser des associations de gènes favorables (Bateson, 1982, 1983a). Elle permet aussi l'augmentation de la représentation des gènes identiques par descendance dans les descendants consanguins et ainsi augmente la fitness inclusive² des individus (Hamilton, 1964a,b). De ce fait, des stratégies adaptatives peuvent être sélectionnées pour favoriser la consanguinité si les bénéfices de cette consanguinité surpassent les coûts de la dépression de la consanguinité et de l'évitement des partenaires apparentés. Il existe ainsi un continuum de stratégies dans la nature entre un évitement complet de la consanguinité jusqu'à la préférence des accouplements entre apparentés (Figure 1.6) (Szulkin et al., 2013).

Certaines des stratégies évoquées précédemment, que ce soit de préférence ou d'évitement de la consanguinité, impliquent un choix actif de la part des individus pour discriminer leurs apparentés. Le choix du partenaire sexuel, qui est une des thématiques principales de cette thèse, nécessite ainsi une reconnaissance de la parentèle afin que puisse s'exprimer une préférence et potentiellement un choix envers un (ou des) partenaire(s) particulier(s).

1.2 La reconnaissance de parentèle

La reconnaissance de parentèle, définie par la reconnaissance de ses apparentés, implique que la fréquence et/ou le type d'interactions entre les individus diffèrent selon leur apparentement. Deux mécanismes légèrement différents sous-tendent cette reconnaissance de parentèle : la reconnaissance des apparentés et leur discrimination. Selon le contexte écologique, les individus peuvent avoir les capacités de reconnaître leurs apparentés sans forcément les discriminer, c'est à dire adapter leurs comportements face à eux. La section suivante va ainsi s'intéresser à la reconnaissance de parentèle au sens large, en traitant tout d'abord l'origine de cette théorie, puis les comportements dans lesquels peut être impliquée la reconnaissance de parentèle. Nous nous intéresserons ensuite aux mécanismes utilisés lors de cette reconnaissance pour enfin s'interroger sur les bases génétiques sous-jacentes connues à la reconnaissance de parentèle.

²La fitness inclusive est une extension de la notion de fitness darwinienne permettant de prendre en compte dans la fitness d'un individu l'effet de la reproduction de tous ses apparentés et pas seulement ses descendants. Cette notion sera traitée plus longuement dans la section 1.2.1.

1.2.1 La sélection de parentèle

L'évolution des sociétés animales a rapidement posé question à Darwin, car cette organisation et l'altruisme qui peut en découler semble contraire à sa théorie de la sélection naturelle (Darwin, 1859) : *"I will not here enter on these several cases, but will confine myself to one special difficulty, which at first appeared to me insuperable, and actually fatal to my whole theory. I allude to the neuters or sterile females in insect communities [...]"*. En effet, Darwin définit la fitness comme le succès reproducteur individuel. De ce fait, les comportements altruistes, c'est-à-dire possédant un coût direct pour l'émetteur et un bénéfice pour le receveur, font diminuer la fitness de l'émetteur et devrait ainsi être contre-sélectionné. Pourtant, l'observation de comportements dit altruistes par exemple chez les espèces sociales d'Hyménoptères contredisent la prédiction précédente. Il introduit alors une nouvelle notion, la sélection familiale, pour résoudre ce paradoxe : *"This difficulty, though appearing insuperable, is lessened, or, as I believe, disappears, when it is remembered that selection may be applied to the family, as well as to the individual, and may thus gain the desired gain"*. Il passe ainsi d'une sélection individu-centré (la sélection naturelle) à une sélection groupe-centrée (la sélection familiale). La notion de sélection familiale de Darwin s'apparente à la sélection de groupe proposée par Georges Price en 1970 . La sélection de groupe de Price est une généralisation des équations de la sélection naturelle de Fisher, dans lesquelles il introduit des termes d'altruisme (coûts et bénéfices de l'altruisme envers un membre du groupe). Cette théorie a été fortement critiquée par la suite et l'existence d'adaptations liées au groupe suscite encore aujourd'hui des controverses (Leigh Jr, 2010; Kramer and Meunier, 2016; Rachlin, 2017).

Cent ans après Darwin, Hamilton s'intéresse à l'évolution génétique de l'altruisme et publie en 1964 les deux articles fondateurs de la théorie de la sélection de parentèle, en modélisant mathématiquement ce mécanisme, sans avoir recours à la sélection de groupe introduite par Darwin (Hamilton, 1964a,b). Il introduit alors la notion de fitness inclusive, qui est une extension de la notion de fitness darwinienne, que nous avons déjà abordée dans la section précédente. Hamilton explique ainsi que si un avantage sélectif est dû à un gène conférant un bénéfice à ceux qui en sont porteurs, alors : *"there is nothing special about the parent-offspring relationship except its close degree and a certain fundamental asymmetry. The full-sib relationship is just as close."* (Hamilton, 1964a). De ce fait, la fitness d'un individu ne devrait pas se limiter à la reproduction de ses seuls descendants, mais à la reproduction de tous les individus qui lui sont apparentés, en pondérant évidemment par la probabilité qu'il porte ce gène (Equation 1.1). Cette probabilité est directement corrélée au lien de parenté entre les individus.

$$a^\bullet = 1 + \delta a + e^\circ, \quad (1.1)$$

a^\bullet étant la fitness d'un individu, δa l'effet de son génotype et e° les effets des autres individus sur l'individu focal, qui dépendent évidemment de leurs propres génotypes. Ses travaux ont donné naissance à ce que l'on nomme aujourd'hui la règle d'Hamilton :

$$br > c, \quad (1.2)$$

avec b les bénéfices pour tous les individus affectés par le comportement altruiste, r le coefficient d'apparentement entre l'individu altruiste et le bénéficiaire du comportement et c le coût de l'altruisme pour l'individu effectuant l'action.

Cette notion de fitness inclusive permet ainsi de prendre en compte pour un individu donné les avantages de la reproduction de ses apparentés et ainsi d'expliquer les phénomènes de suppression de reproduction dans certaines sociétés animales comme chez

les hyménoptères sociaux. La théorie d'Hamilton est aujourd'hui communément acceptée mais ses implications sont toujours interrogées, en particulier sur l'importance du népotisme³ dans l'évolution des comportements altruistes et demeure ainsi un domaine de recherche toujours actif (Boomsma and d'Ettorre, 2013).

1.2.2 Comportements associés à la reconnaissance de parentèle

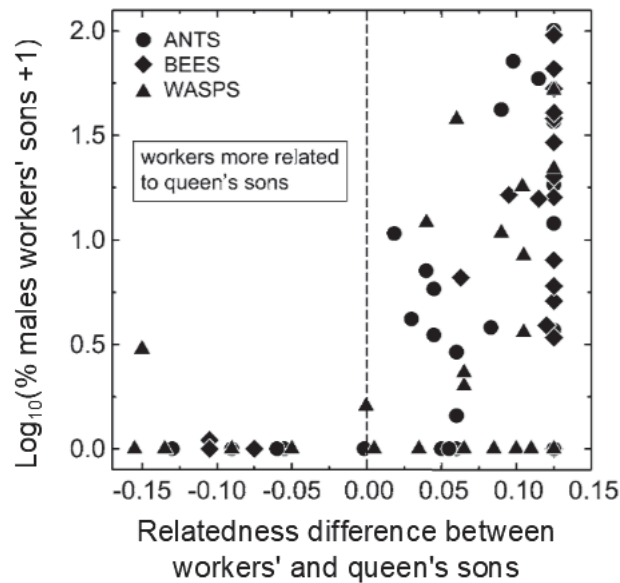


FIGURE 1.8 – **Proportion des mâles issus d’ouvrières comparé aux mâles issus de la reine selon leurs apparentements respectifs dans les colonies de 90 espèces d’Hyménoptères sociaux.** Une différence d’apparement inférieure à 0 indique que les ouvrières sont plus apparentées aux fils de la reine qu’aux fils des autres ouvrières (et inversement pour une différence d’apparement positive). La proportion de mâles issus d’ouvrières diminue quand l’apparement entre eux et les mâles issus de la reine augmente, indiquant un népotisme probable dans le contrôle de la production de mâles par les ouvrières. Tiré de Ratnieks et al. (2006)

La reconnaissance de parentèle est un mécanisme loin d’être restreint au seul phénomène de suppression de reproduction chez les hyménoptères sociaux (Mateo, 2004). Dans les sociétés animales, la reconnaissance de parentèle s’est souvent confondue avec le phénomène de reconnaissance de colonies (nestmate recognition) (Breed, 2003; van Zweden, 2010; Brandstaetter et al., 2008). En effet, la majorité des études ont comparé les réactions d’agression par les gardes des ruches lors de l’introduction d’ouvrières de la même colonie ou d’une colonie différente, comme chez *Lasioglossum zephyrum* (Buckle and Greenberg, 1981; Greenberg, 1988) ou chez l’abeille mellifère (*Apis mellifera*) (Couvillon et al., 2009), ou à la reconnaissance de la couvée comme chez les fourmis du genre *Formica* (Helanterä and d’Ettorre, 2015). Cette reconnaissance est requise pour éviter les phénomènes de parasitisme des colonies par d’autres congénères (le parasitisme social) ou les conflits de parentèle entre lignées à l’intérieur de la colonie, et est ainsi cruciale pour la fitness inclusive des individus.

De manière plus large, la reconnaissance de parentèle est impliquée dans tous les niveaux d’organisation sociale, que ce soit pour le maintien de la hiérarchie à travers les

³Le népotisme est la tendance à favoriser ses apparentés.

rapports de dominance (Hamilton, 1964a) ou la recherche de ressources alimentaires de manière sociale (Battesti et al., 2012). Le choix d'un habitat ou d'un lieu de ponte peut être influencé par le choix des conspécifiques et plus spécifiquement de ses apparentés : soit par mimétisme, où le choix d'un apparenté paraît comme étant aussi le plus pertinent pour soi (Battesti et al., 2012; Francesiaz et al., 2017), soit par évitement afin de limiter la compétition locale (Hubbard et al., 1987; Stephan et al., 2015).

Hamilton avait développé sa théorie en s'appuyant sur les avantages de la reconnaissance de parentèle dans le cadre du népotisme. Si les exemples de discrimination et de traitement différentiel selon le degré d'apparentement à l'intérieur d'une colonie existent chez les vertébrés communaux (Griffin and West, 2003), les preuves sont plus difficiles à trouver chez les insectes sociaux (Buckle and Greenberg, 1981; Gamboa, 1988). En effet, l'absence de discrimination fine (reconnaissance uniquement de l'appartenance ou pas à la colonie) et les premières études ayant testé cette hypothèse n'ont pas réussi à démontrer un népotisme, comme par exemple chez une espèce de guêpe sociale avec une reine polyandre (*Vespa maculifrons*) (Goodisman et al., 2007), interrogeant ainsi la pertinence de la prédiction d'Hamilton (Wenseleers, 2007; Boomsma and d'Ettorre, 2013). Ces études récentes montrent que le népotisme est exprimé dans des contextes particuliers chez les insectes sociaux : l'élevage des mâles des colonies et la manipulation du sex-ratio (Ratnieks et al., 2006). En effet, lors de la comparaison de plus de 90 espèces d'Hyménoptères sociaux, une étude a montré que dans les colonies dans lesquelles les ouvrières étaient plus apparentées aux descendants mâles de la reine qu'aux descendants mâles des autres ouvrières, ces ouvrières produisaient moins de descendants mâles elles-mêmes (Figure 1.8). Ceci suggère que la production de mâles des ouvrières est contrôlée selon leur apparentement, ce qui indique ainsi un népotisme pour l'élevage des mâles (Wenseleers and Ratnieks, 2006). Cependant, l'importance du népotisme pour l'évolution de la socialité a vraisemblablement été surestimée par Hamilton (Boomsma and d'Ettorre, 2013).

Que ce soit pour l'élevage de mâles dans une colonie ou de jeunes par leurs parents, les soins parentaux s'avèrent coûteux pour les adultes, que ce soit en temps ou en énergie (Gross, 2005; Gilbert and Manica, 2015; Bleu et al., 2016). La reconnaissance de ses petits semble donc adaptative dans le cadre de soins parentaux. Elle existe dans de nombreuses espèces pour éviter le parasitisme de portée (Roldán and Soler, 2011; Manna and Hauber, 2016) : chez les mammifères (Corona and Levy, 2015), comme l'otarie à fourrure antarctique (Aubin et al., 2015), les oiseaux comme le moineau friquet (*Passer montanus*) (Poláček et al., 2017) ou les insectes comme évoqué précédemment chez les fourmis (Helanterä and d'Ettorre, 2015).

Enfin, la reconnaissance des apparentés dans le cadre du choix du partenaire sexuel a été souvent étudiée depuis Darwin (Bateson, 1983b; Bonduriansky, 2001; Puurtinen, 2011; Duthie and Reid, 2016). En effet, ce choix du partenaire en discriminant ses apparentés fait partie des mécanismes d'évitement de la consanguinité évoqués dans la section 1.1 et sera traité spécifiquement dans la section 1.3.

La reconnaissance de parentèle est ainsi impliquée dans des comportements divers allant de la reproduction au fonctionnement de sociétés animales complexes. Cela soulève des questions concernant les coûts de la mise en place et de la maintenance d'un tel mécanisme, ainsi que les coûts d'une erreur de discrimination (la discrimination imparfaite) face aux coûts des comportements évoqués précédemment s'ils se produisaient de manière non discriminante. Ces coûts à l'absence de reconnaissance sont variables selon les comportements, et dépendants de l'environnement des individus. De plus, les coûts de la discrimination dépendent probablement des mécanismes utilisés par les animaux pour atteindre cet objectif.

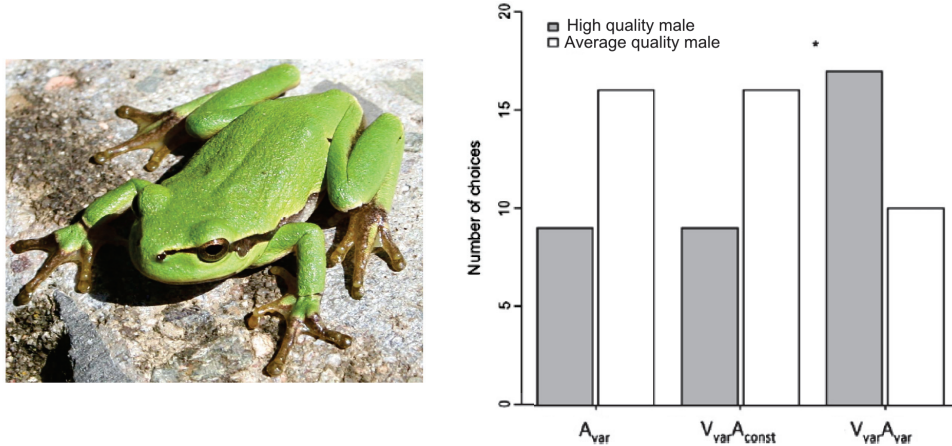


FIGURE 1.9 – **Utilisation de signaux multimodaux par la reinette verte.** À gauche : Photo d'*Hyla arborea* par Felix Reimann, sous licence CC BY-SA 3.0. À droite : Nombre de choix des femelles entre des mâles de haute qualité (en gris) et de qualité moyenne (en blanc) selon les stimuli utilisés. Les signaux sont des signaux acoustiques (vocalises des mâles) ou visuels (modèles de mâles en résine à l'échelle 1 avec le sac vocal enflé et coloré). Ces signaux sont manipulés pour mimer des mâles de haute qualité ou de qualité moyenne (signaux acoustiques : variation de la fréquence, de l'amplitude et du nombre de coassements par seconde et signaux visuels : variation de la coloration du sac vocal via sa brillance et sa chromaticité). Condition unimodale avec des signaux acoustiques variables : A_{var} . Conditions multimodales : Signaux visuels variables et signaux auditif constants ($V_{var}A_{const}$) et signaux visuels et auditifs variables ($V_{var}A_{var}$). Tiré de Gomez et al. (2011b).

1.2.3 Mécanismes de la reconnaissance de parentèle

La reconnaissance de parentèle implique une communication entre un individu récepteur, qui veut évaluer l'appartenance d'un congénère, et un individu émetteur, qui est évalué. La communication peut ainsi se dérouler au niveau intraspécifique (par exemple dans le cadre du choix du partenaire sexuel) ou interspécifique (par exemple lors de l'évaluation d'un parasitisme de portée par une autre espèce). L'émetteur produit ainsi un signal (qui dans notre cas renseigne sur son appartenance) qui va induire des modifications du comportement du récepteur. Les mécanismes de discrimination des apparentés sont multiples inter- et intra-espèces, et ne sont pas mutuellement exclusifs (Tibbetts and Dale, 2007). De fait, de nombreuses espèces utilisent une combinaison de plusieurs signaux, voire de plusieurs types de signaux (ce qu'on appelle la multimodalité) afin d'affiner la fiabilité de l'information et la précision de la décision chez les récepteurs, comme par exemple la reinette verte (*Hyla arborea*) (Gomez et al., 2011a) (Figure 1.9). Il existe ainsi cinq grands modes de signaux : les signaux visuels, acoustiques, chimiques, électriques et tactiles. Nous nous concentrerons ici sur les trois premiers modes qui sont les plus étudiés.

Signaux visuels

Les signaux visuels sont utilisés par de nombreuses espèces afin de discriminer les individus. Les humains sont connus depuis longtemps comme étant capables de reconnaître des similarités entre des visages inconnus (Kaminski et al., 2009), et il a été montré que certains primates non-humains comme le macaque rhésus étaient capables de faire de même (Pfefferle et al., 2014). Cette capacité n'est cependant pas réservée aux primates

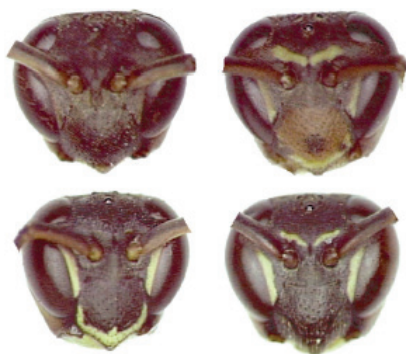


FIGURE 1.10 – **Exemple de marqueurs faciaux visuels utilisés par *Polistes fuscatus* lors de la reconnaissance de ses congénères.** Photo de quatre guêpes échantillonnées à Ithaca, New York, avec des marqueurs faciaux jaunes. Tiré de Tibbetts (2002)

et certains insectes comme les guêpes à papier (*Polistes fuscatus*) sont capables de reconnaître leurs compagnes de ruche grâce à des signaux visuels (marqueurs faciaux et abdominaux, Figure 1.10), mais aussi d'apprendre de nouveaux signaux faciaux (Tibbetts, 2002). La propagation des signaux visuels est par nature dépendante de la qualité de la lumière présente dans l'environnement et peuvent facilement être interceptés par les obstacles présents comme la végétation.

Signaux acoustiques

Les signaux acoustiques ont généralement une bien plus grande portée que les signaux visuels, que ce soit dans l'air ou dans l'eau. De nombreux animaux utilisent ainsi les signaux acoustiques afin de discriminer les individus à distance, comme les éléphants d'Afrique (*Loxodonta africana*). Les éléphants femelles sont ainsi capables de reconnaître leurs apparentés sur la base de leurs vocalisations en utilisant un signal provenant au maximum de 2.5km, tandis que les mâles discriminent et préfèrent se diriger vers des femelles non familières (Stoeger and Baotic, 2017). Les utilisateurs de signaux acoustiques les plus connus restent évidemment les oiseaux mais les insectes utilisent aussi les signaux acoustiques (Bailey et al., 2017).

Signaux chimiques

La communication chimique est considérée comme ancestrale et est la plus répandue chez les êtres vivants, via la production et l'interprétation de bouquets sémiologiques⁴ issus des individus. Les signaux chimiques se divisent en trois grandes catégories : les phéromones⁵, les kairomones⁶ et les allomones⁷. Dans le cadre de la reconnaissance de parentèle, seules les phéromones sont utilisées. L'étude de cette communication a commencé chez les insectes, et particulièrement chez les fourmis il y a plus de 100 ans (Fielde, 1901). La première source de phéromones découverte chez les insectes sont les hydrocarbures cuticulaires (CHC) (van Zweden et al., 2011; Johansson and Jones, 2007; Howard and Blomquist, 2005). Les CHC sont des hydrocarbures à longues chaînes

⁴Substances chimiques émises dans l'environnement ayant une valeur de signal entre les individus.

⁵Composés sémiologiques utilisés comme messageur entre individus de la même espèce permettant de moduler leur physiologie ou leur comportement.

⁶Composés sémiologiques procurant un bénéfice à son récepteur d'une autre espèce en modulant son comportement.

⁷Composés sémiologiques procurant un bénéfice à son émetteur en interagissant avec un individu d'espèce différente.

produits par des cellules spécialisées appelées oenocytes via la chaîne de synthèse des acides gras et transportés ensuite jusqu'à la cuticule des insectes (Chung and Carroll, 2015; Howard and Blomquist, 2005) (Figure 1.11). Ils ont vraisemblablement tout d'abord été sélectionnés afin de limiter la dessiccation des insectes (Chung and Carroll, 2015). Le rôle des CHC dans la reconnaissance de parentèle est connu dans plusieurs ordres d'insectes, comme les Diptères (chez la drosophile (Bartelt and Jackson, 1984), ou les moustiques (Polerstock et al., 2002)), les Blattoptères (Lihoreau et al., 2016) ou les Hyménoptères (chez les fourmis (Liang and Silverman, 2000; Brandstaetter et al., 2008; Brandt et al., 2009; Martin et al., 2013), les abeilles (Kather et al., 2011; Falcón et al., 2014; dos Santos and do Nascimento, 2015), les guêpes (Ode et al., 1995; Metzger et al., 2010a) ou encore les cèphes du blé (Bartelt et al., 2002)). Lihoreau et al. (2016) ont montré que la blatte germanique (*Blattella germanica*) discriminait plusieurs niveaux d'apparentement avec leurs congénères : elle distingue des individus issus de leurs fratries à des individus d'une lignée différente via l'utilisation des CHC.

Cependant, les CHC ne sont qu'une partie des sources d'informations chimiques concernant la parentèle chez les insectes. Des glandes spécialisées produisent des hydrocarbures utilisés dans des contextes écologiques variés. La glande de Dufour est une glande accessoire du système reproducteur des femelles de toutes les espèces d'Hyménoptères (Abdalla and Cruz-Landim, 2001) qui produit des signaux signalant entre autre leur appartenance à une espèce ou leur apparentement dans de nombreuses espèces (Hefetz et al., 1986). Chez les espèces parasitoïdes, comme les Braconidés ou les Ichneumonidés, la détection d'hôtes sains conditionne le succès reproducteur. Des études ont montré que ce marquage était composé majoritairement d'hydrocarbures produits par la glande de Dufour et permettait de reconnaître les hôtes sains des hôtes parasités (Guillot et al., 1974; Howard and Baker, 2003). Dans certaines espèces comme le parasitoïde *Venturia canescens*, le modèle biologique de notre travail, les produits de la glande de Dufour sont utilisés pour connaître l'apparentement des femelles ayant pondu précédemment dans l'hôte (Mudd et al., 1982; Hubbard et al., 1987). D'autres glandes comme les glandes mandibulaires ou thoraciques sont aussi impliquées dans la production de composés odorants utilisés par exemple lors de l'accouplement (Andersen et al., 1988) (Choi and Vander Meer, 2015).

Les phéromones ont longtemps été considérées comme des attributs spécifiques des insectes, mais des études de plus en plus nombreuses montrent l'importance de cette communication chimique chez les mammifères, des rongeurs (Beauchamp and Yamazaki, 2003; Hurst, 2009) aux primates (Charpentier et al., 2008; Boulet et al., 2009), en passant par les pandas (Gilad et al., 2016). Les oiseaux ont, de plus, longtemps été considérés comme ayant des capacités olfactives faibles et la reconnaissance de parentèle grâce à la communication chimique n'a donc que peu été envisagée. Cependant, des études récentes sur le pétrel tempête (*Hydrobates pelagicus*) ont montré qu'il était capable de distinguer ses apparentés grâce à une reconnaissance de l'odeur des individus et qu'il préférait l'odeur d'individus non-apparentés, permettant ainsi un évitement de la consanguinité dans cette espèce philopatrise (Bonadonna and Sanz-Aguilar, 2012).

Signaux spatio-temporels

La reconnaissance de parentèle peut aussi s'appuyer sur des signaux différents des signaux de communication classiques : les signaux spatio-temporels. C'est ainsi qu'est né le concept de reconnaissance basé sur le contexte ("context-based recognition") (Mateo, 2004; Aktipis and Fernandez-Duque, 2011) et qui concerne majoritairement la reconnaissance de colonie (nestmate recognition) ou de portée (littermate recognition). Dans ce concept, la familiarité avec des individus est la base de la reconnaissance de

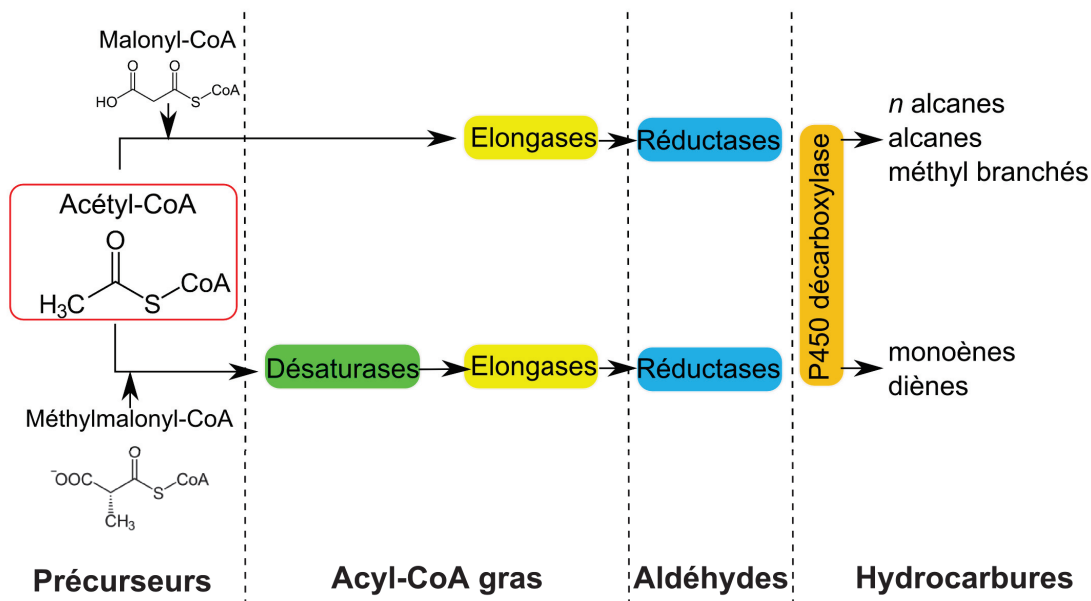


FIGURE 1.11 – Schéma simplifié de la production des CHC chez les insectes. Inspiré de Howard and Blomquist (2005) et Chung and Carroll (2015)

parentèle, sans qu'il y ait forcément un apparentement génétique. Il a par exemple été montré chez l'écureuil roux que les individus étaient capables de distinguer leur apparentés grâce à des signaux acoustiques et de distinguer leurs voisins familiers des individus non familiers (Siracusa et al., 2017). En effet, les individus étaient sujet à plus d'intrusions sur leur territoire de la part d'individus non familiers que de voisins familiers, et de la part d'individus apparentés comparé aux intrusions d'individus non apparentés, montrant une discrimination à la fois des individus familiers et des apparentés. Au contraire, chez *Habrobracon hebetor*, qui est un insecte parasitoïde grégaire (ponte groupée au sein d'un hôte), les individus discriminent les congénères issus du même hôte qu'eux (brood-mate). En revanche, ces braconidés ne sont pas capables de discriminer des individus issus d'une même fratrie si ces derniers ont été élevés sur un autre hôte (Ode et al., 1995). Cette reconnaissance illustre ainsi la difficulté chez certaines espèces de distinguer la reconnaissance des individus familiers de la "vraie" reconnaissance de parentèle.

Modèles ⁸ de reconnaissance de parentèle (matching type)

L'utilisation de signaux spatio-temporels présentée précédemment montre la possibilité d'utiliser des associations, liées à un lieu ou à un moment, pour que l'individu se crée un modèle de référence de l'apparentement. Cette reconnaissance est nommée reconnaissance par apprentissage et est indirecte puisqu'elle ne s'appuie pas sur une estimation directe de degré d'apparentement mais sur la rencontre d'individus dans un contexte social particulier.

La familiarisation Le phénomène de familiarisation est fréquent dans les colonies d'insectes sociaux, où les individus familiers sont considérés comme apparentés (Breed et al., 1995). Ainsi, ces individus familiers seront traités différemment selon les contextes

⁸En traduction du mot anglais "template".

écologiques : soit acceptés dans le cadre de l'accès à la colonie (Buckle and Greenberg, 1981; Greenberg, 1988; Couvillon et al., 2009), soit évités dans le cadre du choix du partenaire sexuel (Smith and Ayasse, 1987). La familiarisation, comme l'utilisation de signaux spatio-temporels sont cependant des méthodes qui ne sont pas fiables puisqu'elles n'utilisent pas le degré d'apparentement comme signal de parentèle.

D'autres méthodes de reconnaissance de parentèle existent, basés eux sur un déterminisme génétique.

La comparaison phénotypique Le phénotype des individus peut comporter des indices sur leur apparentement, qu'ils soient visuels, acoustiques ou chimiques. Les individus peuvent ainsi se baser sur le phénotype de leurs congénères pour évaluer le degré d'apparentement avec eux. Cependant, pour pouvoir faire cette comparaison, les individus ont besoin d'un modèle de référence auquel comparer le phénotype du nouvel individu rencontré, et le degré de correspondance entre la référence et le phénotype de l'individu indiquera le degré d'apparentement entre les deux individus. Chez le poisson *Pelvicachromis pulcher*, le modèle de référence s'établit lors de la croissance du jeune en utilisant comme référence les individus de sa famille (Hesse et al., 2012). Chez d'autres espèces, la référence utilisée est le phénotype de l'individu lui-même (self-referent phenotype matching) (Enigl and Schausberger, 2004; Metzger et al., 2010a; Mateo, 2010). Cette référence personnelle semble ainsi plus précise en terme de reconnaissance "vraie" de parentèle puisque le contexte social de l'individu n'influencera pas la reconnaissance d'apparentés. En théorie, la comparaison phénotypique permet des discriminations très fines entre différents degrés d'apparentement. En pratique, une discrimination fine demande plusieurs indices phénotypiques, et des indices variables qui assurent une individualisation. Dans le cadre de la communication chimique, l'utilisation de bouquets phéromonaux plutôt que d'une seule molécule phéromonale sera plus efficace en terme de discrimination, de même qu'une signature chimique utilisant les ratios entre les différents composés pour signaler l'apparentement permet une beaucoup plus grande variabilité qu'une signature utilisant uniquement la présence ou l'absence d'un composé.

L'effet barbe verte : des allèles de reconnaissance La présence d'un trait perceptible (*i.e.* la barbe verte) indiquant la présence d'un gène chez un individu avait été suggérée par Hamilton comme étant un mécanisme possible d'évolution de l'altruisme, puisque permettant une reconnaissance de parentèle basée sur ce trait (Hamilton, 1964a,b). Cette hypothèse nécessite la co-occurrence de trois propriétés : l'existence de la fameuse barbe verte, l'utilisation de ce marqueur phénotypique pour différencier les porteurs du gène produisant le phénotype, et un népotisme envers les individus porteurs du gène par les autres porteurs malgré un coût à ce népotisme. Cette théorie a permis l'apparition d'un point de vue gène-centré dans la théorie de l'évolution, en opposition avec la vision individu-centrée qui était en vigueur jusqu'à lors. Richard Dawkins, dans son livre *The Selfish Gene*, a popularisé cette vision et nommé cet effet la "Green-beard", littéralement la barbe verte : "*I have a green beard and I will be altruistic to anyone else with green beard*". Ce phénomène a cependant dû attendre 1998 pour que Keller and Ross (1998) produisent le premier exemple de l'occurrence d'un effet de barbe verte chez la fourmi de feu polygyne *Solenopsis invicta* (c'est à dire formant des colonies avec plusieurs reines), où les ouvrières tuaient systématiquement les reines ne portant pas l'allèle récessif du locus *Gp-9*. Depuis, peu d'autres exemples ont été trouvés chez les animaux (Gardner and West, 2010), comme chez les

lézards (Sinervo and Clobert, 2003) ou au niveau cellulaire pour l'adhésion des cellules du placenta (Haig, 1996; Summers and Crespi, 2005) ou des spermatozoïdes chez le mulot sylvestre (Moore et al., 2002) (les autres exemples existants étant chez des microorganismes (Queller et al., 2003; Smukalla et al., 2008)).

Cependant, la coopération entre individus apparentés basée sur des indices génétiques est paradoxale puisque la sélection devrait tendre à diminuer le polymorphisme des loci impliqués dans la reconnaissance de parentèle (Rousset and Roze, 2007). En effet, les individus possédant des allèles communs devraient bénéficier d'une augmentation de fitness disproportionnée grâce à la coopération par rapport aux individus possédant des allèles rares, et ainsi créer une sélection fréquence-dépendante positive sur les loci impliqués dans la reconnaissance de parentèle. Ce paradoxe a été énoncé par Ross H. Crozier en 1986, et a ainsi été nommé de manière éponyme (Crozier, 1986). La compréhension de l'origine et du maintien d'allèles de reconnaissance polymorphique a été explorée de manière théorique et empirique afin de comprendre ce paradoxe apparent (Rousset and Roze, 2007; Holman et al., 2013). Holman et al. (2013) ont ainsi démontré que le choix du partenaire sexuel était une piste de résolution du paradoxe de Crozier, via un choix d'hétérogamie sur les loci impliqués qui permettrait un maintien du polymorphisme.

Les modèles de reconnaissance de parentèle se divisent ainsi en deux catégories : la première nécessitant une (ou des) rencontre(s) avec des apparentés afin de se former un modèle de référence et la deuxième ne nécessitant pas de rencontres préalables. La première catégorie se compose de fait des mécanismes de familiarisation et de comparaison phénotypique avec un modèle de référence basé sur des individus apparentés tandis que la seconde comprend les mécanismes de comparaison phénotypique avec un modèle de référence personnel (self-referent phenotype matching) et de barbe verte.

Informations multiples, biais sensoriels et limitations de traitements de l'information

Les paragraphes précédents ont démontré la variabilité qu'il existe lors de la reconnaissance de parentèle, que ce soit en termes de signaux ou de modèles. La communication est un phénomène complexe, impliquant à la fois la production et la transmission de signaux par un émetteur, la propagation de ces signaux dans l'environnement avant la réception et l'interprétation de ces signaux par le récepteur. Cependant, lors de la transmission des signaux, l'environnement agit comme un filtre et peut altérer le signal. La présence de biais sensoriels peut aussi limiter la bonne réception des signaux (Grether, 2010). La fiabilité du signal est pourtant nécessaire pour que le récepteur puisse prendre des décisions comportementales en accord avec ce signal. L'utilisation d'informations multiples provenant du même objet a tout d'abord été proposée comme une réponse à la perte d'informations lors de la transmission, grâce à la présence d'informations redondantes (back-up information)(Candolin, 2003; De Gelder and Bertelson, 2003). Ces informations multiples peuvent en particulier être multimodales, c'est-à-dire provenant de différents types de signaux (par exemple visuels et acoustiques). Chez les humains, voir une personne parler (signaux visuels et acoustiques) rend la compréhension du discours plus facile comparativement à l'écoute seule de ce discours (signaux acoustiques uniquement)(De Gelder and Bertelson, 2003). L'utilisation de signaux multiples pour indiquer par exemple la qualité d'un mâle à une femelle lors du choix du partenaire sexuel pourrait rendre la tricherie des mâles plus difficile, si par exemple le coût global de l'expression de différents signaux impose une honnêteté entre les traits. Cependant, la détection d'un tel type de communication est assez rare et suggère que l'utilisation d'informations redondantes n'est pas commune (Candolin, 2003).

L'utilisation d'informations multiples non redondantes est cependant très fréquente dans le choix du partenaire sexuel. L'intégration multimodale peut permettre de limiter le bruit de fond présent dans les signaux ou les changements induits par la croissance ou le vieillissement des organes récepteurs (De Gelder and Bertelson, 2003). Par exemple, chez le crabe *Uca annulipes*, les femelles choisissent leur partenaire en deux temps. Tout d'abord, elles sélectionnent dans la population un certain nombre de partenaires potentiels sur le critère de leur taille, puis visitent les terriers uniquement de ces derniers avant de choisir leur partenaire (Backwell and Passmore, 1996). Cet exemple illustre comment deux variables non corrélées peuvent être utilisées pour affiner le choix du partenaire sexuel. Selon l'environnement, la fiabilité des signaux peut varier et on s'attend à ce que les individus adaptent l'utilisation des signaux qu'ils reçoivent selon leur environnement. Une explication aux choix en deux temps des femelles crabes évoqué précédemment est que les mâles défendent leurs terriers et que la présélection de mâles dont les terriers vont être visités réduirait le risque de blessures des femelles. Il y a donc ici utilisation d'un critère à distance (la taille des mâles), qui est affiné par l'utilisation d'un autre critère (la qualité du terrier). L'utilisation de critères multiples peut néanmoins être coûteuse. Premièrement, sur quel critère faire son choix si les informations reçues sont discordantes ? Un exemple classique est l'expérience de la ventriloquie, où la provenance de la voix ne correspond pas à la vision de la marionnette (Welch and Warren, 1980). Selon les espèces, certains signaux sont utilisés prioritairement pour choisir entre deux messages contradictoires (De Gelder and Bertelson, 2003). Par exemple, les humains ont tendance à privilégier les signaux auditifs aux signaux visuels lorsqu'ils sont en contradiction (Fendrich and Corballis, 2001). Deuxièmement, l'intégration multimodale peut impliquer des coûts supérieurs à l'intégration unimodale et ainsi faire apparaître des compromis évolutifs entre par exemple vitesse d'un choix et précision de ce dernier chez la reinette verte *Hyla arborea* (Gomez et al., 2011a,b). L'évolution de l'utilisation de signaux multiples dans des espèces variées tend toutefois à démontrer que les avantages de cette acquisition d'informations multimodales sont supérieurs aux coûts engendrés par ce mécanisme pour obtenir des informations précises permettant une réponse optimale. Toutes les questions autour de la communication multimodale sont pour autant aujourd'hui loin d'être résolues, comme par exemple la question majeure de la généralisation de la supériorité de la communication multimodale sur l'unimodale en terme de performance des individus (Partan, 2013; Rubi and Stephens, 2016). Par exemple, Rubi and Stephens (2016) ont montré chez le geai bleu (*Cyanocitta cristata*) que les individus étaient capables de gérer une communication uni et multimodale (seulement visuelle ou visuelle et acoustique), mais que cela n'affectait pas la performance des individus dans le cadre d'une tâche apprise (*i.e.*, réussir la tâche apprise : accepter un "bon" papillon et rejeter un "mauvais" papillon). Dans le cadre de la reconnaissance de parentèle, les études se sont majoritairement concentrées sur un seul type de signal (souvent chimique) et les approches intégratives manquent dans la littérature. L'exemple de la découverte seulement récente de la capacité des oiseaux à discriminer leurs apparentés grâce à l'olfaction (voir le paragraphe sur les signaux chimiques de la section précédente (Bonadonna and Sanz-Aguilar, 2012)) montre que les chercheurs sont aussi sensibles aux idées reçues de leur communauté, ce qui peut les amener à négliger certaines pistes de recherches importantes en les considérant comme peu probables et à retarder des découvertes. Ces approches plus globales pourraient permettre de mieux comprendre les phénomènes d'évitement de la consanguinité, en particulier dans les cas de réception d'informations discordantes en situation naturelle pouvant mettre à mal la capacité de discrimination des individus.

Une des pistes pour essayer d'appréhender ces questions se trouve peut-être dans l'étude

des bases génétiques de la reconnaissance de parentèle. En effet, le nombre croissant de données disponibles pour de très nombreuses espèces et les possibilités de comparaison que cela engendre pourraient permettre des inférences sur les capacités de traitements de certains types de signaux inconnus dans de nouvelles espèces et ainsi amener à des tests comportementaux non effectués jusqu'à lors. Par exemple, la présence de voies de signalisation olfactives identiques ou proches chez deux espèces, dont une est connue pour son utilisation des signaux olfactifs lors de la reconnaissance de parentèle et l'autre non, peut amener à des tests comportementaux de l'utilisation de ce type de signaux dans la deuxième espèce.

1.2.4 Bases génétiques de la reconnaissance de parentèle

Le travail de bibliographie précédent montre bien à mon sens la complexité du phénomène de reconnaissance de parentèle et les difficultés actuelles à en rendre compte et à en expliquer les mécanismes. L'apparition des nouvelles technologies, que ce soit de séquençage ou de traitements des données, permettent aujourd'hui de s'attaquer à un nouvel aspect de ce problème : la génétique de la reconnaissance de parentèle. Jusqu'à maintenant, les études génétiques démontraient la présence (ou l'absence) d'une corrélation entre apparemment génétique et comportement subséquent (soin aux jeunes, accouplement, acceptation dans une colonie) des individus (Cohas et al., 2008; Martin et al., 2012) ou quantifiaient la corrélation entre apparemment génétique et ressemblance des signaux émis par les individus (Charpentier et al., 2008; Leonhardt et al., 2013). Les apports de la génétique sont aujourd'hui conséquents dans de nombreux domaines de la biologie comportementale bien que le passage génotype-phénotype comportemental soit sujet à de nombreuses difficultés dues aux caractères complexes des comportements étudiés (Robinson et al., 2008). Les études effectuées actuellement se séparent en deux groupes : le premier cherche à comprendre les voies métaboliques impliquées dans la production ou la réception des signaux impliqués dans la reconnaissance de parentèle (Niehuis et al., 2011; Chung et al., 2014; Zhang et al., 2015), tandis que le second étudie les gènes impliqués lors de la reconnaissance de parentèle, notamment via des études de comportements couplées à de la transcriptomique (Bailey et al., 2011; Immonen and Ritchie, 2012).

Chez les insectes, les études se sont ainsi concentrées sur les gènes impliqués dans la biosynthèse des CHC, permettant ainsi d'identifier par exemple une synthase d'acide gras nommée mFAS (CG3524) responsable de la production de CHC chez *Drosophila melanogaster* (Chung et al., 2014), des désaturases via une approche QTL couplée à une approche de blast chez les guêpes parasitoïdes *Nasonia* (Niehuis et al., 2011) ou des récepteurs antennaires différentiellement exprimés selon le sexe (OR : odorant receptor et OBP : odorant binding protein) impliqués dans la réception des signaux chimiques chez la pyrale du maïs asiatique *Ostrinia furnacalis* (Zhang et al., 2015). Les approches comportementales ont permis par exemple de mettre en évidence l'implication de gènes de l'olfaction, de neuropeptides ainsi que des gènes immunitaires dans la réponse des femelles au "chant" émis par les mâles lors de la parade (courtship song) chez *Drosophila melanogaster* (Immonen and Ritchie, 2012). En effet, 41 gènes ont été identifiés comme significativement différentiellement exprimés chez les femelles entre les conditions sans "chant" et avec le "chant" d'un mâle de la même espèce. De plus, cette étude a montré une différence d'expression génétique entre les femelles ayant écouté le chant d'un mâle de la même espèce et les femelles contrôles (les gènes différentiellement exprimés étant majoritairement enrichis dans les fonctions de signalisation, de cognition et de l'olfaction), ainsi qu'entre les femelles ayant écouté le chant d'un mâle d'une autre espèce (Fonctions de l'immunité humorale et de la réponse au stress particulièrement

enrichies dans les gènes différentiellement exprimés) et les femelles contrôles. Ces deux approches donnent ainsi des résultats complémentaires et permettent une nouvelle compréhension du mécanisme de reconnaissance de parentèle.

1.3 Préférence et choix d'un partenaire sexuel

Les thèmes évoqués précédemment dans cette introduction comme la reconnaissance de parentèle ont en grande partie trouvé écho dans ce travail via l'étude des mécanismes de choix du partenaire sexuel. Dans tout ce travail de thèse, le choix du partenaire sexuel a été et sera traité de manière pratiquement exclusive comme un choix des femelles. En effet, le sexe sélectif est ainsi le sexe limitant ou investissant le plus dans la reproduction et de ce fait, est dans la majorité des cas le sexe femelle. Des exemples de choix mâles existent néanmoins dans la littérature (voir Bonduriansky (2001) et Clutton-Brock (2009) pour des revues de littérature). L'utilisation du terme femelle en lieu et place de sexe sélectif est ainsi uniquement une facilité de langage qui ne remet aucunement en cause la possibilité d'un choix mâle ou d'un choix des deux sexes.

Dans les sections précédentes, j'ai évoqué les différents signaux pouvant être utilisés par les individus afin de faire un choix parmi les individus disponibles. Cependant, la femelle doit pouvoir comparer les mâles avec d'autres afin d'exprimer une préférence. En effet, le nombre de partenaires potentiels est potentiellement grand et ils peuvent être de qualité variable. Cette comparaison s'effectue via des stratégies d'échantillonnages classées généralement en deux catégories : le meilleur-parmi- n (best-of- n) (Wittenberger, 1983) (Figure 1.12a) et les règles de décisions de seuil (threshold decision rules) (Moore and Moore, 1988) (Figure 1.12b). La stratégie du meilleur-parmi- n nécessite en théorie d'échantillonner tous les partenaires disponibles pour faire son choix. En conditions naturelles, l'échantillonnage total de la population est impossible, sauf potentiellement dans des espèces sociales vivant en petits groupes (comme chez les suricates (O'Riain et al., 2000; Young et al., 2007)). De ce fait, l'individu va échantillonner n partenaires potentiels avant de faire son choix. La question de ce nombre optimal derrière n est évidemment centrale : échantillonner trop peu d'individus peut donner une image biaisée de la qualité des partenaires disponibles tandis qu'en échantillonner trop engendre des coûts (de temps, de dépense d'énergie, de risques de prédation et de mémoire). La capacité de mémoire nécessaire aux individus pour la stratégie du meilleur-parmi- n peut limiter le nombre d'espèces utilisant cette stratégie. D'ailleurs, les études ont démontré l'utilisation de cette stratégie majoritairement chez les vertébrés supposés avoir de plus grandes capacités cognitives, comme chez l'antilopine (Byers et al., 2005) ou une grenouille (Murphy and Gerhardt, 2002). La stratégie de seuil semble plus parcimonieuse puisque l'individu compare un ou des traits du partenaire potentiel avec un seuil fixé. Ce seuil optimal est supposé être sélectionné dans un environnement stable. Une des différences majeures de ces deux stratégies d'échantillonnage est le nombre de partenaires qu'une femelle peut échantillonner en même temps : dans le cadre du meilleur-parmi- n , la femelle peut estimer la qualité de plusieurs mâles en même temps, tandis que la stratégie de seuil nécessite l'estimation séquentielle de mâles, sans possibilité de revenir sur un mâle rejeté puisqu'il était en dessous du seuil fixé.

Les conditions environnementales comme la densité de populations ou l'ouverture de la végétation, ainsi que les capacités physiologiques des individus peuvent limiter les possibilités d'échantillonnage. On attend ainsi que les stratégies des femelles varient selon les coûts associés à l'échantillonnage. Chez le crabe *Uca mjoebergi*, la sélectivité des femelles décroît en effet quand le risque de prédation augmente (Booksmythe et al., 2008). De même, la compétition intrasexuelle peut affecter la stratégie d'échantillon-

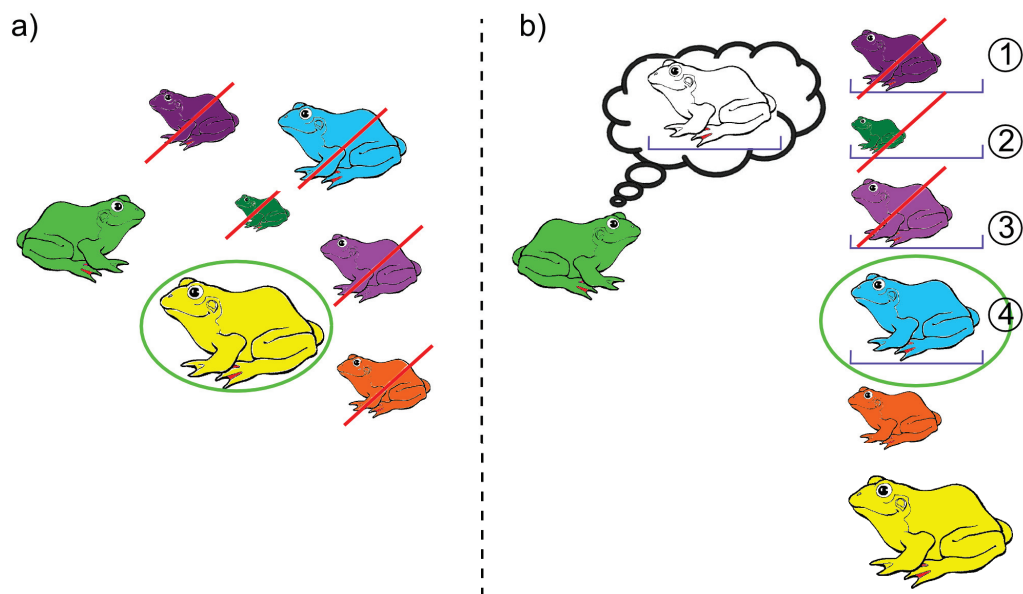


FIGURE 1.12 – **Stratégies d'échantillonnage d'un partenaire sexuel.** Illustration de deux stratégies d'échantillonnage d'un partenaire sexuel sur le critère de la taille. a) Stratégie du meilleur-parmi- n . Le plus gros mâle (ici le jaune) va être choisi par un échantillon de la population. b) Stratégie via une règle de décision de seuil. La femelle a un seuil de taille défini à l'avance et va échantillonner les mâles jusqu'à ce qu'un égale ou dépasse ce seuil (ici la grenouille bleue). Les mâles suivants (orange et jaune) ne seront donc pas échantillonnés.

nage des individus, si le temps passé à choisir un individu augmente le risque qu'il soit déjà choisi par un autre individu. La sélectivité d'un individu peut aussi diminuer selon son expérience précédente (Chapman and Partridge, 1998; Dowling et al., 2007; Laloï et al., 2011; Breedveld and Fitze, 2015) ou lorsqu'il rencontre des individus de "mauvaise qualité", comme chez l'araignée loup (Stoffer and Uetz, 2016). Enfin, ces stratégies nécessitent que l'estimation de la qualité des individus soit précise et constante au cours du temps. Or la présence d'informations multiples parfois contradictoires, de biais sensoriels ou la maturation et/ou sénescence des systèmes sensoriels peuvent limiter cette bonne estimation (voir aussi la section 1.2.3).

La multiplication de facteurs explicatifs rend l'identification des stratégies utilisées par les individus compliquée, en particulier si elles peuvent varier selon les conditions environnementales. Des études théoriques s'interrogent sur les critères optimaux de sélection, comme par exemple le nombre n d'individus à échantillonner (Dechaume-Moncharmont et al., 2016), ou l'influence de la sélection sexuelle et de l'évitement de la consanguinité dans des environnements complexes et changeants (Roff, 2015; Duthie and Reid, 2016). Les études expérimentales peuvent se concentrer sur les séquences de choix, par exemple le choix séquentiel chez le jardinier satiné (Reynolds et al., 2014) ou une espèce de crabes (Backwell and Passmore, 1996) ou l'évolution des agents de la sélection sexuelle (Miller and Svensson, 2014).

Le choix du partenaire sexuel est cependant souvent associé directement à une préférence des individus. Or la préférence et le choix d'un partenaire ne sont pas synonymes : le choix résulte de l'interaction entre la préférence, les conditions environnementales comme la densité des populations et des stratégies d'échantillonnage évoquées précédemment. Dans le cas de l'araignée loup, la rencontre de mâles de moins bonne qualité diminue la sélectivité des femelles (Stoffer and Uetz, 2016). Ainsi, la femelle peut choisir de s'accoupler avec un mâle qu'elle n'aurait pas préféré dans un autre contexte.

La limitation des rencontres conditionne ainsi le choix du partenaire sans forcément affecter la préférence intrinsèque des femelles. La démonstration expérimentale de la différence entre préférence et choix du partenaire est cependant complexe puisque le comportement observé est généralement le choix du partenaire. Une démonstration élégante de cette distinction a été faite par Zandberg et al. (2017) chez la mésange charbonnière. Les auteurs ont montré que les individus avaient une préférence pour des partenaires avec un niveau d'hétérozygotie similaire au leur mais que les individus n'obtenaient pas un partenaire s'accordant à leur préférence. Cette étude démontre bien que la préférence et le choix des partenaires sexuels sont deux processus distincts qu'il convient d'essayer de séparer. Cette réflexion autour des notions de préférence et de choix ont ainsi fait partie intégrante de la réflexion autour de mon travail de thèse, en particulier après les études que nous avons faites en populations naturelles (voir le Chapitre 5).

Difficultés et avantages de l'étude de la reconnaissance de parentèle et de l'évitement de la consanguinité chez les insectes Une première difficulté lorsque l'on parcourt la littérature sur la reconnaissance de parentèle chez les insectes sociaux est la confusion souvent opérée entre reconnaissance de colonie (nestmate recognition) et reconnaissance de parentèle (kin recognition). Cette confusion a des fondements tout à fait logiques puisque dans la très grande majorité des cas, les individus d'une colonie sont étroitement apparentés. La question devient plus complexe quand les chercheurs essaient de séparer l'effet colonie des effets de l'apparentement, ou dans le cadre de colonies polygynes (avec plusieurs reines). Dans certaines espèces comme *Habrobracon hebetor*, une étude a montré que la reconnaissance était uniquement une reconnaissance de "portée" (individus issus du même hôte chez cet insecte grégaire, broodmate recognition) et non d'apparentement (Ode et al., 1995). Cette confusion illustre la difficulté de séparer les effets des différents mécanismes de reconnaissance.

L'estimation de l'évitement de la consanguinité nécessite deuxièmement de pouvoir identifier précisément les partenaires potentiels et réels afin d'avoir accès à leur apparentement (Szulkin et al., 2013). Estimer la probabilité de rencontre entre deux individus est d'autant plus difficile que les individus sont petits et/ou rapides, comme beaucoup d'espèces d'insectes. De fait, la majorité des études d'évitement de la consanguinité *in natura* ont été réalisés sur des espèces de taille plus imposante comme les mammifères (Cohas et al., 2008; Herfindal et al., 2014) ou les oiseaux (Arct et al., 2015). La possibilité de suivi de populations via du marquage des individus par exemple facilite la création de pedigree ou d'identification des couples et de leurs petits. Quelques études sur des populations d'insectes en conditions naturelles ou semi-naturelles ont réussi à mettre en évidence des stratégies différentes d'évitement de la consanguinité, entre une consanguinité optimale chez *Drosophila melanogaster* (Robinson et al., 2012) ou une tolérance à la consanguinité dans une population avec peu de risques d'accouplement entre apparentés chez le grillon champêtre (*Gryllus campestris*) (Bretman et al., 2011). Pourtant, l'étude de ce phénomène en population naturelle dans de nombreuses espèces est nécessaire afin de comprendre les pressions évolutives qui s'exercent sur ces populations et de prendre en compte les conditions environnementales dans lesquelles les individus évoluent. Ce challenge visant à étudier des populations d'insectes en populations naturelles a fait partie intégrante de ce travail de thèse pour réussir à s'éloigner des populations de laboratoire et avoir une vision un peu plus globale de ce phénomène de reconnaissance de parentèle et d'évitement de la consanguinité chez un modèle biologique insecte.

Le modèle insecte comporte cependant des avantages non négligeables pour les études comportementales et génétiques comme celles effectuées dans mon travail. Leur statut

d’Invertébrés permet tout d’abord une expérimentation facilitée par rapport à d’autres modèles biologiques car non soumise au décret 87-848 du 19 octobre 1987 (modifié par le décret 2001-464 du 29 mai 2001) sur l’expérimentation animale. Leur faible taille, qui est comme évoqué précédemment un désavantage pour le suivi individuel sur le terrain, permet en laboratoire une manipulation, un élevage et un stockage aisé pour de nombreuses espèces. Leur faible temps de génération (hors espèces pratiquant une diapause) permet de maintenir un stock d’individus conséquent et de travailler ainsi avec des tailles d’échantillons importantes. De plus, cela facilite les études d’évolutions expérimentales se déroulant sur un grand nombre de générations. De plus, jusqu’à très récemment, le prélèvement d’insectes non protégés en France ne nécessitait pas d’autorisation et était de ce fait aisé administrativement.

Chapitre 2

La guêpe hyménoptère parasitoïde *Venturia canescens*

Sommaire

2.1	Biologie descriptive	30
2.1.1	Ecologie et cycle de vie	30
2.1.2	Le système de détermination du sexe : <i>single-locus Complementary Sex Determination</i>	31
2.2	Un modèle comportemental	34
2.2.1	Un modèle polyvalent	34
2.2.2	Recherche et choix du partenaire sexuel	34

2.1 Biologie descriptive

2.1.1 Ecologie et cycle de vie

Toutes les études réalisées dans cette thèse se sont appuyées sur un unique modèle biologique, *Venturia canescens* Gravenhost (Hymenoptera, Ichneumonidæ). Cette espèce est une guêpe parasitoïde, c'est à dire nécessitant un hôte pour le développement de ses œufs. Elle est généraliste : on lui connaît en effet plus d'une vingtaine d'hôtes, dont les principaux sont des larves de Lépidoptères s'attaquant aux denrées sèches stockées, comme *Plodia interpunctella*, *Ephestia kuehniella* ou *Ectomyelois ceratoniae* (Salt, 1976). Elle est classée parmi les endoparasitoïdes solitaires : les femelles pondent leurs œufs à l'intérieur de l'hôte et, quel que soit le nombre d'œufs pondus dans un hôte, seulement une guêpe émergera (Rogers, 1972; Marris and Casperd, 1996).



FIGURE 2.1 – *Venturia canescens* sur son hôte *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera, Pyralidæ). Les larves d'*E. kuehniella* se développent dans de la semoule de blé et *V. canescens* les détectent via l'utilisation des kairomones que les larves produisent en consommant la semoule. Photo de Thibault Andrieux <http://thibaultandrieux88.wixsite.com/thibaultandrieux88>

Les femelles de *V. canescens* détectent les larves hôtes grâce aux kairomones qu'elles produisent lorsqu'elles s'alimentent (Corbet, 1971; Mudd and Corbet, 1982). Les femelles parasitoïdes pondent généralement un seul œuf dans une larve hôte. Cette ponte ne tue pas l'hôte (on parle de parasitoïde koïnobionte). Le développement du parasitoïde dure environ 21 jours à 25°C et la durée de vie des adultes nourris est sensiblement identique en conditions de laboratoire (Desouhant et al., 2005), pouvant ainsi conduire à des générations chevauchantes. La ponte d'un œuf dans un hôte est suivie par un mouvement caractéristique appelé le "cocking", qui permet de faire passer un nouvel œuf au bout de l'ovipositeur (Rogers, 1972). Ce cocking consiste en un mouvement de flexion puis d'extension de l'abdomen. Ce mouvement caractéristique permet à l'observateur d'identifier une ponte chez cette espèce et permet donc de mesurer le succès reproducteur des femelles permettant de savoir lorsqu'il y a une oviposition (Amat et al., 2003)(Figure 2.2).

Cette espèce est munie de capacités de dispersion importantes : il a été estimé en laboratoire que les femelles étaient capables d'atteindre une vitesse de 0,2 m.s⁻¹ (Amat et al., 2012) et des études en conditions naturelles ont montrés une dispersion rapide des individus (plus d'un hectare en 1h, (Desouhant et al., 2003)).

Venturia canescens s'inscrit comme une espèce d'Hyménoptères à part puisque deux lignées coexistent en sympatrie sur le terrain (Figure 2.3) (Beukeboom et al., 1999;

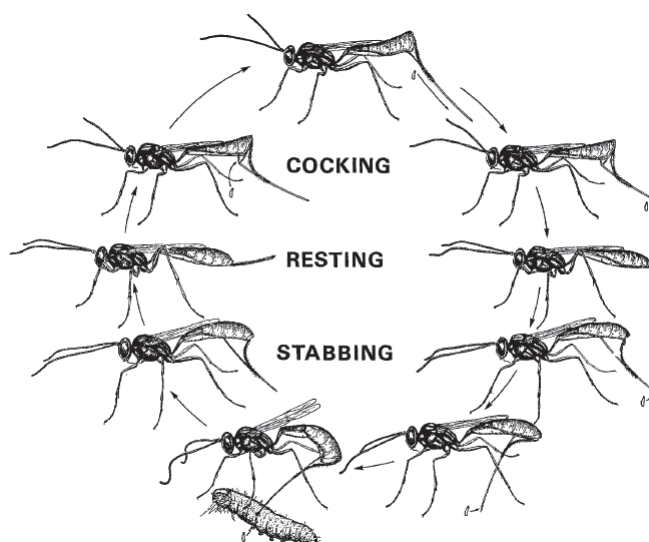


FIGURE 2.2 – Cycle de ponte chez *Venturia canescens*. L'emplacement de l'œuf est indiqué à chaque étape. Tiré de Rogers (1972).

Schneider et al., 2002; Amat et al., 2017) : la première, celle exclusivement utilisée dans cette thèse, avec une reproduction sexuée via sl-CSD comme présenté ci-après (reproduction parthénogénétique arrhénotoque) et une deuxième, asexuée, se reproduisant via une parthénogenèse thélytoque (les femelles produisant uniquement des femelles) (Beukeboom and Pijnacker, 2000). Au commencement de cette thèse, les connaissances génétiques sur cette espèce se basaient sur des marqueurs AFLP (Schneider et al., 2002) ou des microsatellites (Butcher et al., 2000; Mateo Leach et al., 2012). Schneider et al. (2002) ont montré que la reproduction arrhénotoque était majoritaire sur le terrain (Figure 2.3) et que la lignée thélytoque était majoritairement issue d'un seul clone. Une étude plus récente a montré l'existence d'une variabilité génétique plus importante chez les arrhénotoques que chez les thélytoques, les individus thélytoques analysés présentant une homozygotie complète sur tous les marqueurs microsatellites utilisés (Mateo Leach et al., 2012). Durant ma thèse, j'ai pu bénéficier du développement d'autres marqueurs microsatellites et compléter les connaissances sur les populations naturelles de *V. canescens* (marqueurs présentés en Chapitre 4 et utilisés lors des études des Chapitres 4 et 5). Enfin, le génome de *V. canescens* a été séquencé pendant ma thèse par l'équipe de Jean-Marie Drezen (IRBI, Tours) et partiellement annoté (Pichon et al., 2015). La taille du génome a été estimée à 238 Mb lors de ce séquençage.

2.1.2 Le système de détermination du sexe : *single-locus Complementary Sex Determination*

Nous n'avons travaillé dans cette thèse qu'avec une souche sexuée arrhénotoque, puisque l'un des objectifs de cette thèse est d'étudier les mécanismes d'évitement de la consanguinité, et donc nécessite une reproduction sexuée. Chez les Hyménoptères, les individus

sont haplodiploïdes : les femelles se développent à partir d'œufs fécondés tandis que les mâles proviennent d'œufs non fécondés haploïdes. Cependant, un système complémentaire de détermination du sexe appelé Complementary Sex Determination (CSD) entre en œuvre chez la majorité des espèces hyménoptères comme les abeilles (Adams et al., 1977; Beye et al., 1996; Gloag et al., 2016), les bourdons (Gadau et al., 2001), certaines guêpes parasitoïdes (Famille des Braconidæ, genre *Cotesia* (De Boer et al.,

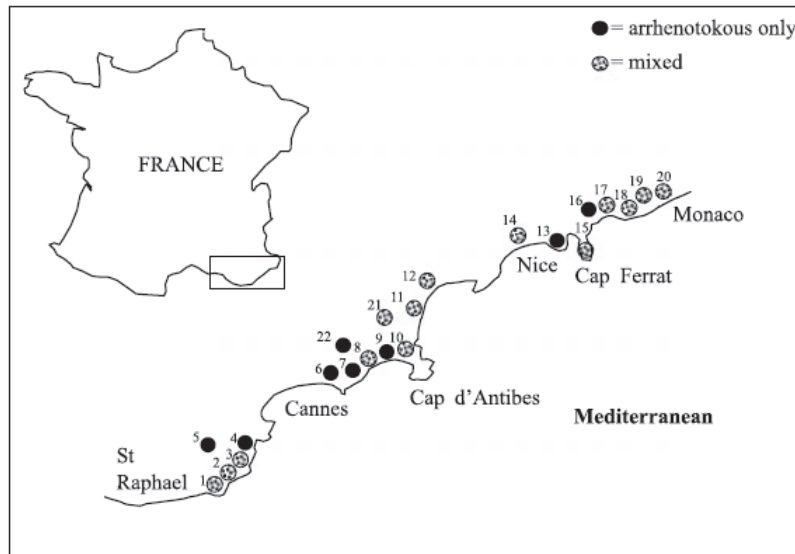


FIGURE 2.3 – Répartition des modes de reproduction de *Venturia canescens* dans la région Sud-Est de la France. 1 = Cap du Dramont, 2 = Agay, 3 = Anthéor, 4 = La Trajas, 5 = Saint Guitte, 6 = La Napoule, 7 = La Croix de Gardes, 8 = Vallauris, 9 = Juan le Pins, 10 = Cap d’Antibes (station I.N.R.A.), 11 = La Brague, 12 = Biot, 13 = Nice, 14 = Panoramèr, 15 = Mont Boron, 16 = Mont Vinagrier, 17 = Mont Gros, 18 = Villefranche, 19 = Eze, 20 = Saint Laurent, 21 = Valbonne, 22 = la Vallée Verte. Tiré de Schneider et al. (2002).

2007; Boer et al., 2008), ou genre *Bracon* (Whiting, 1943; Antolin et al., 2003), Famille des Ichneumonidæ, genre *Venturia* (Beukeboom, 2001) entre autres) ou chez les fourmis (van Wilgenburg et al., 2006; Heimpel and de Boer, 2008). Ce mécanisme repose sur la complémentarité des allèles sur un ("single-locus CSD") ou plusieurs ("multiple-locus CSD") locus. Les individus hémizygotes et donc haploïdes se développent en mâles suivant le mécanisme classique de l’haplo-diploïdie arrhénotoque tandis que les diploïdes se développent différenciellement selon leur homozygotie au(x) locus *csd* : les individus hétérozygotes se développent en femelles diploïdes normales, et les individus homozygotes en mâles diploïdes (Whiting, 1933, 1943). Ces mâles sont généralement viables mais stériles ou produisant une descendance triploïde stérile (Cook, 1993; van Wilgenburg et al., 2006; Fauvergue et al., 2015), bien que quelques exceptions avec des mâles fertiles existent dans deux genres de guêpes parasitoïdes (Genre *Euodynerus* (Cowan and Stahlhut, 2004) et genre *Cotesia* (Elias et al., 2010)). Chez *V. canescens*, les mâles diploïdes sont parfaitement viables, paradedent comme les mâles haploïdes mais sont stériles (Fauvergue et al., 2015).

Le mécanisme moléculaire du CSD, ou « trait lié au sexe de la théorie de la complémentarité », comme nommé par Whiting en 1933, n’a été décrit que chez l’abeille. Le gène du *csd* a en effet été localisé chez *Apis mellifera* sur le bras long du chromosome 8 par Beye et al. (1996) et contient 9 exons (Figure 2.4a). Il provient d’une duplication du gène *feminizer*, lui-même étant un orthologue du gène *transformer* trouvé chez la drosophile (Beye et al., 2003; Hasselmann et al., 2008; Geuverink and Beukeboom, 2014). L’hétérozygotie au locus *csd* est requise pour la formation d’une protéine CSD fonctionnelle de type SR (riche en Sérine et Arginine) et ainsi induire la cascade de féminisation des organes via le gène *fem* (Figure 2.4b). L’hémi- ou l’homozygotie au *csd* ne permet pas la production de la protéine et amène ainsi à la production de mâles (Figure 2.4c) (Gempe et al., 2009; Hasselmann et al., 2010; Nissen et al., 2012; Biewer

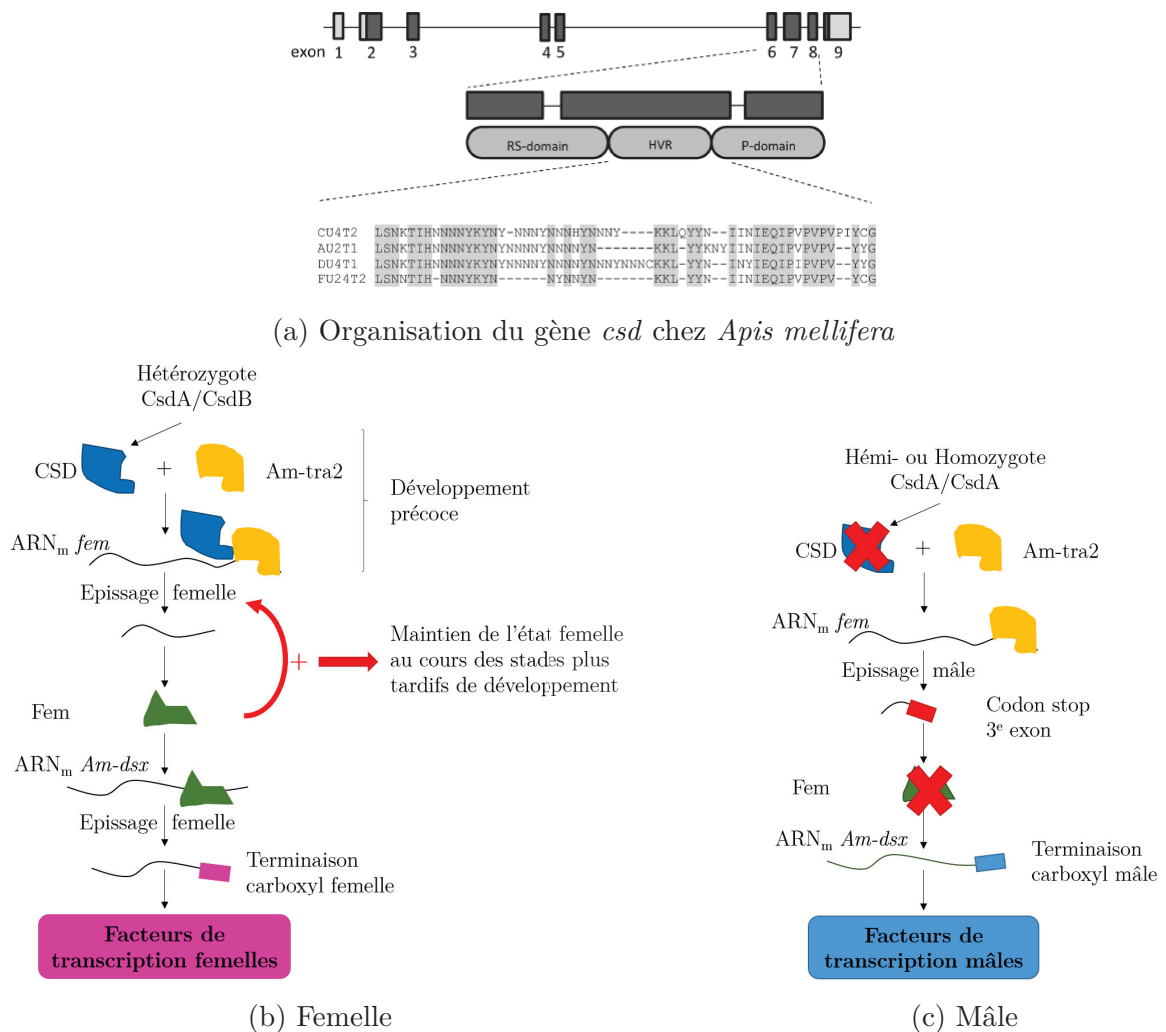


FIGURE 2.4 – Régulation de la détermination du sexe chez *Apis mellifera* via un mécanisme de sl-CSD. (a) Organisation du gène *csd* chez *Apis mellifera*. Localisation des domaines spécifiques potentiels (PSD) : domaine riche en arginine/sérine (RS-domain), région hypervariable (HVR) et domaine riche en proline (P-domain). Un alignement représentatif des séquences hypervariables de quatre séquences du *csd* est représenté. Illustration tirée de Zareba et al. (2017). (b) et (c) Régulation du sexe chez les abeilles. La présence de la protéine CSD est nécessaire pour l'initiation de la cascade génétique de féminisation chez les femelles lors des stades larvaires précoces. Une boucle d'autorégulation positive de la protéine Fem sur l'épissage de son ARN_m permet ensuite le maintien de la féminisation lors des stades plus tardifs. Chez les héli- ou homozygotes au *csd*, la protéine CSD n'est pas fonctionnelle, conduisant à un épissage mâle de l'ARN_m du gène *fem* et ainsi à la production de mâles (haploïde si hémizygotie et diploïde si homozygotie). *fem* : gène *feminizer*, Am-tra2 : protéine homologue à Tra2, Am-dsx : protéine homologue à doublesex

et al., 2015; Zareba et al., 2017).

Le gène *csd* est considéré comme étant vraisemblablement responsable de la parthénogenèse arrhénotoque chez toutes les espèces d’Hyménoptères (Beye et al., 2003; Asplen et al., 2009; Schmieder et al., 2012). Pourtant, malgré de nombreux travaux, ce gène n’a pas été localisé précisément et cloné dans d’autres espèces qu’*Apis mellifera* (voir Holloway et al. (2000) pour une carte QTL chez *Bracon hebetor*, Gadau et al. (2001) chez *Bombus terrestris* ainsi que Schmieder et al. (2012) pour des détections d’orthologues chez les bourdons et les fourmis).

Chez *V. canescens*, un projet ANR nommé Sextinction (ANR-2010-BLAN-1717) a cherché sans succès à localiser le locus *csd*. Cependant, les évidences comme la production de mâles diploïdes dans les proportions attendues sous l’hypothèse du sl-CSD lors d’un croisement frère-sœur (Beukeboom, 2001; Fauvergue et al., 2015) fait que ce mécanisme est communément accepté comme le mécanisme de détermination du sexe dans cette espèce. La présence de cette détermination du sexe par sl-CSD en fait un modèle particulièrement intéressant pour observer le mécanisme de la consanguinité, puisqu’il produit entre autres un coût directement observable, la production de mâles diploïdes. Cette production de mâles diploïdes stériles diminue de fait directement la fitness des femelles, mais elle va aussi influencer la dynamique des populations de parasitoïdes, en participant à la création et au maintien de vortex d’extinction (Figure 4.1). Cet aspect dynamique sera explicité plus particulièrement dans le Chapitre 4 (Section 4.1.2, page 45).

2.2 Un modèle comportemental

2.2.1 Un modèle polyvalent

V. canescens est utilisé comme modèle comportemental depuis les années 1970. Cette espèce a ainsi été utilisée pour répondre à de nombreux questionnements en comportement animal, comme dans les études sur la recherche de ressources (alimentaires et d’hôtes (Driessen and Bernstein, 1999; Desouhant et al., 2005) ou de partenaire sexuel (Metzger et al., 2010*b,a*)), le parasitisme (Harrison et al., 1985; Marris et al., 1996; Reineke et al., 2004; Roberts et al., 2004), le vol et la dispersion (Desouhant et al., 2003; Amat et al., 2012), l’évitement des conspécifiques (Castelo et al., 2003; Metzger et al., 2010*a*), ou encore la comparaison entre lignée sexuée et asexuée (Schneider et al., 2003; Pelosse et al., 2007; Amat et al., 2009; Mateo Leach et al., 2012; Amat et al., 2017). La taille relativement importante de cette espèce (environ 1cm) permet un suivi visuel aisé des individus ainsi que la caractérisation de comportements stéréotypés comme le cocking lors de la ponte d’œufs (Figure 2.2).

2.2.2 Recherche et choix du partenaire sexuel

La recherche du partenaire sexuel est effectuée majoritairement par les mâles dans cette espèce, qui sont attirés par une synergie entre les kairomones produites par les hôtes de *V. canescens* et les phéromones des femelles (Metzger et al., 2010*b*). Les femelles sont uniquement attirées par les hôtes via leurs kairomones et la rencontre entre les mâles et les femelles s’effectue ainsi généralement sur un patch d’hôtes (Metzger et al., 2010*b*). Le mâle va ensuite effectuer une parade devant la femelle : il se place tout d’abord face à la femelle et commence une danse en battant des ailes et en faisant des flexions des pattes arrières (van Santen, 2002). Pendant cette danse, il pivote en gardant la tête en direction de la femelle jusqu’à se retrouver derrière elle. La femelle signifie

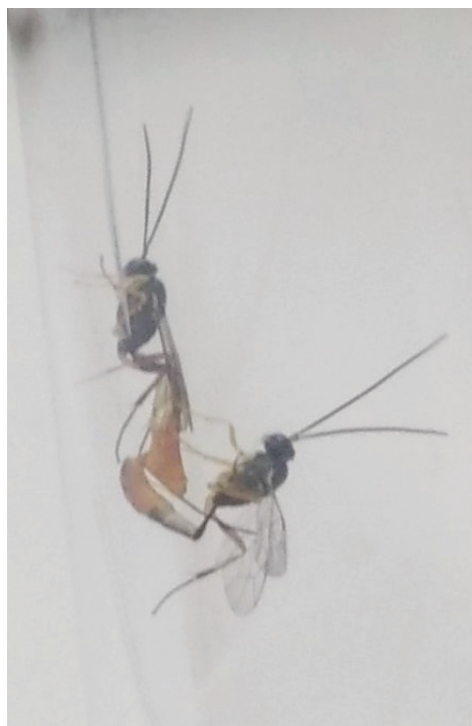


FIGURE 2.5 – **Accouplement de *V. canescens***. Le mâle, situé en dessous, a inséré son appareil génital dans la femelle (au-dessus) et ne bougera plus pendant l'accouplement, qui dure environ une minute.

son acceptation par son absence de mouvement et le mâle effectue alors la monte de la femelle puis l'accouplement à proprement parler, c'est à dire l'insertion des pièces génitales mâles dans le tractus femelle (Figure 2.5). Lors de la parade, la femelle va évaluer la qualité du mâle et peut refuser l'accouplement, soit en s'éloignant du mâle en parade, soit en fléchissant l'abdomen vers le sol, empêchant ainsi l'accouplement, ou enfin en frappant le mâle avec ses pattes arrières pour le déloger lors de la monte. Ce choix femelle du partenaire est d'autant plus important que *V. canescens* est une espèce monoandre (Metzger et al., 2010b), c'est à dire que les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois, et donc que la qualité du partenaire sexuel va influencer la fitness de la femelle. La possibilité d'un choix mâle n'est cependant pas à exclure entièrement dans cette espèce. Les résultats obtenus par Chuine et al. (2015) décrivent une capacité des mâles à discriminer des patches d'hôtes exploités par des femelles leur étant apparentées. Ils ajustent leur temps d'exploration d'un patch en passant significativement plus de temps sur un patch exploité par une femelle non apparentée, pouvant ainsi augmenter leur probabilité de rencontre avec des femelles non apparentées.

Le modèle biologique *Venturia canescens* combine ainsi les avantages d'une taille appréciable pour l'élevage et les expérimentations comportementales avec des modalités d'élevages relativement simples, et deux sites de prélèvement en populations naturelles français connus, utilisés pour constituer chaque année une nouvelle souche de laboratoire afin de préserver la diversité génétique des insectes utilisés (Valence et Nice, voir Chapitre 4 et 5). La monoandrie de cette espèce permet de suivre facilement en laboratoire le pedigree des individus si besoin. Des études antérieures ont démontré la présence de reconnaissance de parentèle et d'évitement des partenaires sexuels apparentés en laboratoire (Hubbard et al., 1987; Metzger et al., 2010a). L'ensemble de ces atouts a participé à l'accumulation de connaissances sur cette espèce (comportementales, génétiques et chimiques) et en fait un modèle particulièrement pertinent pour

l'étude de la reconnaissance de parentèle et de l'évitement de la consanguinité.

Chapitre 3

Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse a démarré autour de la question très générale du choix du partenaire sexuel et des mécanismes qui sous-tendent cette prise de décision.

Cette thématique avait déjà été l'objet de travaux antérieurs (Metzger et al., 2010 a,b ; Fauvergue et al., 2015) chez cette espèce. Ces travaux s'étaient focalisé via une approche phénotypique sur l'étude du système d'appariement, sur l'évitement des partenaires sexuels apparentés et sur les conséquences des accouplements entre apparentés sur la fitness des femelles. Les effets sur la dynamique de populations ont été abordés par la modélisation (Fauvergue et al., 2015; Bompard et al., 2016). Le cadre théorique dans lequel s'inscrivaient ces travaux était celui du "Diploid Male Vortex" présenté par Zayed and Packer (2005) (voir Chapitre 4, page 45). L'ensemble de ces travaux validaient en conditions de laboratoire la prédiction selon laquelle la présence du sl-CSD (voir Chapitre 2, page 31) était corrélée avec des évitements d'apparentés, et que ce choix avait des répercussions sur la production de mâles diploïdes stériles et donc sur le succès reproducteur des femelles. Ainsi, l'ensemble de ces résultats ouvraient des perspectives intéressantes. Premièrement, à l'échelle de la population, la compréhension des pressions de sélection qui favoriserait l'évitement des accouplements appariés¹ et donc la production des mâles diploïdes, reste faible. Deuxièmement, au niveau infra individuel, notre connaissance des mécanismes qui sous-tendent la reconnaissance de parentèle chez cette espèce et chez les animaux d'une manière générale demeure une question ouverte.

Mon travail proposait donc de creuser ces deux points via une approche expérimentale multidisciplinaire. Ma thèse s'est ainsi articulée autour de trois grandes disciplines : un travail d'écologie et de génétique des populations *in natura*, une approche d'écologie comportementale en laboratoire et des expériences d'écologie chimique. Ma thèse visait à répondre à trois grandes questions :

1. **Est-ce que l'évitement des accouplements entre appariés observé au laboratoire conduit à une absence de mâles diploïdes sur le terrain ? Si tel n'est pas le cas, la présence de mâles diploïdes sur le terrain est-elle liée à la taille et la structure génétique des populations ?** (Chapitre 4)

On s'attend à ce que les femelles évitent de s'accoupler avec des apparentés afin de limiter la production de mâles diploïdes. Une absence totale de mâles diploïdes paraît cependant peu probable pour deux raisons. Premièrement, les évitements d'accouplements entre apparentés observés en laboratoire ne sont pas systématiques et il paraît donc peu probable que ce soit le cas sur le terrain. Deuxièmement, les mâles diploïdes sont produits via des accouplements appariés (Voir la section 2.1.2). Ces accouplements peuvent se dérouler entre deux individus non apparentés (selon la fréquence des allèles au sl-CSD portées par les individus). De ce fait, même si les individus évitent parfaitement leurs apparentés, des mâles diploïdes peuvent être produits par accouplements appariés entre individus non apparentés. Si des mâles diploïdes sont observés, on s'attend à ce que leur proportion soit fonction de la diversité génétique sur le locus *csd*, avec plus de mâles diploïdes dans des populations avec une diversité génétique moindre. De fait, une corrélation négative entre isolation, taille, diversité génétique et proportion de mâles diploïdes est attendue. Pour répondre à ces questionnements, nous avons échantillonné 11 populations de *V. canescens*, de taille et de structure génétique différentes, grâce à des populations naturelles continentales et insulaires et des

¹Les accouplements appariés (matched matings) sont des accouplements entre deux individus portant un allèle au locus *csd* commun. Ces accouplements vont donc conduire à la production de mâles diploïdes.

populations captives. Nous avons mesuré la diversité génétique ainsi que la proportion de mâles diploïdes dans ces populations afin de tester nos prédictions. La présence de mâles diploïdes dans des proportions non négligeables même dans les populations avec la plus haute diversité génétique pose cependant la question de l'occurrence réelle d'un évitement d'accouplement entre apparentés sur le terrain.

2. Quels sont les choix de partenaires sexuels en conditions naturelles ? Est-ce que l'évitement de la consanguinité observé au laboratoire peut être quantifié *in natura* quand les partenaires ne sont pas contraints expérimentalement ? (Chapitre 5)

La discrimination et l'évitement des apparentés lors de l'accouplement ont été démontré en laboratoire (Metzger et al., 2010a). Cependant, ces expériences de laboratoires consistaient à mettre en présence une femelle avec un ou plusieurs mâles d'apparentements différents. Or, en populations naturelles, l'accouplement entre deux individus débute par leur rencontre, qui est influencé par de nombreux facteurs comme la densité ou la structure des populations. De ce fait, nous avons travaillé sur deux populations naturelles afin de déterminer les choix de partenaires sexuels sur le terrain. Grâce au génotypage de plus de 400 individus, nous avons estimé l'apparentement entre les partenaires sexuels. Nous avons de plus testé en laboratoire l'influence de facteurs comme la densité de partenaires potentiels et leur apparentement sur le choix du partenaire sexuel (et de fait l'évitement d'accouplement entre apparentés).

3. Quels sont mécanismes sur lesquels reposent le choix du partenaire et donc l'identification des apparentés ? (Chapitre 6)

Des études antérieures suggéraient clairement l'utilisation d'informations chimiques lors du choix du partenaire sexuel (Metzger et al., 2010a). Or, dans cette espèce, la reconnaissance de parentèle médiée par des informations chimiques est connue dans un autre comportement : l'évitement du superparasitisme². Cette constatation amène à la question du coût de production de deux signatures différentes pour une même reconnaissance, celle de parentèle. Nous nous sommes ainsi appuyé sur l'hypothèse émise par Blum en 1996, nommée "semiochemical parsimony", qui postule que les individus devraient utiliser une même information chimique dans plusieurs contextes écologiques afin de limiter les coûts de production et de réception de cette information. Cette double utilisation de la reconnaissance de parentèle nous a permis d'étudier ces signatures chimiques dans ce cadre particulier chez *V. canescens*. Une des conditions nécessaires à la parcimonie de l'information est que ces deux signatures aient des compositions au moins en partie similaires. Nous avons ainsi analysé ces deux signatures chimiques pour tester cette première condition. De plus, si la même information de parentèle est utilisée dans les deux contextes écologiques, nous nous attendons à ce que ces deux signatures soient interchangeable, c'est à dire est-ce que la signature utilisée normalement dans le cadre du choix du partenaire sexuel puisse être utilisée comme une information de parentèle lors du choix d'un hôte et vice versa. Nous avons testé cette hypothèse en réalisant des expériences comportementales d'échange de signatures en laboratoire.

Le manuscrit de thèse est structuré en trois chapitre (nommés chapitres 4 à 6) de résultats écrits autour de trois articles scientifiques (un publié, un en révision et un

²Le superparasitisme est une forme de parasitisme où des œufs de plusieurs individus sont déposés dans le même hôte.

en préparation). Ces chapitres correspondent aux trois grandes questions abordées. Chacun de ces chapitres débute par une courte introduction pour replacer le contexte scientifique, puis vient l'article lui-même et une discussion. Ces discussions de chapitres n'ont pas vocation à rediscuter les thèmes abordés dans les articles mais plutôt à traiter de perspectives ou d'expériences supplémentaires peu ou pas abordées dans les publications scientifiques. Enfin, une discussion générale clôturera ce manuscrit afin de dégager les résultats principaux et d'identifier quelques pistes de recherche pour les années à venir.

Ce travail de thèse apporte ainsi de nouvelles connaissances sur l'évolution des mécanismes d'évitement de la consanguinité via la reconnaissance de parentèle grâce à une approche multidisciplinaire sur une espèce insecte non-modèle.

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 4

Populations isolées et mâles diploïdes : un « je t'aime moi non plus », entre perte de diversité allélique et risque d'extinction

Sommaire

4.1	Introduction	44
4.1.1	Détermination du sexe et production de mâles diploïdes chez les Hyménoptères	44
4.1.2	Diversité génétique des petites populations isolées et vortex d'extinction dû aux mâles diploïdes	45
4.1.3	Contexte de l'étude	47
4.2	Article 1 : Diploid male production correlates with genetic diversity in the parasitoid wasp <i>Venturia canescens</i> : a genetic approach with new microsatellite markers (Publié)	48
4.3	Discussion	63

4.1 Introduction

L'étude des populations naturelles est fondamentale en écologie évolutive. En effet, les études en laboratoire, qui sont par nature contrôlées et contraintes, ne sont pas toujours représentatives des aléas existant et conditionnant les réponses des individus sur le terrain. Et lorsqu'on s'intéresse à l'évolution de mécanismes, qu'ils soient comportementaux comme dans cette thèse, ou d'autre nature, prendre en compte les effets de l'environnement (au sens large : environnement abiotique et biotique, phénomène de compétition, de migration intra- ou inter-espèce et bien d'autres) devient une nécessité. Nous n'observons aujourd'hui en effet que la résultante des forces évolutives (sélection naturelle et dérive) qui se sont appliquées sur les populations observées. Ainsi, des caractères ont pu être sélectionnés au cours du temps, mais ne sont pas exprimés actuellement dans certaines populations naturelles du fait de changements environnementaux. Ces caractères existent, ont été sélectionnés et peuvent ainsi être révélés en laboratoire, car nous les cherchons et nous mettons en œuvre des expériences dans les conditions idéales pour les révéler. Cette différence de conditions, des idéales aux naturelles, est essentielle à garder en tête, afin de comprendre les éventuelles divergences entre les résultats de laboratoire et de terrain, et enfin de pouvoir tester la robustesse des mécanismes mis en évidence en laboratoire. Dans cette thèse, je me suis concentrée sur l'évolution du choix du partenaire sexuel et d'un de ses corollaires qu'est l'évitement de la consanguinité. Le choix du partenaire sexuel a été énoncé comme étant une composante importante de la sélection sexuelle par Darwin en 1859 dans *On the Origin of Species* : "And this leads me to say a few words on what I call Sexual Selection. This depends, not on a struggle for existence, but on a struggle between the males for possession of the females; the result is not death to the unsuccessful competitor, but few or no offspring." (Chapitre IV, page 88). Mais Darwin a particulièrement développé cette théorie dans son ouvrage *La filiation de l'homme et la sélection liée au sexe* (1871). Bien que décriée jusque dans les années 1960 malgré les travaux du statisticien Ronald Fisher, la théorie de la sélection sexuelle est aujourd'hui entièrement acceptée et a donné lieu à de très nombreux travaux dans de nombreux domaines de la biologie, de la génétique à l'étude des comportements en passant par l'écologie des populations. Mon travail s'est ainsi articulé autour d'une composante *in natura* (ce chapitre et le suivant), complétée par des expériences en laboratoire afin d'être capable, autant que faire se peut, de faire cette distinction entre capacité à faire un choix et l'action de choix en elle-même.

4.1.1 Détermination du sexe et production de mâles diploïdes chez les Hyménoptères

Toutes les inférences du système de CSD ¹ comme déterminisme du sexe proviennent ainsi de la détection de mâles diploïdes dans les proportions attendues sous l'hypothèse du mécanisme de CSD dans les populations d'Hyménoptères. De plus, la mise en évidence de mâles diploïdes dans les populations naturelles est extrêmement limitée chez les guêpes parasitoïdes : seules trois études chez trois espèces apparentées ont démontré l'existence de mâles diploïdes dans le genre *Cotesia* (Ruf et al., 2013; de Boer et al., 2012, 2015).

Le nombre d'allèles au *csd* est actuellement estimé à partir de la proportion de mâles diploïdes dans les populations (Encadré 1) (mis à part chez *Apis mellifera* où le gène a été localisé par Beye et al. (1996), voir Chapitre 2, section 2.1.2) et est extrêmement

¹voir Chapitre 2, section 2.1.2 pour une description du système CSD

variable selon les espèces : entre 8 et 121 allèles, mais majoritairement entre 9 et 20 (Cook and Crozier, 1995; Zareba et al., 2017). La fréquence des accouplements appariés (c'est à dire de deux individus portant le même allèle) est dépendante de la composition de la population, et en particulier de la diversité génétique des individus (Encadré 1) (Cook and Crozier, 1995; Adams et al., 1977). En effet, plus la diversité génétique est faible, plus la probabilité d'accouplement apparié est forte et de fait, plus la production de mâles diploïdes augmente. Quelques rares études de terrain ont ainsi démontré une corrélation négative entre diversité génétique des populations et production de mâles diploïdes : chez les fourmis de feu (Ross et al., 1993), les bourdons (Darvill et al., 2006, 2012) et une guêpe à papier (Tsuchida et al., 2014). Cependant, si une détection et un évitement des mâles portant le même allèle au locus *csd* par les femelles existent, la corrélation précédente devrait disparaître ou du moins être atténuée. Cet évitement pourrait être effectué grâce à un effet de « barbe verte » (Gardner and West, 2010), ou en partie en reconnaissant ses apparentés, avec qui la probabilité de partager un allèle commun au CSD est plus forte que dans la population (0.5 entre un frère et une sœur). En effet, l'évitement d'accouplements avec un frère permettrait aux femelles d'éviter une homozygotie au CSD dans 50% des cas.

La production de mâles diploïdes affecte directement la fitness des femelles en réduisant leur nombre de descendants fertiles (van Wilgenburg et al., 2006). Mais elle peut aussi affecter la survie de la population, via le mécanisme du vortex d'extinction des mâles diploïdes présenté ci-après.

4.1.2 Diversité génétique des petites populations isolées et vortex d'extinction dû aux mâles diploïdes

L'étude des petites populations isolées est aujourd'hui importante dans plusieurs domaines de l'écologie et de l'agronomie. En effet, que ce soit par une fragmentation de leur habitat, de phénomènes d'invasions ou d'introduction par l'homme dans un but de lutte biologique, les populations d'insectes sont fréquemment soumises à des goulots d'étranglement, conduisant à la naissance de petites populations isolées. L'action conjointe de l'effet de fondation avec une dérive génétique forte et une dispersion très contrainte conduit souvent à une diversité génétique réduite de ces populations (Dlugosch and Parker, 2008; Fauvergue et al., 2012; Dlugosch et al., 2015). Chez les hyménoptères, des études sur les bourdons ou les abeilles à orchidées ont en effet montré une érosion de la diversité génétique dans des populations insulaires ou ayant subi un fort effet fondateur (Boff et al., 2014; Ellis et al., 2006; Schmid-Hempel et al., 2007). L'existence du mécanisme de détermination du sexe sl-CSD chez les Hyménoptères rend les populations plus sensibles à la perte de diversité génétique. De nombreux travaux théoriques ont formalisé ce lien de rétroaction négative entre la démographie et la diversité génétique des populations isolées et/ou ayant subi un goulot d'étranglement, nommé le « vortex d'extinction dû aux mâles diploïdes » (Figure 4.1) (Zayed and Packer, 2005; Fauvergue et al., 2015; Hein et al., 2009; Bompard et al., 2016). Cependant, peu d'études empiriques ont été réalisées afin de vérifier cette hypothèse (Ross et al., 1993; Darvill et al., 2006, 2012; Tsuchida et al., 2014). Les parasitoïdes ont de plus une sensibilité à la perte de diversité génétique encore accrue dû au caractère cyclique de leur démographie. En effet, les individus parasitoïdes (très majoritairement des insectes, mais il existe aussi des nématodes ou des plantes parasitoïdes) se développent sur ou dans un hôte (là encore très majoritairement des insectes, mais il existe aussi des cas de parasitoïdie sur des araignées ou des vertébrés (Boivin, 1996)), ce qui conduit inévitablement à la mort de l'hôte (Eggleton and Gaston, 1990). L'introduction d'un parasitoïde sur un patch d'hôtes a ainsi pour conséquence de commencer par faire chu-

Encadré 1. Calcul du nombres d'allèles au locus *csd*

Les allèles au locus *csd* sont sous sélection balancée, conduisant à un équilibre stable à $q_i = \frac{1}{K}$, avec q_i la fréquence du i^{e} allèle et K le nombre total d'allèles présent au *csd* (Adams et al., 1977; Cook and Crozier, 1995; Weis et al., 2017). Dans cette configuration, deux types d'accouplement sont possibles : (i) Les accouplements dits "non-appariés" (unmatched matings) : $X_i X_j \times X_r$, avec $r \neq i, j$, qui produiront uniquement des mâles haploïdes et des femelles diploïdes et (ii) les accouplements dits "appariés" (matched matings) : $X_i X_j \times X_r$, avec $r = i$ ou j , où 50% des diploïdes produits seront des mâles.

Par conséquent, dans le cadre d'accouplement unique des femelles (monoandrie) comme chez *Venturia canescens*, il paraît assez évident que la proportion de ces accouplements appariés dépend uniquement du nombre d'allèles présents au *csd* (pour les cas de polyandrie, cette proportion sera aussi dépendante du nombre de mâles avec qui la femelle se sera accouplée, voir Adams et al. (1977) pour les détails). La proportion d'accouplements apparié θ , sous l'hypothèse d'accouplements panmictiques, est exprimée par l'équation suivante :

$$\theta = \frac{2 \sum_{i=0}^K q_i^2 (1 - q_i)}{1 - \sum_{i=0}^K q_i^2} \quad (4.1)$$

Lorsque la population est à l'équilibre, $q_i = \frac{1}{K}$, et l'équation (4.1) se simplifie de la manière suivante :

$$\begin{aligned} \theta &= \frac{2 \sum_{i=0}^K \frac{1}{K^2} \left(1 - \frac{1}{K}\right)}{1 - \sum_{i=0}^K \frac{1}{K^2}} \\ &= \frac{2K \left(\frac{K-1}{K^3}\right)}{1 - \frac{1}{K}} \\ &= \frac{2}{K}. \end{aligned} \quad (4.2)$$

Énoncé plus simplement, une femelle $X_i X_j$ effectue un accouplement appariés dans 2 (mâle X_i ou mâle X_j) des K accouplements possibles.

Comme la proportion de mâles diploïdes parmi les diploïdes est égale à $\frac{1}{2}$ dans les accouplements appariés, on en déduit immédiatement la relation entre la proportion de mâles diploïdes parmi les diploïdes (DMP) et le nombre d'allèles au *csd* : $\text{DMP} = \frac{1}{K}$. L'équation précédente nous permet ainsi de calculer simplement le nombre d'allèles au *csd* :

$$K = \frac{1}{\text{DMP}}.$$

ter la démographie de l'hôte alors que celle du parasitoïde augmente. Cependant, la diminution du nombre d'hôtes à partir d'un certain seuil implique une diminution de la population de parasitoïdes, qui n'a pas eu assez de ressources pour parasiter. Et de fait, la population d'hôtes va ré-augmenter jusqu'à une nouvelle augmentation de la population de parasitoïdes (Figure 4.2)(Hassell, 2000).

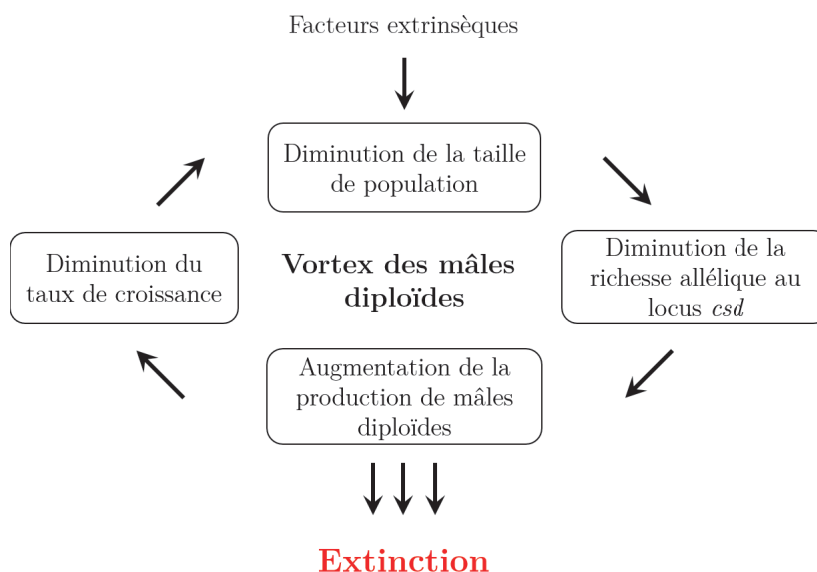


FIGURE 4.1 – **Vortex d’extinction des mâles diploïdes.** Inspiré de Zayed and Packer (2005)

4.1.3 Contexte de l’étude

Chez la guêpe *Venturia canescens*, le mécanisme de détermination du sexe en sl-CSD a été décrit pour la première fois par Beukeboom (2001), avec production de mâles diploïdes entièrement viables et sans distinction morphologique avec les mâles haploïdes. Ces mâles ont un comportement identique aux mâles haploïdes, paradent et s’accouplent avec les femelles en transférant du sperme viable. Ils ont cependant un succès d’accouplement moindre que les haploïdes et ne produisent pas de descendance. En effet, leur partenaire ne produit que des mâles haploïdes, ce qui amène à considérer les femelles comme étant « pseudo-vierges » (Fauvergue et al., 2015). Alors que la production de mâles diploïdes en laboratoire est établie depuis une quinzaine d’années (Beukeboom, 2001; Fauvergue et al., 2015), la détection de mâles diploïdes sur le terrain nous permettrait ainsi de vérifier que leur production existe dans la nature, ainsi que de tester l’hypothèse d’une corrélation entre leur présence et la diversité génétique de la population à laquelle ils appartiennent.

Dans cette étude, nous avons deux objectifs : (i) estimer la proportion de mâles diploïdes dans 11 populations de *V. canescens* du pourtour méditerranéen provenant soit du continent, soit d’îles ou soit de populations captives, et (ii) estimer la diversité génétique de ces populations présentant divers degrés d’isolement ou de goulot d’étranglement démographique.

Nous avons pour ce faire développé deux multiplex de dix et neuf microsatellites chacun incluant à la fois des microsatellites précédemment développés par Mateo Leach et al. (2012) et 15 nouveaux marqueurs, afin de génotyper plus de 600 mâles provenant de 11 populations du pourtour méditerranéen ayant des caractéristiques démographiques différentes : cinq populations en provenance du continent européen (Sud de la France et nord-est de l’Espagne), deux populations insulaires espagnoles (provenant de l’île de Majorque), ainsi que quatre populations captives fondées par des femelles provenant du sud de la France ou d’Israël avec des nombres divers de fondatrices (entre 11 et 120 femelles fondatrices).

Nous avons tout d’abord validé l’utilisation de ces marqueurs dans le cadre d’études en génétique des populations grâce au génotypage de femelles de deux populations

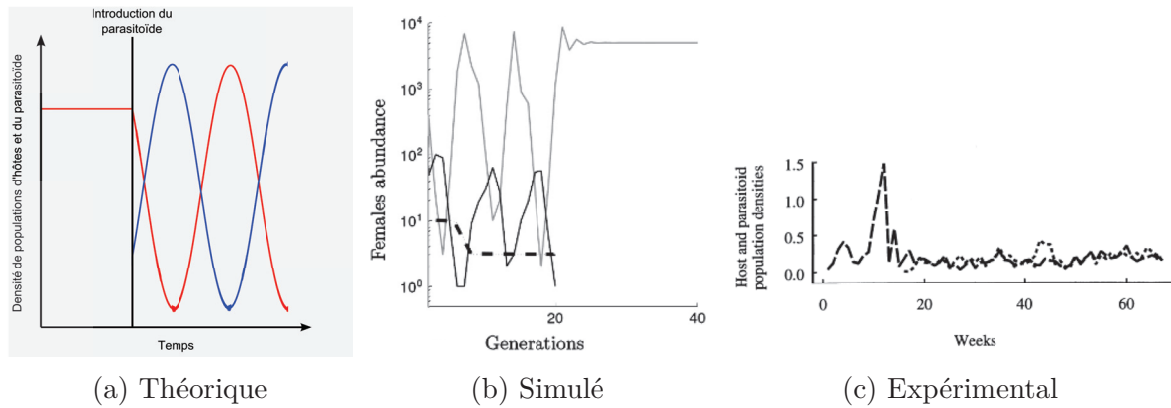


FIGURE 4.2 – **Démographie d’une population de parasitoïdes et de son hôte.** (a) Démographie théorique simplifiée d’un parasitoïde (courbe bleue) et de son hôte (courbe rouge). L’introduction d’un parasitoïde fait chuter la démographie de son hôte, ce qui entraîne sub-séquentement une chute de la démographie du parasitoïde, donnant ainsi à leurs démographies un caractère cyclique. (b) Simulation de la démographie d’un parasitoïde avec *sl-CSD* et production de mâles diploïdes stériles (abondance des femelles en noir), de son hôte (en gris) et de la diversité allélique au locus *csd* (tirets) Tirée de Bompard et al. (2016). (c) Résultats expérimentaux de la démographie du parasitoïde *Venturia canescens* (ligne pointillée) et d’un de ses hôte *Ephestia kuehniella* (ligne brisée). Tirée de Bonsall and Hassell (1998).

continentales situées à Valence et Nice (France). En effet, les marqueurs se sont révélés polymorphes dans nos deux populations (entre 2 et 14 allèles), avec une fréquence d’allèles nuls négligeable (au maximum égal à 8.5% pour un marqueur) et une absence de déséquilibre de liaison commun aux deux populations. De plus, nous avons démontré la fiabilité de nos marqueurs pour la détermination de la ploïdie des individus, nous permettant ainsi de détecter les mâles diploïdes dans plus de 98% des cas avec un seul multiplex. Nous avons montré que les populations insulaires et captives souffraient d’une baisse de leur diversité génétique ainsi que d’une augmentation de la production de mâles diploïdes, comme attendu avec l’hypothèse du vortex d’extinction dû aux mâles diploïdes.

Cette étude a été initiée dans le cadre de la thèse de doctorat en biologie de Chloé Vayssade, intitulée *Interaction entre démographie et génétique dans les petites populations : études sur un Hyménoptère parasitoïde avec incompatibilités génétiques* (Vayssade, 2014). Le développement des microsatellites ainsi que toutes les données de terrain ont été acquis durant la thèse de C. Vayssade. J’ai ensuite analysé ces données et rédigé l’article présenté ci-après, qui a été publié dans *Ecology and Evolution* en septembre 2016.

4.2 Article 1 : Diploid male production correlates with genetic diversity in the parasitoid wasp *Venturia canescens* : a genetic approach with new microsatellite markers (Publié)

Diploid male production correlates with genetic diversity in the parasitoid wasp *Venturia canescens*: a genetic approach with new microsatellite markers

Marie Collet¹, Chloé Vayssade², Alexandra Auguste², Laurence Mouton¹, Emmanuel Desouhant¹, Thibaut Malausa² & Xavier Fauvergue²

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

²UMR 1355-7254 Institut Sophia Agrobiotech, CNRS, Université Nice Sophia Antipolis, INRA, 06900 Sophia Antipolis, France

Keywords

Diploid males, microsatellite markers, sl-CSD, *Venturia canescens*.

Correspondence

Marie Collet, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR 5558, CNRS, Université Claude Bernard, Université de Lyon, F-69622 Villeurbanne, France.
Tel: 00 33 (0)4 72 44 82 16;
Fax: 00 33 (0)4 72 43 13 88;
E-mail: marie.collet@univ-lyon1.fr

Funding Information

Agence Nationale de la Recherche (Sextinction project ANR-2010-BLAN-1717) and the Fédération de Recherche sur la Biodiversité (VORTEX project APP-IN-2009-052).

Received: 20 May 2016; Revised: 12 July 2016; Accepted: 18 July 2016

doi: 10.1002/ece3.2370

Introduction

Sex determination takes on many different forms in animals (Beukeboom and Perrin 2014). In insects of the order Hymenoptera, haplodiploidy is the rule: Males develop from unfertilized eggs and are haploid, whereas females develop from fertilized eggs and are diploid. In numerous species including sawflies, pollinating bees, social and solitary wasps, ants, and parasitoids, the underpinning genetic mechanism of sex determination relies on the complementarity of alleles at a single gene (Whiting 1943; van Wilgenburg et al. 2006; Heimpel and de Boer 2008). This gene – *csd*, for complementary sex determiner – has been described in the honeybee and comes from the duplication of the *transformer* gene (Geuverink and Beukeboom 2014). The *csd* gene is

Abstract

Sex determination is ruled by haplodiploidy in Hymenoptera, with haploid males arising from unfertilized eggs and diploid females from fertilized eggs. However, diploid males with null fitness are produced under complementary sex determination (CSD), when individuals are homozygous for this locus. Diploid males are expected to be more frequent in genetically eroded populations (such as islands and captive populations), as genetic diversity at the *csd* locus should be low. However, only a few studies have focused on the relation between population size, genetic diversity, and the proportion of diploid males in the field. Here, we developed new microsatellite markers in order to assess and compare genetic diversity and diploid male proportion (DMP) in populations from three distinct habitat types – mainland, island, or captive –, in the parasitoid wasp *Venturia canescens*. Eroded genetic diversity and higher DMP were found in island and captive populations, and habitat type had large effect on genetic diversity. Therefore, DMP reflects the decreasing genetic diversity in small and isolated populations. Thus, Hymenopteran populations can be at high extinction risk due to habitat destruction or fragmentation.

probably responsible for arrhenotoky in all species of the order Hymenoptera (Beye et al. 2003; Asplen et al. 2009; Schmieder et al. 2012). Under single-locus complementary sex determination (sl-CSD), unfertilized eggs are hemizygous at the *csd* locus and develop normally into haploid males (Whiting 1943). Among the fertilized eggs, only heterozygous individuals develop into females; homozygosity at the *csd* locus yields diploid males that are generally, but not always unviable or sterile (Cowan and Stahlhut 2004; Heimpel and de Boer 2008; Harpur et al. 2013). sl-CSD is the mechanism of sex determination for which empirical evidence prevails in Hymenoptera (Cook 1993; van Wilgenburg et al. 2006; Heimpel and de Boer 2008), but other mechanisms such as multi-locus CSD or genomic imprinting also occur (Verhulst et al. 2010).

At the population level, sl-CSD causes higher sensitivity to losses of genetic diversity. A decrease in allelic richness at the *csd* locus and a subsequent increase in homozygosity are expected to result in more diploid males and, in turn, lower population growth rate. Theoretical models predict that sl-CSD is at the core of a “diploid male vortex,” a feedback between demographic and genetic processes that potentially drives bottlenecked populations toward extinction (Zayed and Packer 2005; Hein et al. 2009; Fauvergue et al. 2015; Bompard et al. submitted). However, diploid males represent such fitness cost that various individual behaviors have evolved to limit their production. Dispersal limits inbreeding and the consequent diploid male production (Ruf et al. 2011), and also allows the recruitment of new *csd* alleles, so that well-connected populations are expected to produce fewer diploid males (Hein et al. 2009). Some Hymenoptera with sl-CSD have undifferentiated populations beyond a 100-km scale (Estoup et al. 1996; Zimmermann et al. 2011), suggesting high dispersal abilities. Mate choice can also influence the production of diploid males with a reduction expected in case of inbreeding avoidance (Whitehorn et al. 2009; Metzger et al. 2010a; Thiel et al. 2013). Such behaviors may mitigate the diploid male vortex (Hein et al. 2009).

The central assumption of CSD population models is that small, bottlenecked, or isolated populations have a low genetic diversity, including diversity at the *csd* locus, and consequently a high proportion of diploid males. To date, however, empirical support to this assumption is scarce. Only rare field data on fire ants (Ross et al. 1993), bumblebees (Darvill et al. 2006, 2012), or paper wasps (Tsuchida et al. 2014) suggest a relationship between population size, genetic diversity, and the proportion of diploid males. These studies have all relied on genetic markers to estimate within-population genetic diversity, gene flow between distinct populations, mating structure, and, in some cases, the proportion of diploid males.

Evidence for diploid males in natural populations mainly concerns social Hymenoptera. In these species, the dramatic bias in sex ratio toward females renders estimations of the proportion of diploid males very problematic. In parasitoid wasps, the proportion of diploid males was assessed in only three related species: *Cotesia glomerata* (Ruf et al. 2013), *Cotesia rubecula* (de Boer et al. 2012), and *Cotesia vestalis* (de Boer et al. 2015). Parasitoid populations often experience small population size, for example as a consequence of cyclic dynamics (Hassell 2000) or biological control introductions (Hopper and Roush 1993). Given the key role that parasitoid wasps play by controlling the populations of herbivorous insects in natural ecosystems and agrosystems (Shaw and Hochberg 2001), the scarcity of field estimations on the occurrence of diploid males in the field is surprising.

Venturia canescens G. (Hymenoptera: Ichneumonidae) is a parasitoid wasp with sl-CSD (Beukeboom 2001). This species is a model organism commonly used in laboratory studies on behavior, physiology, and life history traits (Harvey et al. 2001; Desouhant et al. 2005; Pelosse et al. 2007). Two reproduction modes are known in this species (Schneider et al. 2002): thelytoky (asexual, parthenogenesis) and arrhenotoky (sexual reproduction under haplodiploidy). In arrhenotokous *V. canescens*, diploid males are fully viable and able to mate. However, they are sterile, and females with whom they mate produce only sons, similar to virgin females (Fauvergue et al. 2015). The prevalence of diploid males in natural or captive *V. canescens* populations has not been estimated yet, and little is known about the genetic structure of natural populations. So far, the rare population genetic studies on *V. canescens* showed the absence of genetic structure at the geographic scale of the French Riviera (Schneider et al. 2002; Mateo Leach et al. 2012).

We developed this study with a threefold objective: (1) develop microsatellite markers in order to assess male ploidy and conduct population genetic studies on arrhenotokous *V. canescens*; (2) estimate the proportion of diploid males in several populations; and (3) estimate the genetic diversity of *V. canescens* populations under various conditions of population size and isolation. For this, we compared mainland, island, and captive populations, with the expectation of a lower genetic diversity and a higher proportion of diploid males in captive populations compared to insular populations and in insular populations compared to mainland populations.

Materials and Methods

Sampling

Female *V. canescens* were collected during summer 2010 in two natural populations located in southern France near Nice and Valence (Table 1). To attract parasitoid females, open cups containing a mixture of host-rearing medium (semolina) and larvae of the host *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) were hung in trees. Infested semolina is impregnated with host kairomones and is very attractive for *V. canescens* females (Corbet 1971; Metzger et al. 2008). Females visiting the traps to oviposit were collected, brought into the laboratory, allowed to lay eggs for 2 days on a host patch, and then killed and preserved in 96% ethanol. The reproductive mode of captured females was tested by checking the presence of males among offspring. Only arrhenotokous (sexual) females were used in the following analysis.

In addition, males were searched in eighteen locations of the Mediterranean Basin between 2011 and 2013 during late summer and autumn. Five sites were located on

Table 1. Studied populations: locality, habitat type (mainland, island, and captive populations), geographic coordinates, host plant (Car, Fig, Wal, Pom, Che, Pea, Haz, Cit, and Oli being respectively carob, fig, walnut, pomegranate, cherry, peach, hazelnut, citrus, and olive trees), year of sampling, and year of foundation between parentheses for captive populations, with the corresponding number of males or females sampled. See Figure 1 for a map of localities.

Populations						Sampling		
Habitat type	Country	Locality	Name	Geographic coordinates	Host plant	Date	Number of males	Number of females
Mainland	France	Valence	Val10	44°58'21"N 4°55'39"E	Che/Pea/Haz	2010	0	37
		Nice	Nice10	43°41'23"N 7°18'6"E	Car	2010	0	44
		Nice	Nice11	43°41'23"N 7°18'6"E	Car	2011	190	0
		Nice	Nice13	43°41'23"N 7°18'6"E	Car	2013	90	21
		Solliès	Sol13	43°10'58"N 6°2'55"E	Fig/Wal/ Pom/Che	2013	16	0
	Spain	Vila-Seca	VS13	41°7'34"N 1°8'07"E	Car	2013	58	2
		Vinyols	Vy13	41°6'12"N 1°2'26"E	Car/Oli	2013	33	2
Island	France	Corsica	NA ¹			2013	0	0
		Porquerolles	NA ¹			2013	0	0
	Spain	Mallorca	Mlc12	39°47'58"N 2°57'53"E	Car	2012	21	0
		Mallorca	Mlc13	39°47'58"N 2°57'53"E	Car	2013	38	3
	Italy	Sicily	NA ¹			2012	0	0
	Greece	Crete	Cre12	35°11'39"N 25°2'09"E	Pom/Fig/Cit/Oli	2012	0	1
		Crete	Cre13	35°11'39"N 25°2'09"E	Pom/Fig/Cit/Oli	2013	0	1
	Malta	Gozo	Goz12	36°3'34"N 14°16'34"E	Car	2012	0	2
	Cyprus	Cyprus	Cyp12	34°39'5"N 33°0'17"E	Car	2012	0	1
		Cyprus	NA	34°39'5"N 33°0'17"E	Car	2013	0	0
Captive	France	Nice	CapNiceA	43°41'23"N 7°18'6"E	Car	2013 ² (2011)	50	0
		Nice	CapNiceB	43°41'23"N 7°18'6"E	Car	2013 ³ (2011)	31	0
		Valence	CapVal	44°58'21"N 4°55'39"E	Che/Pea/Haz	2013 (2013)	50	0
	Israel	Tel-Aviv	CapIsr	Not Available	Not Available	2013 (2011)	50	0

¹Several sites were searched in these locations, but no wasps were found.

²Sampled in July 2013.

³Sampled in October 2013.

mainland in Nice (France, 2011 and 2013), Solliès (France, 2013), and Vinyols and Vila-Seca (Spain, 2013). In 2012, we searched *V. canescens* males in five sites located on islands: Mallorca (Spain), Gozo (Malta), Crete (Greece), Sicily (Italy), and Cyprus. Several sites per island were sampled. In 2013, the same protocol was followed to capture males on French islands (Porquerolles and Corsica), in Mallorca (Spain), Cyprus, and in Crete (Greece) (Table 1

and Fig. 1). We selected field sites with at least 10 individual host plants (i.e., carob, fig, pomegranate, citrus, palm, or walnut trees; Salt 1976). On each site, ten male traps were evenly distributed. They were hung in host trees at 50–150 cm from the ground. Traps were checked after 48 h. If one *V. canescens* individual was caught, 20–40 traps were added on the site. *V. canescens* males are attracted by the synergy of pheromones produced by females and

kairomones from their hosts (Metzger et al. 2010b). Traps baited with extracts from these semiochemicals were designed to attract and capture males. A trap consisted of a 125 mm × 200 mm yellow sticky sheet, in the center of which was hung a vial containing the extract. To prepare the extract, 100 g of host-rearing medium containing larvae was immersed during 1 h in 200 mL of hexane. The solution was filtered, and one female was soaked in 100 µL for 3 h. The female was then removed, and the extract was stored at −20°C. A few hours before being used in the field, the extract was evaporated by heating the vial on a hot plate (this step was skipped for the 2013 campaign, after it was shown that evaporation occurred within a few hours in the field). As for females, traps were hung within host trees, and all *V. canescens* males that stuck on the traps were collected and preserved individually in 96% ethanol.

In parallel, we collected males in three captive (laboratory mass-reared) populations differing in their history and geographic origin (Table 1): (1) a 25–30-generation-old population founded with about 120 females from Nice, (2) a 10–15-generation-old population founded with about 100 females from Valence, and (3) a 15–20-generation-old population founded with 11 females from Israel. Hence, these captive populations experienced different intensities of founding effects, genetic drift, and inbreeding. The three populations were maintained with a standard protocol on larvae of the host *E. kuehniella* obtained by rearing 50 mg of *E. kuehniella* eggs (about 2000 eggs) provided by Biotop (Livron-sur-Drôme, France) in plastic boxes (8 × 12 × 25 cm) set with 250 g of wheat semolina. Each week, three boxes containing second to fifth instar host larvae were inoculated with 50 males and 50 females of *V. canescens* emerging from all available (about six) rearing boxes.

Development of microsatellite genetic markers

Using a DNeasy Tissue Kit from Qiagen (QIAGEN, Hilden, Germany), DNA was extracted from a single 1.5-mL

tube containing a pool of 20 adult females of *V. canescens* recently collected from the Nice population and kept in the laboratory for a few generations. The obtained DNA solution was enriched in microsatellites and pyrosequenced by the company Genoscreen (Lille, France), following the protocol described in Malausa et al. (2011). Using the iQDD program (Meglecz et al. 2010), primer pairs were designed for 675 microsatellite loci (Malausa et al. 2011), among which 124 were screened in monoplex PCR on DNA of one thelytokous and six arrhenotokous *V. canescens* females from three populations: Valence, Nice, and Antibes (geographic coordinates: 43°33′51″N, 7°7′28″E). Six primer pairs designed by Mateo Leach et al. (2012) were also tested following the same protocol.

The DNA extracts used for these monoplex PCR were obtained using the DNeasy Tissue Kit of QIAGEN. Each monoplex PCR contained 2 µL of DNA, 5 µL of 2X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, and 0.2 µmol/L of each primer. The total volume was adjusted to 10 µL with ultrapure water. PCR was performed as follows: a step of denaturation at 95°C during 15 min, followed by 25 cycles of 30 sec of denaturation at 94°C, 90 sec of annealing at 58°C and 60 sec of extension at 72°C, and a final extension step of 30 min at 60°C. PCR products were separated on a 2% agarose gel stained with ethidium bromide to detect amplification of DNA fragments. For 37 successfully amplified microsatellite loci, forward primers labeled with one of four fluorochromes (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) were used in a monoplex PCR with the DNA samples and conditions previously described. Two microliters of PCR product was added to 8.75 µL of Hi-Di formamide and 0.25 µL of GeneScan500 Liz size standard (Applied Biosystems). The mix was loaded on an ABI 3130XL genetic analyzer (Applied Biosystems), and alleles were scored using Gene Marker[®] version 1.75 (SoftGenetics, State College, PA). Monomorphic markers were discarded, and the remaining markers were combined according to their size and fluorochrome in several multiplex PCRs that were tested on the same seven individuals and in the same PCR conditions as previously

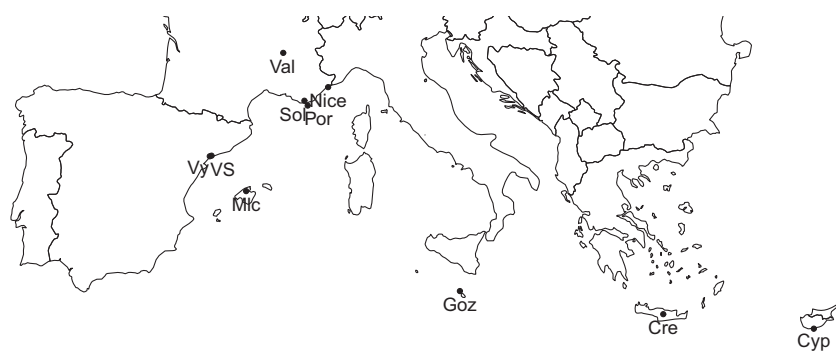


Figure 1. Location of field sampling. Cre, Cyp, Göz, Mlc, Nice, Sol, Val, VS, and Vy are respectively acronyms for Crete, Cyprus, Gozo, Mallorca, Nice, Solliès, Valence, Vila-Seca, and Vinyols. As no wasps were found in Porquerolles, Corsica, and Sicily, these locations are not presented here.

described. Finally, we selected 19 microsatellite loci amplified using two multiplex PCRs (Table 2).

Assessment of male ploidy

We used the genetic markers from the multiplex PCR I (Table 2) to detect diploid males: If a male is found heterozygous for at least one locus, it is considered diploid (Zhou *et al.* 2006; Armitage *et al.* 2010; Souza *et al.* 2010). However, if a diploid male is homozygous for all loci, it will be falsely scored haploid. To estimate the power of the developed microsatellite markers to correctly assess male ploidy, we calculated the probability that a diploid male is homozygous at all the 10 loci of the multiplex and, hence, falsely considered haploid. For this, we first calculated the probability that a diploid male produced by a brother–sister pair is homozygous for all 10 loci of the multiplex PCR I (see Annex). In parallel, we compared ploidy assessed on the same individuals via microsatellite genotyping and flow cytometry. Measure of male ploidy by flow cytometry is based on DNA quantity in cell nuclei (haploid nuclei being expected to have twice less DNA than diploid nuclei). To produce enough diploid males for analysis, brother–sister pairs were formed with individuals from a captive population. From the offspring, 39 males were collected and killed: The thorax was used for genetic analyses and the head for flow cytometry.

We performed flow cytometry analyses as described in de Boer *et al.* (2007). Only the head of insects was used for flow cytometry because endoreduplication doubles the quantity of DNA in cells of other parts of the body of haploid males, making haploid and diploid nuclei undistinguishable (Aron *et al.* 2005). To isolate cell nuclei, each insect head was crushed in 0.5 mL of Galbraith buffer by turning the B pestle 20 times in a Dounce tissue grinder maintained on ice. The homogenate was filtered through a 40- μ m cell strainer cap. Cell nuclei were stained with 20 μ L propidium iodide at 1 mg/mL. Nuclei were analyzed on a LSRII Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) with an excitation wavelength of 561 nm. Using FACSDiva Version 6.1.3 (BD Biosciences), we analyzed 10,000 nuclei per sample in a region that excluded doublets and debris. Flow cytometric DNA histograms of diploid females were used as reference to identify diploid males. The ploidy of each captured male was deduced from its genotype at microsatellite markers from multiplex PCR I. A male was considered diploid if it was heterozygous at least at one locus.

Population genetics

Validation of microsatellites on female wasps

To be used in population genetic studies, each marker must have several detectable alleles and must not be

linked with any other marker or locus under selection. We therefore measured genetic polymorphism, estimated frequencies of null alleles, and test for departures from Hardy–Weinberg (HW) equilibrium and linkage disequilibrium on the two mainland populations from Valence and Nice where enough females were captured in 2010 (Table 1). DNA of each captured female was extracted with the PrepGem Insects kit (ZyGEM, Hamilton, New Zealand). DNA extraction, PCR, and genotyping were performed as previously described. The GENEPOP software version 4.3 (Rousset 2008) was used to calculate the number of alleles, the expected and observed heterozygosity, and to test for HW equilibrium and linkage disequilibrium between loci. We estimated null allele frequencies with the FreeNA program (Chapuis and Estoup 2007).

Population structure and male ploidy

For all males captured, DNA was extracted, PCR were performed with multiplex I, and genotypes were analyzed as previously described. Only males with at least eight loci genotyped were used for the analysis. Coexistence of male haploidy and diploidy impedes the estimation of classical population genetic statistics such as observed and expected heterozygosity or Wright's *F* statistics. We therefore computed a value of allelic richness per locus and per population with FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet 1995) and calculated the number of private alleles in each population (i.e., the number of alleles specific to a population), because allelic richness can be standardized independently of sample size, and both measures are independent of heterozygosity. The allelic richness was computed as in El Mousadik and Petit (1996), that is, a mean number of alleles for each locus in each population, with populations weighted in inverse proportion to their sample sizes in order to give the same weight to all populations. As FSTAT is not able to handle haploid and diploid data in the same analysis, we merged the haploid data from pairs of males to create "false diploids" without changing allelic frequencies. We then analyzed all "diploids" in a single run.

Statistical analysis

We used a hierarchical generalized linear model (binomial error and logit link) to assess the effect of population structure on the proportion of diploid males (DMP). Population structure was characterized by different nested explanatory variables: *Allelic richness* (All_rich) and *number of private alleles* (Priv_all) nested in the *habitat type* (Habit), that is, mainland, island, or captive (see Table 1). Data were all analyzed with the statistical software R (version 3.2.2, R Core Team, 2015). The significance of terms in the statistical model was assessed with type II sum-of-

Table 2. Characteristics of two multiplex PCRs amplifying 19 microsatellite loci in *Venturia canescens*.

Multiplex	Locus	Repeat motif	F-Primer	R-Primer	F 5' label	Concentration (µmol/L)	Size range (bp)	GenBank no.
I	VC068	(GA) ₉	TATCCTCCAGCATTCGTCC	CTCGCTCGGTGGAACACTAC	FAM	0.1	104–120	KX258853
	Vcan071	(CAA) ₁₁	CTCCTACGCACCTCCCTCAC	TGTACGTTGGCACTTGAGC	FAM	0.1	223–254	GU053679
	VC092	(AG) ₉	TGTTGGCTCTTGCTGTAAGT	CTCTCGTCAATTGCGTCGT	FAM	0.1	284–307	KX258854
	VC094	(GT) ₈	TCGATTGCTTGAATCCTCTG	CACATATTTCCCTTGACAC	FAM	0.2	429–436	KX258855
	VC009	(CAA) ₂₆	AACAGCAACAGCAACAGGTG	ACTTTGCCACGTGATTTCC	VIC	0.1	313–337	KX258847
	VC036	(TTC) ₁₂	GTCAGCGATACACGCACG	GTACGCCTTATTCTCGCG	NED	0.1	226–254	KX258849
	VC002	(AG) ₁₁	TCCGTTTCGTCTCAITATAATTCA	ATGATTGCTCTGACCGCTTC	NED	0.4	324–342	KX258845
	VC001	(AG) ₁₀	TTTCGCCAGTTTGTCTGTAAG	AACGAAACGAAATTTACAATCG	NED	0.4	391–447	KX258844
	VC066	(CAA) ₇	ACACATTTGAACTCGAATCGAA	TCCTCTTGAAGCTCAAATTCG	PET	0.2	87–90	KX258852
	VC060	(CTT) ₁₂	TATCTCGGCTTCTATTCCGG	AGGCGCTGATTCGAAGTTAA	PET	0.2	206–231	KX258851
	VC106	(AG) ₁₁	CAAGCATGTATGTGATCGGTG	CGTAACTATTTCCGCTGGC	FAM	0.2	89–97	KX258856
	Vcan073	(TGT) ₁₅	GGTCCAAAGGTACTTCCTGA	ACTTCGTCAGCCCTACCTT	FAM	0.2	227–267	GU053681
VC047	(AG) ₁₁	ACCTGAGGGCACTATCTGTTT	CGAAAGTTAATTTAGACCGAGC	VIC	0.2	141–157	KX258850	
VC031	(TC) ₁₁	TCAGTCACTTAGTGCACCTGGAA	GGGTGGTGTAAATAGACCGAGG	VIC	0.2	227–261	KX258848	
VC006	(AG) ₈	GACTAATGCAGGAGGTTGTCG	GGCACAGTTTATGTTTTCAGCG	VIC	0.2	317–357	KX258846	
VC120	CCCCT(CCT) ₂	CAATCGATCAACGATACATTCG	GCAGGGTAGCAGCTTAGTGG	NED	0.2	92–128	KX258858	
		(CT) ₂ CCCCT(CT) ₉						
Vcan106	(TC) ₂₄	CCTCATCTCGAGGGAGGATT	ATCGCGAGTTGCGTAGTTTC	NED	0.2	183–222	GU053714	
VC107	(CAG) ₅ (CAA) ₁₂	CAACATCACCAACAAACACCA	CACCTGCACATGTCGTTGC	PET	0.2	85–108	KX258857	
Vcan088	CAGAGG(TA) ₂	AGTAACCGGTCAGCCTTGG	CAGGTTCCAATTTCCACACA	PET	0.2	133–150	GU053696	
		(CA) ₄₄						

All the microsatellites were developed in this study, except Vcan071, Vcan073, Vcan106, and Vcan088 that come from Mateo Leach et al. (2012).

squares tested with analyses of deviance with the likelihood ratio test based on the χ^2 distribution (*car* package (Fox and Weisberg 2010)). We used nonparametric analysis to test for population differentiation (Kruskal–Wallis test on allelic richness and the number of private alleles). Due to the low sample size (11 when using populations and three when testing the effect of habitat types) and therefore the lack of statistical power, we estimated the effect size by computing the Cohen's *d* (Cohen 1977; Nakagawa and Cuthill 2007) with *effsize* library in R (Torchiano 2015) and used the threshold provided in Cohen (1992) to assess the magnitude of the effect, that is, $|d| < 0.2$: negligible, $|d| < 0.5$: small, $|d| < 0.8$: medium, otherwise large.

In all multiple analyses such as tests for HW equilibrium, *P*-values were corrected for multiple testing via the false discovery rate (FDR) procedure (Benjamini and Hochberg 1995). Means are thereafter presented with standard errors unless indicated otherwise.

Results

Insect sampling and microsatellite markers

A total of 108 females were collected between 2010 and 2013, and 627 males were collected in 11 populations

(Table 1 and Fig. 1). No males were found in the French, Italian, Greek, Malta, and Cyprus islands, and as only one to three females were sampled in these locations, they were not used for the microsatellite development. Therefore, we used 75 females from Nice and Valence (2010) for the development of genetic markers.

Validation of microsatellite markers for population genetic studies

For all the nineteen microsatellites developed, amplification was obtained for all the arrhenotokous *V. canescens* females trapped in Nice (Nice10 population) and in Valence (Val10 populations). The number of alleles ranged from 2 to 14 (mean number of alleles = 7.95 ± 0.76 , Table 3). The two multiplex PCRs displayed a similar range (multiplex I: 2–12 alleles, multiplex II: 4–14 alleles) and mean number of alleles (multiplex I: 7.3 ± 0.92 , multiplex II: 8.67 ± 1.25 , *t*-test: $t = -0.88$, *df* = 15, *P* = 0.39). The markers had a maximum frequency of null alleles equal to 8.5% (Vcan073 locus, Val10 population; mean: $1.7 \pm 0.6\%$ in Nice10 population and $1.8 \pm 0.7\%$ in Val10 population) and a null median frequency for both populations. No departure from the HW equilibrium was found in any of the populations

Table 3. Genetic diversity at 19 microsatellite loci for natural populations of *Venturia canescens* sampled in 2010 near Nice and Valence, south-east of France.

Multiplex	Primer name	Number of alleles	Population							
			Nice10 (<i>n</i> = 44)				Val10 (<i>n</i> = 37)			
			<i>H_e</i>	<i>H_o</i>	HW <i>P</i> -value	Null allele frequency	<i>H_e</i>	<i>H_o</i>	HW <i>P</i> -value	Null allele frequency
I	VC068	7	0.742	0.727	0.848	0.012	0.826	0.865	0.771	0.000
	Vcan071	11	0.809	0.750	0.493	0.036	0.798	0.838	0.728	0.000
	VC092	7	0.636	0.705	0.390	0.000	0.600	0.676	1.000	0.000
	VC094	4	0.592	0.545	0.771	0.034	0.511	0.541	0.813	0.000
	VC009	8	0.697	0.864	0.135	0.000	0.649	0.703	1.000	0.000
	VC036	7	0.540	0.568	0.771	0.000	0.450	0.432	0.771	0.000
	VC002	7	0.577	0.591	0.813	0.026	0.716	0.757	0.771	0.000
	VC001	12	0.600	0.477	0.370	0.090	0.655	0.595	0.176	0.046
	VC066	2	0.487	0.386	0.509	0.069	0.491	0.486	1.000	0.003
II	VC060	8	0.549	0.591	0.927	0.000	0.558	0.568	0.135	0.011
	VC106	4	0.711	0.750	0.976	0.000	0.728	0.676	0.307	0.019
	Vcan73	10	0.672	0.818	0.746	0.000	0.706	0.541	0.135	0.092
	VC047	5	0.573	0.636	0.821	0.000	0.607	0.541	0.396	0.013
	VC031	14	0.650	0.591	0.390	0.048	0.674	0.595	0.493	0.083
	VC006	11	0.673	0.773	0.813	0.000	0.593	0.595	0.771	0.000
	VC120	7	0.515	0.500	0.771	0.000	0.593	0.459	0.135	0.059
	Vcan106	14	0.875	0.886	0.400	0.008	0.836	0.919	0.746	0.000
	VC107	6	0.724	0.705	0.493	0.000	0.603	0.622	0.479	0.022
Vcan088	7	0.644	0.682	0.813	0.009	0.489	0.541	0.821	0.000	

n: number of females analyzed; *H_e*: expected heterozygosity; *H_o*: observed heterozygosity; HW *P*-value: *P*-value of the test for Hardy–Weinberg equilibrium after FDR correction.

(Table 3), and the observed heterozygosity (H_o) was similar in the two multiplex PCRs in both populations (Mean H_o multiplex I: 0.63 ± 0.03 , multiplex II: 0.66 ± 0.03 ; t -test: $t = -0.54$, $df = 36$, $P = 0.59$; Table 3). Two pairs of microsatellites were detected as linked when both populations were considered: Vcan073/Vcan106 ($\chi^2 = \infty$, $df = 4$, $P < 0.0001$) and VC107/Vcan106 ($\chi^2 = 24.2$, $df = 4$, $P = 0.0063$). However, when populations were analyzed separately, the pairs of loci were linked only in one population (Vcan073/Vcan106 in Val10 and VC107/Vcan106 in Nice 10), we therefore decided to keep all loci. Therefore, the two multiplex PCR can be used for genetic studies with equivalent performance.

Validation of markers for ploidy assessment

The probability that a diploid male produced by sibmating is homozygous for all microsatellite loci of the multiplex I was low enough ($P = 0.0023$) to rely on microsatellites for ploidy assessment. This was confirmed by the congruence between flow cytometry and microsatellite genotyping results. Haploid and diploid males were easily discriminated by flow cytometry, with diploid males presenting a profile similar to that of diploid females (Fig. 2). For the 39 males tested, the ploidy measured by flow cytometry and genotyping analyses matched perfectly.

Population genetic structure and proportion of diploid males

After genotyping with the markers of multiplex I, we discarded 28 males for which more than one loci did not amplify. As a result, 599 males (95.5%) were successfully genotyped and used in the analysis.

Population differentiation

The population structure was estimated through different parameters such as allelic richness (All_Rich) and the number of private alleles (Priv_all) from male genotyping data (Table 4). The number of private alleles was marginally significantly different between habitat types (mainland, island, and captive, Kruskal–Wallis test, $\chi^2 = 5.68$, $df = 2$, $P = 0.058$), and allelic richness significantly differed between habitat types (Kruskal–Wallis test, $\chi^2 = 6.72$, $df = 2$, $P = 0.035$) and populations (Kruskal–Wallis test, $\chi^2 = 18.51$, $df = 10$, $P = 0.047$). Both measures shared the same trend suggesting that the diversity is the lowest in captive populations and the highest in mainland (Table 4). Effect sizes were medium or large for each comparison for both variables (mainland–island, All_Rich: $d = 2.35$, Priv_all: $d = 1.09$; mainland–captive,

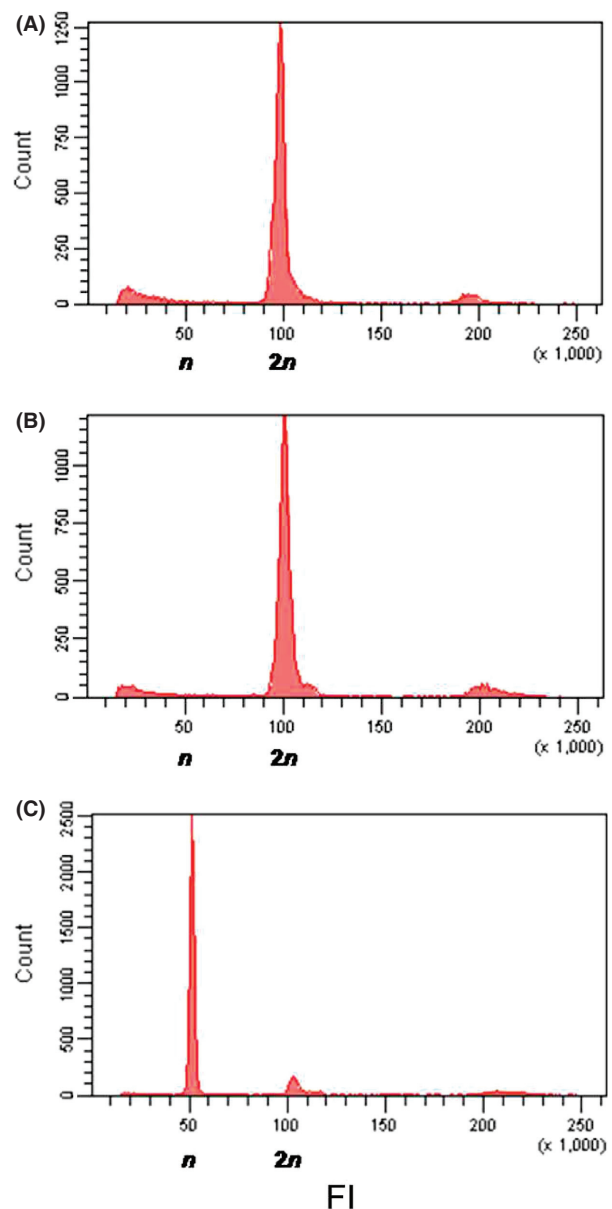


Figure 2. Flow cytometric histograms of the number of nuclei registered as a function of their fluorescence intensity (FI), for a representative female (A), diploid male (B), and haploid male (C). FI is expressed in an arbitrary unit calibrated to value 100 at the fluorescence intensity with the highest number of nuclei registered in females, which are known to be diploid.

All_Rich: $d = 1.56$, Priv_all: $d = 1.52$; island–captive, All_Rich: $d = 0.67$, Priv_all: $d = 1.41$). The sampling year had no impact on the mean allelic richness for populations sampled over 2 years (t -test, Nice11–Nice13: $t = -0.247$, $df = 15.9$, $P = 0.808$ and Mlc12–Mlc13: $t = -0.124$, $df = 15.9$, $P = 0.903$). Allelic richness of the captive population from Israel (CapIsr) appeared different

Table 4. Characteristics of *Venturia canescens* populations based on the analysis of males.

Location	Population	Number of sampled males	Number of genotyped haploid males	Number of genotyped diploid males	Mean number of alleles	Overall allelic richness	Number of private alleles
Mainland							
France	Nice11	190	172	10	6.78 ± 0.92	3.37	8
	Nice13	90	85	2	6.00 ± 0.75	3.52	0
	Sol13	16	12	1	3.78 ± 0.43	3.58	2
Spain	VS13	58	49	3	5.67 ± 0.78	3.41	3
	Vy13	33	30	1	5.22 ± 0.64	3.68	4
Mean Mainland		77.4 ± 3.5	69.6 ± 3.4	3.4 ± 0.9	5.49 ± 0.34	3.51 ± 0.14	3.4
Island							
Spain	Mlc12	21	18	3	4.22 ± 0.43	3.27	0
	Mlc13	38	33	4	4.56 ± 0.47	3.25	1
Mean Island		29.5 ± 1.6	25.5 ± 1.5	3.5 ± 0.3	4.39 ± 0.31	3.26 ± 0.18	0.5
Captive							
France	CapNiceA	50	43	7	4.33 ± 0.37	3.32	0
	CapNiceB	31	26	1	3.78 ± 0.52	3.04	0
	CapVal	50	48	1	3.67 ± 0.44	3.08	0
Israël	CapIsr	50	42	8	2.44 ± 0.24	2.05	0
Mean Captive		45.3 ± 0.7	39.8 ± 0.8	4.3 ± 0.9	3.56 ± 0.23	2.87 ± 0.15	0

Allelic richness and mean number of alleles were computed with FSTAT software. This software being unable to handle both haploid and diploid data in the same analysis, the co-occurrence of haploid and diploid males constrained us to merge pairs of haploid data to create “false diploid” males. The results presented are mean ± SE.

from all the other populations except the captive populations from Nice and Valence (CapNiceB and CapVal, pairwise *t*-tests between populations with FDR correction for multiple testing, data not shown). As the CapIsr population was highly differentiated from the other populations, it could potentially drive the significant trend observed. Indeed, when allelic richness was compared without CapIsr, the difference between populations disappeared (Kruskal–Wallis test, $\chi^2 = 4.745$, $df = 9$, $P = 0.856$), and the difference between habitat types became only marginally significant (Kruskal–Wallis test, $\chi^2 = 5.804$, $df = 2$, $P = 0.055$).

Diploid male proportion and genetic diversity

Diploid males were found in all populations, but in variable proportions (from $DMP = 0.02 \pm 0.02$ in CapVal to $DMP = 0.16 \pm 0.05$ in CapIsr; Table 4 and Fig. 3). The sampling year had no impact on the proportion of diploid males for populations sampled over 2 years (proportion test, Nice11–Nice13: $\chi^2 = 0.760$, $df = 1$, $P = 0.383$ and Mlc12–Mlc13: $\chi^2 = 5.10^{-32}$, $df = 1$, $P = 1$). As expected, the DMP was affected by habitat type (LR $\chi^2 = 7.07$, $df = 2$, $P = 0.029$, Table 5), with a negative relationship between the DMP and the allelic richness of each habitat types (Fig. 4). When removing the CapIsr population, the effect of the habitat type became non-significant ($P = 0.105$), but we still found a negative influence of allelic richness (nested within habitat types) on DMP (LR $\chi^2 = 6.80$, $df = 2$, $P = 0.033$, Table 5).

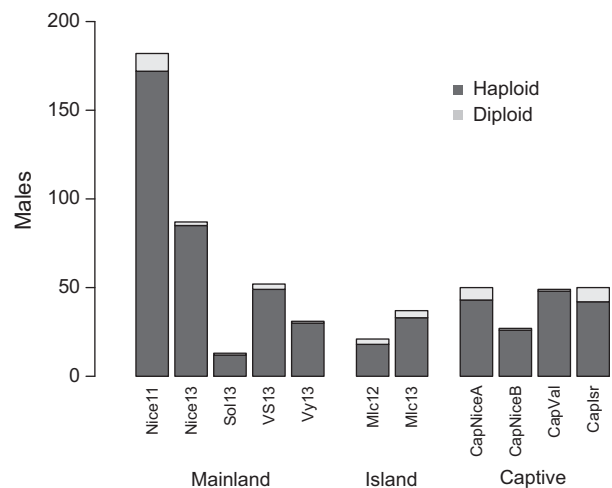


Figure 3. Number of haploid and diploid males in the 11 populations within each habitat type.

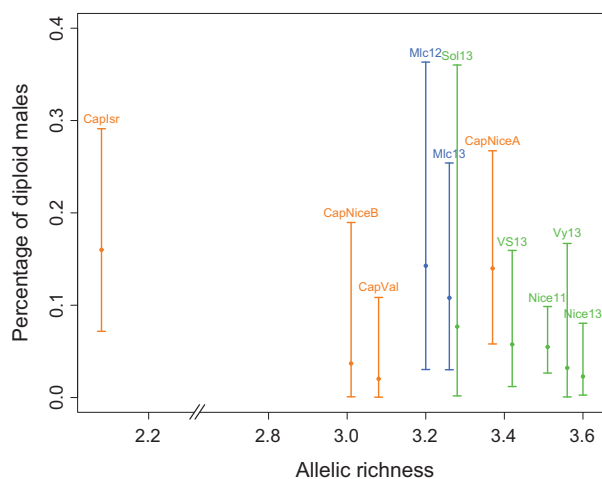
Discussion

We developed highly variable microsatellite markers for the parasitoid wasp *V. canescens*. Polymorphism, HW equilibrium, the absence of linkage disequilibrium, and negligible null allele frequencies make these markers suitable for population genetic studies. In addition, relatively high rates of heterozygosity enable a reliable measure of male ploidy, confirmed by flow cytometry. Using these markers, we estimated within-population genetic diversity and the proportion of diploid males in eleven locations

Table 5. Effect of habitat type and genetic diversity on diploid male proportion.

Response variable	Diploid male proportion		
	LR χ^2	df	<i>P</i>
With Caplsr population			
Habit	7.0710	2	0.029
Habit:All_rich	2.4942	2	0.287
Habit:Priv_all	0.5125	1	0.474
Without Caplsr population			
Habit	4.5108	2	0.104
Habit:All_rich	6.7997	2	0.033
Habit:Priv_all	0.5125	1	0.474

LR, Likelihood ratio; df, degrees of freedom; Habit, habitat type; All_rich, allelic richness; Priv_all, private alleles. *P* < 0.05 highlighted in bold.

**Figure 4.** Percentage of diploid males according to allelic richness in the 11 populations, with 95% confidence intervals. Colors represent the three habitat types of locations: light green for the mainland populations, light blue for the island populations, and orange for the captive populations.

around the Mediterranean Sea, as well as in captive populations. We found a tendency for genetic diversity to be reduced in small and isolated populations, and the proportion of diploid males to increase with decreasing genetic diversity. These patterns are expected theoretically in a scenario whereby reduced population size yields decreased genetic diversity (and decreased allelic polymorphism at the sl-CSD locus), increased proportion of diploid males, decreased population growth rate, and, if dramatic enough, population extinction (a scenario referred to as the diploid male vortex; Zayed and Packer 2005). Hence, our results suggest that habitat type and population history are key features that should be considered when studying genetic diversity in parasitoids with sl-CSD.

The effect of habitat type on genetic diversity was marked by a lower diversity in captive populations. These bottlenecked and completely isolated populations were characterized by a lower allelic richness compared to either island or mainland populations, and a lower number of private alleles compared to mainland populations (Table 3). Because the number of private alleles is highly dependent on sampling effort, the effect of habitat type on the number of private alleles could simply result from the high number of individuals captured in the mainland population of Nice. Besides, the captive population from Israel was highly differentiated from all populations as a result of a very small foundress number (11 females). This population had the lowest allelic richness and mean number of alleles, and hence, it is likely that these extreme values had driven the effect of habitat type. Indeed, the population effect disappeared when discarding the population from Israel. Nonetheless, the effect of habitat type remained marginally significant, suggesting that the trend of higher allelic richness in mainland compared to island and captive populations is indeed real.

The decrease in genetic diversity co-occurring with higher rates of inbreeding in small and isolated populations, such as island populations, has been documented in various species (mammals, birds, fishes, insect or plants, Frankham 1997; Furlan et al. 2012). In *V. canescens*, the higher genetic diversity in mainland compared to captive populations could be explained by efficient dispersal. In this species, adults are good dispersers (Desouhant et al. 2003), a feature that corroborates the absence of genetic structure at the scale of southeastern France (Schneider et al. 2002). In island and captive populations, founder effect and genetic drift combined with constrained dispersal should lead to genetic erosion, a phenomenon that is also observed in other species of the order Hymenoptera such as bumblebees or orchid bees (Ellis et al. 2006; Schmid-Hempel et al. 2007; Boff et al. 2014).

Consistent with these effects of habitat type on diversity at microsatellite loci, the proportion of diploid males was affected by the habitat type with more frequent diploid males in island and captive populations than in mainland locations. The highest proportion (16%) was observed in the captive population from Israel, which is congruent with the lowest genetic diversity estimated. In other species, diploid male production was also found to be higher in isolated population compared to larger genetically diverse populations (Kukuk and May 1990). Overall, the proportion of diploid males in *V. canescens* (6.8% overall, CI 95% [5.0–9.2%]) is in the order of magnitude of estimations in other species of parasitoids with sl-CSD: 10% in a native population of *C. glomerata* (Ruf et al. 2013) and 15% in a population of *C. rubecula* introduced for biological control (de Boer et al. 2012).

It is however important to notice that despite a high sampling effort in several islands, we caught males only on one island (Mallorca), for two consecutive years. It is therefore possible that the trend of lower genetic diversity and higher proportion of diploid males compared to mainland populations are due to a peculiar composition specific to Mallorca population, and rather than an effect of the habitat type “island” and its isolation. The habitat isolation effect is nonetheless corroborated by the genetic erosion observed in captive populations, and thus likely to be real, but would require new samplings in other islands to be confirmed.

Behaviors such as natal dispersal and mate choice can mitigate the effects of decreased genetic diversity and hence attenuate diploid male production. In *C. glomerata*, a biased fertilization occurs and limits genetic incompatibility, leading to a DMP lower than expected in field populations (Ruf et al. 2013). On the contrary, the lack of mate discrimination in *C. rubecula* could explain the relatively high DMP observed in its field populations (de Boer et al. 2012). Laboratory studies in *Bracon brevicornis* have reported an avoidance of mating with a partner harboring the same allele at the sl-CSD locus (i.e., avoidance of matched matings; Thiel et al. 2013), and sib-mating avoidance was observed in *V. canescens* (Metzger et al. 2010a). Such behaviors should reduce the DMP and thus lessens the production of unfit offspring (Parker 1983; Chuine et al. 2015).

The higher proportion of diploid males in captive and island populations of *V. canescens* could result from a lower genetic diversity in isolated populations, or a downgrade in discrimination of females against related males. In a number of species, females adapt future mate choice according to the genotype of their first mate [lizards (Laloi et al. 2011; Breedveld and Fitze 2015); beetles (Dowling et al. 2007); *Drosophila* (Chapman and Partridge 1998)]. This hypothesis may not hold for *V. canescens* because females are monoandrous (Metzger et al. 2010b). However, as island or captive populations are genetically eroded, the probability for a female to encounter a male bearing a similar allele at the *csd* locus is higher; possibly, successive encounters with low-quality males before mating could lead to an adaptive decline in sib-avoidance. This could explain the increase in diploid male production in small or isolated populations. At last, the presence of diploid males even in mainland populations where the genetic diversity is high and where no departure from HW equilibrium was detected could also be due to imperfect sib-mating avoidance, as observed under the laboratory conditions (Metzger et al. 2010a).

Our study suggests that diploid male production in insects of the order Hymenoptera reflects fitness decline resulting from inbreeding in small and isolated habitats.

Sex determination via sl-CSD imposes a major genetic constraint and may reflect an “unintelligent design” (sensu van Wilgenburg et al. 2006), which makes some hymenopterans highly sensitive to isolation. Hence, our study raises the question of population conservation (Zayed 2009) and highlights that small organisms such as insects may also suffer from habitat destruction and fragmentation.

Acknowledgments

We thank Virginie Dos Santos and Anna Chuine for their comments on the draft, Didier Crochard, Bastien Quaglietti, Laurent Gina, Sarah Fréchet and Virginie Dos Santos for field sampling. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Sextinction project ANR-2010-BLAN-1717) and the Fédération de Recherche sur la Biodiversité (VORTEX project APP-IN-2009-052), both coordinated by X. Fauvergue.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Armitage, S., J. Boomsma, and B. Baer. 2010. Diploid male production in a leaf-cutting ant. *Ecol. Entomol.* 35:175–182.
- Aron, S., L. de Menten, D. R. Van Bockstaele, S. M. Blank, and Y. Roisin. 2005. When hymenopteran males reinvented diploidy. *Curr. Biol.* 15:824–827.
- Asplen, M. K., J. B. Whitfield, J. G. De Boer, and G. E. Heimpel. 2009. Ancestral state reconstruction analysis of hymenopteran sex determination mechanisms. *J. Evol. Biol.* 22:1762–1769.
- Benjamini, Y., and Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B Methodol.* 57:289–300.
- Beukeboom, L. W. 2001. Single-locus complementary sex determination in the ichneumonid *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera). *Neth. J. Zool.* 51:1–15.
- Beukeboom, L. W., and N. Perrin. 2014. The evolution of sex determination. Oxford Univ. Press, Oxford, U.K.
- Beye, M., M. Hasselmann, M. K. Fondrk, R. E. Page Jr, and S. W. Omholt. 2003. The gene *csd* is the primary signal for sexual development in the honeybee and encodes an SR-type protein. *Cell* 114:419–429.
- de Boer, J. G., P. J. Ode, L. E. M. Vet, J. B. Whitfield, and G. E. Heimpel. 2007. Diploid males sire triploid daughters and sons in the parasitoid wasp *Cotesia vestalis*. *Heredity* 99:288–294. doi:10.1038/sj.hdy.6800995
- de Boer, J. G., B. Kuijper, G. E. Heimpel, and L. W. Beukeboom. 2012. Sex determination meltdown upon

- biological control introduction of the parasitoid *Cotesia rubecula*? *Evol. Appl.* 5:444–454.
- de Boer, J. G., M. A. Groenen, B. A. Pannebakker, L. W. Beukeboom, and R. H. Kraus. 2015. Population-level consequences of complementary sex determination in a solitary parasitoid. *BMC Evol. Biol.* 15.
- Boff, S., A. Soro, R. J. Paxton, and I. Alves-dos-Santos. 2014. Island isolation reduces genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male production in a neotropical orchid bee. *Conserv. Genet.* 15:1123–1135.
- Bompard, A., I. Amat, X. Fauvergue, and T. Spataro. submitted. Trophic interactions may reverse the demographic consequences of inbreeding. *Ecology*.
- Breedveld, M. C., and P. S. Fitze. 2015. A matter of time: delayed mate encounter postpones mating window initiation and reduces the strength of female choosiness. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 69:533–541.
- Chapman, T., and L. Partridge. 1998. Sex-specific selection on time to remate in *Drosophila melanogaster*. *Anim. Behav.* 56:1267–1278.
- Chapuis, M.-P., and A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24:621–631.
- Chuine, A., S. Sauzet, F. Debias, and E. Desouhant. 2015. Consequences of genetic incompatibility on fitness and mate choice: the male point of view. *Biol. J. Linn. Soc.* 114:279–286.
- Cohen, J. 1977. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Rev. ed. Academic Press, New York.
- Cohen, J. 1992. A power primer. *Psychol. Bull.* 112:155–159.
- Cook, J. M. 1993. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity* 71:421–435.
- Corbet, S. A. 1971. Mandibular gland secretion of larvae of the flour moth, *Anagasta kuehniella*, contains an epideictic pheromone and elicits oviposition movements in a Hymenopteran parasite. *Nature* 232:481–484.
- Cowan, D. P., and J. K. Stahlhut. 2004. Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101:10374–10379.
- Darvill, B., J. S. Ellis, G. C. Lye, and D. Goulson. 2006. Population structure and inbreeding in a rare and declining bumblebee, *Bombus muscorum* (Hymenoptera: Apidae). *Mol. Ecol.* 15:601–611.
- Darvill, B., O. Lepais, L. C. Woodall, and D. Goulson. 2012. Triploid bumblebees indicate a direct cost of inbreeding in fragmented populations. *Mol. Ecol.* 21:3988–3995.
- Desouhant, E., G. Driessen, L. Lapchin, S. Wielaard, and C. Bernstein. 2003. Dispersal between host populations in field conditions: navigation rules in the parasitoid *Venturia canescens*. *Ecol. Entomol.* 28:257–267.
- Desouhant, E., G. Driessen, I. Amat, and C. Bernstein. 2005. Host and food searching in a parasitic wasp *Venturia canescens*: a trade-off between current and future reproduction? *Anim. Behav.* 70:145–152.
- Dowling, D. K., U. Friberg, and G. Arnqvist. 2007. A comparison of nuclear and cytoplasmic genetic effects on sperm competitiveness and female remating in a seed beetle. *J. Evol. Biol.* 20:2113–2125.
- El Mousadik, A. E., and R. J. Petit. 1996. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theor. Appl. Genet.* 92:832–839.
- Ellis, J. S., M. E. Knight, B. Darvill, and D. Goulson. 2006. Extremely low effective population sizes, genetic structuring and reduced genetic diversity in a threatened bumblebee species, *Bombus sylvarum* (Hymenoptera: Apidae): genetic structuring in declining Bumblebees. *Mol. Ecol.* 15:4375–4386.
- Estoup, A., M. Solignac, J. M. Cornuet, J. Goudet, and A. Scholl. 1996. Genetic differentiation of continental and island populations of *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apidae) in Europe. *Mol. Ecol.* 5:19–31. doi:10.1111/j.1365-294X.1996.tb00288.x.
- Fauvergue, X., A. Chuine, C. Vayssade, A. Auguste, and E. Desouhant. 2015. Sterile males in a parasitoid wasp with complementary sex determination: from fitness costs to population extinction. *BMC Ecol.* 15.
- Fox, J., and S. Weisberg. 2010. *An R companion to applied regression* Second Edition. SAGE, Thousand Oaks CA.
- Frankham, R. 1997. Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* 78: 311–327.
- Furlan, E., J. Stoklosa, J. Griffiths, N. Gust, R. Ellis, R. M. Huggins, et al. 2012. Small population size and extremely low levels of genetic diversity in island populations of the platypus, *Ornithorhynchus anatinus*: low genetic diversity in Island Platypuses. *Ecol. Evol.* 2:844–857.
- Geuverink, E., and L. W. Beukeboom. 2014. Phylogenetic distribution and evolutionary dynamics of the sex determination genes doublesex and transformer in insects. *Sex. Dev.* 8:38–49.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.* 86:485–486.
- Harpur, B. A., M. Sobhani, and A. Zayed. 2013. A review of the consequences of complementary sex determination and diploid male production on mating failures in the Hymenoptera. *Entomol. Exp. Appl.* 146:156–164.
- Harvey, J. A., I. F. Harvey, and D. J. Thompson. 2001. Lifetime reproductive success in the solitary endoparasitoid, *Venturia canescens*. *J. Insect Behav.* 14:573–593.
- Hassell, M. P. 2000. Host-parasitoid population dynamics. *J. Anim. Ecol.* 69:543–566.
- Heimpel, G. E., and J. G. de Boer. 2008. Sex determination in the hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 53:209–230.
- Hein, S., H. J. Poethke, and S. Dorn. 2009. What stops the “diploid male vortex”? – a simulation study for species with single locus complementary sex determination. *Ecol. Model.* 220:1663–1669.

- Hopper, K. R., and R. T. Roush. 1993. Mate finding, dispersal, number released, and the success of biological-control introductions. *Ecol. Entomol.* 18:321–331.
- Kukuk, P. F., and B. May. 1990. Diploid males in a primitively eusocial bee, *Lasioglossum (Dialictus) zephyrum* (Hymenoptera: Halictidae). *Evolution* 44:1522.
- Laloi, D., C. Eizaguirre, P. Fédérici, and M. Massot. 2011. Female choice for heterozygous mates changes along successive matings in a lizard. *Behav. Processes* 88:149–154.
- Malausa, T., A. Gilles, E. Meglec, H. Blanquart, S. Duthoy, C. Costedoat, et al. 2011. High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Mol. Ecol. Resour.* 11:638–644.
- Mateo Leach, I., S. Ferber, L. van de Zande, and L. W. Beukeboom. 2012. Genetic variability of arrhenotokous and thelytokous *Venturia canescens* (Hymenoptera). *Genetica* 140:53–63.
- Meglec, E., C. Costedoat, V. Dubut, A. Gilles, T. Malausa, N. Pech, et al. 2010. QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics* 26:403–404.
- Metzger, M., D. Fischbein, A. Auguste, X. Fauvergue, C. Bernstein, and E. Desouhant. 2010a. Synergy in information use for mate finding: demonstration in a parasitoid wasp. *Anim. Behav.* 79:1307–1315.
- Metzger, M., C. Bernstein, T. S. Hoffmeister, and E. Desouhant. 2010b. Does kin recognition and sib-mating avoidance limit the risk of genetic incompatibility in a parasitic wasp? *PLoS One* 5:e13505.
- Nakagawa, S., and I. C. Cuthill. 2007. Effect size, confidence interval and statistical significance: a practical guide for biologists. *Biol. Rev.* 82:591–605.
- Parker, G. A. 1983. Mate quality and mating decisions. Pp. 141–164 in Patrick Bateson, ed. *Mate choice*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, New York.
- Pelosse, P., C. Bernstein, and E. Desouhant. 2007. Differential energy allocation as an adaptation to different habitats in the parasitic wasp *Venturia canescens*. *Evol. Ecol.* 21:669–685.
- R Core Team 2015. R: a language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput, Vienna, Austria.
- Ross, K. G., E. L. Vargo, L. Keller, and J. C. Trager. 1993. Effect of a founder event on variation in the genetic sex-determining system of the fire ant *Solenopsis invicta*. *Genetics* 135:843–854.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resour.* 8:103–106.
- Ruf, D., S. Dorn, and D. Mazzi. 2011. Females leave home for sex: natal dispersal in a parasitoid with complementary sex determination. *Anim. Behav.* 81:1083–1089.
- Ruf, D., S. Dorn, and D. Mazzi. 2013. Unexpectedly low frequencies of diploid males in an inbreeding parasitoid with complementary sex determination. *Biol. J. Linn. Soc.* 108:79–86.
- Salt, G. 1976. The hosts of *Nemeritis canescens*: a problem in the host specificity of insect parasitoids. *Ecol. Entomol.* 1:63–67.
- Schmid-Hempel, P., R. Schmid-Hempel, P. C. Brunner, O. D. Seeman, and G. R. Allen. 2007. Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. *Heredity* 99:414–422.
- Schmieder, S., D. Colinet, and M. Poirié. 2012. Tracing back the nascence of a new sex-determination pathway to the ancestor of bees and ants. *Nat. Commun.* 3:895.
- Schneider, M. V., L. W. Beukeboom, G. Driessen, L. Lapchin, C. Bernstein, and J. J. M. Van Alphen. 2002. Geographical distribution and genetic relatedness of sympatric thelytokous and arrhenotokous populations of the parasitoid *Venturia canescens* (Hymenoptera). *J. Evol. Biol.* 15:191–200.
- Shaw, M. R., and M. E. Hochberg. 2001. The neglect of parasitic Hymenoptera in insect conservation strategies: the British fauna as a prime example. *J. Insect Conserv.* 5:253–263.
- Souza, R. O., M. A. Del Lama, M. Cervini, N. Mortari, T. Eltz, Y. Zimmermann, et al. 2010. Conservation genetics of neotropical pollinators revisited: microsatellite analysis suggests that diploid males are rare in orchid bees. *Evolution* 64:3318–3326.
- Thiel, A., A. C. Weeda, J. G. de Boer, and T. S. Hoffmeister. 2013. Genetic incompatibility drives mate choice in a parasitic wasp. *Front. Zool.* 10:43.
- Torchiano, M. 2015. effsize: efficient effect size computation. R package. version 0.5.4. <https://CRAN.R-project.org/package=effsize>.
- Tsuchida, K., K. Kudô, and N. Ishiguro. 2014. Genetic structure of an introduced paper wasp, *Polistes chinensis antennalis* (Hymenoptera, Vespidae) in New Zealand. *Mol. Ecol.* 23:4018–4034.
- Verhulst, E. C., L. W. Beukeboom, and L. van de Zande. 2010. Maternal control of haplodiploid sex determination in the wasp *Nasonia*. *Science* 328:620–623.
- Whitehorn, P. R., M. C. Tinsley, and D. Goulson. 2009. Kin recognition and inbreeding reluctance in bumblebees. *Apidologie* 40:627–633.
- Whiting, P. W. 1943. Multiple alleles in complementary sex determination of *habrobracon*. *Genetics* 28:365–382.
- van Wilgenburg, E., G. Driessen, and L. W. Beukeboom. 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an “unintelligent” design? *Front. Zool.* 3:1.
- Zayed, A. 2009. Bee genetics and conservation. *Apidologie* 40:237–262.
- Zayed, A., and L. Packer. 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102:10742–10746.
- Zimmermann, Y., D. L. P. Schorkopf, R. F. A. Moritz, R. W. Pemberton, J. J. G. Quezada-Euan, and T. Eltz. 2011.

Population genetic structure of orchid bees (Euglossini) in anthropogenically altered landscapes. *Conserv. Genet.* 12:1183–1194. doi:10.1007/s10592-011-0221-1.
 Zhou, Y., H. Gu, and S. Dorn. 2006. Single-locus sex determination in the parasitoid wasp *Cotesia glomerata* (Hymenoptera : Braconidae). *Heredity* 96:487–492.

Annex:

Calculation of the probability that a F2 male, produced by sibmating, is homozygous for all 10 markers from multiplex I.

A sample of 30 females was collected in a three- to five-generation-old captive population (founded in autumn 2009 with about 40 females from Nice). These females constitute the F0 generation and had presumably mated randomly in the population. Their offspring (generation F1) were constrained to mate between siblings (Fig. A1). We computed the probability that an F2 male, produced via sibmating, is homozygous for all genetic markers, using allelic frequencies and inbreeding coefficient (Fis) of F0 females.

We first calculated the probability that an F2 diploid individual is homozygous at one microsatellite locus, given the genotypes of its grandparents (F0 generation) at this locus (Fig. A1). Then, for each locus *k*, we calculated the probability that an F0 female is heterozygous at this locus as $P_k(\text{Het}_{F0}) = (1 - F_{is}) \times H_e$ and the probability that she is homozygous as $P_k(\text{Hom}_{F0}) = 1 - P_k(\text{Het}_{F0})$, where H_e

is expected heterozygosity at loci *k* under HW equilibrium. We calculated as follows the conditional probabilities that the F0 male carries at loci *k* a different (DA) or common (CA) allele with the F0 female, knowing that the female is heterozygous (Het_{F0}) or homozygous (Hom_{F0}):

$$P_k(\text{CA}|\text{Het}_{F0}) = \sum_{i=1}^n \sum_{\substack{j=2 \\ i < j}}^n \left(\frac{2p_i p_j}{H_e} \right) (p_i + p_j)$$

$$P_k(\text{DA}|\text{Het}_{F0}) = 1 - P_k(\text{CA}|\text{Het}_{F0})$$

$$P_k(\text{CA}|\text{Hom}_{F0}) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{p_i^2}{1 - H_e} \right) p_i$$

$$P_k(\text{DA}|\text{Hom}_{F0}) = 1 - P_k(\text{CA}|\text{Hom}_{F0})$$

p_i and p_j are the frequencies of alleles *i* and *j*, respectively. Using the proportions of F2 homozygous from Figure A1, the probability that an F2 diploid is homozygous as locus *k* was as follows:

$$P_k(\text{Hom}_{F2}) = P_k(\text{Het}_{F0})(0.5P_k(\text{CA}|\text{Het}_{F0}) + 0.25P_k(\text{DA}|\text{Het}_{F0})) + P_k(\text{Hom}_{F0})(P_k(\text{CA}|\text{Hom}_{F0}) + 0.5P_k(\text{DA}|\text{Hom}_{F0}))$$

The probability that a diploid F2 is homozygous at all 10 loci from multiplex I was as follows:

$$P(\text{Hom}_{F2}) = \prod_{k=1}^{10} P_k(\text{Hom}_{F2}).$$

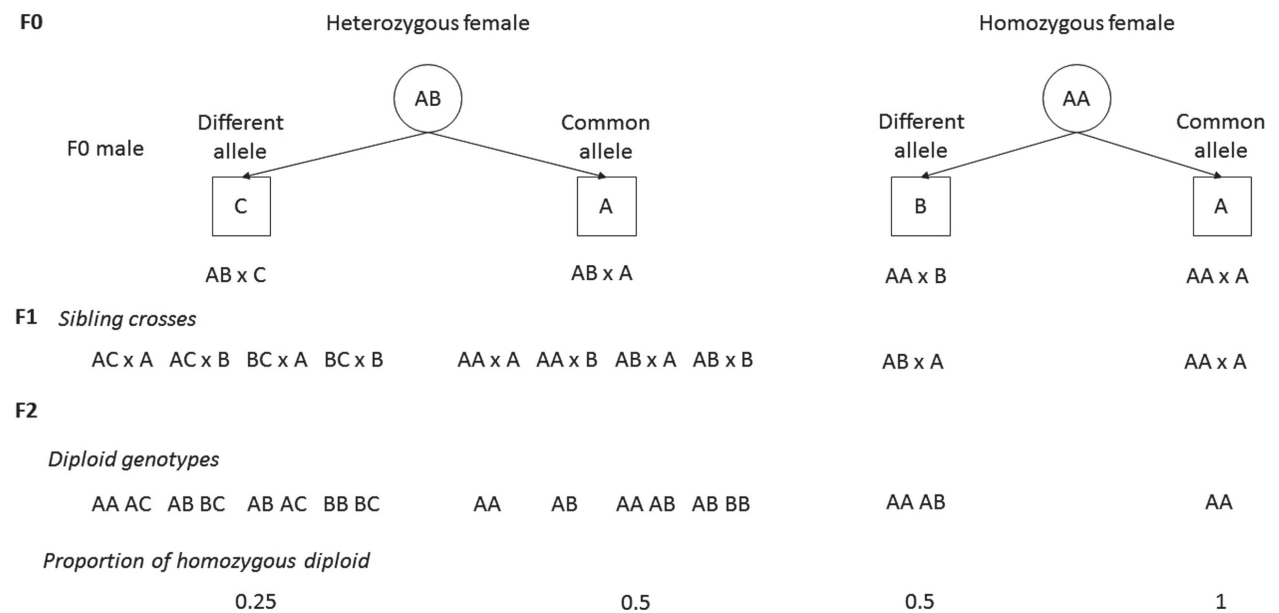


Figure A1. Proportion of heterozygous diploid F2 at one microsatellite locus, according to the genotype of the F0 pair.

4.3 Discussion

Cette partie de discussion n'a pas pour vocation de reprendre la discussion développée dans l'article précédent mais plutôt de compléter des points peu ou non abordés précédemment, comme le choix du développement de marqueurs microsatellites face aux méthodes de génomes complets.

Dans cette étude, nous avons démontré chez une guêpe parasitoïde l'existence d'une corrélation entre taille et isolement de populations, d'une part avec leur diversité génétique et d'autre part avec leur proportion de mâles diploïdes. Cette corrélation avait été très explorée de manière théorique mais assez peu d'exemples biologiques corroboraient l'existence de corrélations entre les différentes étapes du vortex d'extinction dû aux mâles diploïdes (voir Kukuk and May (1990) pour une corrélation chez une abeille eusociale *Lassioglossum (Dialictus) Zephyrum*, Darvill et al. (2006, 2012) chez les bourdons, et Tsuchida et al. (2014) chez une guêpe à papier). La vérification de prédictions théoriques telles que celles de Zayed and Packer (2005) demande des plans d'échantillonnage ambitieux et la capture de mâles sur une seule île malgré les 8 échantillonnages insulaires effectués dans notre étude démontre la difficulté d'atteindre de tels objectifs. En effet, nos résultats, bien que significatifs et ayant des tailles d'effets fortes (Cohen, 1977), demanderaient des échantillonnages complémentaires en particulier sur des îles afin d'asseoir la tendance que nous avons trouvée. De plus, une caractérisation des tailles de populations sur les îles nous permettrait d'affiner le lien entre insularité, démographie, diversité génétique et production de mâles diploïdes. En effet, si la contrainte migratoire est forte sur les îles malgré les capacités de dispersion de *Venturia canescens* (plusieurs centaines de mètres par heure, (Desouhant et al., 2003), l'importance de l'événement de fondation et de potentielles invasions successives restent inconnues à ce jour, limitant ainsi notre compréhension de la dynamique de ces populations.

Nous avons ainsi travaillé conjointement sur des populations naturelles (continentales ou insulaires) et sur des populations captives de laboratoire. La présence de très faible diversité génétique et d'une proportion importante de mâles diploïdes dans les populations captives (jusqu'à 16% dans la population provenant d'Israël) pose la question de l'utilisation de telles populations appauvries génétiquement lors des expériences en laboratoire. Ces constatations amènent ainsi à recommander aux chercheurs ayant des populations captives d'insectes en général de vérifier la diversité génétique de leurs élevages et de procéder si possible à des rééchantillonnages réguliers sur le terrain afin d'étudier des populations au plus proche de la diversité génétique *in natura* afin de limiter les biais possibles des expérimentations en laboratoires.

Ce travail, en plus d'apports évidents sur notre connaissance du phénomène de « vortex d'extinction », est aussi une contribution méthodologique importante pour l'étude d'une espèce non-modèle. Nous avons ainsi développé 15 nouveaux marqueurs microsatellites réunis en seulement deux multiplex de PCR, permettant ainsi un usage facilité et optimisé en temps et en coût. Le développement de marqueurs sur des espèces non modèles telle que *V. canescens* est une étape indispensable et un enjeu majeur dans l'étude des populations naturelles (Thomson et al., 2010; Davey et al., 2011). Cette étape est souvent coûteuse et complexe, et ouvre cependant de nouveaux champs d'investigation tel que la génétique des populations, la dynamique des populations ou la conservation de ces espèces (Guichoux et al., 2011). Ces 15 marqueurs s'ajoutent ainsi à ceux développés par Butcher et al. (2000) et Mateo Leach et al. (2012), augmentant ainsi les possibilités d'études sur cette espèce, encore très mal connue en conditions naturelles.

Avec l'amélioration constante des technologies disponibles pour les chercheurs, en par-

ticulier en tant qu'étudiante en thèse « née » au cours de l'aire « omics », la question du développement de microsatellites face aux SNPs² et aux séquençages de génomes complets se pose inévitablement. Nous sommes effectivement rentrés dans une aire où les techniques de *Next Generation Sequencing* (NGS) sont en constante évolution, avec des résultats parfois spectaculaires (le projet des 1000 Génomes³ (Consortium, 2010) par exemple), permettant de passer de la génétique à la génomique des populations. Pour autant, les microsatellites ne sont pas tombés en désuétude comme annoncé aux début des années 2000. En effet, les microsatellites ont des avantages certains sur les SNPs, en commençant par le fait majeur qu'ils sont multialléliques (et souvent hautement polymorphes) contrairement aux SNPs. Cela induit plusieurs conséquences majeures en faveur des microsatellites :

- Une valeur informative bien supérieure, induisant un nombre nécessaire de microsatellites inférieur au nombre des SNP nécessaires (20 microsatellites versus 50 SNP, (Santure et al., 2010), division du nombre de marqueurs par 4 à 10 (Morin et al., 2004))
- Un biais de détermination (« ascertainment bias ») inférieur (Putman and Carbone, 2014; Guichoux et al., 2011)
- Un pouvoir de résolution bien supérieur aux SNP lorsque l'on s'intéresse à une histoire évolutive récente, ou sur une petite échelle spatiale (avec une meilleure inférence des structures de populations), ou à des espèces (quasi-) clonales ou avec un faible taux d'évolution (Putman and Carbone, 2014; Guichoux et al., 2011)
- Une meilleure assignation des individus en fratrie (Hauser et al., 2011)

Ces caractéristiques sont tout à fait pertinentes dans le cadre de notre étude puisque nous remplissons plusieurs critères : nous nous sommes intéressés à la structure de populations vraisemblablement récentes (pour les populations insulaires), chez une espèce qui comporte à la fois une lignée sexuée (arrhénotoque, utilisée dans cette étude) mais aussi une lignée asexuée (thélytoque), hautement homozygote. Ce développement de marqueurs permettra ainsi une meilleure étude de ces deux lignées, souvent utilisées comparativement afin d'estimer le coût du sexe sur différents traits d'histoire de vie (Foray et al., 2014; Amat et al., 2006). Bien évidemment, les microsatellites ne sont pas sans désavantages : leur développement est souvent long et coûteux, leur nombre bien inférieur aux SNPs et leurs localisations peuvent être non représentatives du génome complet, leur mécanisme de mutation (par « glissement » de la machinerie de réplication (Ellegren, 2004)) conduit à un taux d'erreur plus élevés et à la présence d'allèles nuls et le génotypage d'une multitude d'individus peut être onéreux. Cependant, les désavantages des microsatellites sont actuellement majoritairement techniques, en particulier pour leur développement (Guichoux et al., 2011), et certains sont en train d'être dépassés. Bien que le nombre d'individus ne soit pas réductible, nous avons résolu en grande partie le problème du coût et du temps des analyses génétiques en multiplexant fortement (10 et 9 microsatellites par multiplex) nos marqueurs, ce qui est un passage fortement recommandé pour pouvoir continuer à utiliser efficacement ces marqueurs dans le futur (Putman and Carbone, 2014; Guichoux et al., 2011). De plus, les avancées « omics » actuelles bénéficient aussi à la facilitation de la détection de microsatellites.

²Single Loci Polymorphism

³<http://www.internationalgenome.org/home>

Enfin, les limitations actuelles de notre étude sont majoritairement dues à des limitations d'échantillonnage et n'aurait donc pas été résolues via l'utilisation de SNPs ou de génomes complets. En effet, nous avons démontré une détection parfaite de la ploïdie des mâles avec notre set de marqueurs, et l'estimation des fréquences alléliques est précise comme nous avons génotypé plus de 25 individus dans toutes nos populations (excepté Solliès, où 16 mâles étaient disponibles), la recommandation étant entre 25 et 30 (Hale et al., 2012). Et en ces temps de transition écologique, la prise en compte du coût du temps de calcul, des ressources nécessaires et du stockage de nos données n'est pas accessoire, donnant évidemment l'avantage à 20 microsatellites face aux SNPs ou des génomes complets.

La détection de mâles diploïdes confirme que les accouplements appariés existent chez *V. canescens* sur le terrain et complète ainsi les connaissances sur les mâles diploïdes dans les populations naturelles dans un autre genre hyménoptère que le genre *Cotesia*. La probabilité d'obtenir un accouplement apparié est logiquement bien supérieure lors d'accouplements entre apparentés, puisque leur probabilité de détenir les mêmes allèles est plus forte (par exemple, $P(\text{Accouplement apparié frère-sœur}) = 0.5$). Pourtant, Metzger et al. (2010a) ont montré un évitement des accouplements entre apparentés en laboratoire. Se pose donc la question de l'évitement d'accouplements entre apparentés sur le terrain afin de comprendre la co-occurrence de ces deux résultats apparemment contradictoires.

Chapitre 5

Tolérance à l'accouplement entre apparentés sur le terrain

Sommaire

5.1	Introduction	68
5.1.1	Reconnaissance des apparentés et choix du partenaire sexuel	68
5.1.2	Contexte de l'étude	70
5.2	Article 2 : Insect and incest : field evidence for dangerous liaisons in a parasitoid wasp (en révision)	70
5.3	Discussion	93

5.1 Introduction

L'évitement d'accouplement entre apparentés est un phénomène que nombreux écologues pensent commun. En effet, l'existence d'une diminution de la fitness des individus à cause d'un accouplement entre apparentés (la dépression de consanguinité) est démontrée dans de nombreuses espèces animales et végétales (Charlesworth and Willis, 2009; Tregenza and Wedell, 2000) et est souvent considérée comme un phénomène devant conduire à la sélection de stratégies d'évitement (Szulkin et al., 2013; Pusey and Wolf, 1996).

5.1.1 Reconnaissance des apparentés et choix du partenaire sexuel

La reconnaissance et le choix d'un partenaire sexuel est un des mécanismes décrit dans la littérature qui permet d'atténuer les effets du fardeau de la consanguinité (Greenwood et al., 1978; Duthie and Reid, 2016). De nombreux travaux se sont interrogés sur les coûts d'un tel évitement, qu'ils soient physiologiques ou génétiques (Bateson, 1982, 1983*a*; Bonte et al., 2012; Cooney and Bennett, 2000; O'Riain et al., 2000; Bengtsson, 1978). Des études théoriques se sont de plus penchées sur les conditions nécessaires à l'apparition d'un évitement des partenaires sexuels apparentés et ont démontré qu'il existait des conditions défavorables à la mise en place de stratégie d'évitement (Waser et al., 1986; Kokko and Ots, 2006; Puurtinen, 2011; Duthie and Reid, 2016; Szulkin et al., 2009). En effet, bien qu'un évitement d'accouplement entre apparentés a été montré dans des espèces variées (Szulkin et al., 2013; Arct et al., 2015; Cooney and Bennett, 2000; Boulet et al., 2009; Bonadonna and Sanz-Aguilar, 2012), d'autres espèces montrent une préférence (Thünken et al., 2007; Olson et al., 2012) ou une tolérance à l'accouplement entre apparentés (Bourdais and Hance, 2009; Chapman and Stewart, 1996; Chapman and Crespi, 1998). La tolérance à l'accouplement entre apparentés peut toutefois conditionner le recours à des stratégies alternatives dans les espèces sociales (infidélité et divorce par exemple chez la marmotte alpine, (Cohas et al., 2008; Lardy et al., 2011)). Cependant, on ne connaît actuellement que peu de choses sur le choix du partenaire sexuel dans la nature chez les insectes non sociaux. Une exception existe chez *Drosophila melanogaster*, où Robinson et al. (2012) ont observé une tolérance à l'accouplement entre apparentés malgré des coûts directs sur la fécondité des femelles, ou chez le grillon, avec une tolérance aux accouplements entre apparentés (Bretman et al., 2011)

Néanmoins, les expériences se déroulent majoritairement en laboratoire et s'effectuent dans un environnement contraint négligeant des caractéristiques fondamentales des populations lors du choix du partenaire sexuel : la densité de population et la fréquence de rencontre des apparentés (Kokko and Rankin, 2006; Duthie and Reid, 2016), la dispersion (Gandon, 1999; Gros et al., 2008; Hardouin et al., 2015)... En effet, la sélection sexuelle est fortement influencée par de nombreux facteurs intrinsèques et/ou extrinsèques aux individus (Cotton et al., 2006), comme par exemple le nombre de partenaires potentiels, *i.e.* un individu de sexe opposé, en état de se reproduire, disponible et que l'on peut atteindre spatialement pendant la période de reproduction (Figure 5.1).

Ce nombre de partenaires potentiels, et leur probabilité de rencontre augmentent automatiquement avec la densité de la population. Cela impacte directement la sélection sexuelle en faisant varier la compétition intra- et/ou inter-sexe, et peut par conséquent faire basculer les individus d'une stratégie à une autre (pour la recherche du partenaire –actif versus passif, par exemple chez un crabe (de Rivera et al., 2003)–, le choix du partenaire –exigeant versus tolérant, par exemple chez les élans (Herfindal et al., 2014)–,

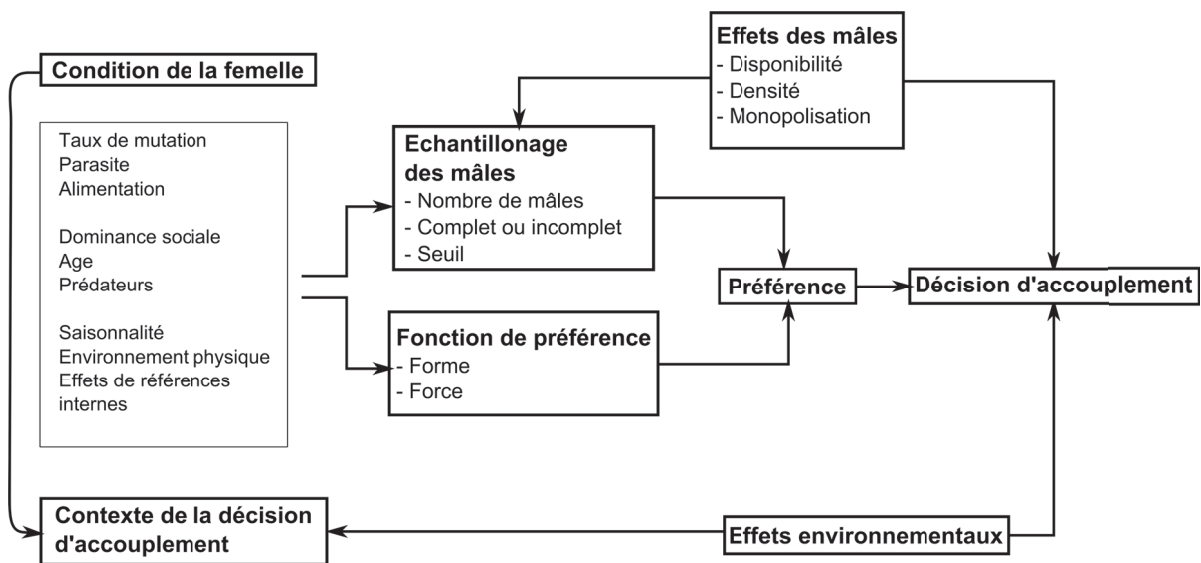


FIGURE 5.1 – **Décisions d'accouplements, chemin et processus.** La décision d'accouplement est influencée par la préférence de la femelle pour un partenaire, qui se divise entre la fonction de préférence reliée aux phénotype des mâles (qui conditionne leur attractivité), et les règles d'échantillonnage des mâles par les femelles (par exemple, le nombre de mâles échantillonné correspond-t-il à la totalité des mâles de la population ?) afin de choisir son partenaire préféré. Cette préférence est influencée par la condition interne de la femelle (Alimentation, taux de parasitisation, taux de mutation), son statut social, etc..., qui vont déterminer le contexte femelle-dépendant de la décision d'accouplement. Ce contexte peut être en interaction avec le contexte environnemental dans lequel se déroule la décision d'accouplement. En plus d'effets environnementaux, la décision d'accouplement peut de plus être influencée par des effets mâles-dépendants. Adapté de Cotton et al. (2006)

le soin aux jeunes...). De plus, le lien entre densité de population et stratégies individuelles d'accouplements est à double sens : comme énoncé précédemment, la densité de population influence les stratégies d'accouplements des individus et de fait impacte directement leur fitness ; et en retour la fitness des individus affecte directement le taux de croissance de la population et de fait sa densité. Cet équilibre dynamique n'existe ainsi pas dans les expériences de laboratoire, réalisées majoritairement sur une génération, avec un expérimentateur proposant souvent lui-même les partenaires potentiels selon des critères particuliers (apparemment (Metzger et al., 2010a), âge (Fricke and Maklakov, 2007), caractéristiques morphologiques...) et avec une densité de population constante.

5.1.2 Contexte de l'étude

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au système d'appariement chez *Venturia canescens*. Cette espèce subit un coût direct de la consanguinité, avec la production de mâles diploïdes stériles (dû à son système de déterminisme du sexe en sl-CSD, voir la section 4.1.1, page 44), ce qui correspond à une condition requise pour l'apparition de l'évitement des apparentés (Kokko and Ots, 2006). Comme attendu, une étude précédente a montré un évitement d'accouplement entre apparenté lors d'expériences de non-choix en laboratoire (Metzger et al., 2010a).

Nous avons étudié dans l'article suivant deux populations naturelles de *V. canescens* du sud de la France, en génotypant plus de 450 individus du terrain et leurs descendants sur 18 marqueurs microsatellites. Contrairement aux résultats obtenus en laboratoire, nous avons observé une tolérance à l'accouplement entre apparentés dans la population naturelle située à Nice. En effet, nous avons montré que 11% des paires mâle-femelle étaient apparentées dans cette population et que 11% des accouplements s'effectuaient entre apparentés, ce qui indique que *V. canescens* s'accouple aléatoirement, quel que soit son degré d'apparentement avec son partenaire. De plus, nous avons confirmé cette tolérance lors de tests en cage à populations en laboratoire. Nous avons toutefois redémontré la capacité de reconnaissance des apparentés chez *V. canescens*.

Cet article est actuellement en révision après une soumission dans la peer-community PCI Evolutionary Biology fin août 2017. Les seules modifications effectuées dans l'article présenté ici par rapport à l'article soumis est la correction de fautes d'orthographe. Le commentaire du recommander ainsi que les deux reviews de cet article sont disponibles en Annexe A.

5.2 Article 2 : Insect and incest : field evidence for dangerous liaisons in a parasitoid wasp (en révision)

Insects and incest: field evidence for dangerous liaisons in a parasitoid wasp

Marie Collet^{1*}, Isabelle Amat, Sandrine Sauzet¹, Alexandra Auguste², Xavier Fauvergue², Laurence Mouton¹, Emmanuel Desouhant¹

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

² INRA, CNRS, Université Côte d'Azur, ISA, France

*Corresponding author: marie.collet@univ-lyon1.fr

Abstract

1. Sib-mating avoidance is a pervasive behaviour, which likely evolves in species that are subject to inbreeding depression. Laboratory studies have provided elegant demonstrations, but small-scale bioassays often minimize the costs associated with mate finding and mate-choice and may for this reason produce spurious findings.

2. We inferred the mating behaviour of the parasitoid wasp *Venturia canescens* from the genetic analyses of natural populations. We used *V. canescens* as a model organism because in this species laboratory experiments have shown that sib-mating yields a 25% decrease in fertile offspring, and as a consequence, sib-mating is partially avoided.

3. Our study consisted of genotyping 86 wild-caught males, 155 wild-caught-females and their 226 daughters at eighteen microsatellite loci. With these data we were able to reconstruct the genotypic of females' mate and estimate the relatedness of each mating pair.

4. We found that the effective rate of sib-mating does not differ from the probability that sibs encounter one another at random, which suggest a sib-mating tolerance in this species. However, complementary lab experiments confirmed that kin discrimination exist in this species, with related pairs having a lower mating latency.

5. These results suggest that *V. canescens* tolerates sib-mating in the field despite kin discrimination, and therefore call into question common beliefs on inbreeding depression in species with single-locus complementary sex determination. This inbreeding tolerance also opens up the question as to why kin discrimination is maintained in this species.

Key-words: Field assay, Inbreeding tolerance, Kin recognition, Parasitic wasp, single-locus Complementary Sex Determination

Introduction

When inbreeding lowers fitness-related components such as survival and fertility, natural selection should favour behaviours preventing the reproduction of genetically-related individuals or mitigating harmful consequences (Pusey and Wolf, 1996; Keller and Waller, 2002; Angeloni et al., 2011). Various strategies have been described in

animals, including sib-mating avoidance, dispersal (Greenwood et al., 1978; Szulkin and Sheldon, 2008), polyandry, extra-pair paternity, divorce (Hatchwell et al., 2000; Cornell and Tregenza, 2007; Cohas et al., 2008; Lardy et al., 2011; Reid et al., 2015; Duthie and Reid, 2016), and postcopulatory mechanisms, such as the preferential use of sperm from unrelated males by inseminated females (Tregenza and Wedell, 2002; Bretman et al., 2004). Mate-choice is

probably the most pervasive behaviour for sib-mating avoidance (Pusey and Wolf, 1996). Altogether, these strategies are associated with costs in the form of decreased survival and energy expenditure (Bonte et al., 2012), loss of mating opportunities (Cooney and Bennett, 2000; O’Riain et al., 2000), or the disruption of favourable gene associations (Bateson, 1982, 1983). Selection on behaviours underlying inbreeding avoidance should thus depend on inbreeding load, which scales the advantage of inbreeding avoidance and the costs of implementing adapted behavioural responses. Selection may also depend on inclusive benefits of inbreeding, which result from the increased representation of genes identical by descent in inbred offspring (Kokko and Rankin, 2006; Puurtinen, 2011; Duthie and Reid, 2016).

The balance between benefits and costs associated with inbreeding and inbreeding avoidance depends on population structure. For instance, population density constrains mate availability and consequent encounter rate, and may therefore influence mate choice (Kokko and Rankin, 2006; Duthie and Reid, 2016). In the lizard *Zootoca vivipara*, female choosiness is reduced when mate encounter rate decreases (Breedveld and Fitze, 2015). Similarly, genetically-related partners are less avoided in small and isolated populations of moose, with an amplified effect when the sex-ratio is female-biased (Herfindal et al., 2014). In the marsupial carnivore *Antechinus agilis*, habitat selectivity following natal dispersal is negatively correlated with the abundance and relatedness of females occupying habitats, which suggests a pervasive effect of inbreeding risk on dispersal (Banks and Lindenmayer, 2014).

Responses to inbreeding risk reflect the diversity of benefits and costs associated with inbreeding and inbreeding avoidance. Observations range from systematic inbreeding avoidance to inbreeding tolerance, or even, inbreeding preference (Szulkin et al., 2013). For example, inbreeding preference is observed in the cichlid fish *Pelvicachromis taeniatus*, where parental care occurs, with higher cooperation and investment in related pairs (Thünken et al., 2007), or in rodents such as *Marmota*

flavipentris, despite the lower survival of inbred progeny (Olson et al., 2012). On the other hand, ring-tailed lemurs or mole rats living in socially structured groups systematically avoid inbreeding (Cooney and Bennett, 2000; Boulet et al., 2009).

Assessing inbreeding avoidance patterns, that is, the occurrence of inbreeding avoidance and the behavioural strategies implied, is a difficult task that requires the estimation of relatedness coefficients between actual and potential mates (Szulkin et al., 2013). This may explain why most field studies have been conducted on large species of mammals or birds, for which monitoring is much easier compared to small invertebrates (Cohas et al., 2008; Herfindal et al., 2014; Arct et al., 2015; Hardouin et al., 2015)). It is therefore no surprise that inbreeding avoidance patterns have been rarely documented in insects, especially in the wild (but see (Robinson et al., 2012) for a field assessment of optimal inbreeding in *Drosophila melanogaster*).

In this study, we take up this challenge by studying, in the field, a parasitoid wasp with a simple form of inbreeding depression. Many species of the order Hymenoptera have single-locus complementary sex determination (sl-CSD) whereby sex is determined by both ploidy and heterozygosity at a unique sex determination locus (Cook, 1993; van Wilgenburg et al., 2006; Heimpel and de Boer, 2008). Males develop from unfertilized haploid eggs whereas females develop from fertilized diploid eggs. Inbreeding depression arises for diploids that are homozygous at the sex locus: instead of developing normally into females, they turn into abnormal diploid males that are generally unviable or sterile (Cook, 1993; van Wilgenburg et al., 2006; Fauvergue et al., 2015). Whatever the diversity of sex alleles in the population, full sibs have 50% chance of sharing a common sex allele, and, should they mate, half of their diploid offspring develops into unfit males (Cook, 1993). Hence, assuming females fertilize half of their eggs, sib-mating results in 12.5% fewer offspring, on average. sl-CSD is thus a form of inbreeding depression underlined by overdominance, with no

deleterious alleles at the sex locus but a strong heterozygous advantage (Charlesworth and Willis, 2009). The low fitness of diploid males should favour sib-mating avoidance.

In the parasitoid wasp *Venturia canescens* Gravenhost (Hymenoptera: Ichneumonidae) single locus complementary sex determination (Beukeboom, 2001) has a negative impact on the fitness of both males (Chuine et al., 2015) and females (Vayssade, 2014). Consistently, mating success in no-choice bioassays decreases with increasing genetic relatedness (Metzger et al., 2010a; Chuine, 2014; Chuine et al., 2015). Circumstantial evidence suggest that females are the choosy sex, which makes sense in a species with a monandrous/polygenous mating system (Beukeboom, 2001; Metzger et al., 2010b; Fauvergue et al., 2015).

In this study, we developed a population genetic approach based on microsatellite genotyping in order to assess inbreeding avoidance and underlying behaviours in field populations of *Venturia canescens*. To fulfil this objective, we first sampled two natural populations of *V. canescens* and compared the observed rate of sib-mating to the probability of random encounter among genetically-related individuals. Under the hypothesis of sib-mating avoidance, we expected the rate of sib-mating to be smaller than the probability that relatives encounter at random. In a follow-up experiment, we further explored the effect of density and average relatedness on inbreeding avoidance, with the expectation that sib-mating avoidance should decrease with decreasing density and increasing relatedness. Finally, we used the field data to test whether sex-biased dispersal could limit encounters among sibs in the field. We show that sib-mating tolerance occurs in the wild, and propose an evolutionary scenario to explain why this result contrasts with earlier findings and prior expectations.

Materials and Methods

Biological model

Venturia canescens is a solitary endoparasitoid found in most circum-Mediterranean areas ((Salt, 1976). Females lays eggs in a large range of hosts found on various fruits (Salt, 1976; Driessen and Bernstein, 1999; Collet et al., 2016). Some hosts of *V. canescens*, like *Ectomyelois ceratoniae* have a scarce distribution, with a single larva developing in rare infested fruits (Driessen and Bernstein, 1999). Males search for females via a synergistic combination of volatile sex pheromones emitted by females and kairomones from hosts ((Amat et al., 2009; Metzger et al., 2010b). Immature development time and adult lifespan are both around three weeks (at 25°C), which yields overlapping generations. Adults are good dispersers, with a flight velocity estimated at 0.2 m.s⁻¹ (Schneider et al., 2002; Amat et al., 2012).

Insect sampling in the field

Adult *V. canescens* were captured from June to September 2014, across 10 non-consecutive days. Two field sites located 300 km apart were sampled: Valence (N 44°58'21" E 4°55'39", composed of fruit trees in an orchard) and Nice (N 43°41'23" E 7°18'6", composed of carob trees in a semi-natural park). We captured only females in Valence and wasps of both sexes in Nice.

Two different types of traps were used: kairomone-baits for the capture of live females, and yellow sticky traps for males, which were generally found dead. Female traps constituted of an open cup containing host larvae, *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), along with used rearing medium (semolina). Saliva secreted by host larvae when feeding serves as a kairomone for female *V. canescens* (Corbet, 1971). Traps were hung in trees (Metzger et al., 2008) and visited every 20 minutes to capture attracted females. For males, we used yellow sticky traps baited with extracts from females and hosts, a method that has already proved successful (Collet et al., 2016). Traps consisted of a 125 mm × 200 mm yellow sticky trap with a vial containing the extracts attached in its centre. As for females, traps were hanged within host trees, and all the *V. canescens* males that were found stuck on the traps were

collected and conserved individually in 96% ethanol to preserve DNA. We captured 77 females and 86 males in Nice and 78 females in Valence (see Results and Table 1).

Insect rearing

The wild females trapped were brought back to the laboratory where they were handled in a climatic chamber under constant conditions (24±1°C, 60±10% RH, LD 16:8) and fed with 50% water-diluted honey. Each female was allowed to lay eggs individually in *E. kuehniella* hosts for three days. As sexual and asexual strains coexist in *V. canescens* (Beukeboom et al., 1999; Schneider et al., 2002), we used the presence of males among offspring as evidence for arrhenotoky. Mothers and their offspring were killed and preserved individually in 96% ethanol. Thelytokous individuals were discarded.

Genotyping

Genotyping was performed based on 18 microsatellites developed by (Collet et al., 2016) and (Mateo Leach et al., 2012) (See SEM-A for details on the genotyping and SEM-D for details on the number of microsatellites used). We genotyped all field-captured males and females (hereafter referred to as wild females) and up to three daughters per female (see SEM-B for a justification of the number of offspring genotyped). When there were fewer than three daughters per female (ca. 40%), all were genotyped.

We estimated polymorphism and linkage disequilibrium at each microsatellite locus for the wild females of Nice and Valence with the GENEPOP software version 4.3 (Raymond and Rousset, 1995). The frequency of null alleles was estimated with FREE NA software (Chapuis and Estoup, 2007). Population differentiation was estimated based on Wright's F estimator F_{st} with the FSTAT software version 2.9.3 (Goudet, 1995). Effective population sizes were estimated using the full likelihood method, assuming random mating, developed by (Wang, 2009), and implemented in COLONY software (Jones and Wang, 2010). As effective population sizes were small (< 80), we did not check for Hardy-Weinberg equilibrium. We also sought for diploid males as a proxy of consanguinity and of the number of alleles at *csd* locus. A male was considered diploid if heterozygous at one or more microsatellite locus, haploid otherwise (Collet et al., 2016).

Inference of father genotype from field data and estimation of partner relatedness

- Inference of mate's genotype

We inferred the genotype of wild females' mates based on the genotypes of wild females and their offspring. For this, we used the software COLONY, which reconstructs families based on haplodiploid genotypes (Jones and Wang, 2010). When alternative genotypes were proposed for a given female's mate, we selected the only compatible one on a case-by-case basis. We successfully inferred

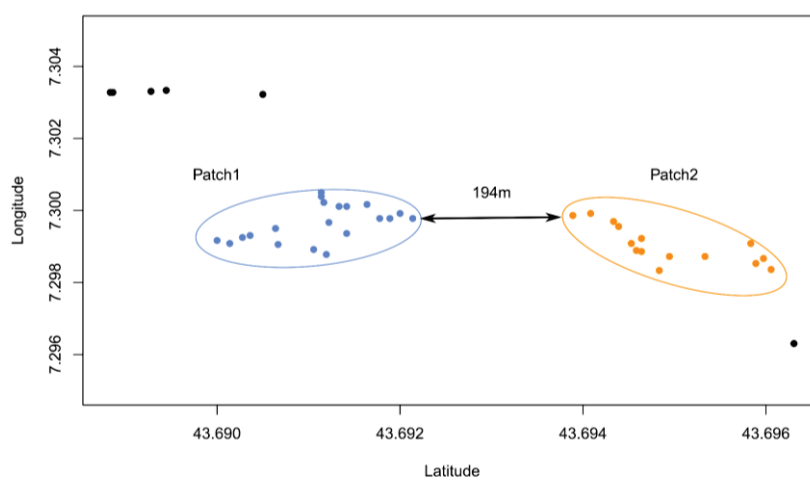


Figure 1 – Location of carob trees from the Nice field site where *Venturia canescens* were captured during the summer 2014. Each dot represents a tree. Axes are GPS coordinates. Blue dot represent trees of “Patch 1” and orange dots represent trees of “Patch 2” (see also Table 2). Six trees (black dots) were included in neither of the two patches, as they did not fit our definition of patches.

51 mates' genotypes for the 54 mothers (see Results and Table 1).

- Estimation of relatedness between potential *versus* mated partners in the field

To assess if *V. canescens* females avoid mating with their relatives in the field, we compared the observed number of wild females mated with a related male to the number expected under the assumption of random mating. For this, we determined a "relatedness threshold" above which individuals were considered related. To determine this threshold, we simulated populations with similar allele frequencies at microsatellite loci to that of natural populations and a balanced sex ratio (see SEM-C for details on simulations). Simulations allowed to keep track of pedigrees, yielding a perfect knowledge of kinship for all potential mates. These were classified in three categories: full-sibs, half-sibs, or unrelated. Besides, we calculated the relatedness coefficient (r) for all female-male pairs from these simulated populations (software COANCESTRY; (Wang, 2011)). This allowed to estimate the optimal relatedness threshold minimizing the number of wrong assignments (i.e., unrelated pairs assigned related based on the threshold, or vice-versa). We found $r_{crit} = 0.16$ (SEM-D, Fig. S2). Logically, this threshold is lower than the theoretical relatedness between a brother and a sister ($r_{sister-brother} = 0.25$; $r_{brother-sister} = 0.5$) and in the interval of relatedness for 1st degree cousins ($r = 0.125$ or $r = 0.1875$ depending on the cross). With this threshold, we expect to wrongly assign 11.4% of the relationships.

We applied this $r_{crit} = 0.16$ threshold to field data. First, we estimated the number of wild females that had been inseminated by a related male. Second, we generated a theoretical distribution of the number of couples with an $r \geq 0.16$ under the null hypothesis of random mating. For this, each of the 51 wild females from Nice, for which a mate genotype had been successfully inferred, was paired randomly with one of the 79 genotyped males, and we counted the number of pairs with $r \geq 0.16$. This calculation was

repeated 1000 times to produce the null distribution. We finally compared the observed number of related pairs with the null distribution via a permutation test implemented in the function AS.RANDTEST from the ADE4 package in R software version 3.2.3 (Chessel et al., 2004; R Core Team, 2015). We also estimated the probability that a female encountered a related male in the field the day of her capture.

Sex-biased dispersal in the field

Sex-biased dispersal can decrease the burden of inbreeding depression by reducing encounters and subsequent mating among sibs. We thus assessed the dispersal ability of males and females between in the population of Nice, where two trapping locations were distinguishable (Figure 1). The first patch contained a group of 21 trees and the second patch 15 trees. Trees were planted a few meters from one another within patches, and the two patches were about 200 m away. Six sampled trees further apart were not included in this scheme (black dots on Figure 1).

We calculated the relatedness between individuals of each sex within and between patches using COANCESTRY software (Wang, 2011). Sex-biased dispersal should result in higher coefficients of relatedness within patches than between patches for the sex dispersing at smaller distances (Prugnolle and de Meeus, 2002). Coefficients of relatedness inter-patch and intra-patch were compared via a Kruskal-Wallis test (with patch as an explanatory factor) for each sex separately. For the previous significant test, post-hoc (with Bonferroni corrections) Mann-Whitney's U -tests between the three modalities (i.e. relatedness within patch 1, relatedness within patch 2, and relatedness between patches) were performed.

Effect of male density and sib frequency on sib-mating avoidance

We aimed at untangling the effects of male density and the frequency of encounters with related males on female mate choice. We thus designed a factorial experiment with two

densities of males (high density, noted D , with nine males, and low density, noted d , with three males) and two frequencies of related males (high frequency, noted F , with 2/3 of brothers, and low frequency, noted f , with 1/3 of brothers). Males were marked according to kinship (brother vs unrelated) with a drop of paint applied on their thorax 24h before being tested. The two colours used did not modify behaviours (data not shown, and (Desouhant et al., 2003) but were nonetheless alternated randomly across the different trials. Each trial took place as follows: a virgin female, kept in an individual vial from emergence, was released in a mesh cage ($30 \times 30 \times 30$ cm) containing the males at 25°C , 65% RH and with a constant luminosity between 10 am and 4 pm. Courtship and mating behaviours were monitored for 30min or until a mating had occurred. We recorded mating latency, copulation duration, status (colour) of the successful male, number and timing of male rejections by females and status (colour) of rejected males. Twenty trials were performed per factor level, excepted for d-F (18 replicates). We analysed the proportion of sib-mating with the GEE-GLM approach (Generalized Estimating Equation – Generalized Linear Model; (Liang and Zeger, 1986) implemented with a binomial distribution and a logit link function, an exchangeable correlation structure and a fixed scale. The model was fitted with the GEEPACK package in R software with families as clusters (Højsgaard et al., 2006). We also tested whether the latency before copulation was impacted by the density of males, the proportion of related males and the number and timing of rejected males (either related or unrelated) with a Cox model with mixed effects, with the families as random

effect (COXME package in R software, (Therneau, 2015).

Results

Genotyping

A total of 241 wasps were captured in Valence and in Nice. In Valence, 78 wild females were captured (Table 1), among which 44 produced a total of 86 daughters (Table 1; 5.1 ± 0.4 offspring including 2.0 ± 0.2 daughters per female). In Nice, 86 males and 77 females were captured, among which 57 produced 140 daughters (Table 1; 4.8 ± 0.3 offspring including 2.5 ± 0.1 daughters per female). We genotyped 467 of these individuals at 18 microsatellite markers. We obtained the genotype at all 18 microsatellites for 402 individuals; for 50 individuals, 15 to 17 markers were amplified, for 11 individuals, 1 to 10 markers were amplified, and for four individuals, we obtained no amplification (Table 1). Only individuals with successful amplification at 15 loci or more were included in the dataset, which represented 452 individuals (96.8%).

No linkage disequilibrium was detected and null allele frequency was always lower than 6.5% in both populations. We found no genetic differentiation between the two populations ($F_{st} = 0.01$). We nonetheless treated the two populations separately because the probability that a male captured in one population had inseminated a female captured in the other is negligible. Effective population sizes were estimated at 79 for Nice (IC 95% [44; 82]) and 51 for Valence (IC 95% [26; 56]). These values are low and not significantly different.

Table 1 – Number of adult *Venturia canescens* captured in the wild populations of Nice and Valence. Pop = population; Number of mothers = number of females captured in the field and which have produced at least one daughter; F = female, M = male.

Pop	Sex	Wild individuals	Wild individuals successfully genotyped	Number of mothers	Total number of daughters	Daughters successfully genotyped
Nice	F	77	77 (100%)	54	140	134 (96%)
	M	86	79 (92%)	-	-	-
Valence	F	78	77 (99%)	35	86	85 (99%)

Sib-mating avoidance in the field? Relatedness of actual versus potential mates

In Nice, the mean coefficient of relatedness between wild males and females was $r = 0.047 \pm 0.001$. We estimated that $11\% \pm 0.79\%$ (IC 95%) of the relatedness coefficients between these individuals were higher than the threshold $r_{crit} = 0.16$ (671 comparisons over 6083, from 79 males \times 77 females); the corresponding pairs were considered as genetically related. The average probability that a female encountered a related male in the field the day of its capture was $12.0\% \pm 4.9$ (Fig. 2).

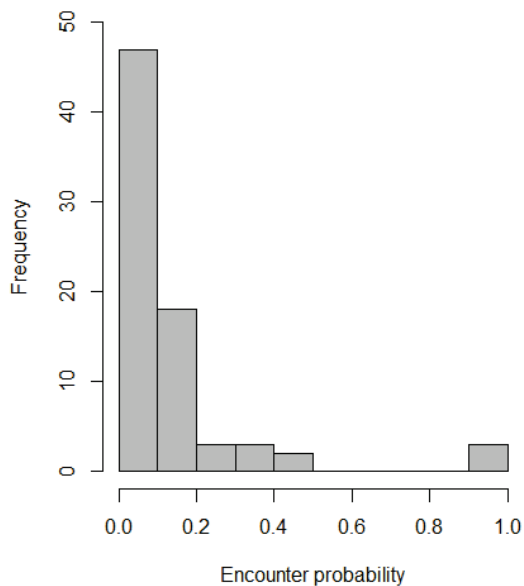


Figure 2 – Distribution of the probability that a female *Venturia canescens* encountered a genetically related male during the day of capture in the Nice population. For each female caught, we computed its relatedness with all males captured the same day. We then counted the number of relationships with $r \geq 0.16$ and we divided this number by the total number of relatedness computed (*i.e.* the number of males captured the same day).

Thirty-five and 54 wild females from Valence and Nice, respectively, produced at least one female offspring, allowing us to infer the genotype of their male mate (Table 1). The mean relatedness between these inferred pairs was 0.050 ± 0.009 in Nice and 0.044 ± 0.013 in Valence. Assuming $r_{crit} = 0.16$, we found six and four genetically related pairs in Nice and

Valence, respectively, that is, $11.1\% \pm 8.4\%$ and $11.4\% \pm 10.5\%$ of all pairs. For the population of Nice, this observed number of related pairs did not differ from the number expected under the assumption of random mating (1000 permutations; mean number of related pairs expected under random mating assumption = 5.264; number observed = 6, $p = 0.822$; Fig. 3).

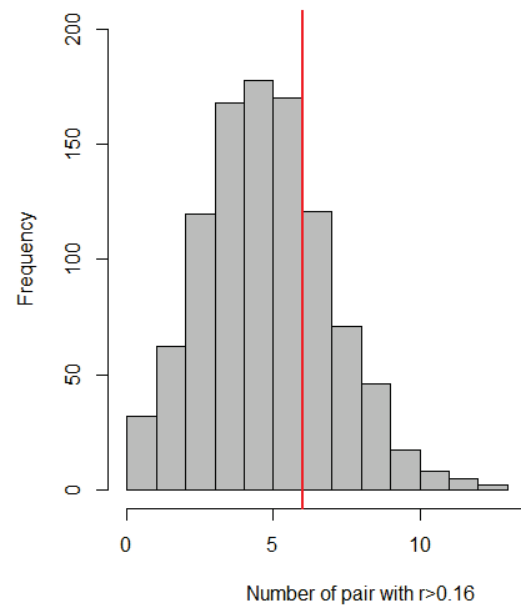


Figure 3 – Theoretical distribution of the number of crosses between genetically related male and female *Venturia canescens* under the assumption of random mating. The theoretical distribution was built using random sampling of a mate for each of the 51 females from the Nice population, estimating r for each pair and counting those with $r > 0.16$. Sampling was reiterated 1000 times. The red line represents the observed number of pairs with a $r > 0.16$.

Proportion of diploid males and number of CSD alleles

In species with SI-CSD, diploid males result from matched matings (parents sharing a common allele at the *csd* locus), and the probability of matched mating in a panmictic population is $2/k$, where k is the effective number of *csd* alleles. Hence, the number of alleles at the *csd* locus is inversely proportional to the frequency of diploid males (Cook, 1993; Cook and Crozier, 1995). We estimated the number of *csd* alleles in the population of Nice, where random mating is suggested by the

previous result. Six males were found diploid among 79 males captured ($7.6\% \pm 5.8\%$, IC 95%) yielding an estimation of 13.8 alleles at the *csd* locus (83 diploid individuals/6 diploid males) and a probability $p = 0.14$ of matched matings.

Sex-biased dispersal in the field

We captured 50 females and 47 males in patch 1, 18 females and 22 males in patch 2. Genetic relatedness was estimated among females and among males within patches (referred to as 1-1 for intra Patch 1 and 2-2 for intra Patch 2) as well as between patches (referred to as 1-2) (Table 2). Mean relatedness differed significantly within and between patches for females (Kruskal-Wallis test: $\chi^2 = 14.88$, $df = 2$, $p < 1.10^{-4}$) but not for males (Kruskal-Wallis test: $\chi^2 = 1.72$, $df = 2$, $p = 0.424$).

For females, relatedness was similar within each of two patches (1-1 and 2-2; Mann-Whitney test: $U = 80550$, $p = 0.520$; Table 2) and higher than between patches (1-1 / 1-2 comparison, Mann-Whitney test: $U = 56724$, $p < 4.10^{-4}$; 2-2 / 1-2 comparison, Mann-Whitney test: $U = 65356$, $p = 0.012$). Therefore, sex-biased dispersal occurs in *V. canescens*, with males dispersing more than females.

Effect of male density and sib frequency on sib-mating avoidance

Mating success was higher at high male density, with 40 matings / 49 trials (81.6%) in high density conditions (*D*) versus 38 matings / 86 trials (44.1%) in low density conditions (*d*) (Table 3; proportion test: $\chi^2 = 16.44$, $df = 1$, $p = 5.02 \cdot 10^{-5}$). Mate choice did not depart from expected proportions of sib-mating under random mating (GEE-GLM model, *p*-value of the Intercept = 0.3). This was confirmed by a positive relationship between the proportion of related males and the probability of sib-mating (analysis of the Wald statistic table with an ANOVA, $\chi^2 = 15.36$, $df = 1$, $p = 8.9 \cdot 10^{-5}$). Male density had no effect on mate choice ($\chi^2 = 0.92$, $df = 1$, $p = 0.34$) and there was no interaction between male density and the proportion of related males ($\chi^2 = 0$, $df = 1$, $p = 1$). Time before

copulation decreased with increasing male density and increasing number of sib rejections (Cox-hazard model with mixed effect, $p = 3.17 \cdot 10^{-7}$ and $p = 1.36 \cdot 10^{-3}$ respectively, Table 4), but was affected by neither the proportion of related males, nor the number of rejections of unrelated males ($p = 0.19$ and $p = 0.16$ respectively, Table 4).

Table 2 – Mean relatedness r (\pm SE) among females and among males of *Venturia canescens*, either within patches (1-1 or 2-2) or between patches (1-2) of host plants (carob trees) in the population of Nice. F = female, M = male.

Sex	Patch	Mean r (\pm SE)
F	1-1	0.065 \pm 0.002
	2-2	0.060 \pm 0.006
	1-2	0.050 \pm 0.002
M	1-1	0.042 \pm 0.002
	2-2	0.048 \pm 0.006
	1-2	0.043 \pm 0.003

Discussion

Sib-mating avoidance in *Venturia canescens* had been observed in behavioural experiments performed in the laboratory (Metzger et al., 2010a). In contrast, the genetic approach developed in this study shows that in field populations the observed frequency of matings between genetically related males and females is similar to the probability of sib-mating expected under an assumption of completely random encounters. Our study thus suggests that sib-mating tolerance occurs in the wild. A follow-up laboratory bioassay allowing mate choice further demonstrate that the density of males and the proportion of related individuals do not change the pattern of inbreeding avoidance: females do not use relatedness as a cue to choose their mates. This latter experiment nonetheless confirm that females can discriminate sibs from non-sibs and shows that the latency before copulation

decreases after the rejection of a sib. Besides, our field data suggest sex-biased dispersal, although without yielding passive sib-mating avoidance. In the remainder of the discussion, we propose an evolutionary scenario to explain the apparent discrepancy between patterns observed in the field and in the laboratory.

Table 3 - Effect of male density and sib frequency on sib-mating avoidance in *Venturia canescens*. Two densities of males (D : high density = 9 males, and d : low density = 3 males) and two frequencies of brothers (F : high frequency = 2/3 brothers and f : low frequency = 1/3 brothers) were manipulated in a cage experiment. Here, we present the number of successful matings for each modality (20, except for the dF modality where only 18 were reached).

	Mating	D	d
F	Brother	12	12
	Unrelated	8	6
	Successful	20/23 trials	18/44 trials
f	Brother	6	6
	Unrelated	14	14
	Successful	20/26 trials	20/42 trials

Mating rates between relatives, be they inferred from genetic analyses or from a simulation model assuming random encounters between males and females, were both equal to 11%. Consistently, in laboratory cages, the proportion of sib-mating perfectly matched the proportion of sibs present. Both results are congruent with an absence of sib-mating avoidance in *Venturia canescens*, and questions past evidence of kin recognition in the contexts of both host parasitization (Bernstein and Driessen, 1996; Marris et al., 1996) and mate choice (Metzger et al., 2010a; Chuine et al., 2015). In their experiments, (Metzger et al., 2010a) showed with no-choice tests that a female mated twice more often with unrelated males than with their brothers, and were therefore capable of sib-mating avoidance. Sib-mates were also discriminated against in the presence of odours from brothers, suggesting that mate-choice was underlined by volatile

cues ((Bernstein and Driessen, 1996; Marris et al., 1996; Metzger et al., 2010a; Chuine et al., 2015). We confirmed this ability of kin recognition in our choice test, the rejection of brothers (but not that of unrelated males) decreasing the female copulation latency.

We propose several hypotheses to explain these differences in results. First, we could face the ghost of a past selection for sib-mating avoidance. If the cost of inbreeding was higher in the evolutionary history of *V. canescens*, behaviours allowing kin recognition and reducing the risk of inbreeding could have been selected for. We found male-biased dispersal at a local scale (Table 2), which is quite rare in non-social insects (Lagisz et al., 2010; Bennett et al., 2013; Downey et al., 2015). This mechanism of sex-biased dispersal is sometimes responsible for inbreeding avoidance (Gandon, 1999; Roze and Rousset, 2005). For instance, in the mountain roe deer *Capreolus capreolus*, sib avoidance occurs during the mating season (summer). This genetic pattern is probably underlined by short-range breeding excursions by females, outside their usual home range, a behaviour which can decrease the probability of mating with a relative (Biosa et al., 2015). Although sex-biased dispersal seems to have no influence on sib-mating in our population, it could decrease the selective pressure acting on sib-mating avoidance by reducing the sib encounter rate. We indeed found that the distribution of sib-encounter probability is skewed towards zero, leading to more than half of the females having no chance to encounter a related male on a particular day, possibly because of the low number of individuals in the field or as a result of sex-biased dispersal (Fig. 2). The average probability for a female to encounter a relative is nonetheless in the same range as actual sib-mating (12%; Fig. 2). Kin recognition mechanisms could then have persisted, but not sib-mating avoidance.

The second hypothesis is that female choosiness in *V. canescens* is density-dependent, as shown in other species (Kokko and Rankin, 2006; Duthie and Reid, 2016). Sib-mating avoidance would arise in dense or aggregated populations with high mate

encounter rates, but not in scarce populations where the cost of discrimination – remaining virgin – is higher. This was shown in a small isolated population of moose, with females accepting higher levels of inbreeding in years where males are less available (Herfindal et al., 2014). A similar reasoning may also hold true for highly inbred populations, where sib-mating avoidance would result in a high probability of not mating at all, a penalty that could exceed inbreeding depression (Kokko and Ots, 2006). In *V. canescens*, density affected mating success but not sib-mating probability. Besides, the proportions of related males that we tested in the laboratory were respectively twice and four times higher than those found in the field, and still, no sib-mating avoidance was observed. We therefore conclude that *V. canescens* does not avoid sib-mating, whatever the density of males and the level of inbreeding.

Table 4 – Effect of male density, sib frequency and the number of male rejections on time before mating in *Venturia canescens*. We analysed the deviance table of the Mixed-effect Cox model with the female families as random effect.

	Log likelihood	χ^2	df	p-value
NULL	-351.51			
Male density	-338.44	26.14	1	3.17 .10 ⁻⁷
Sib frequency	-337.57	1.74	1	0.19
Rejection of sib	-332.45	10.25	1	1.36 .10 ⁻³
Rejection of unrelated	-331.46	1.97	1	0.16
Density × sib frequency	-331.46	0.01	1	0.92

The third hypothesis is that the absence of sib-mating avoidance despite kin recognition could arise if female discrimination against related males decays over time. In a number of species, females adapt future mate choice according to the genotype of their first mate (lizards: (Laloi et al., 2011; Breedveld and Fitze, 2015), beetles: (Dowling et al., 2007), Drosophila: (Chapman and Partridge, 1998)). However, this hypothesis does not hold for *V. canescens* because females are monoandrous (Metzger et al., 2010b). Nonetheless, encountering a succession of low-quality (*i.e.* related) males could still affect female choice. We have shown in the lab experiment that even if females did not avoid sib-mating, their latency before copulation decreased significantly after having rejected a brother. This result confirms that *V. canescens* is capable of discriminating relatives in the context of mating (Metzger et al., 2010a; Chuine, 2014; Chuine et al., 2015) and suggests that the presence of relatives affects mating by decreasing the latency before copulation.

An alternative argument to explain the observed lack of evidence for kin discrimination in our field study is the misclassification of cousins or more distant individuals as full sibs. The reasoning is that when genetic relatedness decreases to that of cousins ($r \leq 0.1875$) sib-mating avoidance in *V. canescens* declines steeply ((Chuine, 2014). Hence, misclassifying cousins as brothers should yield an absence of mating avoidance, with no surprise. This is nonetheless unlikely. First, we classified pairs as sibs versus non-sibs based on a threshold $r_{crit} = 0.16$ that proved to minimize the probability of misclassification (about 10% of errors). Second, increasing this threshold to further restrict the definition of kinship did not change our conclusions, that is, the observed number of related pairs was always similar to that expected under random mating ($r_{crit} = 0.2$: 1000 permutations, 2 observed related pairs, 1.88 expected related pairs, $p = 1$; $r_{crit} = 0.25$: 1000 permutations, 0 observed related pairs, 0.999 expected related pairs, $p = 0.637$). Hence, the hypothesis that poor kinship assignment has yielded spurious results falls short of argument, and we conclude that the lack of

evidence for sib-mating avoidance truly reflects a lack of sib-mating avoidance.

Tolerance to sib-mating, as observed in *Venturia canescens*, is often explained by low inbreeding depression or high cost of outbreeding (Kokko and Ots, 2006; Puurtinen, 2011). In *V. canescens*, inbreeding has only a moderate negative impact on egg load and hatching rate, and no effect on other fitness components such as mating probability or body size (Vayssade et al., 2014). Despite common beliefs, the genetic load resulting from sl-CSD might not be dramatic either. In the population of Nice, we estimated 13.8 alleles at the *csd* locus, which is in the range of what was previously found in Hymenoptera (8-86 alleles, mostly between 9 to 20; (Cook and Crozier, 1995). Under random mating, this yields a probability of matched-mating of 14% (2/13.8). In case of brother sister-mating, the probability of matched mating increases to 50%. Assuming that females fertilize half of their eggs so that matched mating results in 25% diploid males, and that diploid males are sterile (Fauvergue et al. 2015), the expected reduction in the number of fertile offspring is 3.5% (0.14×0.25) under random mating. If sib-mating was perfectly avoided, this expected reduction would be 2.3% (0.09×0.25 , see SEM-E for the calculation). Sib-mating avoidance would thus result in about 1% more fertile offspring in the populations we studied, a fitness gain that may appear insignificant. Hence, the relatively low probability of matched mating and the consequent benign inbreeding load may be insufficient to select for sib-mating avoidance.

V. canescens could satisfy the hypothesis of inbreeding tolerance (Waser et al., 1986; Kokko and Ots, 2006). Tolerance to sib-mating is found in other taxa, such as mammals or birds (Szulkin et al., 2009; Nichols et al., 2014; Reynolds et al., 2014), despite evidence for costs of inbreeding (Billing et al., 2012; Olson et al., 2012; Reid et al., 2015). However, we also found a low effective size in both sample sites ($N_e = 51$ in Valence, $N_e = 79$ in Nice), in the same range as threatened bumblebees populations (Ellis et al., 2006) and some endangered populations of Hine's emerald dragonfly (Monroe and Britten, 2015).

Therefore, *V. canescens* can be prone to loss of genetic diversity, which can be amplified by inbreeding tolerance. However, the *csd* alleles are under strong balancing selection, and thus could overcome the genetic impoverishment as in populations of Asiatic honeybee (Gloag et al., 2016).

At last, the discrepancies between sib-mating avoidance in the lab and inbreeding tolerance in the field could come from the fact that kin-recognition mechanisms could have evolved for other purposes than sib-mating avoidance. Evidence for active kin recognition is indeed pervasive in other ecological contexts such as territory defence, reciprocal altruism, or dominance hierarchies and so on (Mateo, 2004). In *Venturia canescens* the evolution of kin recognition in a superparasitism avoidance context could explain the maintenance of recognition without sib-mating avoidance. Indeed, females are able to discriminate the self, their relatives and their conspecifics when laying their eggs, by avoiding already parasitized hosts (superparasitism avoidance). As *V. canescens* is a solitary species, only one offspring at most will emerge from a host and therefore superparasitism has a high cost for female fitness. Moreover, the intensity of superparasitism avoidance increases with their relatedness to the first laying female (Hubbard et al., 1987; Marris et al., 1996; Amat et al., 2009). Under the hypothesis of a primary evolution of kin recognition in the parasitism context and a secondary use in mate choice, the molecular pathways of sib recognition in the two ecological contexts should therefore be close. Previous work has shown that kin recognition during mating was probably mediated by semiochemicals from the insect cuticle in this species (cuticular hydrocarbons, (Metzger et al., 2010a; Chuine, 2014). On the other hand, the discrimination of superparasitized larvae is driven by the chemical volatiles (hydrocarbons) that are left by the female during oviposition (Fisher, 1961; Harrison et al., 1985). The similarities between both chemical information enable us to question the existence of a unique pathway for kin recognition in both contexts and therefore reconcile the laboratory results with our field study. Superparasitism avoidance could be a

strong selective pressure linked to the maintenance of kin recognition, as the costs of superparasitism are positively correlated with the relatedness between the competing females. Further experiments are needed to appraise the hypothesis that sib-mating avoidance previously observed in the lab could be a by-product of this recognition.

Authors' contributions

M.C., I.A., X.F., L.M. and E.D. designed the experiment and M.C., S.S and A.A collected the data. M.C., I.A., L.M. and E.D. designed and interpreted the analyses. M.C. conducted the analyses and assembled a first draft. M.C., I.A., X.F., L.M. and E.D. all contributed to revisions.

Acknowledgments

We want to thank François Debias for his help in the field capture of insects, rearing and technical assistance, and Aurélie Blin for technical advices on genotyping. We thank Angèle, Anatole and Auguste Desouhant for their help in the field sampling. This work was partly funded thanks to Agence Nationale de la Recherche ("Sextinction" project, ANR-2010-BLAN-1717). We declare no conflict of interest.

Data accessibility

The data set used for the main analyses, the scripts to recreate the results and the figures are available from the Dryad Digital Repository <http://dx.doi.org/>

Bibliography

- Amat, I., Besnard, S., Foray, V., Pelosse, P., Bernstein, C., Desouhant, E., 2012. Fuelling flight in a parasitic wasp: which energetic substrate to use? *Ecol. Entomol.* 37, 480–489. doi:10.1111/j.1365-2311.2012.01388.x
- Amat, I., Desouhant, E., Bernstein, C., 2009. Differential use of conspecific-derived information by sexual and asexual parasitic wasps exploiting partially depleted host patches. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 63, 563–572. doi:10.1007/s00265-008-0691-4

- Angeloni, F., Ouborg, N.J., Leimu, R., 2011. Meta-analysis on the association of population size and life history with inbreeding depression in plants. *Biol. Conserv.* 144, 35–43. doi:10.1016/j.biocon.2010.08.016
- Arct, A., Drobnik, S.M., Cichoń, M., 2015. Genetic similarity between mates predicts extrapair paternity—a meta-analysis of bird studies. *Behav. Ecol.* 26, 959–968. doi:10.1093/beheco/arv004
- Banks, S.C., Lindenmayer, D.B., 2014. Inbreeding avoidance, patch isolation and matrix permeability influence dispersal and settlement choices by male agile antechinus in a fragmented landscape. *J. Anim. Ecol.* 83, 515–524. doi:10.1111/1365-2656.12128
- Bateson, P., 1983. Optimal outbreeding, in: *Mate Choice*. Cambridge University Press, pp. 257–278.
- Bateson, P., 1982. Preferences for cousins in Japanese quail. *Nature* 295, 236–237. doi:10.1038/295236a0
- Bennett, V.J., Pack, S.M., Smith, W.P., Betts, M.G., 2013. Sex-biased dispersal in a rare butterfly and the implications for its conservation. *J. Insect Conserv.* 17, 949–958. doi:10.1007/s10841-013-9577-5
- Bernstein, C., Driessen, G., 1996. Patch-Marking and Optimal Search Patterns in the Parasitoid *Venturia canescens*. *J. Anim. Ecol.* 65, 211. doi:10.2307/5724
- Beukeboom, L., Driessen, G., Luckerhoff, L., Bernstein, C., Lapchin, L., Van Alphen, J., 1999. Distribution and relatedness of sexual and asexual *Venturia canescens* (Hymenoptera). *Proc Exp Appl Entomol Neth NEV Amst.* 10, 23–28.
- Beukeboom, L.W., 2001. Single-locus complementary sex determination in the ichneumonid *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera). *Neth. J. Zool.* 51, 1–15.
- Billing, A.M., Lee, A.M., Skjelseth, S., Borg, Å.A., Hale, M.C., Slate, J., Pärn, H., Ringsby, T.H., Sæther, B.-E., Jensen, H., 2012. Evidence of inbreeding depression but not inbreeding avoidance in a natural house sparrow population. *Mol. Ecol.*

- 21, 1487–1499. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05490.x
- Biosa, D., Grignolio, S., Sica, N., Pagon, N., Scandura, M., Apollonio, M., 2015. Do relatives like to stay closer? Spatial organization and genetic relatedness in a mountain roe deer population. *J. Zool.* 296, 30–37. doi:10.1111/jzo.12214
- Bonte, D., Van Dyck, H., Bullock, J.M., Coulon, A., Delgado, M., Gibbs, M., Lehouck, V., Matthysen, E., Mustin, K., Saastamoinen, M., Schtickzelle, N., Stevens, V.M., Vandewoestijne, S., Baguette, M., Barton, K., Benton, T.G., Chaput-Bardy, A., Clobert, J., Dytham, C., Hovestadt, T., Meier, C.M., Palmer, S.C.F., Turlure, C., Travis, J.M.J., 2012. Costs of dispersal. *Biol. Rev.* 87, 290–312. doi:10.1111/j.1469-185X.2011.00201.x
- Boulet, M., Charpentier, M.J., Drea, C.M., 2009. Decoding an olfactory mechanism of kin recognition and inbreeding avoidance in a primate. *BMC Evol. Biol.* 9, 281. doi:10.1186/1471-2148-9-281
- Breedveld, M.C., Fitze, P.S., 2015. A matter of time: delayed mate encounter postpones mating window initiation and reduces the strength of female choosiness. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 69, 533–541. doi:10.1007/s00265-014-1864-y
- Bretman, A., Wedell, N., Tregenza, T., 2004. Molecular evidence of post-copulatory inbreeding avoidance in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* 271, 159–164. doi:10.1098/rspb.2003.2563
- Chapman, Partridge, 1998. Sex-specific selection on time to remate in *Drosophila melanogaster*. *Anim. Behav.* 56, 1267–1278. doi:10.1006/anbe.1998.0900
- Chapuis, M.-P., Estoup, A., 2007. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24, 621–631. doi:10.1093/molbev/msl191
- Charlesworth, D., Willis, J.H., 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nat. Rev. Genet.* 10, 783–796. doi:10.1038/nrg2664
- Chessel, D., Dufour, A.-B., Thioulouse, J., 2004. The ade4 package-I- One-table methods. *R News* 4, 5–10.
- Chuine, A., 2014. Des mécanismes aux conséquences adaptatives du choix du partenaire sexuel pour la compatibilité génétique. Exemple d'un hyménoptère parasitoïde soumis à la dépression de consanguinité. Université Claude Bernard Lyon 1.
- Chuine, A., Sauzet, S., Debias, F., Desouhant, E., 2015. Consequences of genetic incompatibility on fitness and mate choice: the male point of view. *Biol. J. Linn. Soc.* 114, 279–286. doi:10.1111/bij.12421
- Cohas, A., Yoccoz, N.G., Bonenfant, C., Goossens, B., Genton, C., Galan, M., Kempnaers, B., Allainé, D., 2008. The genetic similarity between pair members influences the frequency of extrapair paternity in alpine marmots. *Anim. Behav.* 76, 87–95. doi:10.1016/j.anbehav.2008.01.012
- Collet, M., Vayssade, C., Auguste, A., Mouton, L., Desouhant, E., Malausa, T., Fauvergue, X., 2016. Diploid male production correlates with genetic diversity in the parasitoid wasp *Venturia canescens*: a genetic approach with new microsatellite markers. *Ecol. Evol.* 6, 6721–6734. doi:10.1002/ece3.2370
- Cook, J.M., 1993. Sex determination in the Hymenoptera: a review of models and evidence. *Heredity* 71, 421–435.
- Cook, J.M., Crozier, R.H., 1995. Sex determination and population biology in the hymenoptera. *Trends Ecol. Evol.* 10, 281–286. doi:10.1016/0169-5347(95)90011-X
- Cooney, R., Bennett, N.C., 2000. Inbreeding avoidance and reproductive skew in a cooperative mammal. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 267, 801–806. doi:10.1098/rspb.2000.1074
- Corbet, S.A., 1971. Mandibular gland secretion of larvae of the flour moth, *Anagasta kuehniella*, contains an epideictic pheromone and elicits oviposition

- movements in a Hymenopteran parasite. *Nature* 232, 481–484.
- Cornell, S.J., Tregenza, T., 2007. A new theory for the evolution of polyandry as a means of inbreeding avoidance. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 274, 2873–2879. doi:10.1098/rspb.2007.0926
- Desouhant, E., Driessen, G., Lapchin, L., Wielaard, S., Bernstein, C., 2003. Dispersal between host populations in field conditions: navigation rules in the parasitoid *Venturia canescens*. *Ecol. Entomol.* 28, 257–267. doi:10.1046/j.1365-2311.2003.00511.x
- Dowling, D.K., Friberg, U., Arnqvist, G., 2007. A comparison of nuclear and cytoplasmic genetic effects on sperm competitiveness and female remating in a seed beetle. *J. Evol. Biol.* 20, 2113–2125. doi:10.1111/j.1420-9101.2007.01433.x
- Downey, M.H., Searle, R., Bellur, S., Geiger, A., Maitner, B.S., Ohm, J.R., Tuda, M., Miller, T.E.X., 2015. A comparative approach to testing hypotheses for the evolution of sex-biased dispersal in bean beetles. *Ecol. Evol.* 5, 4819–4828. doi:10.1002/ece3.1753
- Driessen, G., Bernstein, C., 1999. Patch departure mechanisms and optimal host exploitation in an insect parasitoid. *J. Anim. Ecol.* 68, 445–459.
- Duthie, A.B., Reid, J.M., 2016. Evolution of Inbreeding Avoidance and Inbreeding Preference through Mate Choice among Interacting Relatives. *Am. Nat.* 188, 651–667. doi:10.1086/688919
- Ellis, J.S., Knight, M.E., Darvill, B., Goulson, D., 2006. Extremely low effective population sizes, genetic structuring and reduced genetic diversity in a threatened bumblebee species, *Bombus sylvarum* (Hymenoptera: Apidae): GENETIC STRUCTURING IN DECLINING BUMBLEBEES. *Mol. Ecol.* 15, 4375–4386. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03121.x
- Fauvergue, X., Chuine, A., Vayssade, C., Auguste, A., Desouhant, E., 2015. Sterile males in a parasitoid wasp with complementary sex determination: from fitness costs to population extinction. *BMC Ecol.* 15. doi:10.1186/s12898-014-0032-6
- Fisher, R., 1961. Study in Insect Multiparasitism .1. Host Selection and Oviposition. *J. Exp. Biol.* 38, 267–.
- Gandon, S., 1999. Kin Competition, the Cost of Inbreeding and the Evolution of Dispersal. *J. Theor. Biol.* 200, 345–364. doi:10.1006/jtbi.1999.0994
- Gloag, R., Ding, G., Christie, J.R., Buchmann, G., Beekman, M., Oldroyd, B.P., 2016. An invasive social insect overcomes genetic load at the sex locus. *Nat. Ecol. Evol.* 1, s41559-016-0011-016. doi:10.1038/s41559-016-0011
- Goudet, J., 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *J. Hered.* 86, 485–486.
- Greenwood, P.J., Harvey, P.H., Perrins, C.M., 1978. Inbreeding and dispersal in the great tit. *Nature* 271, 52–54. doi:10.1038/271052a0
- Hardouin, L.A., Legagneux, P., Hingrat, Y., Robert, A., 2015. Sex-specific dispersal responses to inbreeding and kinship. *Anim. Behav.* 105, 1–10. doi:10.1016/j.anbehav.2015.04.002
- Harrison, E.G., Fisher, R.C., Ross, K.M., 1985. The temporal effects of Dufour's gland secretion in host discrimination by *Nemeritis canescens*. *Entomol. Exp. Appl.* 38, 215–220. doi:10.1111/j.1570-7458.1985.tb03521.x
- Hatchwell, B.J., Russell, A.F., Ross, D.J., Fowlie, M.K., 2000. Divorce in cooperatively breeding long-tailed tits: a consequence of inbreeding avoidance? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 267, 813–819.
- Heimpel, G.E., de Boer, J.G., 2008. Sex Determination in the Hymenoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 53, 209–230. doi:10.1146/annurev.ento.53.103106.093441
- Herfindal, I., Haanes, H., Roed, K.H., Solberg, E.J., Markussen, S.S., Heim, M., Saether, B.-E., 2014. Population properties affect inbreeding avoidance in moose. *Biol. Lett.* 10, 20140786–20140786. doi:10.1098/rsbl.2014.0786
- Højsgaard, S., Halekoh, U., Yan, J., 2006. The R Package geepack for Generalized

- Estimating Equations. *J. Stat. Softw.* 15. doi:10.18637/jss.v015.i02
- Hubbard, S.F., Marris, G., Reynolds, A., Rowe, G.W., 1987. Adaptive Patterns in the Avoidance of Superparasitism by Solitary Parasitic Wasps. *J. Anim. Ecol.* 56, 387. doi:10.2307/5055
- Jones, O.R., Wang, J., 2010. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 551–555. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02787.x
- Keller, L.F., Waller, D.M., 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Evol.* 17, 230–241. doi:10.1016/S0169-5347(02)02489-8
- Kokko, H., Ots, I., 2006. When Not to Avoid Inbreeding. *Evolution* 60, 467–475. doi:10.1111/j.0014-3820.2006.tb01128.x
- Kokko, H., Rankin, D.J., 2006. Lonely hearts or sex in the city? Density-dependent effects in mating systems. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 361, 319–334. doi:10.1098/rstb.2005.1784
- Lagisz, M., Wolff, K., Sanderson, R.A., Laskowski, R., 2010. Genetic Population Structure of the Ground Beetle, *Pterostichus oblongopunctatus*, Inhabiting a Fragmented and Polluted Landscape: Evidence for Sex-Biased Dispersal. *J. Insect Sci.* 10. doi:10.1673/031.010.10501
- Laloi, D., Eizaguirre, C., Fédérici, P., Massot, M., 2011. Female choice for heterozygous mates changes along successive matings in a lizard. *Behav. Processes* 88, 149–154. doi:10.1016/j.beproc.2011.08.011
- Lardy, S., Cohas, A., Figueroa, I., Allaine, D., 2011. Mate change in a socially monogamous mammal: evidences support the “forced divorce” hypothesis. *Behav. Ecol.* 22, 120–125. doi:10.1093/beheco/arq168
- Liang, K.-Y., Zeger, S.L., 1986. Longitudinal Data Analysis Using Generalized Linear Models. *Biometrika* 73, 13–22. doi:10.2307/2336267
- Marris, G.C., Hubbard, S.F., Scrimgeour, C., 1996. The perception of genetic similarity by the solitary parthenogenetic parasitoid *Venturia canescens*, and its effects on the occurrence of superparasitism. *Entomol. Exp. Appl.* 78, 167–174. doi:10.1111/j.1570-7458.1996.tb00778.x
- Mateo, J.M., 2004. Recognition systems and biological organization: The perception component of social recognition. *Ann. Zool. Fenn.* 41, 729–745.
- Mateo Leach, I., Ferber, S., van de Zande, L., Beukeboom, L.W., 2012. Genetic variability of arrhenotokous and thelytokous *Venturiacanesens* (Hymenoptera). *Genetica* 140, 53–63. doi:10.1007/s10709-012-9657-6
- Metzger, M., Bernstein, C., Desouhant, E., 2008. Does constrained oviposition influence offspring sex ratio in the solitary parasitoid wasp *Venturia canescens*? *Ecol. Entomol.* 33, 167–174. doi:10.1111/j.1365-2311.2007.00953.x
- Metzger, M., Bernstein, C., Hoffmeister, T.S., Desouhant, E., 2010a. Does Kin Recognition and Sib-Mating Avoidance Limit the Risk of Genetic Incompatibility in a Parasitic Wasp? *PLoS ONE* 5, e13505. doi:10.1371/journal.pone.0013505
- Metzger, M., Fischbein, D., Auguste, A., Fauvergue, X., Bernstein, C., Desouhant, E., 2010b. Synergy in information use for mate finding: demonstration in a parasitoid wasp. *Anim. Behav.* 79, 1307–1315. doi:10.1016/j.anbehav.2010.03.003
- Monroe, E.M., Britten, H.B., 2015. Single-sample estimation of effective population size in several populations of the endangered Hine’s emerald dragonfly. *Freshw. Sci.* 34, 1058–1064. doi:10.1086/682073
- Nichols, H.J., Cant, M.A., Hoffman, J.I., Sanderson, J.L., 2014. Evidence for frequent incest in a cooperatively breeding mammal. *Biol. Lett.* 10, 20140898–20140898. doi:10.1098/rsbl.2014.0898
- Olson, L.E., Blumstein, D.T., Pollinger, J.R., Wayne, R.K., 2012. No evidence of inbreeding avoidance despite demonstrated survival costs in a

- polygynous rodent: NO INBREEDING AVOIDANCE IN A POLYGYNOUS RODENT. *Mol. Ecol.* 21, 562–571. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05389.x
- O’Riain, M.J., Bennett, N.C., Brotherton, P.N.M., McIlrath, G., Clutton-Brock, T.H., 2000. Reproductive suppression and inbreeding avoidance in wild populations of co-operatively breeding meerkats (*Suricata suricatta*). *Behav. Ecol. Sociobiol.* 48, 471–477. doi:10.1007/s002650000249
- Prugnolle, F., de Meeus, T., 2002. Inferring sex-biased dispersal from population genetic tools: a review. *Heredity* 88, 161–165. doi:10.1038/sj.hdy.6800060
- Pusey, A., Wolf, M., 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Trends Ecol. Evol.* 11, 201–206.
- Puurttinen, M., 2011. Mate Choice for Optimal (k)inbreeding. *Evolution* 65, 1501–1505. doi:10.1111/j.1558-5646.2010.01217.x
- R Core Team, 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna Austria.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. An Exact Test for Population Differentiation. *Evolution* 49, 1280–1283. doi:10.2307/2410454
- Reid, J.M., Arcese, P., Keller, L.F., Germain, R.R., Duthie, A.B., Losdat, S., Wolak, M.E., Nietlisbach, P., 2015. Quantifying inbreeding avoidance through extra-pair reproduction. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 69, 59–74. doi:10.1111/evo.12557
- Reynolds, S.M., Uy, J.A.C., Patricelli, G.L., Coleman, S.W., Braun, M.J., Borgia, G., 2014. Tests of the kin selection model of mate choice and inbreeding avoidance in satin bowerbirds. *Behav. Ecol.* 25, 1005–1014. doi:10.1093/beheco/aru065
- Robinson, S.P., Kennington, W.J., Simmons, L.W., 2012. Assortative mating for relatedness in a large naturally occurring population of *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 25, 716–725. doi:10.1111/j.1420-9101.2012.02466.x
- Roze, D., Rousset, F., 2005. Inbreeding Depression and the Evolution of Dispersal Rates: A Multilocus Model. *Am. Nat.* 166, 708–721. doi:10.1086/497543
- Salt, G., 1976. The hosts of *Nemeritis canescens*: a problem in the host specificity of insect parasitoids. *Ecol. Entomol.* 1, 63–67.
- Schneider, M.V., Beukeboom, L.W., Driessen, G., Lapchin, L., Bernstein, C., Van Alphen, J.J.M., 2002. Geographical distribution and genetic relatedness of sympatrical thelytokous and arrhenotokous populations of the parasitoid *Venturia canescens* (Hymenoptera). *J. Evol. Biol.* 15, 191–200. doi:10.1046/j.1420-9101.2002.00394.x
- Szulkin, M., Sheldon, B.C., 2008. Dispersal as a means of inbreeding avoidance in a wild bird population. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 703–711. doi:10.1098/rspb.2007.0989
- Szulkin, M., Stopher, K.V., Pemberton, J.M., Reid, J.M., 2013. Inbreeding avoidance, tolerance, or preference in animals? *Trends Ecol. Evol.* 28, 205–211. doi:10.1016/j.tree.2012.10.016
- Szulkin, M., Zelazowski, P., Nicholson, G., Sheldon, B.C., 2009. Inbreeding avoidance under different null models of random mating in the great tit. *J. Anim. Ecol.* 78, 778–788. doi:10.1111/j.1365-2656.2009.01544.x
- Therneau, T.M., 2015. *coxme: Mixed Effects Cox Models*.
- Thünken, T., Bakker, T.C.M., Baldauf, S.A., Kullmann, H., 2007. Active Inbreeding in a Cichlid Fish and Its Adaptive Significance. *Curr. Biol.* 17, 225–229. doi:10.1016/j.cub.2006.11.053
- Tregenza, T., Wedell, N., 2002. Polyandrous females avoid costs of inbreeding. *Nature* 415, 71–73. doi:10.1038/415071a
- van Wilgenburg, E., Driessen, G., Beukeboom, L.W., 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera: an “unintelligent” design? *Front. Zool.* 3, 1. doi:10.1186/1742-9994-3-1
- Vayssade, C., 2014. Interaction entre démographie et génétique dans les

- petites populations : études sur un Hyménoptère parasitoïde avec incompatibilités génétiques.
- Vayssade, C., de Fazio, C., Quaglietti, B., Auguste, A., Ris, N., Fauvergue, X., 2014. Inbreeding Depression in a Parasitoid Wasp with Single-Locus Complementary Sex Determination. PLoS ONE 9, e97733. doi:10.1371/journal.pone.0097733
- Wang, J., 2011. coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. Mol. Ecol. Resour. 11, 141–145. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02885.x
- Wang, J., 2009. A new method for estimating effective population sizes from a single sample of multilocus genotypes. Mol. Ecol. 18, 2148–2164. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04175.x
- Waser, P.M., Austad, S.N., Keane, B., 1986. When Should Animals Tolerate Inbreeding? Am. Nat. 128, 529–537. doi:10.1086/284585

Supplementary Electronic Material

SEM-A. Genotyping

Captured *Venturia canescens* were genotyped at 18 microsatellite loci developed by Collet et al. (2016) and Mateo Leach et al. (2012) (Table S1). They were first removed from 96% ethanol, dried, washed twice during 5s in 0.065% NaCl solution, and DNA was individually extracted with the PrepGem Insects kit (ZyGEM, Hamilton, New Zealand). For this, wasps were soaked in ZyGEM mix with 4 μ L of prepGEM buffer 10X, 1 μ L of prepGEM enzyme and 35 μ L of H₂O for 2h at 75°C and then 5min at 95°C. The mix was then centrifuged 2min at 10,000g and only the supernatant was used. PCRs were performed in a final volume of 10 μ L containing between 0.1 and 0.4 μ M of each primer, 5 μ L of 10X QIAGEN Multiplex PCR Master Mix, and 2 μ L of DNA as described in Collet et al. (2016). PCRs processed as follows: a step of denaturation at 95°C during 15 minutes, 25 cycles of 30s denaturation at 94°C, 90s annealing at 58°C and 60s extension at 72°C, and a final extension step of 30 minutes at 60°C. Two microliters of the PCR product were added to 9.6 μ L of Hi-Di formamide and 0.2 μ L of GeneScan500 Liz size standard (Applied Biosystems). The mix was loaded on an ABI 3130XL genetic analyser (Applied Biosystems) and alleles were scored using Gene Marker[®] version 1.75 (SoftGenetics, State College, USA).

Simulations

Simulations aimed at determining the optimal number of microsatellites and the optimal number of female offspring genotypes for each wild female captured in order to i) infer mates' genotype with a high reliability, ii) compute accurately the coefficient of relatedness between mates, and iii) determine the appropriate relatedness threshold to assign pairs as "Related" or "Unrelated". Simulations were performed with the R software (R Core Team, 2015).

SEM-B - Number of daughter genotyped to successfully reconstruct male genotypes

We used computer simulations to estimate the accuracy of inferences on male genotypes and its sensitivity to the number of offspring used to infer these genotypes. To this end, we simulated populations of 100 females and 100 males, each with known genotypes at 18 microsatellites loci. Genotypes were based on allele frequencies estimated in natural populations, which have revealed a significant polymorphism with ≥ 4 alleles per loci and observed heterozygosity > 0.5 (Collet et al, 2016). Mating was simulated as the random selection of male and female pairs, with male replacement (in *V. canescens*, males are polyandrous and females monoandrous; Metzger et al., 2010). Each pair produced one, two, three, or six female offspring, with mendelian inheritance of alleles at each of the 18 loci.

We used the software COLONY (Jones and Wang, 2010) to reconstruct fathers' genotypes from the genotypes of mothers and daughters, and compared these inferred genotypes to the ones known *a priori* from simulations. Reconstructed genotypes could match or mismatch actual genotypes, but comparisons were twisted in some cases for

Table S1 : Characteristics of the two multiplex PCR used to amplify 18 microsatellite loci in *Venturia canescens*. All the microsatellites were developed in Collet et al. (2016), except Vcan071, Vcan073, Vcan106 and Vcan088 that comes from Mateo Leach et al. (2012).

Primer sequences 5'-3'									
Multiplex	Locus	Repeat motif	F-Primer	R-Primer	F label	5' Concentration (µM)	Size range (bp)	GenBank no.	
I	VC068	(GA) ₉	TATCCTTCCAGCATTTCGTCC	CTCGCTCGGTGGAACACTAC	FAM	0.1	104-120	KX258853	
	Vcan071	(CAA) ₁₁	CTCCTACGCACTCCCTCAC	TTGTACGTTGGCACTTGAGC	FAM	0.1	223-254	GU053679	
	VC092	(AG) ₉	TGTTCCGGCTCTTGCTGTAAGT	CTCTCGTCAATTGCGTCGT	FAM	0.1	284-307	KX258854	
	VC094	(GT) ₈	TCGATTGCTTGAATCCTCTG	CACATATTTCCCTTGCAACC	FAM	0.2	429-436	KX258855	
	VC009	(CAA) ₂₆	AACAGCAACAGCAACAGGTG	ACTTTTGCCACGTGATTTCC	VIC	0.1	313-337	KX258847	
	VC036	(TTC) ₁₂	GTCAGCGATACACGCACG	GTACGCCTTATTCTCGCG	NED	0.1	226-254	KX258849	
	VC002	(AG) ₁₁	TCCGTTTCGTCTCATTATAATTCA	ATGATTGCTCTGACCGCTTC	NED	0.4	324-342	KX258845	
	VC001	(AG) ₁₀	TTTCGCCAGTTTGCTGTAAG	AACGAAACGAAATTTACAATCG	NED	0.4	391-447	KX258844	
	VC060	(CTT) ₁₂	TATCTCGGTTCTATTCCGG	AGGCGCTGATTGGAAGTTAA	PET	0.2	206-231	KX258851	
	II	VC106	(AG) ₁₁	CAAGCATGTATGTGATCGGTG	CGTAACTATTTGCGTTGGC	FAM	0.2	89-97	KX258856
Vcan073		(TGT) ₁₅	GGTCCAACGGTACTTCCTGA	ACTTCCGTGAGCCCTACCTT	FAM	0.2	227-267	GU053681	
VC047		(AG) ₁₁	ACCTGAGGGCACTATTCTGTTT	CGAAAGTTAATTTCTAGACCGAGC	VIC	0.2	141-157	KX258850	
VC031		(TC) ₁₁	TCAGTCACTTAGTGCACTTGGA	GGGTGGTGAATAGAGCGAGG	VIC	0.2	227-261	KX258848	
VC006		(AG) ₈	GACTAATGCAGGAGGTTGTGCG	GGCACAGTTTATGTTTCAGCG	VIC	0.2	317-357	KX258846	
VC120		CCCCT(CCT) ₂ (CT) ₂ CCCCT(CT) ₉	CAATCGATCAACGATACATTGCG	GCAGGGTAGCAGCTTAGTGG	NED	0.2	92-128	KX258858	
Vcan106		(TC) ₂₄	CCTCATCTCGAGGGAGGATT	ATCGCGAGTTGCGTAGTTTC	NED	0.2	183-222	GU053714	
VC107		(CAG) ₅ (CAA) ₁₂ CAGAGG(TA) ₂	CAACATCACCAACAACACCA	CACTTGACATGTCGTTGC	PET	0.2	85-108	KX258857	
Vcan088		(CA) ₄₄	AGTAACCGGTCAGCCTTTGG	CAGTTCCAATTTCCACACA	PET	0.2	133-150	GU053696	

Table S2. Accuracy of inferred male genotypes and sensitivity to the number of daughters genotyped.

Number of daughters per female	Number of fathers	Number of fathers without mismatches	Number of fathers with resolved mismatches	Number of fathers with unresolvable mismatches	Successful inference of father genotype (%)
1	63	51	11	1	98.4
2	66	50	14	2	97.0
3	59	52	6	1	98.3
6	61	50	11	0	100

which COLONY proposed different alleles for a given loci. When this occurred, we selected the allele that matched with the genotypes of their female-mate and daughters, on a case-by-case basis. If choice was not possible (*i.e.* identical mother and offspring genotype), we checked if one of the two proposed alleles corresponded the true allele and if yes, the genotype reconstruction was classified as a resolved mismatch and considered a successful inference. Otherwise, it was classified as an unresolvable mismatch and added to unsuccessful inference.

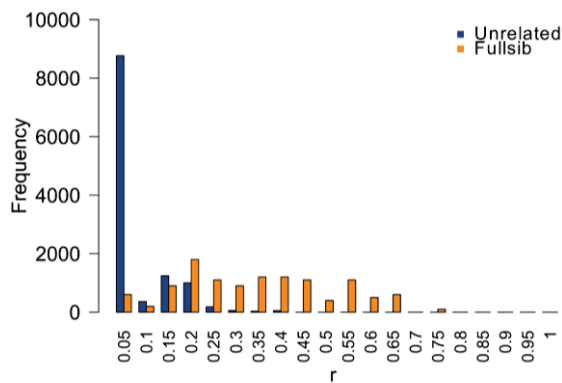


Figure S1. Distribution of relatedness coefficient between females and males after 100 simulations.

We successfully reconstructed 97% to 100% of the fathers' genotypes. This percentage of successful reconstruction did not depend on the number of offspring used (Table S2, Proportion test: $\chi^2 = 1.85$, $df = 3$, p -value = 0.61). Consequently, our simulations allowed us to determine that three is the optimal number of female offspring per wild female we have to

genotype in order to reconstruct their father genotype, but using females with only one or two female offsprings allowed us to correctly infer the father genotype with a manual correction in most cases (Table S2).

SEM-C – Determination of the accurate relatedness threshold between males and females

We used allele frequencies at microsatellite loci from Collet et al. (2016) to simulate a population initiated with 13 females and 13 males. This composition yield a number of relatedness estimations (3003) similar to that in the natural population of Valence (38 females and their mates: 2926 estimations). Mating was simulated as before (SEM-B) and each mated female produced three daughters and three sons. We further estimated the relatedness within all possible male-female pairs, including full sib offspring (117 brother-sister pairs) and unrelated offspring (11,700 unrelated pairs). This was performed with the software COANCESTRY (Wang, 2011) and TrioML, an estimator allowing inbreeding (Wang, 2007) and having the smallest quadratic error term compared to alternative COANCESTRY estimators applied to our data. As a direct calculation of relatedness was not possible between haploid and diploid individuals, we duplicated each male's genotype before the analysis, and allowed inbreeding (F) in the model. This procedure led to infer males as completely inbred (F=1) and its relatedness with a diploid

Table S3. Accuracy of relatedness assignments according to the number of microsatellites genotyped.

Number of microsatellites	Minimal number of wrong assignments	Threshold relatedness r_{crit}	Percentage of wrong assignments
10	46	0.12	19.7
15	31	0.16	13.2
18	33	0.17	14.1
20	28	0.15	12.0

female was then correctly inferred (J. Wang, personal communication). 100 populations were simulated. The distribution of relatedness coefficients for sibs and unrelated offspring were not clearly separated (Figure S1). We thus estimated a threshold coefficient, r_{crit} , allowing to best discriminate full sibs from unrelated individuals. For this, we counted wrong assignments in the 117 pairs of sibs and a random sample of 117 pairs of unrelated individuals for thresholds varying from 0 to 1 (0.01 step). The assignment rule was: all pairs with a relatedness coefficient greater than or equal to the threshold tested were assigned as related, and the others as unrelated. We selected the r value (called r_{crit}) that minimized the number of wrong assignments.

We first used these simulations to test the influence of the number of microsatellites markers on the accuracy of assignments. We tested 18 (all markers, see SEM- A), 15 (without VC001, VC106 and Vcan088) and 10 microsatellites (without VC001, VC006, VC031, VC068, VC092, VC106, Vcan088, and Vcan 106). The microsatellites suppressed were those with the lower amplification success (unpublished data). The number of wrong assignments was sensitive to the number of microsatellites (Table S3; Proportion test, $\chi^2 = 7.50$, $df = 3$, p -value = 0.05), but post-hoc comparisons were insignificant after correcting for multiple testing (Benjamini and Hochberg, 1995). When using 20 microsatellites instead of 18, adding Vcan69 (5 alleles, $He=0.452$) and Vcan63 (4 alleles,

$He=0.458$) from Mateo Leach et al. (2012), 12% of the relationships were wrongly assigned. Adding microsatellite markers did not increase significantly the sensitivity of the threshold (12% instead of 14% wrong assignments), but losing more than three markers increase the number of wrong assignments by almost 6% (Table S3). Given the small gain of adding two loci, we decided to use 18 microsatellites, and to keep in the analysis all individuals with at least 15 microsatellites genotyped.

SEM-D. Optimal threshold relatedness

The previous simulation with 18 microsatellite markers was repeated one hundred times, each replication yielding a threshold relatedness minimizing the number of wrong assignments. We chose the median value as the final threshold relatedness, $r_{crit}=0.16$ (Figure S2).

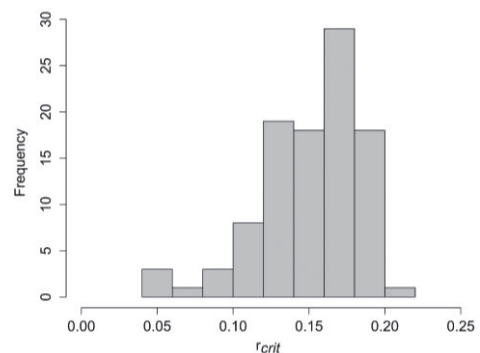


Figure S2. Distribution of the threshold relatedness minimizing the number of wrong assignments.

We merged the male-female relatedness data from the 100 simulations and estimated the number of wrong assignments when applying the threshold $r_{crit}=0.16$. We obtained 152,100 male-female relatedness coefficients, from which 11,700 were from full sib pairs and 140,400 from unrelated pairs. With $r_{crit}=0.16$, we wrongly assigned 11.4% of the pairs (17,311 out of the 152,100), of which 1% (1559) were full sibs wrongly assigned as unrelated, and 10.4% (15,752) were unrelated wrongly assigned as full sibs. The appropriate relatedness threshold was therefore found to be $r_{crit}= 0.16$ in our populations.

SEM-E. Fitness benefit of sib mating avoidance

We calculated the change in number of fertile offspring if sib mating was perfectly avoided in the population of Nice. To simplify computations, we hypothesized that genetically related mates are always brothers and sisters, leading to a maximum fitness impact of SI-CSD on fitness and therefore, a maximum benefit of sib mating avoidance.

We defined $P(MM)$ as the probability of matched mating, $P(BM)$ as the probability of sib mating and $P(UM)$ as the probability of mating between unrelated pairs. Our genetic study indicated that $P(MM) = 0.14$, $P(BM) = 0.12$, and therefore $P(UM) = 1 - P(BM) = 0.88$. In case of brother-sister mating, the probability of matched mating is 50%, so that $P(MM|BM) = 0.5$.

We first calculated the proportion of matched matings resulting from sib mating:

$$\begin{aligned} P(BM|MM) &= \frac{P(MM|BM) \times P(BM)}{P(MM)} \\ &= \frac{0.5 \times 0.12}{0.14} \\ &= 0.43 \end{aligned}$$

The proportion of unrelated mating among the matched matings is therefore:

$$P(UM|MM) = 1 - P(BM|MM) = 0.57$$

We can thus determine the proportion of matched mating among matings between unrelated pairs, which would be the only matings yielding diploid males if sib mating avoidance were perfect:

$$\begin{aligned} P(MM|UM) &= \frac{P(UM|MM) \times P(MM)}{P(UM)} \\ &= \frac{0.57 \times 0.14}{0.88} \\ &= 0.09 \end{aligned}$$

Therefore, if sib mating was perfectly avoided, 9% of the matings would lead to matched matings, and would thus produce 25% of diploid males among their offspring. It results in a decrease of 2.3% of the number of fertile offspring produced.

5.3 Discussion

Dans cet article, nous avons étudié le système d'appariement dans deux populations naturelles de *Venturia canescens*. Nous avons ainsi pu reconstruire les génotypes des partenaires sur le terrain à partir des marqueurs microsatellites développés précédemment (voir Chapitre 4, pages 43–67) et déterminer leur apparentement. Nous avons démontré que, contrairement aux études précédentes en laboratoire où une majorité de femelles *V. canescens* évitaient les accouplements entre apparentés, la totalité des individus tolère ces accouplements en populations naturelles.

Ces divergences entre laboratoire et terrain soulignent l'importance de combiner des études *in natura* et en laboratoire, en particulier lors des études de comportement. Les études en laboratoire permettent de maîtriser les contraintes environnementales, connues pour influencer fortement les comportements, et permet ainsi d'atteindre une répétabilité nécessaire pour confirmer la présence ou l'absence d'un comportement, sans facteurs confondants. De plus, le laboratoire permet dans certains cas de modifier ou combiner les stimuli et leurs intensités, permettant de corrélérer étroitement un comportement et son stimuli, et ainsi découvrir des effets seuils ou dose-dépendant : chez la reinette verte (*Hyla arborea*), Gomez et al. (2011b) ont montré que la combinaison de signaux visuels et auditifs variables permet de moduler le choix du partenaire des femelles et de suggérer un compromis vitesse-précision du choix du partenaire sexuel. Cependant, comme toute démarche expérimentale, l'expérimentation en laboratoire a ses inconvénients. Malgré un plan expérimental soigné, il est en effet difficile de rendre compte de toutes les contraintes (spatiales, temporelles, génétiques) existant dans la nature. Les conditions contrôlées recherchées précédemment peuvent amener à créer des conditions non réalistes et ainsi s'interroger sur le caractère adaptatif des réponses observées dans ces conditions. Par exemple, les expériences précédentes démontrant un évitement des partenaires sexuels apparentés chez *V. canescens* étaient des expériences de non-choix, c'est à dire qu'une femelle était face à des mâles tous apparentés ou tous non-apparentés (Metzger et al., 2010a). Or, il a été démontré que les résultats et les interprétations des expériences de choix ou de non-choix pouvaient amener à des conclusions différentes dans le cadre de lâcher de parasitoïdes pour de la lutte biologique (Murray et al., 2010). De plus, le plan expérimental de l'étude de Metzger et al. (2010a) ne permettait pas de connaître l'influence de l'apprentissage des femelles face à la rencontre de mâles de statuts différents. De nombreuses études ont montré l'importance des rencontres ou des accouplements avec des mâles de statuts différents. En effet, les femelles adaptent le choix de leur prochain partenaire sexuel selon le génotype de leur partenaire précédent dans de nombreuses espèces phylogénétiquement éloignées : chez les lézards (Laloi et al., 2011; Breedveld and Fitze, 2015), les scarabées (Dowling et al., 2007), la drosophile (Chapman and Partridge, 1998) ou encore chez des espèces sociales lors du choix des partenaires hors couples (chez les marmottes (Cohas et al., 2008), les mangoustes (Nichols et al., 2015) ou les oiseaux (Arct et al., 2015; Wang and Lu, 2011)). Chez les espèces monoandres comme *V. canescens*, la « qualité » des individus rencontrés et non des partenaires peut être utilisée comme élément de choix du partenaire sexuel, comme cela a déjà été montré chez l'araignée-loup *Schizocosa ocreata* par exemple (Stoffer and Uetz, 2016). C'est ainsi pour compléter ces expériences précédentes que nous avons réalisé les expériences de choix présentées dans l'article, qui rendent ainsi compte de cette discrimination séquentielle des partenaires potentiels. Il est cependant difficile de connaître le nombre et le statut des mâles rencontrés sur le terrain chez les insectes et ainsi de vérifier l'importance de cette discrimination *in natura*, mais il me semble indispensable de ne pas les négliger d'office.

De fait, la combinaison de l'étude de laboratoire et de ces expériences de non-choix,

avec celle présentée ici, comportant à la fois des données de terrain et des expériences de choix en laboratoire permet d'avoir une vision d'ensemble du choix du partenaire sexuel dans cette espèce. *V. canescens* dispose donc de la capacité de discriminer ses apparentés, sans pour autant utiliser systématiquement ou même fréquemment cette information pour le choix de son partenaire sexuel.

Ces résultats nous ont amené à nous demander quels pouvaient être les mécanismes ayant permis l'apparition et la maintenance d'un système de reconnaissance des apparentés alors qu'il n'est visiblement pas utilisé lors du choix du partenaire sexuel. Une hypothèse est que ce mécanisme de reconnaissance a évolué dans un contexte écologique différent, et que la reconnaissance de parentèle lors de l'accouplement est un sous-produit de cette évolution. Or, chez *V. canescens*, la reconnaissance de parentèle a été détectée dans un autre comportement : l'évitement du superparasitisme (Hubbard et al., 1987; Marris et al., 1996; Amat et al., 2009). En effet, les femelles de cette espèce évitent de pondre dans un hôte déjà parasité, et cet évitement est d'autant plus fort que leur apparentement avec la femelle ayant pondu précédemment est fort. L'étude des coûts subséquents au non-évitement des apparentés dans les deux contextes (choix du partenaire sexuel et choix de l'hôte de ponte) nous a de plus conforté dans l'idée d'une apparition primaire de l'évitement des apparentés dans le contexte de l'évitement du superparasitisme. Vayssade et al. (2014) ont en effet montré qu'il existait une dépression de consanguinité chez *V. canescens*, avec une diminution de 20% de la charge en œufs des femelles issues de croisements consanguins et la production de mâles diploïdes stériles. Cependant, de nombreuses autres caractéristiques testées par Vayssade et al. (2014) ne sont pas affectées par la consanguinité, comme la probabilité d'accouplement, la taille des femelles, la présence de femelles dans la descendance des femelles consanguines..., rendant ce coût de la consanguinité peu élevé dans le cadre du choix du partenaire. D'autre part, le coût du superparasitisme est élevé, puisqu'au plus un seul descendant émergera d'un hôte, quel que soit le nombre d'œufs de parasitoïdes pondus au départ dans l'hôte. Les mécanismes d'éliminations des larves surnuméraires passent par l'inhibition de la croissance des larves de stades inférieurs ou par des combats entre larves à l'intérieur de l'hôte (Marris and Casperd, 1996). Cette différence de coûts nous a ainsi amené à réfléchir à l'évitement des apparentés dans le cadre du choix du partenaire sexuel comme étant un sous-produit d'un évitement préexistant lors du choix de l'hôte de ponte.

Ainsi, la compréhension et la comparaison de la reconnaissance de parentèle dans ces deux contextes écologiques différents est devenu la suite logique de mon travail de thèse.

Chapitre 6

Mécanismes chimiques de reconnaissance des apparentés

Sommaire

6.1	Introduction	96
6.2	Article 3 : Do parasitoid wasps use the same cues to inform on kinship during host and mate choice ? (en préparation)	97
6.3	Discussion	115

6.1 Introduction

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'évolution et la maintenance du système de reconnaissance de parentèle chez la guêpe parasitoïde *Venturia canescens*. En effet, nous avons démontré dans le chapitre précédent (Chapitre 5) que les femelles toléraient l'accouplement avec des apparentés sur le terrain. De ce fait, l'évitement de parentèle dans le cadre du choix du partenaire sexuel ne semblait pas être un bon candidat pour expliquer l'apparition et la maintenance du système de reconnaissance de parentèle dans cette espèce. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que la reconnaissance de parentèle pouvait avoir été sélectionnée à travers le comportement d'évitement du superparasitisme¹ et que la reconnaissance lors du choix du partenaire sexuel serait alors un sous-produit de cette reconnaissance d'hôtes. Avec une telle hypothèse, les signatures des deux reconnaissances de parentèle devraient être très semblables puisque l'une dériverait directement de la seconde et ainsi être un exemple de parcimonie chimique (Blum, 1996).

Chez *Venturia canescens*, la signature chimique utilisée lors du choix du partenaire est vraisemblablement médiée par les hydrocarbures cuticulaires (CHC) (Metzger et al., 2010a). De plus, lors de la ponte d'un œuf dans un hôte, les femelles de cette espèce déposent des hydrocarbures produits par une glande accessoire à leur système reproducteur, la glande de Dufour (Abdalla and Cruz-Landim, 2001; Mudd et al., 1982; Harrison et al., 1985), et différencient le marquage de leurs apparentées des marquages non-apparentés (Mudd et al., 1982; Hubbard et al., 1987). L'hypothèse de parcimonie chimique (semiochemical parsimony) énoncée par Blum (1996), postule que la même information chimique peut être utilisée dans plusieurs contextes écologiques différents, réduisant ainsi à la fois les coûts de production mais aussi de réception et de traitement du signal. On s'attend de ce fait à ce que l'information de parentèle soit codée de manière identique dans les CHC et les hydrocarbures produits par la glande de Dufour et ainsi être dans un cadre idéal afin de tester cette hypothèse. Ces fonctions écologiques diverses d'un même signal chimique sont bien connues chez les insectes sociaux (Chung and Carroll, 2015) comme chez les fourmis (Choi and Vander Meer, 2015), les termites (Robert et al., 2004) ou les abeilles (Kocher and Grozinger, 2011). Cependant, la littérature manque sur les espèces solitaires et la coexistence de ces deux signatures de parentèle lors du choix du partenaire ou de l'hôte chez *V. canescens* nous permet de tester cette hypothèse.

Le premier prérequis à l'hypothèse de parcimonie est que les signatures chimiques des CHC et de la glande de Dufour aient au moins des composés communs. De plus, comme ces signatures codent une information de parentèle, nous nous attendons à ce que la variabilité des signatures soit faible entre individus apparentés (à l'intérieur d'une famille) et plus forte entre individus non apparentés (entre familles). Enfin, si l'information de parentèle est effectivement codée de la même façon dans les deux signatures, l'utilisation d'une signature hors de son contexte écologique natif devrait engendrer le même comportement d'évitement que la signature native. Par exemple, l'utilisation de CHC sur un hôte devrait mimer un dépôt de la glande de Dufour d'une femelle et ainsi provoquer un évitement de cet hôte "parasité". Inversement, un extrait de glande de Dufour lors du choix du partenaire sexuel devrait être utilisé comme une signature d'apparentement et ainsi moduler l'accouplement entre deux individus.

Nous avons ainsi combiné des études d'écologie chimique afin de caractériser ces signatures chimiques, intra et inter familles et des études de comportements où nous

¹Le superparasitisme est un comportement des femelles parasitoïdes d'évitement des larves déjà parasitées lors de la ponte. Ce comportement peut être adaptatif (Hubbard et al., 1987) ou médié par un virus (Martinez et al., 2012).

avons interchangé les signatures CHC et glande de Dufour lors du choix du partenaire sexuel et l'évitement du superparasitisme. Nous avons décrit pour la première fois ces signatures chez *V. canescens* en identifiant 23 composés des CHC et 16 de la glande de Dufour, dont certains étaient déjà connus dans d'autres espèces comme des signaux d'apparement. Nous avons ensuite montré que, contrairement à nos attendus, la variabilité chimique intrafamille n'était pas inférieure à la variabilité interfamille. Cependant, ce résultat ne permet pas d'invalider l'hypothèse de parcimonie puisque les signatures chimiques sont des assemblages complexes de molécules dont certaines ont vraisemblablement des fonctions autre que la reconnaissance de parentèle (reconnaissance du sexe, de l'espèce...) et qui peuvent de ce fait brouiller le signal attendu. Nous avons donc complété ces études chimiques par des études de comportements qui ont montré que les femelles étaient capables d'utiliser les CHC pour moduler leur temps de résidence sur un patch d'hôtes. Cependant, nous n'avons pas détecté d'effet de la glande de Dufour sur le choix du partenaire. L'ensemble de ces résultats nous ont fait conduit à rejeter l'hypothèse de parcimonie dans le cadre de la reconnaissance de parentèle chez *Venturia canescens*.

6.2 Article 3 : Do parasitoid wasps use the same cues to inform on kinship during host and mate choice ? (en préparation)

Do parasitoid wasps use the same cues to inform on kinship during host and mate choice?

Marie Collet,^{1,*} Guillaume Meiffren,² Isabelle Amat,¹ Gilles Comte,² Laurence Mouton,¹ and Emmanuel Desouhant¹

¹*Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive UMR5558, F-69622 Villeurbanne, France*

²*Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire d'Écologie Microbienne UMR5557, INRA USC 1364, F-69622 Villeurbanne, France*

Kin recognition is involved in many animal behaviours. However, the mechanisms that underlie this communication are numerous and understanding the evolution of kinship discrimination is challenging. In this study, kin recognition is studied in two different ecological contexts: mate choice and host choice in a parasitoid wasp, *Venturia canescens*. We made the hypothesis that the wasp used the same cues in both ecological contexts. We thus chemically analysed the two signals used for kin recognition, *i.e.* cuticular hydrocarbons (CHC) during mate choice and the Dufour's gland (DG) during host choice. Moreover, we tested if the CHC and the DG can be used as kin marker outside their natal context, which means can CHC be used for host choice and DG for mate choice? We described for the first time the CHC and DG compositions and found that they have more than 10 compounds in common. However, we were not able to detect a distinct signature for different families of wasps, which was expected. We showed that CHC was used by females to modulate their residence time on an host patch but we did not find an effect of DG on mate choice. Therefore, we conclude that *V. canescens* females used different kinship cues for host and mate choice. It raises the question of the maintenance of two mechanisms of kin recognition in a parasitoid species.

Keywords: Kin recognition, Cuticular HydroCarbons (CHC), Dufour's gland (DG), *Venturia canescens*, superparasitism, inbreeding avoidance

INTRODUCTION

Animal communication is involved in multiple behaviours, such as nestmate recognition, parental care or mate choice. Information between emitters and receivers are exchanged through different signals or cues, from visual to chemical, via acoustic [1, 2]. Sending reliable information may require that multiple signals or cues in interaction were sent as it is usually observed in complex sexual displays [3]. In mate choice context kin discrimination is used by numerous species, from mammals [4–7], to birds [8] and social or non-social insects [9–11]. Use of information related to kinship during mate choice is expected to avoid the costs related to inbreeding depression when inbred individuals have a lower fitness than outbred individuals [12, 13].

Chemical communication, and especially the use of cuticular compounds was postulated to be involved in insect communication more than 100 years ago (in ants: Fielde [14]). Cuticular hydrocarbons were first described for their effect on insect desiccation resistance before being discovered as signals of communication. For example, kin recognition cues are mostly encoded in the Cuticular HydroCarbons (CHC) [2, 15]. They are used by both social and non-social species to assess kinship in various behaviours such as nestmate recognition, grooming (in ants) or mate choice. Evi-

dence of the CHC function is now well established in Dipteran (*Drosophila* [16], mosquitoes [17, 18]), or Hymenopteran, as ants [19–22], bees [23–25], sawflies [26] or wasps [10, 27]. However, the CHC are not the only chemical information suppliers in insects. Accessory glands such as mandibular or thoracic glands are also known to produce odorous compounds [28, 29]. All hymenopteran females have got an accessory gland of their reproductive tract called the Dufour's gland [30]. This gland produces pheromones and odorous components involved in the trail behaviour in ants, kin recognition or host marking in parasitic wasps [30, 31]. For example, the parasitoid wasp *Halticoptera rosae* used the Dufour's gland products deposited during oviposition by conspecific females on hosts to detect the healthy from the already parasitized hosts and adapt their oviposition decision [32]. Females avoiding already parasitized hosts is called superparasitism avoidance [33–35]. In solitary parasitoids, the cost of superparasitism is high since, irrespective of the number of eggs laid in a host, only one parasitoid will emerge from it. The parasitoid larvae indeed compete and fight inside the host until one dies [36, 37]. Therefore, avoidance of kin-parasitized hosts is selected in solitary parasitoids, as superparasitism will lead to the death of relative larvae (either the offspring of a relative or its own offspring) and to a decrease of inclusive

fitness [38, 39].

The presence of multiple sites of scent production in an organism questions the possibility of information redundancy, *i.e.* multiple cues signalling for the same information, since information production, emission and reception are potentially costly for individuals [3]. The theory called "semiochemical parsimony" proposed by Blum in 1996 postulated that the same chemical information can be used in different ecological contexts. Such multiple uses of pheromones is well described in social species [29, 41–43]. For example, in the bumblebee *Bombus terrestris*, the CHC were found to encode both the colony membership and the current fertility of the workers [44]. The nest guards modulate their aggressive behaviour depending on both information, being tolerant to nestmate and non-fertile non-nestmate workers, whereas an agonistic behaviour is elicited by fertile non-nestmate workers when they try to enter the nest [44]. The content of the Dufour's gland was found to be involved in many behaviours such as aggregation, use as a trail pheromone in ants, as a sex pheromone or use for kin recognition in wasps and even used in the raiding process by slave-making ants [30]. We could therefore also expect that the same chemical information can be produced by different glands and used in different ecological contexts. CHC and Dufour's gland compounds are good candidates to test the "semiochemical parsimony" hypothesis in hymenopterans.

The general aim of the study was to test this hypothesis in a parasitoid wasp, *Venturia canescens* Gravenhost (Hymenoptera: Ichneumonidae). This species is solitary and has therefore a strong cost to superparasitize. Moreover, the system of sex determination of this wasp (single-locus Complementary Sex Determination, [45]) leads to the production of sterile diploid males under inbreeding. Thus, this model is particularly interesting to study the "semiochemical parsimony" hypothesis, as kin recognition is involved in two costly behaviours. We investigated if the cuticular hydrocarbons and the Dufour's gland (DG) content is a unique information of kinship used by *Venturia canescens* in two different ecological contexts: host and mate choice. Indeed, the male CHC were postulated by Metzger *et al.* [10] to act as the kinship cues used by females to choose their mates, whereas the Dufour's gland is known to act as a kinship marker deposited on hosts during egg laying by the females [31, 38]. To fulfil this objective we conducted chemical and behavioural experiments. We first described the chemical composition of CHC and DG. Under the parsimony hypothesis we expected

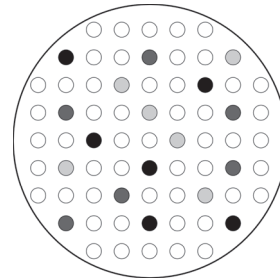


Figure 1. **Experimental set-up of superparasitism avoidance.** The Plexiglas patch contained 18 *E. kuehniella* larvae represented by the coloured cells (light grey, dark grey and black), distributed evenly between three odorous modalities: Hexane, CHC + hexane and Dufour's gland content + hexane. The cells containing larvae were fixed during the whole experiment, but the odorous modality of each cell was randomly assigned at the beginning of each trial, keeping the constraint of six cells in each modality. The female used to extract the odours (the donor female; see Figure 2) was either a sister or an unrelated of the focal female used afterwards in the trial.

that part of the chemicals were common in cuticle and DG, and that those compounds are involved in kin recognition. We tested this latter expectation by identifying the functions of each common compound in other hymenopteran species and by testing whether females from the same family had less variable chemical profiles (CHC and DG) than unrelated females. We then investigated the interchangeability of CHC and DG scents in the two different behavioural contexts. We tested i) whether CHC scents influence superparasitism decision, as DG scents do [31, 38, 46] and ii) whether DG scents play a role in mate choice, as CHC do [10]. We expected that CHC and DG scent elicit the same behaviour than its natural counterpart, *i.e.* sibling-mating and superparasitism avoidance.

MATERIALS AND METHODS

Biological model and rearing facilities

Venturia canescens is a solitary endoparasitoid found in most circum-Mediterranean areas [47]. It is one of the few hymenoptera species where sexual (arrhenotokous) and asexual (thelytokous) individuals co-occur [48] and where asexuality (*i.e.* thelytoky) is not caused by bacterial endosymbionts [49, 50]. Females lay eggs in a large range of host species found on various fruits [51]. Females are attracted to mandibular secretions (kairomones) produced by their host larvae [52]. The females

have a behaviour characteristics when laying eggs, with an obligatory cocking movement that allows the females to pass an egg into the ovipositor [53]. The cocking is performed quickly after each oviposition which allows detecting any laid eggs reliably [54]. Thus, the cocking behaviour is a good proxy of the female’s fitness. Male search for females via a synergistic combination of volatile sex pheromones emitted by females and kairomones from hosts [55, 56].

In this study we used only sexual wasps. The wasp culture was established from adults collected in the field near Valence (44°98’ N, 4°93’ E, INRA, Gotheron), southern France, on several occasions during the summer of 2015. The host, *Ephesia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidæ), was reared in the laboratory on organic wheat semolina medium for three weeks before being presented to the parasitoid (eggs from Biotop mass rearing facility located in Antibes, France). Parasitoid development took place in a controlled environment (24 ± 1°C; 60 ± 5% RH; LD regime 12 h:12 h). Immature development time and adult lifespan, when adult are fed, are both around three weeks (at 25°C), which yields overlapping generations.

To compare sisters and unrelated chemical signatures and to test for the effect of the social environment – mimicking by the presence of odours from related or unrelated conspecifics – on patch exploitation, we needed to control the pedigree of the wasps. That is why we constructed families as follow: we randomly collected females from the mass rearing, and maintained them individually with two males in a little box (∅: 8 cm, height: 3 cm) with meshed lid containing about 30 three-weeks host larvæ on about 1 cm depth of organic wheat semolina. The wasps were fed *ad libitum* with water- diluted honey (50-50) and allowed to lay eggs for three weeks. Then the parents were removed from the box, and the offspring collected at their emergence in order to make sure they are virgin. The females were kept individually in plastic vials with a drop of water-diluted honey, whereas the males were kept with their brothers and fed the same way. All individuals used in the experiments were two-days old.

Chemical ecology

CHC and DG extracts provided from virgin females to avoid contamination from the males odours (CHC) during copulation. Therefore, as donors were virgin females and behavioural choice were done on mated focal females, we aimed at

comparing the CHC and DG profiles of virgin and mated females. We expected that chemical information did not change with the mating status since mated females still continue to emit sexual pheromones and attract males [10]. We collected 83 virgin females from ten families that produced at least five virgin females. In order to have access to the CHC and DG of each female, two days after emergence we anesthetized each donor female on ice for ten minutes and dissected them by gently pulling their last abdominal segment to expose the reproductive tract. These females were virgin to avoid males contaminated females with their odours (their CHC) during copulation. The remaining body used to extract the CHC, was immediately soaked in 400µL of HPLC-grade hexane in a glass vial. The DG was then separated from the reproductive tract and soaked in 50µL of HPLC-grade hexane. After 4 hours at room temperature, the body was removed from the glass vial and both vials were transferred to a –80°C freezer until their chemical analysis.

The analyses were performed using an interfaced Hewlett-Packard6890 gas chromatograph (GC) system coupled to an HP 5973 MDS (Mass selective Detector) mass spectrometer (MS, 70 eV, electron impact ionization) (Agilent technologies, Palo Alto, CA). A DB-FFAP column was used (30m × 250µm, 0.25µm film thickness from Agilent technologies). Analyses were performed in splitless injection mode with helium at a constant flow of 1.0 ml.min⁻¹ and an initial temperature of 240°C for the injector port. The oven temperature was initially 110°C for 3 min, increased to 160°C at a rate of 10°C.min⁻¹, to 200°C at a rate of 3°C.min⁻¹, to 250°C at a rate of 6°C.min⁻¹ and finally stopped at 250°C for 9 min. Hexane blanks were also analysed daily to control for the potential contamination of samples. Hydrocarbons were characterized using mass spectrum and the Kovat’s retention indices [57]. The peak area of each hydrocarbon was integrated manually from the total ion chromatogram.

Experiment 1- Dufour’s gland (DG) extract as a chemical information for the choice of host patch

The superparasitism avoidance elicited by Dufour’s gland extract was until nowadays only described in thelytokous (asexual) wasps of *V. canescens* [31, 38]. We therefore first tested the use of DG extract as information in arrhenotokous (sexual) wasps by comparing behaviour of a *V. canescens* females on host patches marked with

Table 1. **Patch residence-time analysis.** Estimations of regression coefficients (β), SE, Hazard ratio (HR) and P-values of the covariates included in the Cox’s hazard proportion model. The effects of the social environment (*Soc*), the type of odorous cells encountered (*Meet*_{Hex} for hexane larvae, *Meet*_{CHC} for CHC larvae and *Meet*_{Dufour} for Dufour’s gland larvae) and their interactions (colon) on the patch residence time were assessed. The P-values in bold are statistically significant for $\alpha = 0.05$.

	β	SE	Hazard ratio (HR)	P-value
<i>Soc</i> (Sister)	1.196	0.499	3.306	0.017
<i>Meet</i> _{Hex}	-0.160	0.058	0.852	0.006
<i>Meet</i> _{CHC}	0.158	0.072	1.171	0.029
<i>Meet</i> _{Dufour}	0.001	0.036	1.001	0.977
<i>Soc</i> (Sister): <i>Meet</i> _{Hex}	0.088	0.087	1.092	0.313
<i>Soc</i> (Sister): <i>Meet</i> _{CHC}	-0.205	0.093	0.814	0.027
<i>Soc</i> (Sister): <i>Meet</i> _{Dufour}	-0.089	0.073	0.915	0.224

or without a DG extract. The patches used were petri dishes (\emptyset : 5 cm) filled to the rim with clean wheat semolina. We fixed on the patch a thin gauze previously soaked with 4 mL of *Ephestia kuehniella* kairomone solution to mimic host presence. This solution was prepared by dissolving, during 2h30, host kairomones that were deposited in the semolina by host larvae while feeding with organic solvents (250mL of acetone and 250mL of pure ethanol). We used mass-reared larvae of one month and semolina (about 250g). Before the beginning of a trial, the gauze with the solution was allowed to dry for 2h. On the morning of the experiment, we dissected the Dufour’s gland of two-day old females (randomly chosen in the mass-rearing) and soaked it in 100 μ L of HPLC-grade hexane for 4h. We then deposited 90 μ L in droplets in order to cover homogeneously half of the gauze (*i.e.* host patch) with the DG extract. The host patch was dried for 15 minutes before being presented to a two-day old female in controlled conditions ($24 \pm 1^\circ\text{C}$; $60 \pm 5\%$ RH). We monitored the time spent on each half of the host patch by the female for 10min or unless the female flies out of the patch. The observer was blind for the side on which the DG’s extract was deposited.

Experiment 2- Superparasitism avoidance in host marked with CHC

We tested whether females can discriminate hosts marked with CHC belonging to sibs. We expect that CHC from a sib have a repellent effect on oviposition, as it was shown with DG extract [38]. The second aim was to test whether this effect is amplified in an odorous social environment simulated by sister odours, as shown by Marris *et al.* [31].

Preparation of the host patch

We used the cellular patch system previously used to study *V. canescens* foraging behaviour [38, 39]. The cellular host patches are Plexiglas discs (\emptyset : 14 cm, thickness: 1 cm) carved with 69 regularly spaced numbered cells (\emptyset : 8 mm and 2 mm deep) distributed in nine rows. All cells were filled to the rim with wheat semolina, and 18 cells contained a single fourth instar *E. kuehniella* larva (Figure 1). All discs were covered with a thin gauze to prevent the larvae from leaving the cells. The discs were prepared seven days before the experiment in order to obtain attractive cells, *i.e.* cells with semolina contaminated with the kairomones produced by the larvae. Each female was presented to a single disc.

Experimental set-up

We constructed 50 families to ensure the production of sisters and unrelated females. The virgin emergent females from each family were kept individually in plastic vials with water-diluted honey and randomly assigned to two groups: the focal females, that will explore a patch of hosts and make oviposition decisions, and the donor female, that will be dissected to get back their CHC and Dufour’s gland contents (as chemical extraction killed the individuals, we could not extract odours from a female and used it afterwards for behavioural experiment) (Figure 2). After 24 h, we added two unrelated 24- or 48-hours old males in vials with each focal female in order to get it mated. The morning of the experiment, the 48-hours old focal females were individually isolated in new and clean vials until the experiment started. 15 minutes before the trial, five accessible hosts in wheat semolina were provided to each female. The females that

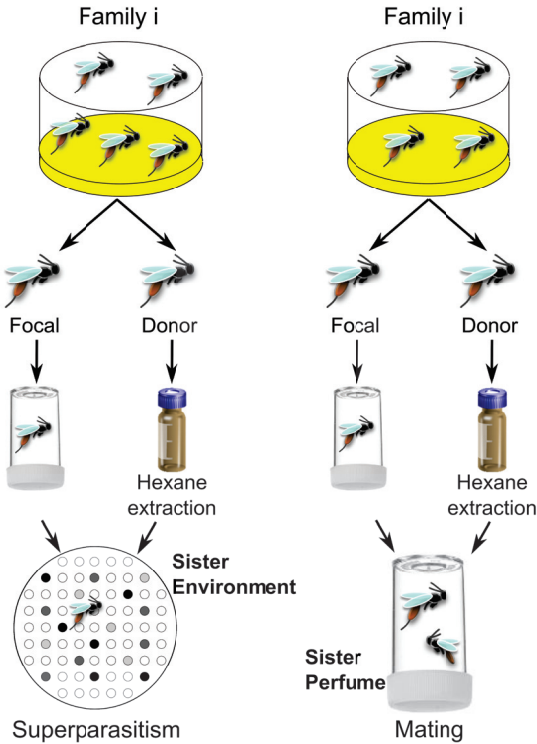


Figure 2. **Experimental set-up for superparasitism and mating experiments.** Families were constructed with mass-rearing females. Wasps with an ovipositor are females. In this figure, the experimental designs are illustrated in the context where females have to choose (to oviposit or mate) in presence of sib odours. When the donor female comes from a different family than that of the focal female, decisions have to be made in presence of unrelated odours.

were not actively foraging were discarded.

The females were dissected with the same protocol as for the superparasitism experiment, except that the DG and the remaining body (CHC) were soaked separately in $100\mu\text{L}$ of HPLC-grade hexane. After four hours of soaking, $14\mu\text{L}$ of an odorous solution (3 modalities: hexane, DG+hexane, CHC+hexane) was put on the gauze of the host patch, above a cell containing a host larva (Figure 1). The odorous modality of a cell was chosen randomly across the trials. A host patch always contained six larvae perfumed by one of the three odorous modalities. These odours constituted what we called the odorous social environment. The host patch was dried for 15 minutes before being presented to the focal female (in controlled conditions: $24 \pm 1^\circ\text{C}$; $60 \pm 5\%$ RH).

In order to test whether the odorous social environment, mimicking by odours from sisters or unrelated wasps, has an influence on females behaviour,

the donor female and the focal females were either sisters or unrelated to each other. Each focal female was used only once to avoid any pseudo replication and effect of learning. The focal female was put in the centre of the patch and its behaviours were recorded for 30 min using an event recorder (JWATCHER v1.0 software) or until it left the patch. As the female often made short excursions outside the patch, we defined a 5 cm circle around the patch and a female was recorded as leaving when it went out of the larger circle or if it spent more than 5 min in the area between the host patch and the larger disc. During the trial, we recorded the time when various behaviours occurred: cocking, leaving the patch or the larger disc, and the number and the type of the cell visited. Thanks to the cocking behaviour, we knew precisely when and in which cell each female has laid its eggs. As a consequence, we could determine if a given marked host (*i.e.* that received an odorous solution) was parasitized. We also recorded the time the female spent at antennating (*i.e.* detecting host kairomones) and probing on each cell. Therefore, we observed the behaviours of focal females within two odorous social environment modalities (Sister Environment or Unrelated Environment) on three different kind of odorous cells (Hexane, CHC+hexane or DG+hexane), where all larvae were healthy at the beginning of the trial.

Experiment 3- Sib-mating avoidance when partners are in presence of Dufour's gland marks

Here we tested whether the perfume from the Dufour's gland of a relative can disrupt mating between unrelated partners, as shown with CHC perfume of a relative [10]. As in experiment 2, we created families ($n=30$), and the emergent females were kept individually in plastic vials with water-diluted honey. They were randomly assigned in a group of focal or donor females. 48 hours after their emergence, the donor females were dissected as previously described and their Dufour's gland (DG) soaked in $50\mu\text{L}$ of hexane (as in Harrison *et al.* [58]) for 4 hours. $20\mu\text{L}$ of DG extract or pure hexane (for the control) was deposited on a 1cm^2 filter paper. After 15 min, the dried filter paper was put in a new vial where the focal female was introduced for 15 min. Then an unrelated male was added in the vial and the behaviours of the partners were recorded for 30 min or until a mating occurred (Figure 2). The time the male spent to court the female, the timing of the mating and

its duration (if any) were recorded. The donor female was either a sister or unrelated with the focal female and always unrelated to the male. We thus had three modalities, corresponding to the perfume on the filter paper: Hexane, Dufour's gland from a sister perfume or Dufour's gland from an unrelated female perfume.

Statistical analysis

All statistical analysis were done in the R v3.4.0 software [59].

Chemical ecology

We analysed the CHC and Dufour's gland profiles separately from virgin and mated females. Only peaks present in at least 10% of the individuals were kept in the analysis. The peaks areas were log normalized within each profile with Aitchison transformation [60]. We then used Principal Component Analysis (PCA) to identify the peaks that contributed the most to the variation along each axis. Moreover, we used Between-class PCA between families [61] to identify the peaks that contributed the greatest to difference between families. We made the same multivariate analysis with the subset of peaks that are only present in both CHC and DG profiles. We also tested the family effect on chemical profile by computing Wilk's λ , and the euclidian distance between CHC and DG profiles for each individual and compared these distances between families with a variance analysis (ANOVA). We calculated the chemical richness (peak number), and the diversity indices (Shannon and Simpsons index, that weight for the peak abundance) for CHC and DG extracts separately and tested for a family effect on these indices with an ANOVA analysis. Finally, we calculated the diagnostic power (DP) of each peak to identify peaks that varied more between than within families [62]. Peaks with DP higher than the average were considered as the best candidates for kin-recognition cues [62]. We also compared the CHC and Dufour's gland profile of virgin and mated females via PCA analysis, and using a multivariate analysis of variance (MANOVA) on in the three families that had more than six mated females.

Experiment 2- Superparasitism avoidance

To test the superparasitism avoidance hypothesis, we calculated a "superparasitism index" as

described in [39]: $SP = \frac{p_{odor}/t_{odor}}{p_{hexa}/t_{hexa}}$, where p_{odor} is the number of ovipositions in a perfumed host (CHC or Dufour's gland), t_{odor} the time spend by the female probing perfumed cells and p_{hexa} and t_{hexa} the number of ovipositions and the time spend probing in hexane-perfumed cells. If we considered that a healthy host is always accepted by a female, p_{hexa}/t_{hexa} will measure the foraging skill of a female, whereas p_{odor}/t_{odor} will depend both on the foraging skill of the female and it willingness to lay eggs in an already parasitized host. SP will therefore measure to female propensity to superparasitize. We thus defined SP_{CHC} and SP_{Dufour} when the perfumed cells were CHC- perfumed and Dufour's gland perfumed cells, respectively. SP_{all} is the index for cells perfumed by CHC- or Dufour's gland. We then compared the different SP ratio to 1 (*i.e.* the expected value under the null hypothesis) with Student tests, where $SP = 1$ indicates an absence of discrimination of the host by *V. canescens* whatever the perfume, $SP < 1$ an avoidance of perfumed host and $SP > 1$ a preference for perfumed host.

We also compared the residence time of a patch between the Sister and the Unrelated Environment by the means of survival analysis (with Weibull distribution). Moreover, we tested if the encountering of an odorous larva has an effect on the propensity of the female to leave the patch. The effect of odorous social environment (Sister or Unrelated, fixed covariates) experienced by the female, the number of larvae encountered in each odorous modality (Hexane, CHC+ hexane or DG+hexane, time-dependant covariate) were assessed by a Cox's proportional hazard model. The interaction between the social environment and all the time-dependent covariates were included to test whether the influence of each kind of encounter differs between the two social environments. A hazard ratio (HR) greater than 1 indicates that the covariate increases the probability to leave for a female, and therefore decreases the residence time. Conversely, a hazard ratio < 1 indicates an increased residence time of the focal female. For all the previous analyses, we checked if the female family has an effect on our results by comparing our model with the mixed model with families as the random factor (*coxme* package, [63]). We did not detect any effect of families and therefore kept the fixed model.

Experiment 3- Sib-mating avoidance

We compared the proportion of matings according to the perfumed modality (Hexane, Dufour's

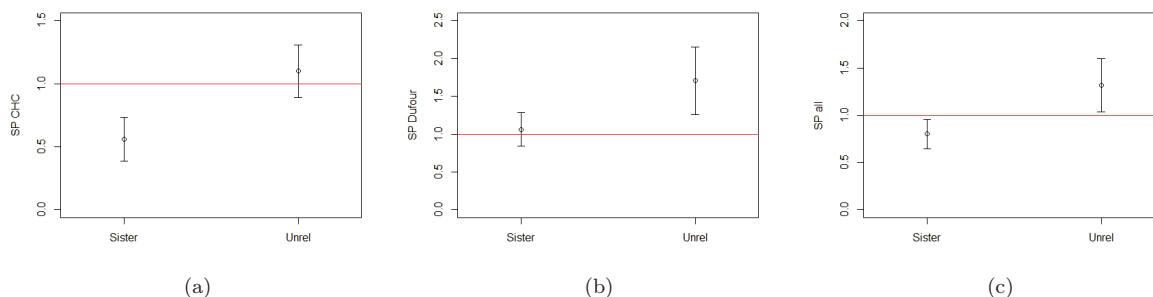


Figure 3. Mean values (\pm SE) of superparasitism index (SP) in related (Sister) or unrelated (Unrel) social environment for (a) CHC-, (b) Dufour’s gland- and (c) both odours perfumed larvae. The red line represents the value of SP under the null hypothesis of no avoidance of perfumed larvae (that is the $SP=1$).

gland from a sister or Dufour’s gland from an unrelated female) with a Generalized Linear Model (binomial error and logit link) with the hexane modality (control) as an offset since we tested deviation from this modality.

Moreover, we analysed the latency before mating with a cox model, with the perfumed modalities, the number of courtship events and their duration as explanatory variables. The interactions between the variables were non significant and therefore removed from the model. We also tested whether there was a difference in the number of courtship events according to the perfumed modality using a Generalized Linear Model (Poisson error and log link).

RESULTS

Chemical ecology: CHC and Dufour’s gland (DG) profiles

Overall, 83 virgin females from 10 families and 35 mated females from 8 families were dissected and their CHC and DG analysed.

CHC chemical profiles of virgin females

78 females gave a consistent profile (5 females were discarded from the data set because of evaporation of their extraction products during the freezing period) with 23 peaks present in at least 10% of the individuals (Table 2, Figure S1a). Each profile was composed of long-chain hydrocarbons, mostly alkenes and alkanes (C_{21} to C_{29}), five acids and one ester. The first factor (PCA1) explained more than 25% of the overall variation in the CHC profiles and was mostly explained by low-molecular-weight hydrocarbons (57.8% of PCA1 explained by

four hydrocarbons from C_{21} to C_{23}). On the other hand, the second factor (PCA2) explained 10.5% of the variation and was mostly explained by acids (41.4% explained by three components with a retention time higher than 27 min). More than 12.5% of the variability was explained by the differences between families (Between-PCA inertia). However, we found that the chemical profiles were not significantly different between the families (Wilk’s $\lambda = 0.021$, $F_{207,406} = 1.15$, $p = 0.12$). Moreover, the families did not differ significantly in their chemical richness, their Shannon or Simpsons indices (ANOVA: Richness, $F_{9,68} = 0.900$, $p = 0.53$; Shannon index, $F_{9,68} = 0.914$, $p = 0.52$; Simpson index, $F_{9,68} = 0.920$, $p = 0.51$). Eight compounds had a Diagnostic Power (DP) value greater than the average. Three of them were variables that explained the most of the two first Between-families PCA factors (PCA1: 11.5% explained by the pentacosene (peak 11); PCA2: 16.5% explained by pentacosane (peak 10) and 9.4% by the palmitic acid (peak 17), Table 2). We also focused on heneicosane (peak 1, Table 2), as Mudd *et al.* [46] found that this compound elicited an avoidance behaviour, but we didn’t find any significant difference in heneicosane content between the families (ANOVA, $F_{9,68} = 0.581$, $p = 0.808$).

Dufour’s gland chemical profiles of virgin females

We analysed the DG profile of 81 females (as the extracts of two over the 83 females were not well conserved and therefore could not be analyzed by GC-MS) and found 16 peaks present in at least 10% of the individuals (Table 2, Figure S1b). These profiles were mostly composed of alkenes and alkanes (C_{21} to C_{29}), one acid and one ester. 11% of the variability was explained by the differences between families (Between-PCA inertia). We found

Table 2. **Chemical compounds found in *V. canescens*.** We identified the compounds (when possible) from their molecular weight, mass spectra and Kovats retention index. The identity of the compounds indicated with a † are not 100% reliable as the mass spectra corresponded to the identity given but the retention time were slightly shifted. For each peak, we indicated its rank in the chemical profile (Peak), its retention time, its Diagnostic Power (DP) value (values higher than the mean are highlighted in bold) and its identity in CHC and Dufour’s gland extracts.

CHC			Dufour’s gland				
Peak	Retention time (min)	DP (mean=1.007)	Molecular weight(g/mol)	Compounds (Formula)	DP (mean=1.000)	Retention time (min)	Peak
1	11.4	0.975	296	Heneicosane (C ₂₁ H ₄₄)	0.989	11.4	1
2	11.7	1.033	294	Heneicosene (C ₂₁ H ₄₂)	0.983	11.6	2
-	-	-	299	Isopropyl palmitate (C ₁₉ H ₃₈ O ₂)	1.001	13.3	3
3	14	0.985	308	Docosene (C ₂₂ H ₄₄)	-	-	-
4	15.2	0.989	324	Tricosane (C ₂₃ H ₄₈)	0.968	15.1	4
5	15.4	0.980	322	Tricosene (C ₂₃ H ₄₆)	0.982	15.3	5
6	15.5	1.005	322	Tricosene derivative (C ₂₃ H ₄₆)	0.991	15.4	6
7	15.6	0.981	322	Tricosene derivative (C ₂₃ H ₄₆)	0.988	15.5	7
8	16.3	1.023	-	<i>Unresolved</i>	0.968	16.2	8
9	17.7	0.978	-	<i>Unresolved</i>	-	-	-
10	19.3	1.055	352	Pentacosane (C ₂₅ H ₄₂)	1.009	19.2	9
11	19.4	1.098	350	Pentacosene (C ₂₅ H ₄₀)	1.019	19.3	10
12	19.5	0.974	350	Pentacosene derivative (C ₂₅ H ₄₀)	-	-	-
13	19.7	0.974	350	Pentacosene derivative (C ₂₅ H ₄₀)	1.008	19.6	11
14	21.6	1.085	367	Hexacosane (C ₂₆ H ₅₄)	-	-	-
15	23.6	0.973	380	Heptacosane (C ₂₇ H ₅₆)	1.075	23.5	12
16	26.9	1.003	408	Nonacosane (C ₂₉ H ₆₀)	1.005	26.8	13
17	27.2	1.065	256	† Palmitic acid (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	-	-	-
-	-	-	410	Squalene (C ₃₀ H ₅₀)	1.017	28.5	14
18	29.1	0.973	437	Hentriacontane (C ₃₁ H ₆₄)	-	-	-
19	29.2	1.012	284	† Stearic acid (C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	-	-	-
20	29.6	1.008	282	† Oleic acid (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	0.993	29.5	15
21	30.1	0.967	280	† Linoleic acid (C ₁₈ H ₃₂ O ₂)	-	-	-
22	31.2	0.998	278	† Linolenic acid (C ₁₈ H ₃₀ O ₂)	-	-	-
23	33.1	1.022	-	<i>Unresolved</i>	-	-	-
-	-	-	-	<i>Unresolved</i>	0.998	35.2	16

that the chemical profiles were not significantly different between the families (Wilk’s $\lambda = 0.103$, $F_{144,458} = 1.06$, $p = 0.32$). Moreover, the families did not differ significantly in their chemical richness, their Shannon or Simpsons indices (ANOVA: Richness, $F_{9,71} = 0.690$, $p = 0.72$; Shannon index, $F_{9,71} = 0.836$, $p = 0.59$; Simpson index, $F_{9,71} = 1.06$, $p = 0.40$). Seven compounds have DP values greater than the average, in which five are the principal explanatory variables of the two first Between-families PCA factors (PCA1: 22.7% explained by heptacosane (peak 12), 20.8% by pentacosene (peak 10) and 17.3% by the peak 14; PCA2: 17.9% explained by heptacosane (peak 12), 12.2%

by nonacosane (peak 13) and 12.2% by the peak 11, Table 2). As in CHC profiles, we didn’t find any difference in the heneicosane content between the families (ANOVA, $F_{9,71} = 0.814$, $p = 0.605$).

Comparison between CHC and Dufour’s gland chemical profiles in virgin females

The CHC and DG chemical profiles were significantly different (Wilk’s $\lambda = 0.023$, $F_{26,132} = 217.9$, $p < 2.10^{-16}$). They shared 13 compounds, which represent 57% (13/23) of the compounds present in the CHC profile and 81% (13/16) of the compounds

present in the Dufour’s gland profile (Table 2). Two of them (Pentacosane and Pentacosene) are found with a DP value higher than the average in both profiles; seven were specific to the CHC profile and five to the Dufour’s gland profile. When the analysis was made only on the 13 common components, we found that the differences between the CHC and the Dufour’s gland explained 22% of the chemical profiles’ variability. These differences are mostly explained by three compounds, Tricosene (22.9%), Nonacosane (16.3%) and Stearic acid (15.3%). We found that the family effect on the euclidian distance between CHC and Dufour’s gland profiles was marginally significant (ANOVA, $F_{9,60} = 1.977$, $p = 0.058$).

Comparison between the chemical profiles of virgin and mated females

We didn’t find any difference between the chemical profiles of virgin and mated females, neither in the CHC profile (Inertia of Between-Status PCA: 1.4%, MANOVA with the females’ status as the explanatory variable: Wilk’s $\lambda = 0.562$, $F_{22,30} = 1.064$, $p = 0.43$), nor in the DG profile (Inertia of Between-Status PCA: 0.7%, MANOVA with the females’ status as the explanatory variable: Wilk’s $\lambda = 0.744$, $F_{16,39} = 0.838$, $p = 0.64$). Moreover, we did not find any compound specific to one or the other status.

Experiment 1- Dufour’s gland (DG) extract as a chemical information for choice of host patch

The behaviour of 15 females was recorded during the preliminary experiment. Overall, the females spent significantly less time on the Dufour’s gland perfumed part of the patch compared to the non-perfumed part (38% versus 62%, proportion test: $\chi^2 = 343.04$, $df = 1$, $p < 2.2 \cdot 10^{-16}$).

Experiment 2- Superparasitism avoidance

55 (out of the 67) females representing 28 families were active and exploited (*i.e.* we observed probing, antennating...) the host patches. The females did not use the local information (host perfume) for their oviposition decision: they did not avoid the perfumed hosts compared to the hexane control (mean Superparasitism index (SP) compared to 1, $p > 0.05$ for all tests after FDR correction [64], Figure 3).

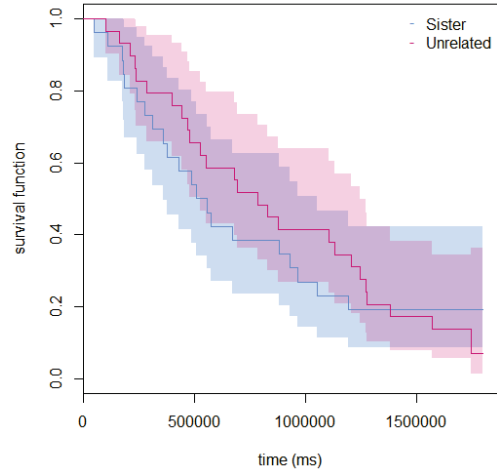


Figure 4. **Patch residence time.** The curves of patch residence time are plotted with a Kaplan-Meier representation and are accompanied by IC 95 (coloured areas).

The chemical information from the global environment did not influence the superparasitism decision: we didn’t find any difference in host avoidance according to the odorous social environment (Student test between Sister and Unrelated Environment: SP_{CHC} , $t = 1.52$, $df = 26.8$, $p = 0.14$, SP_{Dufour} , $t = 0.99$, $df = 22.1$, $p = 0.33$).

The chemical information from environment (social odorous environment) had no effect on the oviposition number: the females laid in average the same number of eggs in the two social environments (Student test: $t = -0.205$, $df = 52.15$, $p = 0.83$). However, the social environment had a strong influence on another fitness proxy: the patch residence time. Indeed, the sister social environment increased by more than 230% the female propensity to leave the patch (HR = 3.306, Table 1), although the total residence time on patches didn’t differ between the two social environments (Sister or Unrelated, survival analysis with Weibull distribution, $\chi^2 = 0.03$, $df = 1$, $p = 0.86$, Figure 4).

Furthermore, local information had an effect on the patch residence time: encountering a control larva perfumed with hexane decreased significantly the probability of leaving the patch by almost 15% (HR = 0.852, $p = 0.006$), whereas encountering a CHC-perfumed larva increased this probability by 17% ($p = 0.029$). The interaction between the Sister environment and the encountering of a CHC-perfumed larva was also significant and its hazard ratio lower than 1 (HR = 0.814, Table 1). This means that the propensity to leave the patch when encountering a CHC-perfumed larva was less-

DISCUSSION

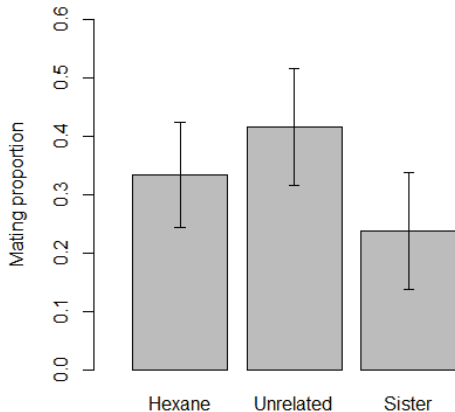


Figure 5. **Mating proportion (\pm SE) in different perfumed conditions.** Matings occurred in small vials containing filter paper with different perfumes (see also Figure 2). Control: hexane ($N_{\text{Control}} = 21$), Unrelated: Perfume from Dufour's gland extract from a female unrelated to the focal female ($N_{\text{Unrelated}} = 24$), Sister: Perfume from Dufour's gland extract from a sister of the focal female ($N_{\text{Sister}} = 21$).

ened in a Sister environment compared to an Unrelated one. Surprisingly, we did not found the expected repellent effect of Dufour-perfumed larvae ($p = 0.977$, Table1).

Experiment 3- Sib-mating avoidance

We observed the mating behaviour of 66 females from 24 families. The mating proportion did not differ significantly according to the odour added in the mating vial (GLM (binomial family), Deviance= 1.632, $df = 1$, $p = 0.201$, Figure 5). The latency before mating was significantly negatively affected by the number of courtship events (Cox model, Hazard ratio = 1.581, $p = 1.12 \times 10^{-6}$), but not by the odorous modality compared to the hexane control (Unrelated DG: $\beta = 0.561$, $SE = 0.529$, $HR = 1.752$, $p = 0.289$; Sister DG: $\beta = -0.220$, $SE = 0.594$, $HR = 0.803$, $p = 0.711$). We compared the number of courtship events in the different odorous modalities to the hexane control and we didn't find any difference that could explain the difference of mating latency between modalities (GLM (Poisson family), Deviance= 81.04, $df = 2$, $p = 0.797$).

In this study we tested the "semiochemical parsimony" hypothesis [40], *i.e.* the use of a given chemical information in different ecological contexts. More specifically we investigated whether the CHC and the Dufour's gland (DG) in *Venturia canescens* wasps contained the same chemical information used to infer relatedness in mate and host choice contexts. Our results showed that prerequisites for this hypothesis are present in this species. We first showed, through chemical analyses, that CHC and DG profiles share more than half of their components and are mostly composed of linear hydrocarbons from C_{21} to C_{29} . Moreover, some of these common compounds are involved in kin recognition in other species (see Table 3) and therefore could be used in *V. canescens* to discriminate kin from non kin. Part of these compounds are different between families and therefore could play a role in kin discrimination through family discrimination in our species. We then demonstrated that females are able to use CHC, already known to be involved in mate choice [10], to modify the time spend to search for hosts on a patch. Nevertheless, we were not able to detect any influence of DG on mate choice, as expected under the semiochemical parsimony hypothesis. Overall, our results lead to the rejection of this hypothesis. We discuss below reasons that could lead females to use specific cues in each ecological context.

The "semiochemical parsimony" hypothesis [40] relies on the idea that producing a specific chemical information for each ecological context is costly for the emitters. Moreover, the receivers of these multiple chemical information should also endure costs, since they should have developed cognitive and cellular machinery to receive and interpret these numerous cues. As a consequence Blum [40] suggested that species have evolved to re-use existing semiochemical components in different ecological contexts. CHC and DG compounds in Hymenoptera are good candidates to test this hypothesis because of the partial overlap between their ecological functions and the correlation between the two chemical composition (e.g. in the social wasp *Ropalidia marginata* [65]). In the bumble bee, both CHC and DG compounds are known to signal worker fertility [44]. Indeed, in this social wasp, the authors found a positive correlation between CHC, DG and haemolymph chemical compounds, suggesting a common source of hydrocarbons for both CHC and DG after conveyed by haemolymph [65]. In the solitary wasp *V. canescens*, we identified the compounds of CHC

and DG and showed that their compositions were strongly correlated and that certain compounds shared by the CHC and the DG could be involved in kin discrimination. We identified 20 out of 23 compounds present in CHC profiles, and 14 out of the 16 compounds present in the Dufour's gland extract (Table 2). Among the 14 compounds of the DG we identified in the present study, six were already described [46]. We thus described here eight new compounds of this gland in *V. canescens*. All compounds identified are non-volatile long-chain hydrocarbons (n-alkanes, n-alkenes, fatty acids and one ester) well known for their implications in chemical communication in many insect species ([2] and Table 3).

More than half of the components (with the same ratio) are present in both CHC and DG extracts, and especially the major compounds (such as Heneicosane, Tricosane, Tricosene, its derivatives, Pentacosane and Pentacosene), which goes well with the parsimony hypothesis. Interestingly, some of the shared compounds, the alkanes and alkenes between C₂₁ and C₂₅ are markers of intraspecific recognition, such as nestmate recognition (n-Tricosene in ants of the genera *Camponotus* [20], n-Heneicosane in thelytokous strain of *V. canescens* [31, 46]), or in mate recognition (n-Tricosene in *Drosophila melanogaster* [66] or n-Tricosene and n-Pentacosene in *Drosophila simulans* [67]) (Table 3). The fatty acids were also found to be implied in nestmate recognition (Palmitic and Oleic acid in a termite [68]) and in sex recognition (Linoleic acid [69]) (Table 3). These compounds could explain the kin discrimination effects of the CHC and Dufour's gland in *V. canescens*, either in the mate-choice context (CHC, [10]) or in the superparasitism avoidance context (Dufour's gland, [38, 70]). These latter studies showed that thelytokous (asexual) *V. canescens* can use DG extract to discriminate a host already parasitized by a related or an unrelated. We showed that chemicals from DG influence oviposition strategy in arrhenotokous (sexual) females. They allocate less time on a host patch that was already marked by DG extracts, indicating that these extracts contain at least information of conspecifics recognition.

Among the different compounds we identified, the C₂₅ alkanes and alkenes, as for instance Oleic acid, were likely involved in kin recognition (Table 3). They had a diagnostic power value higher than the average both in CHC and in Dufour's gland. Under the hypothesis that the chemical profile (*i.e.* a mix of compounds) is used as a cue to discriminate kin, the profile variability (in the number of compounds and in the quantity of

compounds) should be less variable within than between families. Nonetheless between families, there are around 10% of differences in chemical profiles of CHC and DG but these differences are not statistically different. In several social insect species CHC signatures marked the belonging to a colony [19, 62, 71–74]. However, kin and nestmate recognition are rarely distinguished in social species and therefore nestmate are almost always assumed to be kin. In the parasitic wasp *Bracon hebetor* Ode *et al.* [27] showed that this nestmate recognition (here brood recognition) was mediated by environmental cues. Thus, *B. hebetor* females mated indifferently with brothers and unrelated males if they develop on another host. Less is known about solitary insect such as *V. canescens*. Previous behavioural experiments have shown kin recognition in both mating and superparasitism avoidance contexts [10, 31, 38] and it is therefore surprising that we did not find families differences in our chemical profiles. However, the absence of differences between families cannot rule out the parsimony hypothesis. The CHC and DG scents are a mix of chemical molecules that could have other functions than kin recognition, such as sex or species recognition or even only physiological functions such as resistance to desiccation. Therefore, these "non-kin recognition" molecules can contribute to individual variability of the chemical profiles that can blur the signal. That's why, in order to go further, we completed the chemical ecology analysis by behavioural experiments.

In experiments where we tested whether CHC can be used by *V. canescens* to avoid superparasitism, we found an influence of the social odorous environment (characterized by the odours coming from the donor females and their relatedness with the focal female exploiting the patch). The females were indeed far more prone to leave a patch when the odours came from their sisters. It is congruent with previous studies where the females used conspecific cues for patch-leaving decisions [39], and superparasitize less often self- or kin-parasitized hosts compared to non-kin parasitized hosts [31, 38]. Contrary to these previous studies, we did not find any oviposition avoidance of perfumed hosts (either with CHC or Dufour's gland content), which mimicked a previous oviposition by a conspecific in that host. One explanation of this discrepancy between our data and the previous studies could be that we used *V. canescens* sexual strain whereas avoidance was shown with asexual wasps. However, Amat *et al.* [39] demonstrated the existence of superparasitism avoidance in the sexual strain and thus the use of chemical

marks deposited on the host during egg-laying. It is therefore possible that the superparasitism avoidance effect exists in the sexual strain but is weaker than in asexual strain and therefore more difficult to detect.

Amat *et al.* [39] found that in an asexual strain of *V. canescens*, encountering a healthy host decreased the female propensity to leave the patch, whereas encountering an already parasitized host increased the leaving propensity. They were not able to obtain this result with sexual strain. However, we find the same pattern in our experiment with sexual strain, with the encountering of host perfumed with hexane control (*i.e.* "healthy" host) decreased by 15% the female propensity to leave the patch whereas encountering a CHC-perfumed host increased by 17% the leaving propensity. Surprisingly, we did not find the expected repellent effect of the Dufour's gland perfumed host. It is not likely that we did not extract the Dufour's gland perfume for two reasons. First, we used the same extraction method than for our GC-MS experiment, where compounds were detected. Second, we found this effect in the foraging behaviour of the females in the first experiment. On the other hand, the concentration of Dufour's gland perfume can be lesser than threshold value per surface unit required to elicit a behaviour. Indeed, we deposited similar quantities of Dufour's gland extract in both preliminary and choice experiments but, in the preliminary experiment, the deposits were concentrated on the half of a 5 cm diameter patch, whereas they were randomly distributed in a 14 cm diameter patch in the choice experiment (see Figure 1). Further experiments should be done to test this threshold hypothesis on the DG behavioural effect. Besides these local effects, we have shown that the social environment had an impact on the female propensity to leave a host patch. We found a significant interaction between the social environment and the repellent effect of CHC-perfumed host. It seems that the local effect of perfumed hosts is partly hidden by the global environment odour of a related female. It is possible that, as a female enters a globally related patch, the global ovipositing value is decreased due to superparasitism avoidance. Therefore, as the patch is considered by the female as a "low-quality" patch, the local information are less needed to make a choice between different hosts. This interaction can also explained why we did not detect superparasitism avoidance during oviposition. If the effect is weak in arrhenotokous (sexual) strains, this interaction between global social information and local perfumed host can impaired the detection and

avoidance of marked-hosts.

In the third behavioural experiment that tested the effect of Dufour's gland as a kin marker in a mating context, we did not detect any disturbing effect of the Dufour's gland odours on the mating propensity. This result does not plead in favour of semiochemical parsimony hypothesis under which we expected that DG odour from related decreases the mating propensity (as observed with CHC in Metzger *et al* 2010a). This unexpected result could be due to the fact that Dufour's gland compounds are extracted from females (as the Dufour's gland is a female gland). It is likely that a "female signature" is present in the Dufour's gland as it produced sex pheromones in Formicidae or sexual attractant in non-social bees [30]. Therefore, it is possible that the female signature hides the kin signal and then that the Dufour's gland extract are not used by another female as a cue in mate choice. Nonetheless, the numbers of matings tend to decrease when the females are confronted to a sister scent, which is expected if the Dufour's gland scent of a kin is used as a cue to infer the partner relatedness. Thus, this opens interesting directions of future research to untangle sex and kin recognition signatures in the Dufour's gland and their use by the females in a mate choice context.

In many insect species, the cuticular hydrocarbons are used as cues by males to assess the mating status of females and eventually avoid the already mated partners, such as in *Drosophila melanogaster* [79], mosquitoes (*Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* [17]), or bees (*Andrena nigroaenea* [80]). Such suppression of mated females attractiveness is thought to be especially important in monoandrous species, where courtship toward a mated female is disadvantageous for both males and females [81]. Surprisingly, we did not find any difference between the chemical profiles or virgin and mated females in the monoandrous *V. canescens*. This finding however converges with previous behavioural data that showed that mated females remain attractive to males, even if they systematically refuse multiple matings [56].

The existence of at least two kin signals in *V. canescens* questioned the evolution of different cognitive pathways for kin recognition in insects. One lead to explain this maintenance can lie in phylogenetic history of Hymenopteran. Indeed, the use of CHC during mate choice is well assessed in numerous species [2] and can be likely extrapolated to all hymenopteran species. The Dufour's gland is also present in all females from this order, but has only evolved in parasitic species to mark the parasitized hosts. As non-parasitic species only rely on CHC

Table 3. **Review of the known functions in communication of the chemical compounds found in *V. canescens* (in either CHC or Dufour’s gland).** To our knowledge, no functions in communication were assessed for four components despite their presences in CHC of some species: isopropyl palmitate, hentriacontane, stearic and linolenic acid.

Chemical compounds	Species	Ecological roles	References
Heneicosane (C ₂₁ H ₄₄)	<i>Venturia canescens</i> (thelytokous)	Nestmate recognition	[31, 46]
	<i>Anopheles gambiae</i>	Mate recognition	[17]
Heneicosene (C ₂₁ H ₄₂)	<i>Drosophila virilis</i>	Mate recognition	[16]
	<i>Aleochara curtula</i>	Mate recognition	[75]
Isopropyl palmitate (C ₁₉ H ₃₈ O ₂)	-	-	-
Docosene (C ₂₂ H ₄₄)	<i>Venturia canescens</i>	Nestmate recognition	[76]
Tricosane (C ₂₃ H ₄₈)	<i>Anopheles gambiae</i>	Mate recognition	[17]
	<i>Apis mellifera</i>	Diploid drone recognition	[77]
Tricosene (C ₂₃ H ₄₆)	<i>Campotonus floridanus</i>	Nestmate recognition	[20]
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Mate recognition	[66]
	<i>Drosophila simulans</i>	Mate recognition	[67]
Pentacosane (C ₂₅ H ₄₂)	<i>Aedes aegypti</i>	Mate recognition	[17]
	<i>Apis mellifera</i>	Diploid drone recognition	[77]
Pentacosene (C ₂₅ H ₄₀)	<i>Drosophila simulans</i>	Mate recognition	[67]
Hexacosane (C ₂₆ H ₅₄)	<i>Aedes aegypti</i>	Mate recognition	[17]
Heptacosane (C ₂₇ H ₅₆)	<i>Aedes aegypti</i>	Mate recognition	[17]
	<i>Colias eurytheme</i>	Mate recognition	[78]
	<i>Colias philodice</i>	Mate recognition	[78]
	<i>Apis mellifera</i>	Diploid drone recognition	[77]
	<i>Anopheles stephensis</i>	Chemical communication	[18]
Nonacosane (C ₂₉ H ₆₀)	<i>Apis mellifera</i>	Diploid drone recognition	[77]
	<i>Colias eurytheme</i>	Mate recognition	[78]
	<i>Colias philodice</i>	Mate recognition	[78]
	<i>Coptotermes formosanus</i>	Nestmate recognition	[68]
Squalene (C ₃₀ H ₅₀)	<i>Apis mellifera</i>	Diploid drone recognition	[77]
Hentriacontane (C ₃₁ H ₆₄)	-	<i>Unknown</i>	-
Stearic acid (C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	-	<i>Unknown</i>	-
Oleic acid (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	<i>Coptotermes formosanus</i>	Nestmate recognition	[68]
Linoleic acid (C ₁₈ H ₃₂ O ₂)	<i>Nannotrigona testaceicornis</i>	Sex recognition	[69]
Linolenic acid (C ₁₈ H ₃₀ O ₂)	-	<i>Unknown</i>	-

for kin recognition, it is possible that kin recognition in DG has evolved independently in parasitic species as a complementary system of CHC kin recognition. Therefore, comparative studies on chemical compounds of GD in parasitic and non parasitic wasps could help to answer this challenging question.

Acknowledgements: We thank François De-bias and Elsa Day for the field work and the technical support of this study.

Authors’ contributions: MC, IA, LM and ED designed the behavioural experiments, interpreted the analysis and wrote the article. MC, GC, GM, LM and ED designed the chemical experiment and MC and GM performed the chemical analysis. MC performed the behavioural experiment.

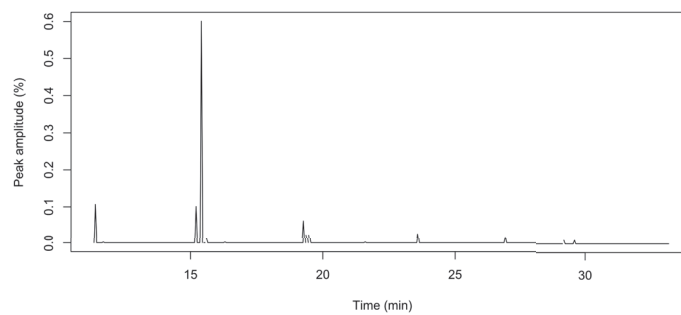
- [1] Jill M. Mateo, “Recognition systems and biological organization: The perception component of social recognition,” *Annales Zoologici Fennici* **41**, 729–745 (2004).
- [2] Björn G. Johansson and Thérèse M. Jones, “The role of chemical communication in mate choice,” *Biological Reviews* **82**, 265–289 (2007).
- [3] Ulrika Candolin, “The use of multiple cues in mate choice,” *Biological Reviews* **78**, 575–595 (2003).
- [4] Zuleyma Tang-Martinez, “The mechanisms of kin discrimination and the evolution of kin recognition in vertebrates: a critical re-evaluation,” *Behavioural Processes* **53**, 21–40 (2001).
- [5] Marie J. E. Charpentier, Marylène Boulet, and Christine M. Drea, “Smelling right: the scent of male lemurs advertises genetic quality and relatedness,” *Molecular Ecology* **17**, 3225–3233 (2008).
- [6] Aurélie Cohas, Nigel Gilles Yoccoz, Christophe Bonenfant, Benoît Goossens, Céline Genton, Maxime Galan, Bart Kempenaers, and Dominique Allainé, “The genetic similarity between pair members influences the frequency of extrapair paternity in alpine marmots,” *Animal Behaviour* **76**, 87–95 (2008).
- [7] I. Herfindal, H. Haanes, K. H. Roed, E. J. Solberg,

* marie.collet@univ-lyon1.fr

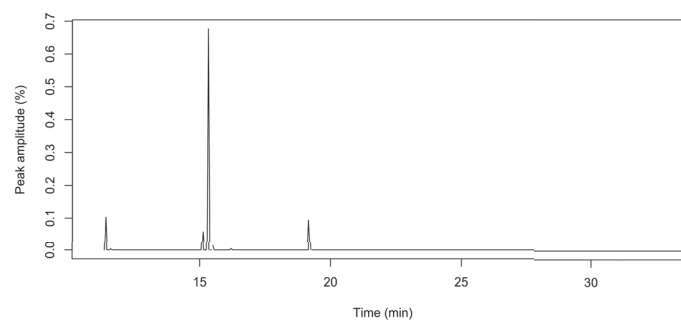
- S. S. Markussen, M. Heim, and B.-E. Saether, "Population properties affect inbreeding avoidance in moose," *Biology Letters* **10**, 20140786–20140786 (2014).
- [8] Aneta Arct, Szymon M. Drobniak, and Mariusz Cichoń, "Genetic similarity between mates predicts extrapair paternity—a meta-analysis of bird studies," *Behavioral Ecology* **26**, 959–968 (2015).
- [9] T. Tregenza and N. Wedell, "Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage: invited review," *Molecular Ecology* **9**, 1013–1027 (2000).
- [10] Marie Metzger, Carlos Bernstein, Thomas S. Hoffmeister, and Emmanuel Desouhant, "Does Kin Recognition and Sib-Mating Avoidance Limit the Risk of Genetic Incompatibility in a Parasitic Wasp?" *PLoS ONE* **5**, e13505 (2010).
- [11] S. P. Robinson, W. J. Kennington, and L. W. Simmons, "Assortative mating for relatedness in a large naturally occurring population of *Drosophila melanogaster*," *Journal of Evolutionary Biology* **25**, 716–725 (2012).
- [12] A. Pusey and M. Wolf, "Inbreeding avoidance in animals," *Trends in Ecology & Evolution* **11**, 201–206 (1996).
- [13] Lukas F. Keller and Donald M. Waller, "Inbreeding effects in wild populations," *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 230–241 (2002).
- [14] Adele M. Fielde, "Further Study of an Ant," *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **53**, 521–544 (1901).
- [15] Ralph W. Howard and Gary J. Blomquist, "Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons," *Annual Review of Entomology* **50**, 371–393 (2005).
- [16] R. J. Bartelt and L. L. Jackson, "Hydrocarbon component of the *drosophila virilis* (diptera: Drosophilidae) aggregation pheromone: (z)-10-heneicosene," *Annals of the Entomological Society of America* **77**, 364–371 (1984).
- [17] Addie R. Polerstock, Sanford D. Eigenbrode, and Marc J. Klowden, "Mating alters the cuticular hydrocarbons of female *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Aedes aegypti* (diptera: Culicidae)," *Journal of Medical Entomology* **39**, 545–552 (2002).
- [18] Brandon Brei, John D. Edman, Ben Gerade, and J. Marshall Clark, "Relative abundance of two cuticular hydrocarbons indicates whether a mosquito is old enough to transmit malaria parasites," *Journal of Medical Entomology* **41**, 807–809 (2004).
- [19] D. Liang and J. Silverman, "'You are what you eat': Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*," *Naturwissenschaften* **87**, 412–416 (2000).
- [20] Andreas Simon Brandstaetter, Annett Endler, and Christoph Johannes Kleineidam, "Nestmate recognition in ants is possible without tactile interaction," *Naturwissenschaften* **95**, 601–608 (2008).
- [21] Miriam Brandt, Ellen van Wilgenburg, Robert Sulc, Kenneth J. Shea, and Neil D. Tsutsui, "The scent of supercolonies: the discovery, synthesis and behavioural verification of ant colony recognition cues," *BMC Biology* **7**, 71 (2009).
- [22] Stephen J. Martin, Emma Vitikainen, Sue Shemilt, Falko P. Drijfhout, and Liselotte Sundström, "Sources of Variation in Cuticular Hydrocarbons in the Ant *Formica exsecta*," *Journal of Chemical Ecology* **39**, 1415–1423 (2013).
- [23] Ricarda Kather, Falko P. Drijfhout, and Stephen J. Martin, "Task Group Differences in Cuticular Lipids in the Honey Bee *Apis mellifera*," *Journal of Chemical Ecology* **37**, 205–212 (2011).
- [24] Tiago Falcón, Maria Juliana Ferreira-Caliman, Francis Morais Franco Nunes, Érica Donato Tanaka, Fábio Santos do Nascimento, and Márcia Maria Gentile Bitondi, "Exoskeleton formation in *Apis mellifera*: Cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development," *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **50**, 68–81 (2014).
- [25] Aline Borba dos Santos and Fábio Santos do Nascimento, "Cuticular Hydrocarbons of Orchid Bees Males: Interspecific and Chemotaxonomy Variation," *PLoS ONE* **10**, e0145070 (2015).
- [26] Robert J. Bartelt, Allard A. Cossé, Richard J. Petroski, and David K. Weaver, "Cuticular Hydrocarbons and Novel Alkenediol Diacetates from Wheat Stem Sawfly (*Cephus cinctus*): Natural Oxidation to Pheromone Components," *Journal of Chemical Ecology* **28**, 385–405 (2002).
- [27] PAUL J. Ode, MICHAEL F. Antolin, and MICHAEL R. Strand, "Brood-mate avoidance in the parasitic wasp *Bracon hebetor* Say," *Animal Behaviour* **49**, 1239–1248 (1995).
- [28] John F. Andersen, Stephen L. Buchmann, David Weisleder, Ronald D. Plattner, and Robert L. Minckley, "Identification of thoracic gland constituents from male *Xylocopa* spp. latreille (Hymenoptera: Anthophoridae) from Arizona," *Journal of Chemical Ecology* **14**, 1153–1162 (1988).
- [29] Man-Yeon Choi and Robert K. Vander Meer, "Multiple functions of fire ant *Solenopsis invicta* mandibular gland products," *Physiological Entomology* **40**, 196–204 (2015).
- [30] F. C. Abdalla and C. da Cruz-Landim, "Dufour glands in the hymenopterans (Apidae, Formicidae, Vespidae): a review," *Revista Brasileira de Biologia* **61**, 95–106 (2001).
- [31] Gay C. Marris, Stephen F. Hubbard, and Charles Scrimgeour, "The perception of genetic similarity by the solitary parthenogenetic parasitoid *Venturia canescens*, and its effects on the occurrence of superparasitism," *Entomologia Experimentalis et Applicata* **78**, 167–174 (1996).
- [32] T. S. Hoffmeister, "Marking decisions and host discrimination in a parasitoid attacking concealed hosts," *Canadian Journal of Zoology* **78**, 1494–1499 (2000), wOS:000089016600022.
- [33] Jacques J.M Van Alphen and Marcel E. Visser, "Superparasitism as an Adaptive Strategy for Insect Parasitoids," *Annual Review of Entomology* **35**, 59–79 (1990).
- [34] J. Martinez, F. Fleury, and J. Varaldi, "Heritable variation in an extended phenotype: the case of a parasitoid manipulated by a virus," *Journal of*

- Evolutionary Biology* **25**, 54–65 (2012).
- [35] Xulin Chen, Gabriela Pavan Bordini, and Philip A. Stansly, “Avoidance of Parasitized Hosts by Female Wasps of *Tamarixia radiata* (Hymenoptera: Eulophidae), Parasitoid of *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae), Vector of Citrus Greening Disease,” *Florida Entomologist* **99**, 311–313 (2016).
- [36] G. C. Marris and Julia Casperd, “The relationship between conspecific superparasitism and the outcome of in vitro contests staged between different larval instars of the solitary endoparasitoid *Venturia canescens*,” *Behavioral Ecology and Sociobiology* **39**, 61–69 (1996).
- [37] Harry L. S. Roberts, Oliver Trüie, and Otto Schmidt, “The development of the endoparasitoid wasp *Venturia canescens* in superparasitised *Ephesttia kuehniella*,” *Journal of Insect Physiology* **50**, 839–846 (2004).
- [38] S. F. Hubbard, Gay Marris, Amanda Reynolds, and G. W. Rowe, “Adaptive Patterns in the Avoidance of Superparasitism by Solitary Parasitic Wasps,” *The Journal of Animal Ecology* **56**, 387 (1987).
- [39] Isabelle Amat, Emmanuel Desouhant, and Carlos Bernstein, “Differential use of conspecific-derived information by sexual and asexual parasitic wasps exploiting partially depleted host patches,” *Behavioral Ecology and Sociobiology* **63**, 563–572 (2009).
- [40] Murray S. Blum, “Semi-chemical Parsimony in the Arthropoda,” *Annual Review of Entomology* **41**, 353–374 (1996).
- [41] Alain Robert, Alexis Peppuy, Etienne Sémon, François D. Boyer, Michael J. Lacey, and Christian Bordereau, “A new C12 alcohol identified as a sex pheromone and a trail-following pheromone in termites: the diene (Z,Z)-dodeca-3,6-dien-1-ol,” *Naturwissenschaften* **91**, 34–39 (2004).
- [42] Sarah D. Kocher and Christina M. Grozinger, “Cooperation, Conflict, and the Evolution of Queen Pheromones,” *Journal of Chemical Ecology* **37**, 1263–1275 (2011).
- [43] Henry Chung and Sean B. Carroll, “Wax, sex and the origin of species: Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating,” *BioEssays* **37**, 822–830 (2015).
- [44] Pierre Blacher, Laurie Boreggio, Chloé Leroy, Paul Devienne, Nicolas Châline, and Stéphane Chaméron, “Specific recognition of reproductive parasite workers by nest-entrance guards in the bumble bee *Bombus terrestris*,” *Frontiers in Zoology* **10**, 74 (2013).
- [45] L. W. Beukeboom, “Single-locus complementary sex determination in the ichneumonid *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera),” *Netherlands Journal of Zoology* **51**, 1–15 (2001).
- [46] A. Mudd, R. C. Fisher, and M. C. Smith, “Volatile hydrocarbons in the dufour’s gland of the parasite *Nemeritis canescens* (Grav.) (Hymenoptera: ichneumonidae),” *Journal of Chemical Ecology* **8**, 1035–1042 (1982).
- [47] Marie Collet, Chloé Vayssade, Alexandra Auguste, Laurence Mouton, Emmanuel Desouhant, Thibaut Malausa, and Xavier Fauvergue, “Diploid male production correlates with genetic diversity in the parasitoid wasp *Venturia canescens*: a genetic approach with new microsatellite markers,” *Ecology and Evolution* **6**, 6721–6734 (2016).
- [48] Isabelle Amat, Jacques J. M. van Alphen, Alex Kacelnik, Emmanuel Desouhant, and Carlos Bernstein, “Adaptations to different habitats in sexual and asexual populations of parasitoid wasps: a meta-analysis,” *PeerJ* **5**, e3699 (2017).
- [49] I. Mateo Leach, *Genetics of arrhenotokous and thelytokous reproduction in *Venturia canescens* (Hymenoptera)*, Ph.D. thesis, University of Groningen, Groningen (2009).
- [50] Vincent Foray, Helene Henri, Sonia Martinez, Patricia Gibert, and Emmanuel Desouhant, “Occurrence of arrhenotoky and thelytoky in a parasitic wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae): Effect of endosymbionts or existence of two distinct reproductive modes?” *European Journal of Entomology* **110**, 103–107 (2013), wOS:000318038000013.
- [51] G. Salt, “The hosts of *Nemeritis canescens*: a problem in the host specificity of insect parasitoids,” *Ecological Entomology* **1**, 63–67 (1976).
- [52] S.A. Corbet, “Mandibular gland secretion of larvae of the flour moth, *Anagasta kuehniella*, contains an epideictic pheromone and elicits oviposition movements in a Hymenopteran parasite.” *Nature* **232**, 481–484 (1971).
- [53] David Rogers, “The Ichneumon Wasp *Venturia Canescens*: Oviposition and Avoidance of Superparasitism,” *Entomologia Experimentalis et Applicata* **15**, 190–194 (1972).
- [54] Isabelle Amat, Carlos Bernstein, and Jacques J. M. van Alphen, “Does a deletion in a virus-like particle protein have pleiotropic effects on the reproductive biology of a parasitoid wasp?” *Journal of Insect Physiology* **49**, 1183–1188 (2003).
- [55] Anna Chuine, Sandrine Sauzet, François Debias, and Emmanuel Desouhant, “Consequences of genetic incompatibility on fitness and mate choice: the male point of view,” *Biological Journal of the Linnean Society* **114**, 279–286 (2015).
- [56] Marie Metzger, Deborah Fischbein, Alexandra Auguste, Xavier Fauvergue, Carlos Bernstein, and Emmanuel Desouhant, “Synergy in information use for mate finding: demonstration in a parasitoid wasp,” *Animal Behaviour* **79**, 1307–1315 (2010).
- [57] E. Kováts, “Gas-chromatographische charakterisierung organischer verbindungen. teil 1: Retentionsindices aliphatischer halogenide, alkohole, aldehyde und ketone,” *Helvetica Chimica Acta* **41**, 1915–1932 (1958).
- [58] E. G. Harrison, R. C. Fisher, and K. M. Ross, “The temporal effects of Dufour’s gland secretion in host discrimination by *Nemeritis canescens*,” *Entomologia Experimentalis et Applicata* **38**, 215–220 (1985).
- [59] R Core Team, “R: A language and environment for statistical computing.” *R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria* (2015).
- [60] J. Aitchison, *The statistical analysis of composi-*

- tional data, Monographs on statistics and applied probability (Chapman and Hall, London ; New York, 1986).
- [61] Sylvain Dolédec and Daniel Chessel, “Co-inertia analysis: an alternative method for studying species–environment relationships,” *Freshwater Biology* **31**, 277–294 (1994).
- [62] Jelle Stijn van Zweden, “Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons,” *Insect Hydrocarbons*, 222–243 (2010).
- [63] Terry M. Therneau, “coxme: Mixed Effects Cox Models,” (2015).
- [64] Yoav Benjamini and Yosef Hochberg, “Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing,” *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* **57**, 289–300 (1995).
- [65] A. Mitra and R. Gadagkar, “The Dufour’s gland and the cuticle in the social wasp *Ropalidia marginata* contain the same hydrocarbons in similar proportions,” *Journal of Insect Science* **14**, 9 (2014).
- [66] Fabien Lacaille, Makoto Hiroi, Robert Twele, Tsuyoshi Inoshita, Daisuke Umemoto, Gérard Manière, Frédéric Marion-Poll, Mamiko Ozaki, Wittko Francke, Matthew Cobb, Claude Everaerts, Teiichi Tanimura, and Jean-François Ferveur, “An inhibitory sex pheromone tastes bitter for *Drosophila* males,” *PLOS ONE* **2**, e661 (2007).
- [67] Gwénaëlle Bontonou, Béatrice Denis, and Claude Wicker-Thomas, “Male pheromone polymorphism and reproductive isolation in populations of *Drosophila simulans*,” *Ecology and Evolution* **2**, 2527–2536 (2012).
- [68] M Guadalupe Rojas, C Werle, and JA Morales-Ramos, “Changes in the ratios of four cuticular hydrocarbons in formosan subterranean termite workers (*Coptotermes formosanus*) (Isoptera: Rhinotermitidae) due to diet,” *Sociobiology* **46**, 131–140 (2005).
- [69] Adriana Pianaro, Cristiano Menezes, Warwick Estevam Kerr, Rodrigo B. Singer, Eda Flávia Lotufo R. A. Patricio, and Anita J. Marsaioli, “Stingless bees: Chemical differences and potential functions in *Nanotrigona testaceicornis* and *Plebeia droryana* males and workers,” *Journal of Chemical Ecology* **35**, 1117–1128 (2009).
- [70] A. Mudd and S. A. Corbet, “Response of the ichneumonid parasite *Nemeritis canescens* to kairomones from the flour moth, *Ephestia kuehniella*,” *Journal of Chemical Ecology* **8**, 843–850 (1982).
- [71] A. Oppelt, N. Spitzenpfeil, J. Kroiss, and Jürgen Heinze, “The significance of intercolonial variation of cuticular hydrocarbons for inbreeding avoidance in ant sexuals,” *Animal Behaviour* **76**, 1029–1034 (2008).
- [72] Abraham Hefetz, Gunnar Bergström, and Jan Tengö, “Species, individual and kin specific blends in Dufour’s gland secretions of halictine bees,” *Journal of Chemical Ecology* **12**, 197–208 (1986).
- [73] Stephen J. Martin, Heikki Helanterä, and Falko P. Drijfhout, “Colony-specific Hydrocarbons Identify Nest Mates in Two Species of *Formica* Ant,” *Journal of Chemical Ecology* **34**, 1072–1080 (2008).
- [74] Stephen J. Martin, Emma Vitikainen, Heikki Helanterä, and Falko P. Drijfhout, “Chemical basis of nest-mate discrimination in the ant *Formica exsecta*,” *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **275**, 1271–1278 (2008).
- [75] K. Peschke, “Cuticular hydrocarbons regulate mate recognition, male aggression, and female choice of the rove beetle, *Aleochara curtula*,” *Journal of Chemical Ecology* **13**, 1993–2008 (1987).
- [76] Anna Chuine, *Des mécanismes aux conséquences adaptatives du choix du partenaire sexuel pour la compatibilité génétique. Exemple d’un hyménoptère parasitoïde soumis à la dépression de consanguinité.*, Ph.D. thesis, Université Claude Bernard Lyon 1 (2014).
- [77] Giulia Santomauro, Neil J. Oldham, Wilhelm Boland, and Wolf Engels, “Cannibalism of diploid drone larvae in the honey bee (*Apis mellifera*) is released by odd pattern of cuticular substances,” *Journal of Apicultural Research* **43**, 69–74 (2004).
- [78] John W. Grula, James D. McChesney, and Orley R. Taylor, “Aphrodisiac pheromones of the sulfur butterflies *Colias eurytheme* and *C. philodice* (Lepidoptera, Pieridae),” *Journal of Chemical Ecology* **6**, 241–256 (1980).
- [79] David Scott, Rollin C. Richmond, and David A. Carlson, “Pheromones exchanged during mating: a mechanism for mate assessment in *Drosophila*,” *Animal Behaviour* **36**, 1164–1173 (1988).
- [80] F. P. Schiestl and Manfred Ayasse, “Post-mating odor in females of the solitary bee, *Andrena nigroaenea* (Apoidea, Andrenidae), inhibits male mating behavior,” *Behavioral Ecology and Sociobiology* **48**, 303–307 (2000).
- [81] H. C. J. Godfray, *Parasitoids: Behavioral and Evolutionary Ecology* (Princeton University Press, 1994) google-Books-ID: B1ZxjLyGQjQC.



(a) CHC



(b) Dufour's gland

Figure S1. **Chromatograms of CHC and DG scents obtained by GC-MS from the same virgin female.** (a) Chromatograms of the CHC scent. (b) Chromatogram of the DG scent. For a better visualisation, the chromatograms are scaled by the total area of the chromatogram, leading the amplitude of each peak being a percentage of the total area. Note the similarities between the two chromatograms.

6.3 Discussion

La mise en perspective de l'évolution des mécanismes de reconnaissance de parentèle dans le cadre du superparasitisme plutôt que dans celui du choix du partenaire sexuel nous a fait nous interroger sur la ressemblance des signaux transmis dans ces deux contextes écologiques. Nous avons par conséquent analysé chimiquement ces deux signatures (*i.e.* CHC pour le choix du partenaire sexuel et glande de Dufour pour l'évitement du superparasitisme). Nous avons décrit pour la première fois la composition des CHC et complété nos connaissances sur la glande de Dufour. Nous avons de plus montré que ces deux signatures avaient plus d'une dizaine de composés communs, dont certains connus pour leur implication dans la reconnaissance dans d'autres espèces d'Insectes, ce qui plaide en faveur de notre hypothèse de parcimonie chimique. En effet, la présence de composés communs est un prérequis nécessaire à la parcimonie chimique. Cependant, nous n'avons pas été capables d'identifier une signature spécifique par famille, ce qui est attendu dans le cadre de la reconnaissance de parentèle. Les expériences de comportements ont montré une utilisation des CHC par les femelles lors de choix du temps d'exploitation d'un patch d'hôtes mais nous n'avons pas démontré d'utilisation de la glande de Dufour comme un marqueur d'appareillement lors du choix du partenaire sexuel. La mise en commun de tous nos résultats nous a donc conduit à rejeter notre hypothèse de parcimonie et ainsi notre hypothèse d'évolution de la reconnaissance de parentèle dans le cadre du choix du partenaire comme un sous-produit de celle de l'évitement du superparasitisme.

Face à ces résultats, ainsi que ceux du chapitre précédent, l'évolution de la reconnaissance de parentèle semble complexe chez *V. canescens*. Une piste émerge cependant d'une des spécificités de notre modèle biologique, la parasitoïdie. Une histoire évolutive possible pour expliquer la coexistence de deux systèmes proches de reconnaissance de parentèle est que l'utilisation des CHC est ancestrale et commune à tous les Hyménoptères. Une reconnaissance des hôtes via le marquage de la glande de Dufour, présente chez toutes les femelles hyménoptères (Abdalla and Cruz-Landim, 2001), n'aurait, elle, évolué que dans les lignées parasites. Or des études récentes démontrent qu'il n'y aurait qu'un seul événement d'acquisition de style de vie parasite chez les hyménoptères, lors de la transition Orussoidea-Apocrites et qui implique l'existence d'un seul ancêtre parasitoïde endophyte ayant vécu au Permien ou au Triassique (289-211 millions d'années) (Whitfield, 1998, 2003; Peters et al., 2017). La monophylie du groupe des hyménoptères parasites pourrait ainsi permettre de tester cette hypothèse d'apparition successive de la reconnaissance de parentèle via les CHC puis de celle via la glande de Dufour pour la reconnaissance des hôtes. L'analyse de la signature chimique CHC et Dufour d'espèces d'Orussoidea permettrait d'avoir un groupe frère des Ichneumonidae avant la transition vers le parasitisme, quand l'analyse comparée d'Aculéates permettrait d'avoir accès aux signatures chimiques après la transition. On peut attendre que les signatures CHC et Dufour des espèces parasites soient fortement corrélées pour les composés impliqués dans la reconnaissance de parentèle, en particulier chez les espèces solitaires, où l'on attend un évitement du superparasitisme, comme nous l'avons montré chez *V. canescens*, quand cela ne sera pas (ou sera moins le cas) chez des espèces non parasites. La difficulté résulte évidemment dans l'identification de ces composés de reconnaissance de parentèle, puisque que dans certaines espèces de guêpes sociales, il a été montré une unique source de production des hydrocarbures et ainsi une forte corrélation entre la production de la glande de Dufour et des CHC (Mitra and Gadagkar, 2014). Mais des études de chimie comparée pourraient ainsi amener des réponses sur cette question en suspens de l'évolution des mécanismes de reconnaissance de parentèle chez les Hyménoptères.

Troisième partie
Conclusion et perspectives

Chapitre 7

Discussion générale et perspectives

« *"Begin at the beginning," the King said gravely, "and go on till you come to the end : then stop".* »

Lewis CARROLL, *Alice's Adventures in Wonderland*

Sommaire

7.1	Résumé des résultats principaux	120
7.2	Bases génétiques de la reconnaissance de parentèle	121
7.2.1	Expérience de présentation des mâles	123
7.2.2	Discussion	125
7.3	Sélection sexuelle et le paradoxe du sexe chez <i>Venturia canescens</i>	127
7.4	Evolution des phéromones sexuelles	131

Dans ce dernier chapitre, je vais tout d'abord présenter un bref résumé de mes résultats expérimentaux pour ensuite aborder trois axes de réflexion autour de mon sujet restant en suspens après mon travail de thèse. L'objectif est d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche sur la sélection sexuelle et la reconnaissance de parentèle, en proposant quand cela est possible des idées d'expérimentations afin de tester les hypothèses proposées. Ces expériences, certaines démarrées et d'autres hypothétiques, sont présentées avec le modèle biologique utilisé dans ce travail, *Venturia canescens*, mais peuvent être adaptées à d'autres modèles afin d'élargir les conclusions proposées. Je vais ainsi tout d'abord présenter une expérience préliminaire de transcriptomique visant à connaître les gènes impliqués dans la reconnaissance de parentèle et le choix du partenaire sexuel. Ce travail s'inscrit dans l'approche intégrative que j'ai voulu mener pendant ma thèse en apportant un nouveau niveau de compréhension de ces deux phénomènes. Cette approche complémentaire va permettre d'interroger la force de la sélection sexuelle au niveau génétique en identifiant par exemple des gènes sous sélection. Je vais discuter ensuite de la contribution de la sélection sexuelle dans l'histoire évolutive de *V. canescens*, en m'interrogeant particulièrement sur son action sur la maintenance d'une reproduction sexuée et la stratégie d'échantillonnage des mâles par les femelles. Enfin, j'utilise l'exemple des phéromones sexuelles pour aborder la question de l'évolution de facteurs impliqués dans la reconnaissance des apparentés et le choix du partenaire.

7.1 Résumé des résultats principaux

Les objectifs principaux de ce travail étaient d'étudier les pressions de sélections agissant sur le choix du partenaire sexuel et la reconnaissance de parentèle dans des populations de la guêpe parasitoïde *Venturia canescens* ainsi que les mécanismes utilisés dans cette espèce pour reconnaître ses apparentés. En effet, des travaux antérieurs avaient démontré que la condition requise à l'action de la sélection sexuelle sur le choix du partenaire sexuel était remplie dans cette espèce. L'accouplement entre deux individus apparentés conduit à une diminution de la fitness de ces individus, avec la production de mâles diploïdes et d'une baisse de fertilité des femelles (Beukeboom, 2001; Vayssade et al., 2014; Chuine et al., 2015). De ce fait, le succès reproducteur des individus varie selon le choix du partenaire sexuel. De plus, les individus sont capables de discriminer leurs apparentés et de modifier leur comportement en conséquence en évitant de s'accoupler avec leurs apparentés (Metzger et al., 2010a; Chuine et al., 2015).

La prédiction du système d'appariement d'une espèce est complexe et quantifier la stratégie de choix du partenaire nécessite de comprendre les facteurs susceptibles de l'influencer en milieu naturel. De ce fait, l'estimation de l'apparentement des partenaires potentiels et réels est la première étape pour déterminer l'existence ou non d'un choix du partenaire sexuel en fonction de son apparentement (Szulkin et al., 2013). C'est pour cette raison que nous avons tout d'abord travaillé en populations naturelles. Nous avons évalué l'apparentement existant entre les partenaires sexuels réels et potentiels (Chapitre 5) afin de prédire la stratégie de choix du partenaire dans cette espèce. De plus, la force de la dépression de consanguinité est un acteur majeur du choix du partenaire. Pour comprendre l'impact de la dépression de la consanguinité en conditions naturelles, nous avons observé un proxy de ce coût à la consanguinité, la proportion de mâles diploïdes (Chapitre 4). Ces deux études ont permis de mettre au jour les pressions de sélection agissant sur le choix du partenaire sexuel. Premièrement, nous avons montré que le coût de la production de mâles diploïdes existait en populations naturelles quel que soit le type de populations testées (continentales et insulaires) et que la proportion de mâles diploïdes était corrélée négativement à l'isolement et à la

diversité génétique des populations (Chapitre 4). Ces résultats nous ont conduit à deux constatations : l'évitement des accouplements entre apparentés, s'il existe sur le terrain, n'est pas complet, comme cela avait déjà été observé en laboratoire (Metzger et al., 2010a). De plus, des paramètres populationnels comme la taille et la structure des populations vont influencer la proportion d'accouplements appariés, vraisemblablement via à une variation de la sélection sexuelle selon les paramètres des populations. Nous avons ainsi continué nos investigations et décrit le système d'appariement de *V. canescens*. Dans une population de Nice, nous avons estimé que la proportion d'individus apparentés était la même dans le groupe des partenaires potentiels que la proportion d'accouplements réels entre apparentés et égale à 11% (Chapitre 5). Nous avons conclu que les individus tolèrent les accouplements entre apparentés dans cette population naturelle.

De ce fait, nous avons cherché à comprendre ces différences entre les travaux antérieurs en laboratoire montrant un évitement d'accouplements entre apparentés (Metzger et al., 2010a) et nos études de terrain. Nous avons testé en laboratoire l'hypothèse que le système d'appariement de *V. canescens* était sensible aux variations de densité et de fréquence des apparentés (Chapitre 5). Nous avons redémontré les capacités des individus à discriminer leurs apparentés mais n'avons pas été capables de retrouver les résultats d'évitement des apparentés lors du choix du partenaire sexuel. Par conséquent, nous nous sommes interrogés sur le maintien des capacités de reconnaissance de parentèle dans cette espèce, alors qu'elle ne semble pas être utilisée dans le cadre du choix du partenaire sexuel dans les populations naturelles et expérimentales que nous avons testées. Les aptitudes de *V. canescens* à utiliser des informations de parentèle pour moduler son comportement sont connues depuis plusieurs dizaines d'années lors du choix d'un hôte pour pondre. En effet, les femelles adaptent le comportement de superparasitisme selon l'apparentement de la femelle ayant pondus précédemment dans l'hôte (Hubbard et al., 1987; Marris et al., 1996). Nous avons émis l'hypothèse que les signaux utilisés dans ces deux contextes écologiques (choix du partenaire sexuel et choix de l'hôte) étaient identiques. Nous avons testé cette hypothèse de parcimonie (Blum, 1996) et conclu que si les femelles étaient capables d'utiliser la signature du choix du partenaire dans le cadre du choix d'hôtes de ponte, l'inverse n'était pas vrai (Chapitre 6). L'hypothèse de parcimonie n'est pas validée chez *V. canescens* et interroge le maintien d'au moins deux systèmes de reconnaissance de parentèle dans cette espèce, un impliqué dans le choix de l'hôte et le second dans le choix du partenaire sexuel.

7.2 Bases génétiques de la reconnaissance de parentèle

Tout au long de cette thèse, j'ai voulu explorer le comportement du choix du partenaire sexuel à travers des approches variées et complémentaires. Que ce soit via des approches comportementales en laboratoire, de génétique en populations naturelles, ou encore d'écologie chimique, mon travail essaye de dessiner une vision globale des mécanismes sous-jacents ce choix et ses conséquences. Cependant, à l'heure des NGS, l'histoire ne semblerait pas complète sans une approche plus mécanistique de la traduction du signal en comportements. Comprendre les bases génétiques des comportements est devenu un enjeu majeur en écologie (Fawcett, 2015). La question des mécanismes (au sens large, c'est-à-dire psychologique, physiologique et moléculaire) pouvant soutenir les comportements a été identifiée par Niko Tinbergen il y a plus de 50 ans et est toujours d'actualité. En effet, la majorité des observations sont phénotypiques et

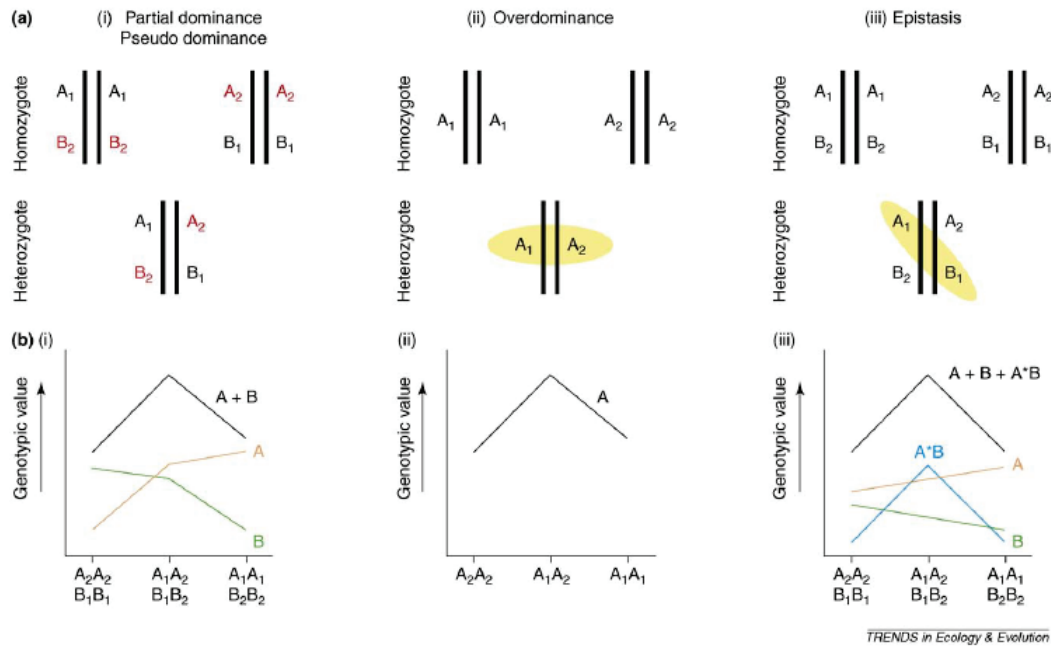


FIGURE 7.1 – **Modèles génétiques de la dépression de consanguinité.** Dans l’hypothèse de dominance partielle (panel (i)), la dépression de consanguinité est expliquée par l’expression d’allèles rares récessifs et délétères lors de la consanguinité. Sous l’hypothèse de surdominance (panel (ii)), c’est la perte d’hétérozygotie qui va être responsable de la consanguinité, car les génotypes hétérozygotes sont considérés comme supérieurs aux homozygotes à chaque locus. Enfin, les interactions épistatiques peuvent être interprétées comme la fixation de combinaisons de gènes incompatibles dû à l’augmentation de la dérive génétique lors des épisodes de consanguinité (panel (iii)). La partie supérieure représente les parents homozygotes et leur descendance hétérozygote pour deux loci A et B. La partie inférieure présente les valeurs génotypiques des génotypes présentés au-dessus, en séparant l’effet des deux loci A et B et leur interaction ($A*B$). Tiré de Kristensen et al. (2010).

le lien phénotype-génotype est complexe à établir. L’étude des profils d’expression des gènes dans différents contextes écologiques permet ainsi d’identifier des gènes ou des familles de gènes impliqués dans des comportements variés et va ouvrir des perspectives sur la compréhension de ces comportements. Premièrement, une fois des gènes identifiés comme acteur d’un comportement, on peut envisager de perturber leurs expressions individuellement (grâce à des techniques de Knock-Out ou d’interférence à ARN par exemple) et d’observer les conséquences phénotypiques sur le comportement étudié afin d’affiner le rôle exact de chaque gène impliqué. Les techniques de transcriptomique peuvent aussi permettre de comparer les profils d’expression des gènes entre des individus exprimant une variabilité comportementale inter- et intra-espèces (Wong and Hofmann, 2001).

De nombreux travaux, en particulier chez la drosophile, insecte modèle par excellence en génétique, ou chez les insectes sociaux, se sont appliqués à disséquer les composants moléculaires de comportements comme l’agressivité, la défense de la ruche ou de comportements sexuels comme la parade des mâles (Alaux et al., 2009; Hunt et al., 2006; Billeter et al., 2006; Emmons and Lipton, 2003; Fitzpatrick et al., 2005; Mikheyev and Linksvayer, 2015).

Cependant, peu d’études se sont concentrées sur la compréhension du choix du partenaire et de la consanguinité. La génétique derrière la dépression de consanguinité est complexe et trois modèles génétiques majeurs sont aujourd’hui proposés : la domi-

nance partielle ou pseudo-dominance, la surdominance (overdominance), et l'épistasie (Figure 7.1 et Kristensen et al. (2010)). De ce fait, les approches génétiques permettent d'estimer le coefficient de consanguinité des individus et de tester l'implication de gènes dans la dépression de la consanguinité, via des approches QTL¹ ou de transcriptomiques. *A contrario*, les mécanismes génétiques de choix du partenaire sexuel restent peu décrits. Un comportement m'intéressait particulièrement : la réception par les femelles des signaux d'apparement, qu'ils soient sexuels émis par les mâles ou déposés par d'autres femelles lors de la ponte et du choix subséquent à la réception de ces signaux chez *V. canescens*. Plusieurs questions peuvent ainsi être posées grâce à une approche génomique. Premièrement, avec des expériences de transcriptomiques, quels sont les gènes différentiellement exprimés entre une condition de réception de signaux d'apparement face à une réception de signaux d'individus non-apparementés ? Cette question se pose de fait à la fois dans le cadre du choix du partenaire sexuel et dans celui du choix d'un hôte. Ce qui nous amène à une seconde question : est-ce que les gènes différentiellement exprimés trouvés précédemment sont-ils les mêmes dans les deux contextes écologiques ? Cette approche permettrait ainsi de tester de manière moléculaire l'hypothèse de parcimonie que nous avons testé chimiquement et comportementalement pendant ma thèse (Chapitre 6). Immonen and Ritchie (2012) se sont intéressés aux changements transcriptomiques chez la femelle *Drosophila melanogaster* associés à l'écoute de chants de parades de mâles. Ils ont démontré que des gènes de l'olfaction exprimés dans les cellules des antennes et des gènes de l'immunité étaient différentiellement exprimés chez les femelles lors de l'écoute des chants de parades et qu'une discrimination était faite entre le chant d'un mâle de la même espèce et un mâle hétérospécifique (*Drosophila simulans*). J'ai ainsi réalisé, en collaboration avec Aurore Gallot, maître de conférences au Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, une étude préliminaire de comparaison du transcriptome de *Venturia canescens* en condition de choix du partenaire sexuel. En se basant sur le même genre d'approche que l'étude de Immonen and Ritchie (2012), nous avons étudié le transcriptome de femelles seules avec ceux de femelles mises en contact avec des mâles frères ou des mâles non apparementés. Notre objectif était d'identifier des gènes impliqués dans la reconnaissance d'un partenaire potentiel en comparant le transcriptome de femelles seules et de femelles avec un mâle. La confrontation entre les conditions des femelles avec un mâle non apparementé et un mâle apparementé peuvent permettre d'identifier des gènes impliqués dans la reconnaissance de parentèle. Nous avons ainsi montré que le transcriptome des femelles des trois modalités était différent et nous avons identifié des familles de gènes candidats à la reconnaissance de parentèle dans le cadre du choix du partenaire sexuel (voir le Matériel et Méthodes de ces analyses en Annexe, page XVII).

7.2.1 Expérience de présentation des mâles

Nous avons utilisé des femelles *Venturia canescens* vierges élevées dans des conditions expérimentales standards ($24 \pm 1^\circ\text{C}$; $60 \pm 5\%$ RH ; régime de lumière 12 h :12 h). Nous avons présenté un mâle à chaque femelle individuellement selon trois conditions : la première où les femelles sont laissées seules (appelé modalité Female par la suite), la deuxième où l'on présente pendant 5 min un mâle non-apparementé (modalité Non-Kin) et la troisième où le mâle présenté est un frère de la femelle (modalité Kin). Dans la deuxième et la troisième modalité, des comportements de parade ont été observés et les mâles tentant de s'accoupler avec une femelle étaient gentiment repoussés avec un pinceau afin que toutes les femelles restent vierges. Au bout de 5 min, les mâles et

¹Quantitative Trait Loci

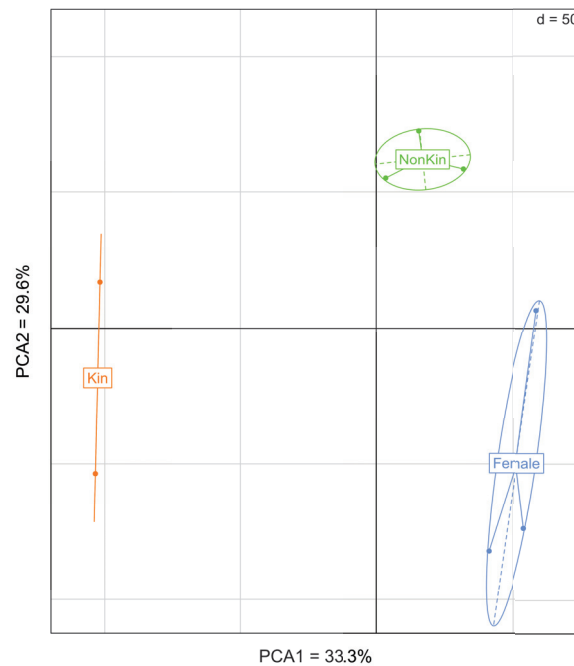


FIGURE 7.2 – **Patrons des données d’expression des gènes femelles selon la présence et le type de mâles.** Représentation des deux premières composantes principales de l’ACP normée (PCA1 et PCA2) sur les données d’expression des gènes des femelles *V. canescens* selon les conditions expérimentales. Female (bleu) : femelle seule, NonKin (vert) : femelle en présence d’un mâle non-apparenté et Kin (orange) : femelle en présence d’un mâle apparenté.

les femelles étaient immédiatement congelés à -80°C . 6 femelles ont été utilisées pour chaque modalité et les expériences ont été répétées trois fois de manières indépendantes (54 femelles et 54 mâles utilisés au total).

Au total, 16752 gènes ont été détectés, avec un taux d’alignement moyen des séquences sur le génome de *V. canescens* de 65.5%. Après filtrage des gènes avec au moins 1cpm (count per million) dans chaque réplikat biologique, nous avons travaillé sur 11204 gènes, soit 67% du nombre de gènes total. Nos trois conditions expérimentales conduisent à des patrons de données d’expression des gènes différents (ACP, Figure 7.2), et expliquent 56% de la variation d’expression des gènes (Inertie de l’ACP inter-condition). 2311 (21%) et 2672 (24%) gènes différentiellement exprimés (DE) ont été détectés respectivement par edgeR et NOISeq (Figure 7.3 et Tableau 7.1). En comparant les conditions "femelle seule" et "femelle avec un mâle apparenté", nous avons en particulier identifié des gènes de la famille de la "protein yellow". Cette protéine est connue chez *Drosophila melanogaster* pour participer à la détermination du sexe et au comportement de parade des mâles (Drapeau et al., 2003). Elle est exprimée chez la drosophile dans les cellules neuronales, ce qui est cohérent avec une expression existant dans la tête de *V. canescens*. Nous avons de plus détecté que des gènes de la famille des récepteurs olfactifs étaient sur-exprimés chez les femelles en présence de mâles (homologue aux Odorant receptor 300 chez *Nasonia vitripennis* ou odorant binding protein 10 chez *Apis cerana cerana*), indiquant une implication probable dans la reconnaissance du partenaire sexuel. Les gènes de la famille des récepteurs olfactifs décrits précédemment sont aussi sur-exprimés dans la condition d’une femelle avec un mâle apparenté comparé à une femelle avec un mâle non apparenté. Certains gènes de la famille de la protéine yellow sont eux sous-exprimés en présence d’un mâle apparenté comparé à un mâle non apparenté et sont donc vraisemblablement impliqués dans la reconnaissance

TABLEAU 7.1 – **Nombre de gènes différentiellement exprimés selon les contrastes et la méthode statistique utilisée.** Les contrastes sont les comparaisons effectuées entre les différentes modalités auxquelles sont soumises les femelles *V. canescens* pour détecter les gènes différentiellement exprimés. Les gènes communs sont ceux communs aux deux méthodes statistiques et qui constituent ainsi le pool de gènes utilisés lors des analyses d'enrichissements.

Contraste	EdgeR	NOISeq	Gènes communs
Seule – Avec un mâle apparenté	1670	1649	1045
Avec un mâle apparenté – Avec un mâle non apparenté	587	933	355
Seule – Avec un mâle non apparenté	852	1211	569

de parentèle. L'analyse d'enrichissement sur les gènes DE communs aux deux méthodes statistiques a permis de distinguer de grandes fonctions sur-exprimées lors de la présence d'un mâle apparenté comparé à une femelle seule comme la respiration cellulaire, les mécanismes de production d'ATP, mais aussi des fonctions liées à la reproduction comme la reproduction sexuée ou les comportements d'accouplements. L'enrichissement des fonctions de reproduction disparaît lors de la comparaison du transcriptome des femelles en présence d'un mâle non apparenté avec celles en présence d'un mâle apparenté, et font apparaître des fonctions de transport d'électron, de lyse d'ATP et d'oxydoréduction enrichie chez les femelles en présence d'un mâle non apparenté. La comparaison du transcriptome des femelles seules avec les femelles en présence d'un mâle non apparenté n'a pas révélé de fonctions significativement enrichies, ce qui demande à aller voir plus spécifiquement les gènes différentiellement exprimés entre ces deux conditions.

7.2.2 Discussion

La détection de profils transcriptomiques différents chez les femelles *V. canescens* après 5 min d'exposition à des mâles d'apparementements différents révèle un changement très rapide de l'expression des gènes vraisemblablement impliqués dans le choix du partenaire sexuel et l'accouplement. Cette vitesse de changement d'expression semble nécessaire pour pouvoir promouvoir une décision rapide (ici accouplement ou rejet du mâle proposé). Chez *V. canescens*, les parades des mâles durent en moyenne 30 secondes et la femelle utilise cette durée pour faire son choix. Une étude sur la drosophile avait aussi détecté des changements d'expression rapides dans le cadre du choix du partenaire sexuel (15 minutes de stimulations chez Immonen and Ritchie (2012)). Ces changements d'expressions géniques nous permettent de comparer les grandes familles de gènes impliquées soit dans la détection de mâles (Contraste femelle seule-femelle en présence de mâle), ou dans la détection de l'apparementement (Contraste femelle avec un mâle non apparementé-femelle avec un mâle apparementé). Nous avons ainsi montré que la présence de mâles (sans accouplement) activait l'expression de gènes olfactifs, de gènes impliqués dans la parade chez d'autres espèces et des voies métaboliques mitochondriales permettant la production d'ATP. La présence de 355 gènes différentiellement exprimés entre les conditions "mâle apparementé" et "mâle non apparementé" communs à nos deux méthodes d'analyses (Tableau 7.1 et Annexe IV, Tableau A) ouvre un champ de recherche sur les gènes impliqués dans la reconnaissance de parentèle dans cette espèce. Les gènes de l'olfaction constituent une première famille génique intéressante à explorer puisque certains de ses membres sont différentiellement exprimés dans tous les contrastes testés. Ce travail est une expérience préliminaire à une expérience de transcriptomique plus ambitieuse. Cette expérience consisterait en la présentation aux

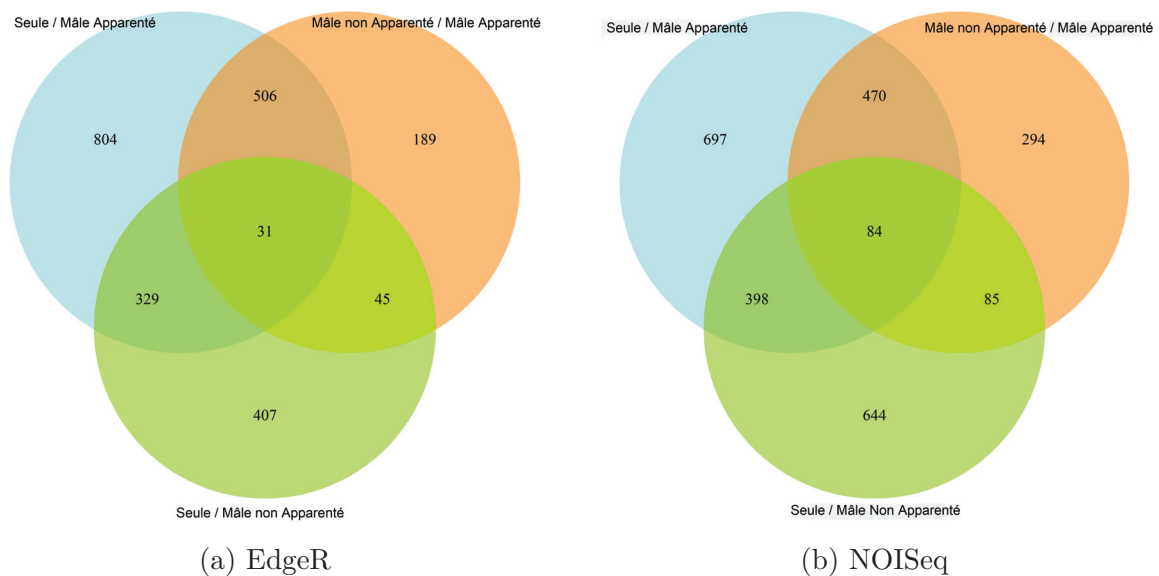


FIGURE 7.3 – Nombre de gènes femelles différemment exprimés selon l'apparement avec son partenaire potentiel. Les diagrammes de Venn représentent les gènes différemment exprimés communs à un, deux ou aux trois contrastes : Contraste bleu, comparaison "Femelles seules" et "Femelles en présence de mâles apparentés", Contraste orange : comparaison "Femelles en présence de mâles apparentés" et "Femelles en présence de mâles non apparentés" et Contraste vert : comparaison "Femelles seules et Femelles en présence de mâles non apparentés". (a) Nombre de gènes femelles différemment exprimés détectés avec le package EdgeR (normalisation TMM, au moins 1 cpm dans chaque réplicat biologique). (b) Nombre de gènes femelles différemment exprimés détectés avec le package NOISeq (méthode bayésienne, normalisation TMM, au moins 1 cpm dans chaque réplicat biologique).

femelles d'odeurs de CHC mâles (apparentés et non apparentés, avec un contrôle de femelle seule) afin de limiter le nombre de stimuli et de détecter des gènes impliqués dans la reconnaissance chimique de parentèle. Cette expérience préliminaire, dont l'analyse reste en cours, nous permet ainsi d'avoir accès à un certain nombre de gènes candidats (gènes de l'olfaction ou gène de la *protein yellow* par exemple) qui rendent possibles des expériences de RT-PCR quantitative afin d'obtenir tout d'abord la confirmation de la différence d'expression entre les différentes conditions, puis des dynamique d'expression des gènes impliqués dans cette reconnaissance. Ceci nous permettrait de calibrer au mieux l'exposition des femelles aux stimuli. En effet, le temps d'exposition avant l'extraction d'ARN est essentiel pour capturer à la fois les variations très rapides d'expression comme on peut l'attendre pour des neurotransmetteurs par exemple mais sans rater l'expression potentiellement différée de gènes impliqués dans la reconnaissance de parentèle. Ce temps d'exposition dépend ainsi du modèle biologique et des comportements étudiés et semble dans les études actuelles être choisi en faisant une estimation grossière de la durée du comportement étudié (Communications personnelles de Cédric Alaux (Alaux and Robinson, 2007) et d'Elina Immonen (Immonen and Ritchie, 2012)). L'analyse transcriptomique de la reconnaissance de parentèle est ainsi la suite logique de mon travail de thèse, après la description phénotypique et chimique, pour identifier les mécanismes moléculaires sous-jacents. Ces expériences ouvrent ainsi des possibilités de comparaison des mécanismes de reconnaissances de parentèle par exemple entre les espèces non-sociales comme *V. canescens* avec des espèces sociales, chez qui la reconnaissance de parentèle est souvent limitée à une reconnaissance de colonie. Cette comparaison serait de ce fait très intéressante pour savoir si cette reconnaissance de colonie (ou de couvée comme vu chez *H. hebetor*, (Ode et al., 1995)) utilise les mêmes voies de signalisation que la reconnaissance "vraie" de parentèle.

7.3 Sélection sexuelle et le paradoxe du sexe chez *Venturia canescens*

La compréhension des mécanismes de reconnaissance de parentèles à travers des études de génomiques évoquées dans la section précédente peut aussi permettre de mettre en évidence des gènes sous sélection positive et ainsi marquer une signature de la sélection sexuelle dans le génome de la guêpe *Venturia canescens*. Tout au long de mon travail, je me suis interrogée sur cette action de la sélection sexuelle, à travers le choix du partenaire et donc la reconnaissance de parentèle. Cependant, l'ajout des résultats de cette thèse aux données préexistantes sur cette espèce interroge l'existence même de la sélection sexuelle dans ce modèle. En effet, comme cela a été explicité en introduction générale (Chapitre 1, section 1.1), la sélection sexuelle se divise en deux composantes majeures : la sélection intrasexuelle (comme les combats de mâles pour l'accès aux femelles en précopulatoire et la compétition spermatique en postcopulatoire) et la sélection intersexuelle (comme le choix du partenaire sexuel en précopulatoire ou le choix cryptique des femelles en postcopulatoire). Or, les preuves de l'existence de ses deux composantes manquent actuellement chez *V. canescens*. Premièrement, la femelle ne s'accouplant qu'une seule fois, les possibilités d'action de la sélection sexuelle postcopulatoire sont de fait extrêmement limitées : pas de compétition spermatique, de choix cryptique des femelles ou de garde des femelles par les mâles. La sélection va ainsi pouvoir agir sur deux processus : la variance du succès reproducteur entre les individus et variation du sexe-ratio des descendants des femelles. On peut en effet s'attendre que, dans le cadre d'un accouplement consanguin, les femelles privilégient la ponte d'œufs non fertilisés (et donc de mâles) pour éviter le coût de la production

de mâles diploïdes. Vayssade et al. (2014) ont en effet montré que les descendants issus de croisements frère-sœur avaient un sexe-ratio plus biaisé vers les mâles que les descendants issus de croisements non apparentés. Cet effet, bien que significatif, n'est cependant pas fort. Cette étude a de plus quantifiée la dépression de consanguinité dans cette espèce, avec une production de mâles diploïdes stériles et une diminution de la charge en œufs des femelles dans le cadre d'accouplements entre apparentés. Deuxièmement, lors de mes travaux de thèse, je n'ai pas réussi à montrer un choix du partenaire sexuel sur le terrain chez *V. canescens* (Chapitre 5) bien que ce choix ait été observé dans certaines conditions en laboratoire (Metzger et al., 2010a; Fauvergue et al., 2015). De plus, aucune observation comportementale n'a jusqu'alors mis en évidence une compétition intrasexuelle comme des combats de mâles. Lors de mes expériences de choix du partenaire sexuel en cage à populations (Chapitre 5), j'ai pu observer des parades simultanées de plusieurs mâles envers une même femelle, mais pas d'éviction de mâles par d'autres. Dans quelques rares cas, nous avons cependant observé des tentatives de monte de la femelle alors qu'un mâle était déjà en train de copuler, ce qui peut potentiellement perturber l'accouplement en cours. Enfin, aucun conflit sexuel n'est actuellement connu dans cette espèce : il n'y a pas de coûts connus à l'accouplement par exemple, que ce soit via des systèmes de poisons transmis par le sperme ou d'endommagement du tractus génital femelle par le mâle. La sélection sexuelle semble donc avoir peu de prise sur l'évolution de *V. canescens*. Cependant, une inconnue de taille demeure : la variance de succès reproducteur des individus sur le terrain. Cette condition, nécessaire à l'action de la sélection sexuelle, est complexe à observer *in natura*. Des expériences d'accouplements contrôlés en laboratoire en faisant varier l'apparement des partenaires, suivie d'un lâcher des femelles en conditions semi-naturelles pour la ponte et d'un génotypage de tous les individus (parents et descendants) afin de déterminer les liens de filiation pourrait permettre d'estimer cette variation de succès reproducteur des individus et de répondre plus fermement à l'action de la sélection sexuelle dans cette espèce.

Dans l'attente de ces résultats de variation de succès reproducteur, l'action de la sélection sexuelle et de la maintenance d'une reproduction sexuée dans cette espèce pose question et en particulier la maintenance de ce mode de reproduction en sympatrie avec un mode de reproduction asexué (parthénogenèse thélytoque, Chapitre 2). Chez *V. canescens*, la thélytoque n'est pas due à l'effet d'un symbiote sur une souche sexuée mais bien un mode de reproduction distinct et obligatoire (Foray et al., 2013). La reproduction sexuée nécessite deux individus de sexes différents pour produire un descendant, quand la reproduction asexuée n'en demande qu'un. Ce coût double du sexe, nommé le paradoxe de la reproduction sexuée, explique que la maintenance de ce mode de reproduction ait été considéré comme un problème dans la théorie de l'évolution (Maynard Smith, 1978). De nombreuses études se sont ainsi penchées sur cet apparent paradoxe entre coût de la reproduction sexuée et sa prévalence dans le monde vivant (Lively and Lloyd, 1990; Agrawal, 2001; Otto, 2001; Hadany and Feldman, 2005; Olofsson and Lundberg, 2007; Lively, 2010; Lehtonen et al., 2012; Moradigaravand and Engelstädter, 2013). La sélection sexuelle a été proposée comme une force pouvant atténuer voire supprimer ce coût de la reproduction sexuée, en réduisant le fardeau mutationnel des individus (Agrawal, 2001; Tomkins et al., 2004; Whitlock and Agrawal, 2009). Le constat fait par Whitlock and Agrawal (2009) est que le succès reproducteur des individus va dépendre non seulement des caractères spécifiques à l'accouplement (caractères exagérés chez les mâles dus à la préférence des femelles par exemple), mais aussi de leur condition générale qui dépend de nombreux gènes (capacité de recherche des partenaires, à se battre...) : c'est l'hypothèse de la capture génique (Tomkins et al., 2004). De ce fait, des mutations délétères vont affecter la condition des individus et

leurs succès reproducteurs, et la sélection sexuelle devrait agir sur le génome complet des individus en purgeant ces mutations délétères. Les preuves expérimentales de ce processus sont cependant rares, les expériences d'évolution expérimentale de Lumley et al. (2015) sur *Tribolium castaneum* faisant office d'exception. En faisant évoluer pendant plus de six ans des populations subissant des régimes de forte ou de faible sélection sexuelle, les auteurs ont montré que les populations avec une histoire évolutive de forte sélection sexuelle étaient résilientes face à la consanguinité tandis que les populations avec sous un régime de sélection sexuelle faible s'éteignaient rapidement (Chapitre 1, Figure 1.4). Les générations de consanguinité successives utilisées pour tester le potentiel d'extinction des populations sont un révélateur du fardeau mutationnel des individus en permettant d'exposer les mutations délétères récessives et montre ainsi que ce fardeau est inférieur chez les populations sous forte sélection sexuelle chez cette espèce.

Cependant, notre modèle biologique, en tant qu'Hyménoptère, possède un avantage certain face au fardeau mutationnel : l'haplo-diploïdie. En effet, les mâles hyménoptères sont haploïdes et de ce fait, les mutations délétères récessives sont exposées à toutes les générations, permettant une purge efficace (Goldstein, 1994). De ce fait, l'effet de purge de la sélection sexuelle ne semble pas nécessaire chez les Hyménoptères et donc chez *V. canescens*. Le maintien de la reproduction sexuée face aux lignées asexuées vivant en sympatrie a donc été l'objet de nombreuses études dans cette espèce (Schneider et al., 2002; Pelosse et al., 2007; Amat et al., 2017).

Les populations asexuées de *V. canescens* sont généralement retrouvées dans des contextes anthropisés comme les silos à grains, où l'environnement est plutôt simple et stable (par exemple en température), avec des hôtes agrégés et une absence de nourriture pour les guêpes adultes, tandis que les populations sexuées sont majoritairement retrouvées dans des vergers, des jardins ou des forêts, où les températures sont variables, les hôtes plus dispersés et un accès à la nourriture possible (Amat et al., 2017). Le mode de reproduction sexuée est supposé être le mode de reproduction ancestral dans cette espèce. Cependant, le scénario évolutif conduisant à la perte de la sexualité dans cette espèce n'est pas connu, et en particulier si elle est arrivée avant ou après la colonisation de milieux anthropiques. L'hypothèse la plus plausible reste une perte secondaire de la sexualité après la colonisation des silos, puisque la faible de variabilité génétique et la faible occurrence des formes asexuées sur le terrain rendent l'hypothèse d'une adaptation rapide à un nouveau milieu peu probable (Mateo Leach et al., 2012; Amat et al., 2017). Le maintien des deux modes de reproduction en sympatrie peut ainsi s'expliquer en partie par une adaptation locale à deux niches écologiques différentes (Amat et al., 2017).

Une autre piste à explorer pour le maintien de la reproduction sexuée se trouve sans doute dans l'étude de l'évolution de la sélection sexuelle dans un environnement complexe (Kuijper and Pen, 2010; Miller and Svensson, 2014). Les différents composants de la sélection sexuelle (sa forme, sa direction et sa force) varient avec l'environnement. Par exemple, la densité des partenaires dans la population peut influencer le choix du partenaire sexuel et ainsi la force de la sélection sexuelle (Kokko and Rankin, 2006). La reproduction sexuée, via le brassage génétique qu'elle procure et les variations de la sélection sexuelle, peut ainsi permettre une adaptation plus rapide et/ou efficace à des conditions environnementales changeantes (Birdsell and Wills, 2003). Les souches sexuées de *V. canescens* sont ainsi plus plastiques que leurs conspécifiques asexuées (Amat et al., 2017). Sous réserve d'une variation de succès reproducteur entre les individus, cette espèce constitue de ce fait un modèle biologique intéressant pour tester l'évolution de la sélection sexuelle dans différents environnements et comparer ensuite les performances des lignées issues de différentes histoires évolutives avec celles des

lignées asexuées.

Enfin, il est possible d'envisager le maintien de la reproduction sexuée à travers l'hypothèse de la Reine Rouge. Cette hypothèse, aussi appelée "course aux armements", stipule que les organismes doivent constamment s'adapter pour faire face aux évolutions des espèces avec qui ils coévoluent. En effet, la reproduction sexuée, comme expliqué dans le paragraphe précédent, permet une recombinaison des allèles existants de manière rapide (à chaque génération), permettant l'apparition de nouveaux phénotypes. Dans le cadre d'une course à l'armement, ce phénotype est classiquement une adaptation à un nouveau parasite grâce à l'apparition d'une résistance. C'est pourquoi la course aux armements serait facilitée chez les individus sexués et a été proposé comme une hypothèse pour expliquer l'apparition et le maintien de la reproduction sexuée (Jaenike, 1978; Birdsell and Wills, 2003; Cooper et al., 2005).

Nous avons vu précédemment que l'environnement peut agir sur les composants de la sélection sexuelle. Nous avons par exemple testé en laboratoire l'influence de la densité et de la fréquence de mâles apparentés sur le choix du partenaire sexuel chez *V. canescens* (Chapitre 5). Ces observations nous ont poussé à nous interroger sur les stratégies d'échantillonnage des femelles en conditions naturelles chez *V. canescens*. En effet, les seules données disponibles sur les insectes sont des données indirectes (génétiques) et l'observation d'accouplements sur le terrain est rare. L'utilisation de la stratégie du meilleur-parmi- n par exemple (voir la section 1.3 du Chapitre 1, page 25) nécessite que les femelles puissent échantillonner plusieurs mâles afin de pouvoir exprimer une préférence et un choix du partenaire sexuel. Or, nos connaissances sur le nombre de rencontres réel entre mâles et femelles sur le terrain sont limitées. Des travaux comme ceux de Bretman et al. (2011), grâce aux marquages individuels et l'installation de centaines de caméras, a permis d'observer directement les couples formés chez le grillon champêtre *Gryllus campestris*. Cependant, les données de rencontres entre mâles et femelles avant l'accouplement ne sont pas disponibles mais seraient extrêmement utiles afin de déterminer la stratégie d'échantillonnage des individus sur un critère d'apparement dans le cadre du choix du partenaire sexuel.

Pour compléter notre travail sur le terrain, des expériences en laboratoire pourraient permettre d'affiner nos connaissances sur le choix du partenaire sexuel en observant la stratégie d'échantillonnage des femelles chez *V. canescens*. Il serait possible de comparer la séquence de choix du partenaire sexuel et le choix final entre une condition où un groupe de mâles de différents apparements serait simultanément présenté à une femelle et une condition où les mâles seraient présentés séquentiellement grâce à un marquage individuel. Si les individus utilisent la stratégie du meilleur-parmi- n , on s'attend à ce que le choix du partenaire soit le même entre les deux conditions de présentation des mâles alors que le choix devrait changer entre deux présentations séquentielles de mâles dans le cadre d'une stratégie avec un seuil de décisions. De plus, ce type d'expérimentations permet de faire varier en premier lieu le nombre de mâles présentés aux femelles afin d'estimer le nombre de mâles conduisant à un choix optimal du partenaire sexuel par la femelle ou de faire émerger un compromis entre temps d'échantillonnage et fitness réalisée des femelles (par exemple en comptant le nombre de filles produites). On pourrait par la suite imaginer faire varier des facteurs environnementaux pouvant influencer la stratégie d'échantillonnage des femelles comme la disponibilité en hôtes, l'état physiologique de la femelle (nourrie ou non nourrie) ou l'évaluation de la densité de partenaires potentiels avant l'accouplement. Ces expériences complèteraient ainsi les études majoritairement théoriques existant sur les stratégies d'échantillonnages et d'explorer la dynamique de ces stratégies selon les facteurs environnementaux (Dechaume-Moncharmont et al., 2016).

L'étude de la contribution de la sélection sexuelle à l'évolution de *V. canescens* m'a

amenée à m'interroger sur les facteurs pouvant influencer le choix du partenaire sexuel dans cette espèce. Les phéromones sexuelles sont ainsi des candidats intéressants puisqu'elles constituent un maillon indispensable du processus de reproduction sexuées chez de nombreuses espèces.

7.4 Evolution des phéromones sexuelles

Dans cette partie, je me suis intéressée à l'évolution des phéromones sexuelles en traitant deux aspects de cette évolution. Premièrement, je m'interroge sur le fait que les femelles accouplées continuent d'émettre des phéromones sexuelles et donc continue d'attirer les mâles après leur accouplement malgré la monoandrie chez *Venturia canescens* (voir le Chapitre 6). Dans un second temps, je discute de manière plus large des mécanismes possibles permettant l'apparition des nouvelles phéromones sexuelles, que ce soit directement via la modification de phéromones ou à partir de composés non phéromonaux existants.

Nous avons montré dans le Chapitre 6 que les femelles vierges et accouplées émettaient des signatures chimiques de composition proche (quantitativement et qualitativement). Cette découverte est en phase avec les observations comportementales montrant une attractivité à distance des femelles accouplées (Metzger et al., 2010b). Ce résultat reste surprenant car les hydrocarbures cuticulaires sont souvent utilisés par les individus pour connaître le statut d'accouplement des femelles (Scott et al., 1988; Schiestl and Ayasse, 2000; Polerstock et al., 2002). On peut s'attendre que chez les espèces monoandres, cette discrimination soit importante puisque les mâles comme les femelles subissent des coûts liés aux tentatives d'accouplements sur des femelles déjà accouplées (coûts en terme de temps et d'énergie pour les mâles qui paraded et coût associé au harcèlement et à l'évitement des mâles pour les femelles). Par exemple, chez l'abeille solitaire monoandre *Andrena nigroaenea*, les femelles accouplées ne suscitent plus l'intérêt des mâles, grâce à la production de deux composés, le all-*trans*-farnesyl hexanoate et le all-*trans*-farnésol, dans les CHC (Schiestl and Ayasse, 2000). Une des possibilités pour expliquer le maintien de cette production de phéromones sexuelles chez *V. canescens* est que le bénéfice initial (*i.e.* attirer un partenaire sexuel) est supérieur au coût du maintien (*i.e.* éviter les mâles après l'accouplement) pour les femelles. Dans une population de faible densité, les femelles rencontrent peu de mâles au cours de leur vie et, de ce fait, l'attraction d'un partenaire sexuel à distance est essentielle et le coût de l'évitement des mâles après s'être accouplée est faible. Il serait ainsi intéressant de faire évoluer des populations de *V. canescens* de densités différentes afin de déterminer si dans des populations à forte densité, le coût plus fort de l'évitement pourrait amener à une sélection pour l'arrêt de l'émission de phéromones sexuelles femelles après l'accouplement. Ces expériences doivent cependant se dérouler dans des conditions semi-naturelles afin que l'évitement de mâles subséquents à l'accouplement soit possible et différent selon la densité de population.

La diversité des phéromones est aujourd'hui encore mal comprise (Symonds and Elgar, 2008; Steiger et al., 2010). En effet, on s'attend à ce que les phéromones soient sous sélection stabilisante, puisqu'un changement de composition ne sera pas interprété correctement par les receveurs. Chez *A. nigroaenea*, le farnésyl hexanoate (et son précurseur le farnésol) sont utilisés lors du choix du partenaire sexuel en inhibant le comportement de parades des mâles. Cependant, ces composés ont été précédemment décrit comme étant impliqués dans le cloisonnement des alvéoles par les femelles, déposé par la glande de Dufour. La sélection sexuelle aurait sélectionné secondairement les mâles capables de discriminer les femelles en train de construire leur ruche

(produisant donc du farnésyl hexanoate), qui sont les femelles accouplées, des femelles vierges, illustrant ainsi la théorie de parcimonie de l'information proposée par Blum (voir la Question 3 du Chapitre 3 et le Chapitre 6). De ce fait, de nouvelles phéromones pourraient apparaître grâce à une utilisation secondaire de composés existants, potentiellement dans un tout autre contexte écologique. De plus, plusieurs études, dont la nôtre, suggèrent une source commune des hydrocarbures des CHC et de la glande de Dufour chez les Hyménoptères (Chapitre 6, (Mitra and Gadagkar, 2014)). En effet, nous avons décrit des compositions proches des CHC et de la glande de Dufour chez *V. canescens*, comme cela avait été montré chez la guêpe sociale *Ropalidia marginata* (Mitra and Gadagkar, 2014). Chez *A. nigroaenea*, la production de farnésyl hexanoate et de farnésol après l'accouplement se produit en effet à la fois dans les CHC et dans la glande de Dufour, confirmant cette hypothèse d'origine commune, ce qui pourrait faciliter la production des nouvelles phéromones.

L'utilisation secondaire de composés déjà présents dans les signatures chimiques dans un contexte dépendant de la sélection sexuelle chez l'abeille *A. nigroaenea* interroge sur l'évolution plus générale des phéromones sexuelles. Le phénomène de spéciation est souvent accompagné d'une grande diversification des phéromones sexuelles, permettant une reconnaissance spécifique efficace et ainsi un isolement précopulatoire des nouvelles espèces (Smadja and Butlin, 2008). Niehuis et al. (2013) ont analysé l'apparition d'une nouvelle phéromone chez les mâles de l'espèce *Nasonia vitripennis*, le 4(R),5(R)-5-hydroxy-4-décanolide, qui diffère uniquement stéréochimiquement d'une phéromone classiquement émise par les mâles de cette espèce. Ils ont montré que les femelles ne réagissaient pas à cette nouvelle substance, contrairement à la phéromone classique. Leurs conclusions supportent ainsi l'idée que de certaines nouvelles phéromones peuvent apparaître grâce à des modifications de phéromones existantes et ne pas être contre-sélectionnée grâce à sa non-perception par les receveurs dans un premier temps, avant d'être utilisé secondairement. Les expériences proposées dans le premier paragraphe sur *V. canescens* (*i.e.* étude des signatures chimiques des femelles après une évolution en forte ou faible densité de populations) pourraient permettre d'identifier les composés spécifiques utilisés par les mâles pour la recherche des femelles parmi les composés présents dans les CHC et de les comparer avec ceux déjà connus dans d'autres espèces d'Insectes (voir la Table 3 de l'article *Do parasitoid wasps use the same cues to inform on kinship during host and mate choice?* en Chapitre 6) afin de compléter nos connaissances sur les phéromones sexuelles.

Conclusion Ce travail de thèse s’est proposé d’explorer les pressions de sélection agissant sur le choix du partenaire sexuel en travaillant à la fois au niveau populationnel sur le terrain et au niveau individuel en s’interrogeant sur les mécanismes sous-jacents à la reconnaissance de parentèle chez la guêpe parasitoïde *Venturia canescens*. Mes travaux soulignent l’importance de mettre à l’épreuve nos connaissances de laboratoire en populations naturelles afin d’élargir notre compréhension de la sélection. La combinaison des travaux *in natura* avec des expériences de laboratoire semble ainsi nécessaire pour avoir une vision globale des phénomènes agissant sur les populations. Cette vision multidisciplinaire et intégrative de l’étude d’un comportement a fortement influencé mon choix de sujet de thèse. La découverte de l’idée de Niko Tinbergen que l’étude et la compréhension d’un comportement ne peut être complète qu’en s’interrogeant sur différents niveaux d’organisation (*Mechanism, Ontogeny, Adaptive Significance, Phylogeny*) a renforcé un sentiment que je ressentais depuis plusieurs années. Durant mes études et lors de ma recherche d’un sujet de thèse qui m’intéresserait pendant mon Master 2, j’avais été extrêmement frustrée par les approches très ciblées proposées par la majorité des chercheurs. Mes stages précédents, en particulier dans l’équipe de Göran Arnqvist (Animal Ecology group, Evolutionary Biology Center, Uppsala, Suède, (Immonen et al., 2016)) m’avaient fait découvrir le champ de l’écologie évolutive et confortée dans mon choix de travailler sur la thématique de sélection sexuelle. J’avais cependant envie d’aller plus loin que l’observation de phénotypes ou l’utilisation uniquement d’outils bioinformatiques. Me confronter à l’écologie comportementale, chimique (et très furtivement à la transcriptomique) dans un laboratoire aussi diversifié que le Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive a comblé mes attentes. J’ai eu la chance de bénéficier d’un double encadrement (deux encadrants, deux équipes appartenant même deux départements différents du laboratoire) et de collaboration avec des équipes de recherche françaises (Equipe Biologie des Populations Introduites, Université Côte d’Azur, INRA, Sophia Antipolis et Laboratoire d’Ecologie Microbienne, Université de Lyon, Lyon). Ces échanges multiples ont été très enrichissants et ont fait partie intégrante de ma formation à la recherche. La confrontation à des visions différentes, parfois très novices et parfois très techniques des différentes parties de mon travail m’a permis de le faire évoluer, que ce soit expérimentalement ou lors de la rédaction d’articles. La thèse a été pour moi l’occasion de découvrir une autre façon de transmettre le savoir, entre discussions informelles, réunions de travail, présentations d’articles, débats d’équipe, participations à des congrès ou encore enseignements. Ces trois années ont été exaltantes, épuisantes, enrichissantes et extrêmement exigeantes, à l’image je pense du métier de chercheur.

Quatrième partie

Annexes

Annexe A

Reviews de l'article "*Insect and incest : field evidence for dangerous liaisons in a parasitoid wasp*" après soumission dans Peer Community in Evolutionary Biology

Marie Collet, Isabelle Amat, Sandrine Sauzet, Alexandra Auguste, Xavier Fauvergue, Laurence Mouton, Emmanuel Desouhant

Insects and incest: field evidence for dangerous liaisons in a parasitoid wasp

<https://doi.org/10.1101/169268>

Keywords: Field assay, Inbreeding tolerance, Kin recognition, Parasitoid wasp, single-locus Complementary Sex Determination

Abstract

1. Sib mating avoidance is a pervasive behaviour, which likely evolves in species that are subject to inbreeding depression. Laboratory studies have provided elegant demonstrations, but small-scale bioassays often minimize the costs associated with mate finding and mate-choice and may for this reason produce spurious findings.
2. We inferred the mating behaviour of the parasitoid wasp *Venturia canescens* from the genetic analyses of natural populations. We used *V. canescens* as a model organism because in this species, laboratory experiments have shown that sib mating yields a 25% decrease in fertile offspring, and congruently, sib mating is partially avoided.
3. Our study consisted in genotyping 86 wild-caught males, 155 wild-caught-females and their 226 daughters at eighteen microsatellite loci. With these data, we were able to reconstruct the genotype of females' mate and estimate the relatedness of each mating pairs.
4. We found that the effective rate of sib mating does not differ from the probability that sibs encounter one another at random, which suggest a sib mating tolerance in this species. However, complementary lab experiments confirmed that kin discrimination exist in this species, with related pairs having a lower mating latency.
5. These results suggest that *V. canescens* tolerate sib mating in the field despite kin discrimination, and therefore call into question the common beliefs on inbreeding depression in species with single-locus complementary sex determination. This inbreeding tolerance also opens up the question of the maintenance of the kin discrimination in this species.

This preprint is worth a revision

by Caroline Nieberding, 2017-08-31 10:34

Manuscript: <https://doi.org/10.1101/169268>

Decision & reviews

Dear Authors, overall your work is very original, integrative and experimentally well designed. Both reviewers had trouble in the presentation of the ideas and experiments, which could be improved (see proposals). The biology of the species and previous work done on the topic also deserved better presentation. If you have the energy to present your work in a more integrated framework and to highlight its novelty (assessment of inbreeding avoidance mechanisms in the wild, for non vertebrates) with more arguments including a thorough review of the existing literature, we believe that this contribution could become a first-rate quality one. Hoping that this is useful for you,

Reviewed by anonymous reviewer, 2017-08-31 10:11

Review of ms by Collet et al, about inbreeding avoidance in *Venturia canescens*; review for the PCI Evol Biol, August 2017.

General comments This manuscript intends to assess whether matings of one wasp species (the model *Venturia canescens*) in the wild avoid the risk of inbreeding, and to examine several mechanisms that may have led to the evolution of inbreeding avoidance such as kin recognition and dispersal. Overall this manuscript appears to me as very original and carefully thought and designed. The main strengths include: 1) that this work combines careful field work -from which a robust sample size of 467 individuals (caught either in the wild or their direct F1 descendants) were sequenced for a total of 18 microsatellites for inferring inbreeding level, in two populations- , simulations run in R to assess the expected level of relatedness and other factors from these datasets, as well as lab-designed experiments in which some mechanisms leading to inbreeding avoidance are tested (the role of density and of relatedness in mate selection). However, I have the problem that I have a hard time understanding: 1) how exactly the experiments were conducted, and this holds true mostly for the simulation work on the expected coefficient of relatedness and on the statistical treatment of the mate choice experiment (I detailed my concerns for the mate choice experiment below), and 2) the conceptual reasoning that put all experiments together. Regarding the first point, the simulation work could most likely be super straightforward to understand if there was simply more space dedicated to transmitting the procedure in the methods section (in the SOM or in the main text as authors prefer). This should be ok to implement as there is at this stage no length limitation (on the PCI website) for manuscripts. Regarding the latter concern, I think that this could be solved by reorganizing the ideas such that what pops up to the mind of the reader in the first place is not brought in the manuscript in the last paragraph of the discussion (for example). I propose below a new “structure” to the presentation of the ideas in the introduction that would help me, and hopefully others, to better understand everything at once. My second main concern is the novelty of this work: The study seems very novel in that the authors claim that the study of inbreeding avoidance in the wild has been so far rarely conducted except in large vertebrate taxa, but this would be much more convincing if it was stated as such more strongly and with a more detailed review of existing studies. If done, I believe that this study has the material for publication in a first rate quality journal. This is also why I wrote below a lengthy review trying to help revising the ms.

Specific comments Here I list some of the places in the manuscript that justify the general comments written above. It is not exhaustive but it aims to help the authors understand where I had trouble and how, perhaps, this could be solved.

Abstract and introduction *The authors write: “Our results suggest that *V. canescens* tolerate sib mating in the field despite kin discrimination, and therefore call into question the common beliefs on inbreeding depression in species with single-locus complementary sex determination. This inbreeding tolerance also opens up the question of the maintenance of the kin discrimination in this species” Comment: The fact is when reading this section of the abstract and the introduction, the reader will immediately think that : 1) the biology of the species may very well explain this apparent discrepancy (see specific questions below) but the lack of information on these aspects of the life history of *V. canescens* gives the feeling that one does not have all information we would need to be able to judge; 2) there are other options that are not discussed until very late in the manuscript (end of the discussion): the existence of kin

recognition despite low risk in the wild for kin matings, may be explained also as 1) a ghost from past adaptation (when effective sizes were smaller?) for which it would be important to have evidence of past demography for the species (using coalescent methods - the genome of the species has been sequenced)? 2) and/or kin recognition is a mechanism under selection for another reason than avoidance of sibmating; for example, it may be advantageous to localize in space related individuals as they may bear similar genetic adaptations to similar environments (same host species, same food source, ...) such that kin recognition may be actually used for other reasons than the one mechanism under testing here, inbreeding avoidance. Third, there may also be no avoidance of kin mating because dispersal has already ensured that the average relatedness coefficient in the wild is below any sufficient inbreeding cost: both the dispersal and the cost of inbreeding for this species has been tested in the manuscript with simulations / analyses using the field data (very smartly)- but it does not come as an obvious alternative in the right place in the introduction; the cost of inbreeding (number of diploid males is provided at the end of the discussion rather than in the result section) and the dispersal effect to inbreeding avoidance is not brought upfront of the start of the introduction as it should be. Hence, all major concepts and mechanisms related to inbreeding avoidance and the evolution of kin recognition as one of the potential mechanisms explaining inbreeding avoidance (but also other patterns) are in the manuscript, but one needs some reorganization to show how smart this study was. I propose that instead of bringing all the ideas and results one by one, the introduction does a better job by showing that the authors have thought of all alternatives, and will test quite a few of them in the results. I hereunder propose such a skeleton for the intro if this may be useful: 1) Inbreeding avoidance has evolved in many organisms because it has costs (list them), yet it also entails benefits so its evolution is the result of the balance between costs and benefits. 2) Environmental factors affect the relative costs and benefits of inbreeding avoidance (list which ones: density, population structure, social structure of the species,...), hence a) we need field data to quantify better the relative cost to benefit of inbreeding avoidance, b) what we see now is the product of past selection and the original factors may well be no longer effective (such as recent increase in demographic size would make inbreeding avoidance mechanisms unnecessary). 3) Kin recognition (by means of chemical communication in many insects) is one major mechanism used for inbreeding avoidance, yet it is not the only one and kin recognition may also have been selected for other reasons (which ones). 4) Altogether, this is one of the very first studies bringing these questions into the wild with robust field data and combined molecular and lab experimental work. The justification of *Venturia* as a model species could be further improved by providing in the intro more information on the biology of the species that justify the relevance of testing all the above points on inbreeding avoidance, cost, benefits and knowledge on kin recognition. The questions that need to be answered about the biology of the species (in the introduction of the MM): What are the chances that related individuals encounter each other for mating : does developmental time differ between sexes? Do mothers lay a clutch of eggs in the same place (group of host) or not? How long do mothers lay eggs ? Do they lay first male next female eggs? How many times mothers do mate (this info is provided later in the introduction)? All these pieces of information could allow predict the likelihood that in nature mating with kin is more or less likely, explaining that the effective rate of sib mating is obtained by random mating, or not, and that specific mechanisms should have evolved, or not.

- We are waiting too long to know (when reading) What is the evidence for inbreeding depression in *Venturia*? The authors write : “Inbreeding depression arises for diploids that are homozygous at the sex locus: instead of developing normally into females, they turn into abnormal diploid males that are generally unviable or sterile “, and also “the low fitness of diploid males”...But the fitness of such males is 0 right- They can't fertilize any eggs?

- The introduction shows that a very large diversity of behavioural strategies related to inbreeding risk exists and that the explanation may be that there are different associated costs and benefits for each species. At the moment, paragraphs 2 and 3 of the introduction show case studies of varying strategies limiting (or not) inbreeding risk in various species, but the actual associated cost/benefit of inbreeding in each system is not provided. It would be nice to better link what is known in each investigated species regarding a) the patterns observed in inbreeding avoidance (or not) and, b) the associated known costs/benefits to inbreeding; that is, to know if, indeed, inbreeding is avoided when it leads to larger costs relative to benefits, and vice-versa, for each investigated species. In practise I would like to know whether, for example, the fitness advantage of related matings in the *Marmosa flavipentris* (if known?) or the observed costs of related mating in the ring-tailed lemurs and mole rats?

Material and methods * The authors write the methods in a way that gives a bit the wrong feeling that they have not thought that inbreeding avoidance may be obtained by dispersal from natal habitat before actual matings occur. In fact the authors test this option as well (and validate it), and the authors also explore the cost of mating with related individuals given the current population structure (and show it is very low). But these pieces of information come at odd places in the manuscript. * “Inference of mate’s genotype : When alternative genotypes were proposed for a given female’s mate, we selected the only compatible one on a case-by-case basis” How exactly was this done (there is information in the suppl data but it is not 100% clear to me).

* The whole section “Estimation of relatedness between potential versus mated partners in the field” is not clear to me and in particular the sentences ““Simulations allowed to keep track of pedigrees, yielding a perfect knowledge of kinship for all potential mates. These were classified in three categories: full-sibs, half-sibs, or unrelated. Besides, we calculated the relatedness coefficient (r) for all female-male pairs from these simulated populations (software COANCESTRY;(Wang, 2011). This allowed to estimate the optimal relatedness threshold minimizing the number of wrong assignments (i.e., unrelated pairs assigned related based on the threshold, or vice-versa). We found $r_{crit} = 0.16$ (SEM-D, Fig. S2). Logically, this threshold is lower than the theoretical relatedness between a brother and a sister (r sister-brother = 0.25; r brother-sister = 0.5) and in the interval of relatedness for 1st degree cousins ($r = 0.125$ or $r = 0.1875$ depending on the cross). With this threshold, we expect to wrongly assign 11.4% of the relationships”. In fact, this notion of “relatedness threshold” that the authors say is the threshold « above which individuals were considered related. »: would it be better to define it as the “threshold at which matings occurs among related individuals more (often?) than at random” ? Also, perhaps because I did not understand the procedure, I wonder whether this threshold of $r=0.16$ is related to any detrimental documented effect of inbreeding in these populations/species? – I suppose it is not, that is why I propose another definition of threshold above. And what does the “ the optimal relatedness threshold” is ? And how can you have « wrong assignments (i.e., unrelated pairs assigned related based on the threshold, or vice-versa) » if the full pedigrees of the simulated populations are known ? More questions: how balanced is the sex ratio in nature - As this affects the simulations of threshold it may be worth investigating how variation in sex ratio (often biased towards more males than females in terms of effective population available for mating), affects estimate of random mating in the wild- ? * The authors write: “We also estimated the probability that a female encountered a related male in the field the day of her capture.” How did they do exactly – As far as I understand, you use for this estimation the date of recapture (only males captures the same day as the female had a chance to mate with her, according to you) and not, for example, some distance between individuals above which encounter as a mate is no longer likely (which I would assume to be

more relevant if individuals are fertile more than one day). * The authors write: “We recorded mating latency, copulation duration, status (colour) of the successful male, number and timing of male rejections by females and status (colour) of rejected males. “ I do not follow fully the statistical treatment of these data: mating outcome is the results of both male and female behaviours, and in other insects it is clear that male courtship activity is a prerequisite for females to accept or refuse the mating, that is, without male courtship there is no chance of mating. I think that the authors do correct mating success of related versus unrelated males by their relative courtship activity , at least in the treatment of the “latency to mate” but what for the actual number of matings? It would be good to provide the exact GEE-GLM best model structures. * Why no males captured in Valencia? (table 1) * I do not understand the sentence “As sexual and asexual strains coexist in *V. canescens* ((Beukeboom et al., 1999; Schneider et al., 2002), we used the presence of males among offspring as evidence for arrhenotoky. Mothers and their offspring were killed and preserved individually in 96% ethanol. Thelytokous individuals were discarded. » : can individuals produce only daughters, or only sons, in this species (I thought that the sex of the offspring was dependent on the fertilization of the eggs, hence all mated individuals can produce both sexes) and why discard some individuals?

Results * The authors write: “We nonetheless treated the two populations separately because the probability that a male captured in one population had inseminated a female captured in the other is negligible. “: why is that? Dispersal distance is much shorter than 200 m for this species the distance between your two populations)? * In the section about “diploid males: Please start by explaining the relevance of this part, that you aim to assess the cost of inbreeding in this species from your field data. And why work with the Nice population only – evidence of random mating is not correlated to genetic diversity -? * In the section about “dispersal”: there is male-biased dispersal in the species, thus how do you take this into account to your quantify the "randomness" of the field matings patterns in your microsatellite data? I would start by showing sex-specific dispersal and next estimate of the resulting mixed populations may still gain, or not, to increase inbreeding avoidance by other mechanisms.

- Section on the « effect of density and relatedness on mating success » : What is used to quantify mate choice? Mate choice is a complex concept that includes both the expression of mate selectivity (females for example usually become less selective when ageing or when density of partners is low - such as in beetles see Moore and Moore PNAS 2001 “Reproductive aging and mating: The ticking of the biological clock in female cockroaches”) and of mate preference (females exert sexual selection on certain traits, but not on others hence they have preferences for some but not all aspects of males). As explained above, mate choice may also, depending on what trait is used to quantify it, include both male and female behaviours as there is mate choice (assumed to be the fact of females) only if male actually court the female in many insects. Mate choice is a complex trait and it is unclear whether male or / and female sexual behaviours are involved in the variation of this traits in your treatments. Your results suggest that there is no mate choice going on, such that females would not avoid related individuals. However your results also suggest that female can recognize kin from non kin males because latency to mate is reduced after females have rejected a kin male. To try and improve clarity it would be good that: 1) The statistical models are more clearly described, including what is the Y response variables and what are the X variables for all models used. 2) The biology of the individuals in the experiments is provided: what was the age of the females/males ? ... 3) the authors write « confirmed this ability of kin recognition in our choice test, the rejection of brothers (but not that of unrelated males) decreasing the female copulation latency.”. Please clarify how you expect latency to

mate to reflect female mate choice (female preference, or female selectivity) for this species ? We may well expect that latency decreases because female selectivity decreases and/or because female preference increases.... It is hard to exclude, again, male willingness to mate (through variation in courtship activity) from this pattern and shorter latency to mate may well highlight variation in male courtship effort rather than variation in aspects of female mate choice.

Discussion * The authors write « Sib mating avoidance in *Venturia canescens* had been evidenced from behavioural experiments in laboratory conditions (Metzger et al., 2010a). In contrast, the genetic approach developed in this study shows that in field populations, the observed frequency of matings between genetically related males and females is similar to the probability of sib mating expected under an assumption of completely random encounters. Our study thus suggests that sib mating tolerance occurs in the wild. » I do not agree with the conclusions because it may well be that there is no tolerance for sibmating in the species but that this has not been detected in this study as: 1) other mechanisms are in action to avoid sibmating in the wild, such as dispersal, so that there is no need for having in addition mate choice against related individuals to evolve; 2) there is no information of the potential detrimental effects of a threshold of 0.16 which was fixed by simulations or of having 10 (?)% chance of producing diploid males. We lack here evidence of the cost potentially associated or not to the actual level of relatedness experienced in the wild.

- The authors write “in the rest of the discussion, we propose an evolutionary scenario to explain the apparent discrepancy between patterns observed in field and in the laboratory. » As far as I understand, there is no discrepancy between your field and lab datasets, as you write below “Mating rates between relatives, be they inferred from genetic analyses or from a simulation model assuming random encounter between males and females, were both equal to 11%. Consistently, in laboratory cages, the proportion of sib mating perfectly matched the proportion of sib present. Both results are congruent with an absence of sib mating avoidance in *Venturia canescens* ". There is rather, if any, a discrepancy is between your datasets and other published data o inbreeding avoidance based on kin recognition in the lab. Such discrepancies may be explained by differences in sex ratio density, effective size, population structure,... under which those other populations used in other publications, evolved. So it is more important to show how your multi-level approach make sense of the pattern rather than try and highlight a so called discrepancy.
- The authors write « This was shown in a small isolated population of moose, with females accepting higher levels of inbreeding in years where males are less available (Herfindal et al., 2014). A similar reasoning may also hold for highly inbred populations ». Do you mean with the word « inbreeding « in fact « inbreeding for their offspring », or ‘ higher relatedness with their mate »? Or “inbreeding level in their mate” : the fact is that in social wasps males cannot be inbred as they are haploid so it is a comparison that is a bit confusing.
- in the section « Tolerance to sib mating, as observed in *Venturia canescens*, is often explained by low inbreeding depression or high cost of outbreeding » : this section would be better placed in the introduction: what is known in *Venturia* regarding cost and benefit of mating with related individuals?

Orthograph - Abstract « that sare ... » - Introduction « habitat selection following natal dispersal is negatively correlated...” rather use the words “ habitat selectivity”? - Introduction” Responses to inbreeding... » add « response to inbreeding risk »... » ?

This paper is concerned with sib-mating avoidance in natural populations of a parasitic wasp. The authors collected males (dead) and females (live) from the field at two different locations and analyzed microsatellites of daughters to determine the level of relatedness between the parents. The estimated rate of sib-mating was then compared to a threshold that was calculated based on encounter rates under random mating. The main finding is that this parasitic wasp species does not avoid sib-mating in the field, despite costs associated with sib-mating. The authors further performed an experiment to determine whether sex-biased dispersal takes place and found that males were dispersing more compared to females. In a laboratory experiment the authors then looked at the effect of male density and proportion of related males on sib-mating avoidance. Overall, density or a higher proportion of sibs did not lead to sib-mating avoidance. Several hypotheses to explain this finding are discussed.

I think this is a very interesting study. The authors have performed experiments both in the laboratory and in the field and have further designed an experiment (i.e. concerned with sex-specific dispersal) aimed to support their findings that sib-mating is not avoided in this species. The study of sib-mating avoidance in the field really is rather unique. One issue that I have with the MS, however, is that the authors claim that virtually no research has been done on sib-mating avoidance in insects. I do not think this is true, because in the laboratory several studies have been done on sib-mating (see my comment below for relevant references). Moreover, I find that the authors are not clearly describing their own previous findings on this topic (Metzger et al 2010 PLoS one). This is important, because in the current version of the MS the order of experiments does not make sense to me. If I would have been in your position I would first have performed laboratory experiments to confirm/extend previous findings on sib-mating avoidance in *V. canescens*. I would then have gone into the field to collect samples, followed by the experiment on sex-specific dispersal. I think the latter is indeed a nice addition that offers a potential explanation, but it would have been better if this experiment had been repeated at the different locations. Overall, I suggest you include a more detailed description of the work that has been done on sib-mating (and avoidance thereof) in insects, including your own work. Otherwise, very well done.

I did not have access to the supplementary files for this MS, so I have not been able to review those.

Minor comments:

I personally like the title, but it is not very informative. I suggest keeping the first part (i.e. Insects and incest), but making the second part of the title more informative (i.e. no avoidance of sib-mating in natural populations of a parasitoid wasp).

Sib-mating should be written with a hyphen in between sib and mating throughout the MS.

Abstract:

You are not mentioning your results on sex-biased dispersal in the abstract. I think that should be included somewhere.

bullet point 1:

... likely evolves in species that are... (remove the s before are).

bullet point 2:

Remove the comma after species

Replace 'congruently' by ', and as a consequence'.

bullet point 3:

Rewrite to: 'Our study consisted of genotyping...'

Rewrite to: 'With these data we were able to reconstruct the genotypic of all females' mates and estimate the relatedness of each mating pair'.

bullet point 5:

Rewrite to: 'These results suggest that *V. canescens* tolerates sib-mating in the field...'

It is either 'the common belief' or 'common beliefs'.

Rewrite to: 'This inbreeding tolerance also opens up the question as to why kin discrimination is maintained in this species'.

Does this really call into question whether inbreeding depression affects species with SI-CSD? You know that inbreeding has negative effects in this species (and others), so the real question is why sib-mating is not avoided in nature despite those costs (and indeed why discriminatory behaviors are maintained).

I would remove parasitoid wasp from your key words (it is already in the title and abstract of your paper). You could replace it with parasitic wasp to cover more ground.

Introduction:

paragraph 1:

Rewrite to: 'Various strategies to avoid inbreeding have been described in animals,'

Put a comma in front of 'such as'

Rewrite to: ' strategies are associated with...'

Rewrite to: 'gene associations'

You write that 'selection on behaviors underlying inbreeding avoidance should depend on inbreeding load, which scales the advantage of inbreeding avoidance and the costs of implementing adapted behavioural responses', but to what does selection scale up to? I suggest rewriting this sentence for clarification.

For the final sentence I suggest including a sub-sentence to explain what you mean with inclusive benefits. For instance, ', i.e. advantages for an individual's inclusive fitness'.

paragraph 2:

It is not population density itself that constrains mate availability, it is a *low* population density that constrains mate availability. This should be written clearly in the MS.

This paragraph needs a concluding statement. For instance you could summarize by saying that when mates are scarce, it might be beneficial to mate despite high relatedness.

paragraphs 3 and 4:

Both of these paragraphs also end a bit abruptly. I would suggest including a concluding sentence to each of these paragraphs to clarify the point that you are trying to make.

paragraph 4:

It is either ‘an inbreeding avoidance pattern’ or ‘inbreeding avoidance patterns’.

You mention here that inbreeding avoidance has rarely been documented in insects, especially in the wild. I agree that not much work has been done in the wild, but in the laboratory plenty of studies have by now been done on inbreeding avoidance in insects, particularly in parasitoids (e.g. Bourdais & Hance 2009 Behav Proces; Lihoreau et al 2007 Behav Ecol; Ode et al 1995 Anim Behav; Visser et al 2014 Behav Ecol Sociobiol). Not all of these studies may actually find that there is sib-mating avoidance, but the absence of positive findings does not mean that no work has been done on the topic. Moreover, your own previous work (Metzger et al 2010 PLoS one) directly addresses sib-mating avoidance, but this aspect of the paper (i.e. choice assays) is only mentioned in the discussion. These findings should already be put forth in the introduction, because it is a critical finding for your species and it puts the work into context. I suggest that you discuss more thoroughly the work that has been done so far on kin avoidance (or the absence thereof) in haplodiploids/parasitoids, including your own work. I think that this would actually strengthen your argument that only little research has been done on inbreeding avoidance in the field.

paragraph 5:

This is an excellent explanation of haplodiploidy and sl-CSD.

paragraph 6: ... ‘monandrous/polygenous’

paragraph 7:

At the end of this paragraph you refer to earlier findings and prior expectations, but what were these earlier findings and prior expectations? Please briefly repeat here.

Materials and methods

paragraph 1:

Could you include what kind of insect *Ectomyelois ceratoniae*? For instance, the moth....

I think it is a bit misleading to only focus on *E. ceratoniae* as a host. As you know *V. canescens* is a generalist (it has been documented to parasitize more than 20 hosts) and some host species may not be solitary like *E. ceratoniae* (for instance, *E. kueniella* or *P. interpunctella*). The fact that Driessen and Bernstein found about one *E. ceratoniae* per fruit is not really a good argument that patches for all hosts are small. Their result that *V. canescens* cannot really distinguish between the presence of 4 or more (up to 20) *Ephestia* larvae (compared to 1 or 2) is, however, supporting the idea that *V. canescens* does not often encounter locally aggregated hosts. If this is indeed the case in nature, it is not likely that this species experiences local mate competition (as sib-mating is not expected at the natal patch).

‘Males search for females...’

...’with a flight velocity estimated...’

paragraph 3:

‘Female traps constituted of an...’

‘Saliva secreted by host larvae when...’

‘Traps were hung...’

‘Traps consisted of a 125mm...’

paragraph 4:

‘... where they were handled in a climatic chamber...’

Should DL be LD here? In other words 16 hours light and 8 hours dark?

I think you need to include a definition here for arrhenotokous and thelytokous (say sexual and asexual).

paragraph 5:

‘..., hereafter referred to as wild females)’

Fewer than 3 daughters per female seems very little to me and suggests that the mothers did not have enough time to lay eggs, that the mothers did not have enough hosts or that mothers produced an extremely male-biased sex ratio. Otherwise it might be because the females caught in the field are already quite old? Why are these numbers so low? You need to explain this in the MS.

‘... at each microsatellite locus...’

Paragraph 12:

I think you should clearly state in the sub-title of this paragraph that these experiments were performed in the laboratory.

Actually, it is not clear to me which individuals are used for these experiments? Is this a standardized laboratory rearing? If so, then information needs to be added about this rearing earlier in the m&m. If this is indeed another rearing, you should also pay some attention to this in the discussion as results might have been different for wild-caught rather than laboratory individuals.

Results

paragraph 2:

‘Effective population sizes were estimated to be 79 for...’

Paragraph 5:

You say that random mating is suggested by your ‘previous results’. I think it would be clearer if you mention here again briefly what that result was.

Paragraph 6:

Should read ‘referred to as ...’ throughout this paragraph.

I think paragraph 6 and 7 should be only one paragraph.

Discussion

Paragraph 1:

‘Sib-mating avoidance in *Venturia canescens* has been observed in behavioural experiments performed in the laboratory...’

Remove comma between field populations and the observed...

‘In the remainder of the discussion...’

‘...patterns observed in the field...’

Paragraph 2:

‘... assuming random encounters between...’

‘... the proportion of sibs present.’

You mention here again that Metzger et al 2010a only performed no-choice tests, but this is not the case. These authors did perform choice tests and that should be stated throughout the MS. I don’t think that leaving out these details adds more novelty to your work, it only obscures the reasoning behind investigating sib-avoidance in the field. It makes more sense to me that first laboratory experiments were done to see whether sib-mating avoidance takes place, in line (or not) with previous findings of Metzger et al 2010a and then to argue that lab experiments may not reflect what is actually happening in nature, thus calling for an investigation of sib-avoidance under natural conditions. I would propose to more openly discuss the findings of Metzger et al 2010a and to introduce your own lab experiments before presenting the results on field individuals.

Paragraph 3:

The first sentence of this paragraph refers to ‘these results’. State here briefly what results you are referring to.

Paragraph 4:

‘The second hypothesis is that female choosiness in *V. canescens* is density-dependent,’

‘A similar reasoning may hold true for...’

Paragraph 7:

‘, the probability of matched mating increases to 50%’

Paragraph 8:

‘threatened’ should read ‘threatened’

Paragraph 9:

‘In *Venturia canescens* the evolution of kin recognition in a superparasitism context...’

‘... has a high cost for female fitness’

The sentence ‘Under the hypothesis of a primary evolution of kin recognition in the parasitism context and a secondary use in mate choice, the molecular pathways of sib recognition in the two ecological contexts should therefore be close’ is not correct grammatically, nor do I understand what you mean here. This needs clarification (or removal).

‘... unique pathway for kin recognition...’

Remove ‘The’ before superparasitism avoidance.

‘that sib-mating avoidance...’

References:

Is the reference of Chuine A. 2014 a PhD thesis or a MSc thesis? This should be mentioned here.

Annexe B

Matériels et Méthodes de l'expérience préliminaire de transcriptomique

B.1 Extraction d'ARN et séquençage

L'extraction des ARN totaux a été effectuée séparément sur des pools de six têtes de femelles au trizol. Une étape de purification sur colonne a été réalisée ensuite et $1\mu\text{g}$ d'ARN totaux a été envoyé à séquençer. La sélection des ARNs polyadénylés, la construction de bibliothèques ainsi que le séquençage ont été effectués par la société Fasteris (Suisse). Lors de la préparation des bibliothèques, une sélection de taille de fragments a été effectuée (180 nucléotides). Chaque pool d'individus a été séquençé avec la technologie Illumina ($2 \times 125\text{pb}$, paired-end, HiSeq 2500). Suite à un incident dans les kits Illumina, la préparation des bibliothèques et le séquençage ont été réalisés deux fois, à l'automne 2014 et pendant l'hiver 2015. Au total, nous avons ainsi obtenu un séquençage pour neuf échantillons biologiques \times 2 réplicats techniques, soit 18 échantillons.

B.2 Analyses statistiques

Après le nettoyage des données, un alignement indépendant des 18 échantillons a été effectué sur le génome de *Venturia canescens* (Pichon et al., 2015) avec le logiciel TopHat (Trapnell et al., 2009) (5 mismatches autorisés par lecture). Suite aux deux séquençages effectués, nous avons décidé de sommer les deux réplicats techniques disponibles pour chaque modalité. De plus, un pool d'échantillon (Kin1) présentait une variance bien plus importante que les autres, et nous avons décidé de le supprimer des analyses ultérieures. La normalisation des données d'expression des gènes a été effectuée avec la méthode de Trimmed mean of M-values (TMM). Seules les séquences avec au moins 1cpm dans les trois réplicats biologiques ont été gardées pour l'analyse. Une analyse en composantes principales (ACP) a été effectuée sur toutes les séquences après filtrage afin de visualiser les différences existantes entre les trois modalités : femelle seule, femelle en présence d'un mâle apparenté et femelle en présence d'un mâle non apparenté. L'analyse de l'expression différentielle des gènes a été faite de deux manières différentes : une analyse d'expression différentielle "classique" (package edgeR (Robinson et al., 2010)) et une analyse Bayésienne (package NOISeq, (Tarazona et al., 2012)) afin de comparer leurs résultats. Nous avons ensuite travaillé sur les gènes détectés comme différentiellement exprimés par les deux méthodes afin de disposer d'un

ensemble de gènes robustes. L'analyse d'enrichissement a été réalisée grâce au logiciel Blast2GO (Conesa et al., 2005).

Annexe C

Tableau des gènes différentiellement exprimés entre les conditions

"Femelle avec un mâle apparenté et

"Femelle avec un mâle non apparenté"

Tableau A - Liste des gènes différentiellement exprimés entre les modalités Femelle avec un mâle apparenté et Femelle avec un mâle non apparenté. Les gènes présentés sont les gènes communs entre les deux méthodes d'analyse d'expression des gènes (edgeR et NOISeq) ayant reçus une annotation via le logiciel Blast2GO (179/355 gènes annotés). Seq_Name : nom de la séquence issue du séquençage, Description : annotation de la séquence, Length : Taille de la séquence, e-value : Probabilité que le blast soit due au hasard, Mean % similarity : Pourcentage moyen de similarité entre la séquence blastée et la séquence de référence trouvée, Nb GO : nombre de familles de fonction biologique (Gene Ontology) dans lesquelles est retrouvée la séquence.

Seq_Name	Description	Length	e-value	Mean % similarity	Nb GO
XLOC_000100	hypothetical protein PREDICTED: uncharacterized	5722	6.5E-1	53	2
XLOC_000177	protein LOC724189 hypothetical protein	2190	3.7E-30	94	1
XLOC_000225	bcere0010_51520	276	3.3E0	64	-
XLOC_000399	moaA nifB pqqE family cyclic nucleotide-gated cation	982	3.7E0	54	-
XLOC_000440	channel beta-1-like PREDICTED: uncharacterized	5272	0.0E0	78	-
XLOC_000471	protein LOC105258513 guanine nucleotide-binding subunit	1331	1.9E-27	69	-
XLOC_000663	beta isoform X1 guanine nucleotide-binding subunit	494	7.4E-62	92	-
XLOC_000664	beta isoform X1	918	3.2E-140	98	-
XLOC_000781	defense 3	887	2.1E-61	79	-
XLOC_000993	transketolase 2 isoform X2 coproporphyrinogen	2845	0.0E0	92	-
XLOC_001002	dehydrogenase	1285	1.8E-1	43	11
XLOC_001099	troponin C, isoform 3 isoform X2	1911	7.8E-72	99	1
XLOC_001125	carboxypeptidase D-like	5434	0.0E0	69	5
XLOC_001315	Zinc finger KIAA0543, partial	510	1.1E-17	65	2
XLOC_003529	a3.1	515	1.5E-14	64	-
XLOC_003536	molecular chaperone Hsp90 PREDICTED: uncharacterized	418	7.6E-1	46	6
XLOC_004009	protein LOC102674983	4298	8.2E-109	74	-
XLOC_004010	serine protease easter	2142	5.8E-120	67	1
XLOC_004011	Serine protease easter	5321	1.2E-141	74	1
XLOC_004160	mitochondrial inner membrane	1009	5.4E-31	91	1
XLOC_004194	defensin precursor	1319	2.3E-27	66	1
XLOC_004259	serine protease	3795	7.7E-94	71	1
XLOC_004529	nahymenoptaecin-2 precursor	1513	2.0E-109	74	-
XLOC_004900	WD repeat-containing 63-like delta-1-pyrroline-5-carboxylate	6928	0.0E0	57	-
XLOC_004908	synthase	4219	0.0E0	92	-
XLOC_004932	hypothetical protein KGM_18541 Uncharacterized protein ART2,	475	1.5E-15	49	-
XLOC_004966	partial	472	1.7E-62	86	-
XLOC_004987	turtle isoform X2 hypothetical protein	13295	0.0E0	80	1
XLOC_005123	MELLADRAFT_91365	468	5.4E-10	86	-

XLOC_005257	PREDICTED: uncharacterized protein LOC103144942	2807	1.1E-84	51	-
XLOC_005275	microfibrillar-associated 1 carotenoid isomeroxygenase	1373	5.5E-73	88	-
XLOC_005421	isoform X1	2618	0.0E0	83	-
XLOC_005775	ribosomal L7A	997	6.6E-140	98	-
XLOC_005778	hypothetical protein SINV_12306, partial	1630	5.6E-36	98	-
XLOC_005905	hypothetical protein SINV_08231, partial	1400	4.6E-166	97	4
XLOC_005933	30S ribosomal S15	393	8.6E0	42	5
XLOC_006010	Protein yellow	505	3.6E-23	82	2
XLOC_006418	Neuroblastoma suppressor of tumorigenicity	2412	2.5E-132	83	-
XLOC_006583	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100113619	1140	2.1E-53	84	-
XLOC_006709	PREDICTED: uncharacterized protein LOC103311848	1988	3.0E-80	54	-
XLOC_006752	troponin C-like	879	9.4E-91	96	-
XLOC_006766	hypothetical protein SINV_13620, partial	6069	1.2E-50	84	1
XLOC_006773	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101741636	324	3.2E-3	67	-
XLOC_006774	hypothetical protein DAPPUDRAFT_68247	325	5.9E-20	79	-
XLOC_006856	hypothetical protein BAUCODRAFT_61973	319	7.4E-1	54	-
XLOC_006897	MULTISPECIES: hypothetical protein	1880	5.8E0	50	-
XLOC_006931	pre-mRNA-processing factor 39	2084	1.6E-119	65	2
XLOC_006944	gibberellin 20 oxidase 1 isoform X4	2027	1.2E-114	76	-
XLOC_006989	hypothetical protein SINV_07342, partial	5002	0.0E0	71	1
XLOC_007071	actin	996	8.5E-103	100	-
XLOC_007092	hypothetical protein DAPPUDRAFT_67127, partial	275	2.5E-21	85	-
XLOC_007094	hypothetical protein TcasGA2_TC004098	4061	8.7E-142	53	2
XLOC_007113	hypothetical protein SINV_11190, partial	3861	3.7E-35	66	-
XLOC_007184	gram-negative bacteria binding 1-2 precursor	512	2.3E-13	73	3
XLOC_007188	PREDICTED: rhodopsin	3194	0.0E0	88	7
XLOC_007218	hypothetical protein	292	8.5E-1	58	2
XLOC_007243	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100574521	292	4.7E-14	66	-
XLOC_007246	Ac1147, partial	241	9.2E-29	83	-
XLOC_007289	60S acidic ribosomal P2-like	643	1.1E-23	94	3
XLOC_007353	CR1-3	1885	1.3E-60	53	-

XLOC_008251	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100741733	1911	1.3E-110	81	-
XLOC_008264	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105191838	1469	1.1E-169	92	3
XLOC_008350	NADH dehydrogenase subunit 4	211	3.3E-19	97	4
XLOC_008357	cytochrome c oxidase subunit III response regulator receiver	626	5.2E-61	94	5
XLOC_008366	modulated diguanylate cyclase	1544	6.2E0	50	-
XLOC_008477	envelope glyco , partial	255	2.7E-1	54	7
XLOC_008496	hypothetical protein	321	3.8E0	50	-
XLOC_008519	pheromone-binding 1	1367	2.6E-44	69	1
XLOC_008789	NADH dehydrogenase subunit 4 putative tumor differentially expressed protein	193	1.1E-4	93	8
XLOC_008804	Chromosome-associated kinesin	223	1.3E-16	86	-
XLOC_008842	KIF4	570	3.1E-15	65	1
XLOC_008845	60S ribosomal L5	1096	0.0E0	95	-
XLOC_008926	metallo-beta-lactamase family hypothetical protein	458	9.8E0	55	3
XLOC_008945	SCHCODRAFT_84433	1180	9.4E-4	74	2
XLOC_008983	putative pol-like protein	2010	3.9E-57	52	-
XLOC_008986	Protein of unknown function N-terminal asparagine	551	4.9E0	50	-
XLOC_008987	amidohydrolase-like isoform X1 glucose dehydrogenase acceptor - 10	1929	0.0E0	95	-
XLOC_009003	glucose dehydrogenase [FAD, quinone]-like	8440	0.0E0	79	-
XLOC_009006	dehydrogenase reductase SDR	4221	0.0E0	93	-
XLOC_009044	family member 11-like isoform X1	1449	1.1E-120	84	-
XLOC_009089	MD-2-related lipid-recognition -like	1151	6.0E-53	73	-
XLOC_009333	hypothetical protein EAG_03557 hypothetical protein	210	5.2E-3	86	-
XLOC_009372	OXYTRI_14248	209	2.2E-20	80	-
XLOC_009531	hypothetical protein Bm1_04940	206	2.2E-15	88	-
XLOC_009536	PREDICTED: neuromodulin MULTISPECIES: hypothetical protein	2018	4.2E-44	83	-
XLOC_009573	MULTISPECIES: hypothetical protein	204	4.1E0	48	2
XLOC_009574	protein	204	3.6E0	48	2
XLOC_009686	TPA: hypothetical protein BOS_429	1547	1.8E-34	54	-
XLOC_009756	hypothetical protein EAG_13571	178	3.0E-27	98	-
XLOC_009809	golgin IMH1 1-phosphatidylinositol-4,5- bisphosphate phosphodiesterase epsilon-1	594	1.9E0	54	-
XLOC_009819	eukaryotic translation initiation factor 4E-binding 2	10361	0.0E0	94	7
XLOC_009856	hypothetical protein SINV_07054, partial	1467	2.0E-50	88	4
XLOC_009968	partial	3212	1.9E-142	57	1

XLOC_010035	hypothetical protein X777_09996, partial	194	7.4E-13	78	-
XLOC_010483	alpha-tubulin, partial	1174	0.0E0	100	6
XLOC_010655	cytochrome oxidase subunit 1, partial (mitochondrion)	182	3.8E-25	93	9
XLOC_010657	cytochrome oxidase subunit 1, partial (mitochondrion)	182	1.4E-25	95	9
XLOC_010697	conserved hypothetical protein hypothetical protein YQE_05442, partial	181	1.7E-13	74	-
XLOC_010741	partial	1704	2.6E-7	73	1
XLOC_010915	NADH dehydrogenase subunit 4	176	6.0E-9	100	4
XLOC_010922	SEC23-interacting protein	5235	0.0E0	81	1
XLOC_011002	hypothetical protein EAG_01177 PREDICTED: uncharacterized	173	6.4E-9	80	-
XLOC_011163	protein LOC102656594 ATP-binding cassette sub-family D member 1-like	5917	4.0E-21	58	-
XLOC_011285	member 1-like	1527	1.4E-148	81	5
XLOC_011300	RNA-binding protein hypothetical protein SINV_09195, partial	527	3.0E0	62	-
XLOC_011448	partial	3405	1.4E-65	49	-
XLOC_011450	NADH dehydrogenase subunit 4	163	2.7E-23	98	4
XLOC_011462	conserved uncharacterized protein acyl- synthetase short-chain family member 3, mitochondrial	2406	1.3E-2	58	-
XLOC_011522	PREDICTED: uncharacterized	3288	0.0E0	88	2
XLOC_011560	protein LOC587493	3274	2.4E-67	54	-
XLOC_011612	odorant-binding 3 hypothetical protein	1272	1.0E-13	64	1
XLOC_011624	DAPPUDRAFT_307880 Diaminohydroxyphosphoribosylami nopyrimidine deaminase	1649	3.7E-11	57	3
XLOC_011630	hypothetical protein X777_01384, partial	160	3.5E0	57	4
XLOC_011632	acyl- synthetase family member 2, mitochondrial	2561	0.0E0	67	2
XLOC_011633	related to WD40-repeat (notchless)	3618	0.0E0	76	-
XLOC_011807)	218	1.5E0	61	-
XLOC_011876	chorismate mutase	1408	7.0E0	55	1
XLOC_012165	autotransporter	161	1.1E0	56	-
XLOC_012214	Zinc finger KIAA0543, partial hypothetical protein	1584	3.4E-74	58	2
XLOC_012240	HELRODRAFT_170760 hypothetical protein SINV_15085, partial	455	4.5E0	54	7
XLOC_012326	PREDICTED: uncharacterized	1937	5.7E-24	86	-
XLOC_012433	protein LOC105192245	2547	5.7E-74	66	-
XLOC_012448	cuticle -like	1433	3.5E-15	57	-
XLOC_012453	pupal cuticle -like hypothetical protein X777_15844, partial	2435	9.6E-5	60	-
XLOC_012454	partial	1267	4.0E-9	58	-

XLOC_012455	hypothetical protein EAG_06493	1011	6.2E-26	68	-
XLOC_012472	hypothetical protein Bm1_11025	161	4.8E-18	95	-
XLOC_012492	40S ribosomal S13	1093	2.8E-94	96	3
XLOC_012580	40S ribosomal S2	1532	1.4E-140	94	4
XLOC_012750	beta-hexosaminidase subunit beta-like	2211	0.0E0	70	1
XLOC_012814	odorant-binding 4	1076	6.2E-5	54	1
XLOC_013017	cytoplasmic antigen 1	148	1.3E-5	75	-
XLOC_013377	microsomal triglyceride transfer large subunit isoform X1	5982	0.0E0	73	2
XLOC_013468	PREDICTED: uncharacterized protein LOC102681459	3287	0.0E0	87	-
XLOC_013491	paired mesoderm homeobox 2A-like	1281	4.5E-8	76	1
XLOC_013493	muscle-specific 20	1916	1.5E-114	96	-
XLOC_013517	hypothetical protein X777_06286	1392	1.7E-6	76	-
XLOC_013578	PREDICTED: ninjurin-1-like	1587	3.5E-47	85	-
XLOC_013655	PREDICTED: uncharacterized protein LOC101741636	1490	2.7E-15	43	-
XLOC_013802	sushi, von Willebrand factor type A, EGF and pentraxin domain-containing 1-like isoform X1	2609	0.0E0	90	-
XLOC_013904	nucleoside-triphosphate diphosphatase	1238	5.2E0	45	-
XLOC_013949	PREDICTED: uncharacterized protein LOC100678478 isoform X1	2143	2.3E-81	57	-
XLOC_014129	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2-like	1373	1.5E-21	81	4
XLOC_014231	60S ribosomal L15, partial	1170	5.3E-103	96	3
XLOC_014235	60S ribosomal L8	1360	8.9E-166	99	3
XLOC_014297	small heat shock with fused histidine kinase and response regulator receiver domain	13670	1.3E-90	96	1
XLOC_014385	PDZ and LIM domain Zasp-like isoform X1	1290	2.2E0	56	7
XLOC_014422	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105249613	3793	2.5E-107	77	-
XLOC_014425	calponin homology domain-containing DDB_G0272472	1726	4.9E-46	62	-
XLOC_014504	Cytochrome P450 302a1, mitochondrial	3565	3.2E-145	59	-
XLOC_014693		508	8.5E-53	84	5
XLOC_014698	endocuticle structural glyco bd-2	1990	2.4E-58	81	1
XLOC_014786	aquaporin -like isoform X2	2384	1.1E-123	86	3
XLOC_014861	ATP synthase subunit gamma, mitochondrial	3791	2.8E-163	90	4
XLOC_014864	cytochrome c	2396	1.7E-62	98	-
XLOC_014874	amino acid adenylation domain	900	5.8E-1	45	2
XLOC_014883	arrestin homolog	5900	0.0E0	91	-

XLOC_014896	hypothetical protein EAI_03501, partial	276	4.1E-21	60	-
XLOC_014935	60S ribosomal L18	1374	1.4E-105	97	3
XLOC_014990	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	2944	0.0E0	96	6
XLOC_015002	PREDICTED: uncharacterized protein LOC105286178	1492	3.8E-14	55	-
XLOC_015075	esterase FE4-like	1953	0.0E0	71	-
XLOC_015291	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	3844	0.0E0	95	5
XLOC_015444	40S ribosomal S3a	919	8.0E-148	91	3
XLOC_015505	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing 10, mitochondrial	3136	5.0E-33	79	-
XLOC_015644	phosphate carrier , mitochondrial	1851	0.0E0	90	-
XLOC_015682	transposase	1349	5.1E-65	56	-
XLOC_015719	40S ribosomal S10-like isoform X1	586	3.6E-71	92	-
XLOC_015753	ferritin subunit	2745	1.9E-120	92	6
XLOC_015773	putative alpha-mannosidase	810	7.0E0	54	-
XLOC_015898	60S ribosomal L23	664	6.2E-82	98	3
XLOC_015978	RNA-directed DNA polymerase	878	7.6E0	54	3
XLOC_016558	lethal(2)essential for life-like	1102	5.1E-69	75	-
XLOC_016560	lethal(2)essential for life-like	2876	2.7E-82	85	-
XLOC_016563	lethal(2)essential for life-like	1103	4.4E-87	82	-
XLOC_016574	rac GTPase-activating 1-like	1058	2.1E-40	56	-
XLOC_016590	glutamine gamma- glutamyltransferase K	329	4.0E0	50	3
XLOC_016671	ribosomal RNA processing 36 homolog	1072	2.1E-81	82	-

*ANNEXE C. TABLEAU DES GÈNES DIFFÉRENTIELLEMENT
EXPRIMÉS ENTRE LES CONDITIONS "FEMELLE AVEC UN MÂLE
APPARENTÉ ET "FEMELLE AVEC UN MÂLE NON APPARENTÉ"*

Bibliographie

- Abdalla, F. C., and C. d. Cruz-Landim. 2001. Dufour glands in the hymenoptera (Apidae, Formicidae, Vespidae) : a review. *Revista Brasileira de Biologia* **61** :95–106. URL http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-71082001000100013&lng=en&nrm=iso&tlng=en. 19, 96, 115
- Adams, J., E. D. Rothman, W. E. Kerr, and Z. L. Paulino. 1977. Estimation of the Number of Sex Alleles and Queen Matings from Diploid Male Frequencies in a Population of *Apis Mellifera*. *Genetics* **86** :583–596. URL <http://www.genetics.org/content/86/3/583>. 31, 45, 46
- Agrawal, A. F. 2001. Sexual selection and the maintenance of sexual reproduction. *Nature* **411** :35079590. URL <https://www-nature-com.inee.bib.cnrs.fr/articles/35079590>. 128
- Aguilera-Olivares, D., L. Flores-Prado, D. Véliz, and H. M. Niemeyer. 2015. Mechanisms of inbreeding avoidance in the one-piece drywood termite *Neotermes chilensis*. *Insectes Sociaux* **62** :237–245. URL <http://link.springer.com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s00040-015-0399-1>. 9
- Aktipis, C. A., and E. Fernandez-Duque. 2011. Parental investment without kin recognition : simple conditional rules for parent–offspring behavior. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **65** :1079–1091. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s00265-010-1115-9>. 19
- Alaux, C., and G. E. Robinson. 2007. Alarm Pheromone Induces Immediate–Early Gene Expression and Slow Behavioral Response in Honey Bees. *Journal of Chemical Ecology* **33** :1346–1350. URL <http://link.springer.com.gate1.inist.fr/article/10.1007/s10886-007-9301-6>. 127
- Alaux, C., S. Sinha, L. Hasadsri, G. J. Hunt, E. Guzmán-Novoa, G. DeGrandi-Hoffman, J. L. Uribe-Rubio, B. R. Southey, S. Rodriguez-Zas, and G. E. Robinson. 2009. Honey bee aggression supports a link between gene regulation and behavioral evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106** :15400–15405. URL <http://www.pnas.org.gate1.inist.fr/content/106/36/15400>. 122
- Amat, I., J. J. M. v. Alphen, A. Kacelnik, E. Desouhant, and C. Bernstein. 2017. Adaptations to different habitats in sexual and asexual populations of parasitoid wasps : a meta-analysis. *PeerJ* **5** :e3699. URL <https://peerj.com/articles/3699>. 31, 34, 129
- Amat, I., C. Bernstein, and J. J. M. van Alphen. 2003. Does a deletion in a virus-like particle protein have pleiotropic effects on the reproductive biology of a parasitoid wasp? *Journal of Insect Physiology* **49** :1183–1188. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191003002117>. 30

- Amat, I., S. Besnard, V. Foray, P. Pelosse, C. Bernstein, and E. Desouhant. 2012. Fuelling flight in a parasitic wasp : which energetic substrate to use? *Ecological Entomology* **37** :480–489. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2311.2012.01388.x/abstract>. 30, 34
- Amat, I., M. Castelo, E. Desouhant, and C. Bernstein. 2006. The influence of temperature and host availability on the host exploitation strategies of sexual and asexual parasitic wasps of the same species. *Oecologia* **148** :153–161. URL <http://link.springer.com.gate1.inist.fr/article/10.1007/s00442-005-0332-9>. 64
- Amat, I., E. Desouhant, and C. Bernstein. 2009. Differential use of conspecific-derived information by sexual and asexual parasitic wasps exploiting partially depleted host patches. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **63** :563–572. URL <http://link.springer.com/10.1007/s00265-008-0691-4>. 34, 94
- Andersen, J. F., S. L. Buchmann, D. Weisleder, R. D. Plattner, and R. L. Minckley. 1988. Identification of thoracic gland constituents from male *Xylocopa* spp. latreille (Hymenoptera : Anthophoridae) from arizona. *Journal of Chemical Ecology* **14** :1153–1162. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/BF01019343>. 19
- Andersson, M. B. 1994. *Sexual Selection*. Princeton University Press. 6
- Angeloni, F., N. J. Ouborg, and R. Leimu. 2011. Meta-analysis on the association of population size and life history with inbreeding depression in plants. *Biological Conservation* **144** :35–43. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006320710003733>. 8
- Antolin, M. F., P. J. Ode, G. E. Heimpel, R. B. O'Hara, and M. R. Strand. 2003. Population structure, mating system, and sex-determining allele diversity of the parasitoid wasp *Habrobracon hebetor*. *Heredity* **91** :373–381. URL <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/hdy/journal/v91/n4/full/6800337a.html>. 32
- Arct, A., S. M. Drobniak, and M. Cichoń. 2015. Genetic similarity between mates predicts extrapair paternity—a meta-analysis of bird studies. *Behavioral Ecology* **26** :959–968. URL <http://beheco.oxfordjournals.org.gate1.inist.fr/content/26/4/959>. 27, 68, 93
- Arnqvist, and Nilsson. 2000. The evolution of polyandry : multiple mating and female fitness in insects. *Animal behaviour* **60** :145–164. 10
- Asplen, M. K., J. B. Whitfield, J. G. De Boer, and G. E. Heimpel. 2009. Ancestral state reconstruction analysis of hymenopteran sex determination mechanisms. *Journal of Evolutionary Biology* **22** :1762–1769. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1420-9101.2009.01774.x/abstract>. 34
- Aubin, T., P. Jouventin, and I. Charrier. 2015. Mother Vocal Recognition in Antarctic Fur Seal *Arctocephalus gazella* Pups : A Two-Step Process. *Plos One* **10** :e0134513. 16
- Backwell, P. R. Y., and N. I. Passmore. 1996. Time constraints and multiple choice criteria in the sampling behaviour and mate choice of the fiddler crab, *Uca annulipes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **38** :407–416. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s002650050258>. 23, 26

- Baguette, M., C. Vansteenwegen, I. Convi, and G. Nève. 1998. Sex-biased density-dependent migration in a metapopulation of the butterfly *Proclossiana eunomia*. *Acta Oecologica* **19** :17–24. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1146609X98800040>. 9
- Bailey, N. W., P. A. Moran, and R. M. Hennig. 2017. Divergent mechanisms of acoustic mate recognition between closely related field cricket species (*Teleogryllus* spp.). *Animal Behaviour* **130** :17–25. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347217301823>. 18
- Bailey, R. I., P. Innocenti, E. H. Morrow, U. Friberg, and A. Qvarnström. 2011. Female *Drosophila melanogaster* Gene Expression and Mate Choice : The X Chromosome Harbours Candidate Genes Underlying Sexual Isolation. *PLoS ONE* **6** :e17358. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0017358>. 24
- Bartelt, R. J., A. A. Cossé, R. J. Petroski, and D. K. Weaver. 2002. Cuticular Hydrocarbons and Novel Alkenediol Diacetates from Wheat Stem Sawfly (*Cephus cinctus*) : Natural Oxidation to Pheromone Components. *Journal of Chemical Ecology* **28** :385–405. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1023/A:1017994410538>. 19
- Bartelt, R. J., and L. L. Jackson. 1984. Hydrocarbon Component of the *Drosophila virilis* (Diptera : Drosophilidae) Aggregation Pheromone : (Z)-10-Heneicosene. *Annals of the Entomological Society of America* **77** :364–371. URL <https://academic.oup.com/aesa/article/77/4/364/84119/Hydrocarbon-Component-of-the-Drosophila-virilis>. 19
- Basolo, A. L. 1990. Female Preference Predates the Evolution of the Sword in Swordtail Fish. *Science* **250** :808–810. URL <http://www.jstor.org/stable/2878604>. 5
- Basolo, A. L. 1998. Shift in investment between sexually selected traits : tarnishing of the silver spoon. *Animal Behaviour* **55** :665–671. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347297906345>. 6
- Bateson, P. 1982. Preferences for cousins in Japanese quail. *Nature* **295** :236–237. URL <http://www.nature.com/gate1.inist.fr/nature/journal/v295/n5846/abs/295236a0.html>. 13, 68
- Bateson, P., 1983*a*. Optimal outbreeding. Pages 257–278 *in* *Mate Choice*. Cambridge University Press. URL https://books.google.fr/books/about/Mate_Choice.html?hl=fr&id=HY-onXFuTcoC. 11, 13, 68
- Bateson, P. P. G., editor. 1983*b*. *Mate choice*. Cambridge University Press, Cambridge [Cambridgeshire]; New York. 16
- Battesti, M., C. Moreno, D. Joly, and F. Mery. 2012. Spread of Social Information and Dynamics of Social Transmission within *Drosophila* Groups. *Current Biology* **22** :309–313. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982211014631>. 16
- Beauchamp, G. K., and K. Yamazaki. 2003. Chemical signalling in mice. *Biochemical Society Transactions* **31** :147–151. URL <http://www.biochemsoctrans.org.inee.bib.cnrs.fr/content/31/1/147>. 19

- Bengtsson, B. O. 1978. Avoiding inbreeding : at what cost? *Journal of Theoretical Biology* **73** :439–444. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022519378901510>. 13, 68
- Beukeboom, L., G. Driessen, L. Luckerhoff, C. Bernstein, L. Lapchin, and J. Van Alphen. 1999. Distribution and relatedness of sexual and asexual *Venturia canescens* (Hymenoptera). *Proc Exp Appl Entomol Neth NEV Amsterdam* **10** :23–28. 30
- Beukeboom, L. W. 2001. Single-locus complementary sex determination in the ichneumonid *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera). *Netherlands Journal of Zoology* **51** :1–15. URL [://000169673400001](http://000169673400001). 32, 34, 47, 120
- Beukeboom, L. W., and L. P. Pijnacker. 2000. Automictic parthenogenesis in the parasitoid *Venturia canescens* (Hymenoptera : Ichneumonidae) revisited. *Genome* **43** :939–944. URL <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g00-061>. 31
- Beye, M., M. Hasselmann, M. K. Fondrk, R. E. Page Jr., and S. W. Omholt. 2003. The Gene *csd* Is the Primary Signal for Sexual Development in the Honeybee and Encodes an SR-Type Protein. *Cell* **114** :419–429. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867403006068>. 32, 34
- Beye, M., R. F. A. Moritz, R. H. Crozier, and Y. C. Crozier. 1996. Mapping the sex locus of the honeybee (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften* **83** :424–426. URL <http://link.springer.com.gate1.inist.fr/article/10.1007/BF01142068>. 31, 32, 44
- Biewer, M., F. Schlesinger, and M. Hasselmann. 2015. The evolutionary dynamics of major regulators for sexual development among Hymenoptera species. *Frontiers in Genetics* **6**. URL <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2015.00124/full>. 32
- Billeter, J.-C., E. J. Rideout, A. J. Dornan, and S. F. Goodwin. 2006. Control of Male Sexual Behavior in *Drosophila* by the Sex Determination Pathway. *Current Biology* **16** :R766–R776. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982206019737>. 122
- Billing, A. M., A. M. Lee, S. Skjelseth, s. A. Borg, M. C. Hale, J. Slate, H. Pärn, T. H. Ringsby, B.-E. Sæther, and H. Jensen. 2012. Evidence of inbreeding depression but not inbreeding avoidance in a natural house sparrow population. *Molecular Ecology* **21** :1487–1499. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1365-294X.2012.05490.x/abstract>. 11
- Biosa, D., S. Grignolio, N. Sica, N. Pagon, M. Scandura, and M. Apollonio. 2015. Do relatives like to stay closer? Spatial organization and genetic relatedness in a mountain roe deer population. *Journal of Zoology* **296** :30–37. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/jzo.12214/abstract>. 9
- Birdsell, J. A., and C. Wills, 2003. The Evolutionary Origin and Maintenance of Sexual Recombination : A Review of Contemporary Models. Pages 27–138 *in* *Evolutionary Biology*. Evolutionary Biology, Springer, Boston, MA. URL https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4757-5190-1_2. 129, 130
- Bleu, J., M. Gamelon, and B.-E. Sæther. 2016. Reproductive costs in terrestrial male vertebrates : insights from bird studies. *Proc. R. Soc. B* **283** :20152600.

- URL <http://rspb.royalsocietypublishing.org.inee.bib.cnrs.fr/content/283/1823/20152600>. 16
- Blum, M. S. 1996. Semiochemical Parsimony in the Arthropoda. *Annual Review of Entomology* **41** :353–374. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.en.41.010196.002033>. 96, 121
- Boer, J. G. d., P. J. Ode, A. K. Rendahl, L. E. M. Vet, J. B. Whitfield, and G. E. Heimpel. 2008. Experimental Support for Multiple-Locus Complementary Sex Determination in the Parasitoid *Cotesia vestalis*. *Genetics* **180** :1525. URL <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.inee.bib.cnrs.fr/pmc/articles/PMC2581954/>. 32
- Boff, S., A. Soro, R. J. Paxton, and I. Alves-dos Santos. 2014. Island isolation reduces genetic diversity and connectivity but does not significantly elevate diploid male production in a neotropical orchid bee. *Conservation Genetics* **15** :1123–1135. URL <http://link.springer.com/10.1007/s10592-014-0605-0>. 45
- Boivin, G. 1996. Évolution et diversité des insectes parasitoïdes. *Antennae*. Numéro spécial pages 6–12. 45
- Bompard, A., I. Amat, X. Fauvergue, and T. Spataro. 2016. Trophic interactions may reverse the demographic consequences of inbreeding. *Ecology* **97** :3131–3142. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1002/ecy.1544/abstract>. 7, 38, 45, 48
- Bonadonna, F., and A. Sanz-Aguilar. 2012. Kin recognition and inbreeding avoidance in wild birds : the first evidence for individual kin-related odour recognition. *Animal Behaviour* **84** :509–513. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347212002758>. 19, 23, 68
- Bonduriansky, R. 2001. The evolution of male mate choice in insects : a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* **76** :305–339. 16, 25
- Bonsall, M. B., and M. P. Hassell. 1998. Population Dynamics of Apparent Competition in a Host-Parasitoid Assemblage. *Journal of Animal Ecology* **67** :918–929. URL <http://www.jstor.org/stable/2647421>. 48
- Bonte, D., H. Van Dyck, J. M. Bullock, A. Coulon, M. Delgado, M. Gibbs, V. Lehouck, E. Matthysen, K. Mustin, M. Saastamoinen, N. Schtickzelle, V. M. Stevens, S. Vandewoestijne, M. Baguette, K. Barton, T. G. Benton, A. Chaput-Bardy, J. Clobert, C. Dytham, T. Hovestadt, C. M. Meier, S. C. F. Palmer, C. Turlure, and J. M. J. Travis. 2012. Costs of dispersal. *Biological Reviews* **87** :290–312. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1469-185X.2011.00201.x/abstract>. 68
- Booksmythe, I., T. Detto, and P. R. Y. Backwell. 2008. Female fiddler crabs settle for less : the travel costs of mate choice. *Animal Behaviour* **76** :1775–1781. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347208003564>. 25
- Boomsma, J. J., and P. d’Ettorre. 2013. Nice to kin and nasty to non-kin : revisiting Hamilton’s early insights on eusociality. *Biology Letters* **9**. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3871339/>. 15, 16

- Boulet, M., M. J. Charpentier, and C. M. Drea. 2009. Decoding an olfactory mechanism of kin recognition and inbreeding avoidance in a primate. *BMC Evolutionary Biology* **9** :281. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2799416/>. 19, 68
- Bourdais, D., and T. Hance. 2009. Lack of behavioural evidence for kin avoidance in mate choice in a hymenopteran parasitoid (Hymenoptera : Braconidae). *Behavioural Processes* **81** :92–94. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376635709000631>. 68
- Brandstaetter, A. S., A. Endler, and C. J. Kleineidam. 2008. Nestmate recognition in ants is possible without tactile interaction. *Naturwissenschaften* **95** :601–608. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s00114-008-0360-5>. 15, 19
- Brandt, M., E. van Wilgenburg, R. Sulc, K. J. Shea, and N. D. Tsutsui. 2009. The scent of supercolonies : the discovery, synthesis and behavioural verification of ant colony recognition cues. *BMC Biology* **7** :71. URL <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/7/71>. 19
- Breed, M. D. 2003. Nestmate Recognition Assays as a Tool for Population and Ecological Studies in Eusocial Insects : A Review. *Journal of the Kansas Entomological Society* **76** :539–550. URL <http://www.jstor.org/stable/25086148>. 15
- Breed, M. D., M. F. Garry, A. N. Pearce, B. E. Hibbard, L. B. Bjostad, and J. Page, Robert E. 1995. The role of wax comb in honey bee nestmate recognition. *Animal Behaviour* **50** :489–496. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347285702631>. 20
- Breedveld, M. C., and P. S. Fitze. 2015. A matter of time : delayed mate encounter postpones mating window initiation and reduces the strength of female choosiness. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **69** :533–541. URL <http://link.springer.com.gate1.inist.fr/article/10.1007/s00265-014-1864-y>. 13, 26, 93
- Bretman, A., D. Newcombe, and T. Tregenza. 2009. Promiscuous females avoid inbreeding by controlling sperm storage. *Molecular Ecology* **18** :3340–3345. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1365-294X.2009.04301.x/abstract>. 10
- Bretman, A., R. Rodríguez-Muñoz, C. Walling, J. Slate, and T. Tregenza. 2011. Fine-scale population structure, inbreeding risk and avoidance in a wild insect population. *Molecular Ecology* **20** :3045–3055. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1365-294X.2011.05140.x/abstract>. 27, 68, 130
- Bretman, A., N. Wedell, and T. Tregenza. 2004. Molecular evidence of post-copulatory inbreeding avoidance in the field cricket *Gryllus bimaculatus*. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **271** :159–164. 9, 10
- Buckle, G. R., and L. Greenberg. 1981. Nestmate recognition in sweat bees (*Lasioglossum zephyrum*) : Does an individual recognize its own odour or only odours of its nestmates? *Animal Behaviour* **29** :802–809. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347281800140>. 15, 16, 21

- Bukowski, T. C., and L. Avilés. 2002. Asynchronous maturation of the sexes may limit close inbreeding in a subsocial spider. *Canadian Journal of Zoology* **80** :193–198. URL <http://www.nrcresearchpress.com/inee/bib/cnrs.fr/doi/10.1139/z01-220>. 9
- Butcher, R. D. J., S. F. Hubbard, and W. G. F. Whitfield. 2000. Microsatellite frequency and size variation in the parthenogenetic parasitic wasp *Venturia canescens* (Gravenhorst) (Hymenoptera : Ichneumonidae). *Insect Molecular Biology* **9** :375–384. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2583.2000.00199.x/abstract>. 31, 63
- Byers, J. A., P. A. Wiseman, L. Jones, and T. J. Roffe. 2005. A Large Cost of Female Mate Sampling in Pronghorn. *The American Naturalist* **166** :661–668. URL <http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/497401>. 25
- Candolin, U. 2003. The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews* **78** :575–595. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/inee/bib/cnrs.fr/doi/10.1017/S1464793103006158/abstract>. 22
- Castelo, M. K., J. C. Corley, and E. Desouhant. 2003. Conspecific Avoidance During Foraging in *Venturia canescens* (Hymenoptera: Ichneumonidae) : The Roles of Host Presence and Conspecific Densities. *Journal of Insect Behavior* **16** :307–318. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1023/A:1023928204793>. 34
- Chapman, and Partridge. 1998. Sex-specific selection on time to remate in *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour* **56** :1267–1278. 26, 93
- Chapman, T. W., and B. Crespi. 1998. High relatedness and inbreeding in two species of haplodiploid eusocial thrips (Insecta : Thysanoptera) revealed by microsatellite analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **43** :301–306. URL <http://link.springer.com/acces/bibliotheque-diderot.fr/article/10.1007/s002650050495>. 68
- Chapman, T. W., and S. C. Stewart. 1996. Extremely high levels of inbreeding in a natural population of the free-living wasp *Ancistrocerus antilope* (Hymenoptera : Vespidae : Eumeninae). *Heredity* **76** :65–69. URL <://WOS:A1996TP13500008>. 68
- Charlesworth, D., and B. Charlesworth. 1987. Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18** :237–268. URL <http://www.jstor.org/stable/2097132>. 8
- Charlesworth, D., and J. H. Willis. 2009. The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics* **10** :783–796. URL <http://www.nature.com/doi/finder/10.1038/nrg2664>. 68
- Charpentier, M. J. E., M. Boulet, and C. M. Drea. 2008. Smelling right : the scent of male lemurs advertises genetic quality and relatedness. *Molecular Ecology* **17** :3225–3233. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/inee/bib/cnrs.fr/doi/10.1111/j.1365-294X.2008.03831.x/abstract>. 19, 24
- Choi, M.-Y., and R. K. Vander Meer. 2015. Multiple functions of fire ant *Solenopsis invicta* mandibular gland products. *Physiological Entomology* **40** :196–204. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/inee/bib/cnrs.fr/doi/10.1111/phen.12102/abstract>. 19, 96

- Chuine, A., S. Sauzet, F. Debias, and E. Desouhant. 2015. Consequences of genetic incompatibility on fitness and mate choice : the male point of view. *Biological Journal of the Linnean Society* **114** :279–286. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/gate1.inist.fr/doi/10.1111/bij.12421/abstract>. 35, 120
- Chung, H., and S. B. Carroll. 2015. Wax, sex and the origin of species : Dual roles of insect cuticular hydrocarbons in adaptation and mating. *BioEssays* **37** :822–830. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/gate1.inist.fr/doi/10.1002/bies.201500014/abstract>. 19, 20, 96
- Chung, H., D. W. Loehlin, H. D. Dufour, K. Vaccarro, J. G. Millar, and S. B. Carroll. 2014. A Single Gene Affects Both Ecological Divergence and Mate Choice in *Drosophila*. *Science* **343** :1148–1151. URL <http://www.sciencemag.org/gate1.inist.fr/content/343/6175/1148>. 24
- Clutton-Brock, T. 2009. Sexual selection in females. *Animal Behaviour* **77** :3–11. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347208004478>. 25
- Cohas, A., N. G. Yoccoz, C. Bonenfant, B. Goossens, C. Genton, M. Galan, B. Kempenaers, and D. Allainé. 2008. The genetic similarity between pair members influences the frequency of extrapair paternity in alpine marmots. *Animal Behaviour* **76** :87–95. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000334720800119X>. 9, 24, 27, 68, 93
- Cohen, J. 1977. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Rev. ed edition. Academic Press, New York. 63
- Conesa, A., S. Götz, J. M. García-Gómez, J. Terol, M. Talón, and M. Robles. 2005. Blast2GO : a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21** :3674–3676. URL <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/21/18/3674/202517/Blast2GO-a-universal-tool-for-annotation>. XVIII
- Consortium, T. . G. P. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **467** :1061–1073. URL <http://www.nature.com.inee.bib.cnrs.fr/nature/journal/v467/n7319/full/nature09534.html?foxtrotcallback=true>. 64
- Cook, J. M. 1993. Sex determination in the Hymenoptera : a review of models and evidence. *Heredity* **71** :421–435. URL <http://www.nature.com/gate1.inist.fr/hdy/journal/v71/n4/abs/hdy1993157a.html>. 32
- Cook, J. M., and R. H. Crozier. 1995. Sex determination and population biology in the hymenoptera. *Trends in Ecology & Evolution* **10** :281–286. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016953479590011X>. 45, 46
- Cooney, R., and N. C. Bennett. 2000. Inbreeding avoidance and reproductive skew in a cooperative mammal. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences* **267** :801–806. URL <http://rspb.royalsocietypublishing.org/gate1.inist.fr/content/267/1445/801>. 11, 68
- Cooper, T. F., R. E. Lenski, and S. F. Elena. 2005. Parasites and mutational load : an experimental test of a pluralistic theory for the evolution of sex. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences* **272** :311–317. URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1634976/>. 130

- Corbet, S. 1971. Mandibular gland secretion of larvae of the flour moth, *Anagasta kuehniella*, contains an epideictic pheromone and elicits oviposition movements in a Hymenopteran parasite. *Nature* **232** :481–484. 30
- Corona, R., and F. Levy. 2015. Chemical olfactory signals and parenthood in mammals. *Hormones and Behavior* **68** :77–90. 16
- Cotton, S., J. Small, and A. Pomiankowski. 2006. Sexual Selection and Condition-Dependent Mate Preferences. *Current Biology* **16** :R755–R765. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982206019956>. 68, 69
- Couvillon, M. J., G. G. F. Roy, and F. L. W. Ratnieks. 2009. Recognition errors by honey bee (*Apis mellifera*) guards demonstrate overlapping cues in conspecific recognition. *Journal of apicultural research* **48** :225–232. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4440684/>. 15, 21
- Cowan, D. P., and J. K. Stahlhut. 2004. Functionally reproductive diploid and haploid males in an inbreeding hymenopteran with complementary sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** :10374–10379. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC478579/>. 32
- Crozier, R. H. 1986. Genetic Clonal Recognition Abilities in Marine Invertebrates Must Be Maintained by Selection for Something Else. *Evolution* **40** :1100–1101. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1558-5646.1986.tb00578.x/abstract>. 22
- Darvill, B., J. S. Ellis, G. C. Lye, and D. Goulson. 2006. Population structure and inbreeding in a rare and declining bumblebee, *Bombus muscorum* (Hymenoptera : Apidae). *Molecular Ecology* **15** :601–611. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1365-294X.2006.02797.x/abstract>. 12, 45, 63
- Darvill, B., O. Lepais, L. C. Woodall, and D. Goulson. 2012. Triploid bumblebees indicate a direct cost of inbreeding in fragmented populations. *Molecular Ecology* **21** :3988–3995. URL <://WOS:000306897500009>. 12, 45, 63
- Darwin, C. 1859. *The Origin of Species*. 8, 14
- Darwin, C. 1872. *The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex*. D. Appleton.
- Davey, J. W., P. A. Hohenlohe, P. D. Etter, J. Q. Boone, J. M. Catchen, and M. L. Blaxter. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* **12** :499–510. URL <http://www.nature.com.inee.bib.cnrs.fr/nrg/journal/v12/n7/full/nrg3012.html?foxtrotcallback=true>. 63
- Dawkins, R. 1976. *The Selfish Gene*. Oxford University Press.
- de Boer, J. G., M. A. Groenen, B. A. Pannebakker, L. W. Beukeboom, and R. H. Kraus. 2015. Population-level consequences of complementary sex determination in a solitary parasitoid. *BMC Evolutionary Biology* **15**. URL <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/15/98>. 44

- de Boer, J. G., B. Kuijper, G. E. Heimpel, and L. W. Beukeboom. 2012. Sex determination meltdown upon biological control introduction of the parasitoid *Cotesia rubecula*? *Evolutionary Applications* **5** :444–454. URL <://WOS:000306271700003.44>
- De Boer, J. G., P. J. Ode, L. E. M. Vet, J. Whitfield, and G. E. Heimpel. 2007. Complementary sex determination in the parasitoid wasp *Cotesia vestalis* (*C. plutellae*). *Journal of Evolutionary Biology* **20** :340–348. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1420-9101.2006.01193.x/abstract>. 31
- De Gelder, B., and P. Bertelson. 2003. Multisensory integration, perception and ecological validity. *Trends in Cognitive Sciences* **7** :460–467. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1364661303002286>. 22, 23
- de Rivera, C. E., P. R. Backwell, J. H. Christy, and S. L. Vehrencamp. 2003. Density affects female and male mate searching in the fiddler crab, *Uca beebei*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **53** :72–83. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s00265-002-0555-2>. 68
- Dechaume-Moncharmont, F.-X., T. Brom, and F. Cézilly. 2016. Opportunity costs resulting from scramble competition within the choosy sex severely impair mate choosiness. *Animal Behaviour* **114** :249–260. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347216000671>. 26, 130
- Desouhant, E., G. Driessen, I. Amat, and C. Bernstein. 2005. Host and food searching in a parasitic wasp *Venturia canescens* : a trade-off between current and future reproduction? *Animal Behaviour* **70** :145–152. URL <://000230443200016>. 30, 34
- Desouhant, E., G. Driessen, L. Lapchin, S. Wielaard, and C. Bernstein. 2003. Dispersal between host populations in field conditions : navigation rules in the parasitoid *Venturia canescens*. *Ecological Entomology* **28** :257–267. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1046/j.1365-2311.2003.00511.x/abstract>. 30, 34, 63
- Dlugosch, K. M., S. R. Anderson, J. Braasch, F. A. Cang, and H. D. Gillette. 2015. The devil is in the details : genetic variation in introduced populations and its contributions to invasion. *Molecular Ecology* **24** :2095–2111. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/mec.13183/abstract>. 45
- Dlugosch, K. M., and I. M. Parker. 2008. Founding events in species invasions : genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17** :431–449. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1365-294X.2007.03538.x/abstract>. 45
- dos Santos, A. B., and F. S. do Nascimento. 2015. Cuticular Hydrocarbons of Orchard Bees Males : Interspecific and Chemotaxonomy Variation. *PLoS ONE* **10** :e0145070. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0145070>. 19
- Dowling, D. K., U. Friberg, and G. Arnqvist. 2007. A comparison of nuclear and cytoplasmic genetic effects on sperm competitiveness and female remating in a seed beetle. *Journal of Evolutionary Biology* **20** :2113–2125. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1420-9101.2007.01433.x/abstract>. 26, 93

- Drapeau, M. D., A. Radovic, P. J. Wittkopp, and A. D. Long. 2003. A gene necessary for normal male courtship, yellow, acts downstream of fruitless in the *Drosophila melanogaster* larval brain. *Journal of Neurobiology* **55** :53–72. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1002/neu.10196/abstract>. 124
- Driessen, G., and C. Bernstein. 1999. Patch departure mechanisms and optimal host exploitation in an insect parasitoid. *Journal of Animal Ecology* **68** :445–459. 34
- Duthie, A. B., G. Bocedi, and J. M. Reid. 2016. When does female multiple mating evolve to adjust inbreeding? Effects of inbreeding depression, direct costs, mating constraints, and polyandry as a threshold trait. *Evolution* **70** :1927–1943. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/evo.13005/abstract>. 11
- Duthie, A. B., and J. M. Reid. 2016. Evolution of Inbreeding Avoidance and Inbreeding Preference through Mate Choice among Interacting Relatives. *The American Naturalist* **188** :651–667. URL <http://www.journals.uchicago.edu.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1086/688919>. 13, 16, 26, 68
- Eggleton, P., and K. J. Gaston. 1990. "Parasitoid" Species and Assemblages : Convenient Definitions or Misleading Compromises? *Oikos* **59** :417–421. URL <http://www.jstor.org/stable/3545155>. 45
- Elias, J., S. Dorn, and D. Mazzi. 2010. No evidence for increased extinction proneness with decreasing effective population size in a parasitoid with complementary sex determination and fertile diploid males. *BMC Evolutionary Biology* **10** :366. URL <http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-10-366>. 32
- Ellegren, H. 2004. Microsatellites : simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* **5** :435–445. URL <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/nrg/journal/v5/n6/full/nrg1348.html>. 64
- Ellis, J. S., M. E. Knight, B. Darvill, and D. Goulson. 2006. Extremely low effective population sizes, genetic structuring and reduced genetic diversity in a threatened bumblebee species, *Bombus sylvarum* (Hymenoptera : Apidae) : GENETIC STRUCTURING IN DECLINING BUMBLEBEES. *Molecular Ecology* **15** :4375–4386. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.2006.03121.x>. 45
- Emmons, S. W., and J. Lipton. 2003. Genetic basis of male sexual behavior. *Journal of Neurobiology* **54** :93–110. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1002/neu.10163/abstract>. 122
- Enigl, M., and P. Schausberger. 2004. Mate choice in the predaceous mite *Phytoseiulus persimilis* : evidence of self-referent phenotype matching? *Entomologia Experimentalis et Applicata* **112** :21–28. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.0013-8703.2004.00175.x/abstract>. 21
- Falcón, T., M. J. Ferreira-Caliman, F. M. Franco Nunes, r. D. Tanaka, F. S. do Nascimento, and M. M. Gentile Bitondi. 2014. Exoskeleton formation in *Apis mellifera* : Cuticular hydrocarbons profiles and expression of desaturase and elongase genes during pupal and adult development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **50** :68–81. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0965174814000769>. 19

- Fauvergue, X., A. Chuine, C. Vayssade, A. Auguste, and E. Desouhant. 2015. Sterile males in a parasitoid wasp with complementary sex determination : from fitness costs to population extinction. *BMC Ecology* **15**. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4449571/>. 32, 34, 38, 45, 47, 128
- Fauvergue, X., E. Vercken, T. Malausa, and R. A. Hufbauer. 2012. The biology of small, introduced populations, with special reference to biological control. *Evolutionary Applications* **5** :424–443. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1752-4571.2012.00272.x/abstract>. 45
- Fawcett, M. J. A. R. H. A. D., Tim W. 2015. The Evolution of Mechanisms Underlying Behaviour. *Current Zoology* **61** :221–225. URL <https://academic.oup.com/cz/article-lookup/doi/10.1093/czoolo/61.2.221>. 121
- Fendrich, R., and P. M. Corballis. 2001. The temporal cross-capture of audition and vision. *Perception & Psychophysics* **63** :719–725. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.3758/BF03194432>. 23
- Field, A. M. 1901. Further Study of an Ant. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* **53** :521–544. URL <http://www.jstor.org/stable/4062764>. 18
- Fisher, S., Ronald Aylmer. 1930. *The genetical theory of natural selection*. Oxford Clarendon Press. URL <https://www.biodiversitylibrary.org/item/69976>. 4
- Fitzpatrick, M. J., Y. Ben-Shahar, H. M. Smid, L. E. M. Vet, G. E. Robinson, and M. B. Sokolowski. 2005. Candidate genes for behavioural ecology. *Trends in Ecology & Evolution* **20** :96–104. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534704003477>. 122
- Foray, V., E. Desouhant, and P. Gibert. 2014. The impact of thermal fluctuations on reaction norms in specialist and generalist parasitic wasps. *Functional Ecology* **28** :411–423. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/1365-2435.12171>. 64
- Foray, V., H. Henri, S. Martinez, P. Gibert, and E. Desouhant. 2013. Occurrence of arrhenotoky and thelytoky in a parasitic wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera : Ichneumonidae) : Effect of endosymbionts or existence of two distinct reproductive modes? *European Journal of Entomology* **110** :103–107. 128
- Forsman, A., M. Hagman, and D. Pfenning. 2006. Calling is an honest indicator of paternal genetic quality in poison frogs. *Evolution* **60** :2148–2157. URL <http://www.bioone.org.inee.bib.cnrs.fr/doi/full/10.1554/06-258.1>. 6
- Francesiaz, C., D. Farine, C. Laforge, A. Béchet, N. Sadoul, and A. Besnard. 2017. Familiarity drives social philopatry in an obligate colonial breeder with weak interannual breeding-site fidelity. *Animal Behaviour* **124** :125–133. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347216303438>. 16
- Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction : Island populations. *Conservation Biology* **12** :665–675. URL <://000074144500021>. 11
- Frankham, R. 2005. Genetics and extinction. *Biological Conservation* **126** :131–140. URL <://000231663000001>. 11

- Fricke, C., and A. A. Maklakov. 2007. Male age does not affect female fitness in a polyandrous beetle, *Callosobruchus maculatus*. *Animal Behaviour* **74** :541–548. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347207002138>. 70
- Gadau, J., C. U. Gerloff, N. Krüger, H. Chan, P. Schmid-Hempel, A. Wille, and R. E. Page. 2001. A linkage analysis of sex determination in *Bombus terrestris* (L.) (Hymenoptera : Apidae). *Heredity* **87** :234–242. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1046/j.1365-2540.2001.00919.x/abstract>. 31, 34
- Gamboa, G. J. 1988. Sister, aunt-niece, and cousin recognition by social wasps. *Behavior Genetics* **18** :409–423. URL <http://link.springer.com.docelec.univ-lyon1.fr/article/10.1007/BF01065511>. 16
- Gandon, S. 1999. Kin Competition, the Cost of Inbreeding and the Evolution of Dispersal. *Journal of Theoretical Biology* **200** :345–364. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022519399909943>. 9, 68
- Gardner, A., and S. A. West. 2010. Greenbeards. *Evolution* **64** :25–38. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1558-5646.2009.00842.x/abstract>. 21, 45
- Gempe, T., M. Hasselmann, M. Schiøtt, G. Hause, M. Otte, and M. Beye. 2009. Sex Determination in Honeybees : Two Separate Mechanisms Induce and Maintain the Female Pathway. *PLOS Biology* **7** :e1000222. URL <http://journals.plos.org.inee.bib.cnrs.fr/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1000222>. 32
- Geuverink, E., and L. Beukeboom. 2014. Phylogenetic Distribution and Evolutionary Dynamics of the Sex Determination Genes *doublesex* and *transformer* in Insects. *Sexual Development* **8** :38–49. URL <http://www.karger.com?doi=10.1159/000357056>. 32
- Gilad, O., R. R. Swaisgood, M. A. Owen, and X. Zhou. 2016. Giant pandas use odor cues to discriminate kin from nonkin. *Current Zoology* **62** :333–336. URL <https://academic-oup-com.inee.bib.cnrs.fr/cz/article/62/4/333/1745978/Giant-pandas-use-odor-cues-to-discriminate-kin>. 19
- Gilbert, J. D. J., and A. Manica. 2015. The evolution of parental care in insects : A test of current hypotheses. *Evolution* **69** :1255–1270. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/evo.12656/abstract>. 16
- Gloag, R., G. Ding, J. R. Christie, G. Buchmann, M. Beekman, and B. P. Oldroyd. 2016. An invasive social insect overcomes genetic load at the sex locus. *Nature Ecology & Evolution* **1** :s41559–016–0011–016. URL <https://www-nature-com.inee.bib.cnrs.fr/articles/s41559-016-0011>. 31
- Goldstein, D. B. 1994. Deleterious Mutations and the Evolution of Male Haploidy. *The American Naturalist* **144** :176–183. URL <http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/285668>. 129
- Gomez, D., C. Richardson, M. Théry, T. Lengagne, J.-P. Léna, S. Plénet, and P. Joly. 2011a. Multimodal signals in male European treefrog (*Hyla arborea*) and the influence of population isolation on signal expression. *Biological Journal of the Linnean Society* **103** :633–647. URL <https://academic-oup-com.inee.bib.cnrs.fr/biolinnean/article/103/>

- 3/633/2530352/Multimodal-signals-in-male-European-treefrog-Hyla. 17, 23
- Gomez, D., M. Théry, A.-L. Gauthier, and T. Lengagne. 2011b. Costly help of audiovisual bimodality for female mate choice in a nocturnal anuran (*Hyla arborea*). *Behavioral Ecology* **22** :889–898. URL <https://academic-oup-com.inee.bib.cnrs.fr/beheco/article/22/4/889/296355/Costly-help-of-audiovisual-bimodality-for-female>. 17, 23, 93
- Goodisman, M. a. D., J. L. Kovacs, and E. A. Hoffman. 2007. Lack of conflict during queen production in the social wasp *Vespula maculifrons*. *Molecular Ecology* **16** :2589–2595. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1365-294X.2007.03316.x/abstract>. 16
- Greenberg, L. 1988. Kin recognition in the sweat bee, *Lasioglossum zephyrum*. *Behavior Genetics* **18** :425–438. URL <http://link.springer.com.docelec.univ-lyon1.fr/article/10.1007/BF01065512>. 15, 21
- Greenwood, P. J., P. H. Harvey, and C. M. Perrins. 1978. Inbreeding and dispersal in the great tit. *Nature* **271** :52–54. URL <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/nature/journal/v271/n5640/abs/271052a0.html>. 8, 9, 68
- Grether, G. F., 2010. Chapter 2 - The Evolution of Mate Preferences, Sensory Biases, and Indicator Traits. Pages 35–76 *in* H. J. Brockmann, T. J. Roper, M. Naguib, K. E. Wynne-Edwards, J. C. Mitani, and L. W. Simmons, editors. *Advances in the Study of Behavior*, volume 41. Academic Press. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065345410410025>. 5, 22
- Griffin, A. S., and S. A. West. 2003. Kin Discrimination and the Benefit of Helping in Cooperatively Breeding Vertebrates. *Science* **302** :634–636. URL <http://science.sciencemag.org.inee.bib.cnrs.fr/content/302/5645/634>. 16
- Gros, A., T. Hovestadt, and H. J. Poethke. 2008. Evolution of sex-biased dispersal : The role of sex-specific dispersal costs, demographic stochasticity, and inbreeding. *Ecological Modelling* **219** :226–233. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304380008004158>. 9, 68
- Gross, M. R. 2005. The Evolution of Parental Care. *The Quarterly Review of Biology* **80** :37–45. URL <http://www.journals.uchicago.edu.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1086/431023>. 16
- Guichoux, E., L. Lagache, S. Wagner, P. Chaumeil, P. Léger, O. Lepais, C. Lepoittevin, T. Malausa, E. Revardel, F. Salin, and R. Petit. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources* **11** :591–611. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x/abstract>. 63, 64
- Guillot, F. S., R. L. Joiner, and S. B. Vinson. 1974. Host Discrimination : Isolation of Hydrocarbons from Dufour's Gland of a Braconid Parasitoid. *Annals of the Entomological Society of America* **67** :720–721. URL <http://aesa.oxfordjournals.org/content/67/4/720>. 19

- Hadany, L., and M. W. Feldman. 2005. Evolutionary traction : the cost of adaptation and the evolution of sex. *Journal of Evolutionary Biology* **18** :309–314. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1420-9101.2004.00858.x/abstract>. 128
- Haig, D. 1996. Gestational drive and the green-bearded placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93** :6547–6551. URL <http://www.pnas.org/content/93/13/6547>. 22
- Haikola, S., W. Fortelius, R. B. O’Hara, M. Kuussaari, N. Wahlberg, I. J. Saccheri, M. C. Singer, and I. Hanski. 2001. Inbreeding depression and the maintenance of genetic load in *Melitaea cinxia* metapopulations. *Conservation Genetics* **2** :325–335. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1023/A:1012538329691>. 8
- Hale, M. L., T. M. Burg, and T. E. Steeves. 2012. Sampling for Microsatellite-Based Population Genetic Studies : 25 to 30 Individuals per Population Is Enough to Accurately Estimate Allele Frequencies. *PLoS ONE* **7** :e45170. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0045170>. 65
- Hamilton, W. D. 1964*a*. The genetical evolution of social behaviour. I. *Journal of Theoretical Biology* **7** :1–16. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022519364900384>. 11, 13, 14, 16, 21
- Hamilton, W. D. 1964*b*. The genetical evolution of social behaviour. II. *Journal of Theoretical Biology* **7** :17–52. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022519364900396>. 11, 13, 14, 21
- Hamilton, W. D., and M. Zuk. 1982. Heritable true fitness and bright birds : a role for parasites? *Science* **218** :384–387. URL <http://science.sciencemag.org.inee.bib.cnrs.fr/content/218/4570/384>. 6
- Hardouin, L. A., P. Legagneux, Y. Hingrat, and A. Robert. 2015. Sex-specific dispersal responses to inbreeding and kinship. *Animal Behaviour* **105** :1–10. 9, 68
- Harrison, E. G., R. C. Fisher, and K. M. Ross. 1985. The temporal effects of Dufour’s gland secretion in host discrimination by *Nemeritis canescens*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **38** :215–220. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1570-7458.1985.tb03521.x/abstract>. 34, 96
- Hassell, M. 2000. Host-parasitoid population dynamics. *Journal of Animal Ecology* **69** :543–566. 46
- Hasselmann, M., T. Gempe, M. Schjøtt, C. G. Nunes-Silva, M. Otte, and M. Beye. 2008. Evidence for the evolutionary nascence of a novel sex determination pathway in honeybees. *Nature* **454** :519–522. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07052>. 32
- Hasselmann, M., S. Lechner, C. Schulte, and M. Beye. 2010. Origin of a function by tandem gene duplication limits the evolutionary capability of its sister copy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107** :13378–13383. URL <http://www.pnas.org/content/107/30/13378>. 32

- Hauser, L., M. Baird, R. Hilborn, L. W. Seeb, and J. E. Seeb. 2011. An empirical comparison of SNPs and microsatellites for parentage and kinship assignment in a wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population. *Molecular Ecology Resources* **11** :150–161. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2010.02961.x/abstract>. 64
- Hefetz, A., G. Bergström, and J. Tengö. 1986. Species, individual and kin specific blends in Dufour's gland secretions of halictine bees. *Journal of Chemical Ecology* **12** :197–208. URL <http://link.springer.com.docelec.univ-lyon1.fr/article/10.1007/BF01045603>. 19
- Heimpel, G. E., and J. G. de Boer. 2008. Sex Determination in the Hymenoptera. *Annual Review of Entomology* **53** :209–230. URL <http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ento.53.103106.093441>. 32
- Hein, S., H. J. Poethke, and S. Dorn. 2009. What stops the 'diploid male vortex'?—A simulation study for species with single locus complementary sex determination. *Ecological Modelling* **220** :1663–1669. URL <://WOS:000267585300011>. 45
- Helanterä, H., and P. d'Ettorre. 2015. A comparative study of egg recognition signature mixtures in *Formica* ants. *Evolution* **69** :520–529. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/evo.12590/abstract>. 15, 16
- Herfindal, I., H. Haanes, K. H. Roed, E. J. Solberg, S. S. Markussen, M. Heim, and B.-E. Saether. 2014. Population properties affect inbreeding avoidance in moose. *Biology Letters* **10** :20140786–20140786. URL <http://rsbl.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rsbl.2014.0786>. 13, 27, 68
- Hesse, S., T. C. M. Bakker, S. A. Baldauf, and T. Thünken. 2012. Kin recognition by phenotype matching is family- rather than self-referential in juvenile cichlid fish. *Animal Behaviour* **84** :451–457. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347212002412>. 21
- Holloway, A. K., M. R. Strand, W. C. Black, and M. F. Antolin. 2000. Linkage Analysis of Sex Determination in *Bracon* sp. Near *hebetor* (Hymenoptera : Braconidae). *Genetics* **154** :205–212. URL <http://www.genetics.org/content/154/1/205>. 34
- Holman, L., J. S. v. Zweden, T. A. Linksvayer, and P. d'Ettorre. 2013. Crozier's paradox revisited : maintenance of genetic recognition systems by disassortative mating. *BMC Evolutionary Biology* **13** :211. URL <https://bmcevolbiol-biomedcentral-com.inee.bib.cnrs.fr/articles/10.1186/1471-2148-13-211>. 22
- Hovestadt, T., O. Mitesser, and H.-J. Poethke. 2014. Gender-Specific Emigration Decisions Sensitive to Local Male and Female Density. *The American Naturalist* **184** :38–51. URL <http://www.jstor.org/stable/10.1086/676524>. 9
- Howard, R. W., and J. E. Baker. 2003. Morphology and chemistry of Dufour glands in four ectoparasitoids : *Cephalonomia tarsalis*, *C. waterstoni* (Hymenoptera : Bethyilidae), *Anisopteromalus calandrae*, and *Pteromalus cerealellae* (Hymenoptera : Pteromalidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B : Biochemistry and Molecular Biology* **135** :153–167. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096495903000769>. 19

- Howard, R. W., and G. J. Blomquist. 2005. Ecological, Behavioral, and Biochemical Aspects of Insect Hydrocarbons. *Annual Review of Entomology* **50** :371–393. URL <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130359>. 18, 19, 20
- Hubbard, S. F., G. Marris, A. Reynolds, and G. W. Rowe. 1987. Adaptive Patterns in the Avoidance of Superparasitism by Solitary Parasitic Wasps. *The Journal of Animal Ecology* **56** :387. URL <http://www.jstor.org/stable/5055?origin=crossref>. 16, 19, 35, 94, 96, 121
- Hunt, G. J., G. V. Amdam, D. Schlipalius, C. Emore, N. Sardesai, C. E. Williams, O. Rueppell, E. Guzmán-Novoa, M. Arechavaleta-Velasco, S. Chandra, M. K. Fondrk, M. Beye, and R. E. Page. 2006. Behavioral genomics of honeybee foraging and nest defense. *Naturwissenschaften* **94** :247–267. URL <http://link.springer.com.gate1.inist.fr/article/10.1007/s00114-006-0183-1>. 122
- Hurst, J. L. 2009. Female recognition and assessment of males through scent. *Behavioural Brain Research* **200** :295–303. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016643280800716X>. 19
- Husband, B. C., and D. W. Schemske. 1996. Evolution of the Magnitude and Timing of Inbreeding Depression in Plants. *Evolution* **50** :54–70. URL <http://www.jstor.org/stable/2410780>. 8
- Immonen, E., M. Collet, J. Goenaga, and G. Arnqvist. 2016. Direct and indirect genetic effects of sex-specific mitonuclear epistasis on reproductive ageing. *Heredit* **116** :338–347. URL <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/hdy/journal/v116/n3/full/hdy2015112a.html>. 133
- Immonen, E., and M. G. Ritchie. 2012. The genomic response to courtship song stimulation in female *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences* **279** :1359–1365. URL <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/279/1732/1359>. 24, 123, 125, 127
- Jacob, G., A.-C. Prevot, and E. Baudry. 2016. Feral Pigeons (*Columba livia*) Prefer Genetically Similar Mates despite Inbreeding Depression. *Plos One* **11** :e0162451. 8
- Jaenike, J. 1978. An hypothesis to account for the maintenance of sex within populations. *Evolutionary theory* **3** :191–194. 130
- Johansson, B. G., and T. M. Jones. 2007. The role of chemical communication in mate choice. *Biological Reviews* **82** :265–289. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1469-185X.2007.00009.x/abstract>. 18
- Kaminski, G., S. Dridi, C. Graff, and E. Gentaz. 2009. Human ability to detect kinship in strangers' faces : effects of the degree of relatedness. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences* **276** :3193–3200. URL <http://rspb.royalsocietypublishing.org.inee.bib.cnrs.fr/content/276/1670/3193>. 17
- Kather, R., F. P. Drijfhout, and S. J. Martin. 2011. Task Group Differences in Cuticular Lipids in the Honey Bee *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology* **37** :205–212. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s10886-011-9909-4>. 19

- Keller, L., and K. G. Ross. 1998. Selfish genes : a green beard in the red fire ant. *Nature* **394** :573–575. URL <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/nature/journal/v394/n6693/abs/394573a0.html>. 21
- Keller, L. F., and D. M. Waller. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution* **17** :230–241. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534702024898>. 8, 11
- Kelly, J. K. 2005. Family level inbreeding depression and the evolution of plant mating systems. *New Phytologist* **165** :55–62. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1469-8137.2004.01184.x/abstract>. 8
- Kocher, S. D., and C. M. Grozinger. 2011. Cooperation, Conflict, and the Evolution of Queen Pheromones. *Journal of Chemical Ecology* **37** :1263–1275. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s10886-011-0036-z>. 96
- Kokko, H. 2001. Fisherian and “good genes” benefits of mate choice : how (not) to distinguish between them. *Ecology Letters* **4** :322–326. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1046/j.1461-0248.2001.00224.x/abstract>. 5
- Kokko, H., M. D. Jennions, and R. Brooks. 2006. Unifying and Testing Models of Sexual Selection. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **37** :43–66. URL <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110259>. 4, 6
- Kokko, H., and I. Ots. 2006. When Not to Avoid Inbreeding. *Evolution* **60** :467–475. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01128.x/abstract>. 11, 13, 68, 70
- Kokko, H., and D. J. Rankin. 2006. Lonely hearts or sex in the city ? Density-dependent effects in mating systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences* **361** :319–334. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1569612/>. 13, 68, 129
- Kramer, J., and J. Meunier. 2016. Kin and multilevel selection in social evolution : a never-ending controversy ? *F1000Research* **5** :776. URL <http://f1000research.com/articles/5-776/v1>. 14
- Kristensen, T. N., K. S. Pedersen, C. J. Vermeulen, and V. Loeschcke. 2010. Research on inbreeding in the ‘omic’ era. *Trends in Ecology & Evolution* **25** :44–52. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534709002274>. 122, 123
- Kuijper, B., and I. Pen. 2010. The evolution of haplodiploidy by male-killing endosymbionts : importance of population structure and endosymbiont mutualisms. *Journal of Evolutionary Biology* **23** :40–52. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1420-9101.2009.01854.x/abstract>. 129
- Kukuk, P. F., and B. May. 1990. Diploid Males in a Primitively Eusocial Bee, *Lasiglossum (Dialictus) zephyrum* (Hymenoptera : Halictidae). *Evolution* **44** :1522. URL <http://www.jstor.org/stable/2409334?origin=crossref>. 63
- Lagisz, M., K. Wolff, R. A. Sanderson, and R. Laskowski. 2010. Genetic Population Structure of the Ground Beetle, *Pterostichus oblongopunctatus*, Inhabiting a

- Fragmented and Polluted Landscape : Evidence for Sex-Biased Dispersal. *Journal of Insect Science* **10**. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3016886/>. 9
- Laloi, D., C. Eizaguirre, P. Fédérici, and M. Massot. 2011. Female choice for heterozygous mates changes along successive matings in a lizard. *Behavioural Processes* **88** :149–154. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376635711001641>. 26, 93
- Lardy, S., A. Cohas, I. Figueroa, and D. Allaine. 2011. Mate change in a socially monogamous mammal : evidences support the "forced divorce" hypothesis. *Behavioral Ecology* **22** :120–125. URL <http://www.beheco.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/beheco/arq168>. 9, 68
- Lehtonen, J., M. D. Jennions, and H. Kokko. 2012. The many costs of sex. *Trends in Ecology & Evolution* **27** :172–178. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534711002916>. 128
- Leigh Jr, E. G. 2010. The group selection controversy. *Journal of Evolutionary Biology* **23** :6–19. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1420-9101.2009.01876.x/abstract>. 14
- Leonhardt, S. D., C. Rasmussen, and T. Schmitt. 2013. Genes versus environment : geography and phylogenetic relationships shape the chemical profiles of stingless bees on a global scale. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* **280** :20130680. 24
- Liang, D., and J. Silverman. 2000. "You are what you eat" : Diet modifies cuticular hydrocarbons and nestmate recognition in the Argentine ant, *Linepithema humile*. *Naturwissenschaften* **87** :412–416. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s001140050752>. 19
- Lihoreau, M., C. Rivault, V. Zweden, and J. S. 2016. Kin discrimination increases with odor distance in the German cockroach. *Behavioral Ecology* **27** :1694–1701. URL <https://academic.oup.com/beheco/article/27/6/1694/2453476/Kin-discrimination-increases-with-odor-distance-in>. 19
- Lively, C. M. 2010. Parasite virulence, host life history, and the costs and benefits of sex. *Ecology* **91** :3–6. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1890/09-1158.1/abstract>. 128
- Lively, C. M., and D. G. Lloyd. 1990. The Cost of Biparental Sex Under Individual Selection. *The American Naturalist* **135** :489–500. URL <http://www.journals.uchicago.edu.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1086/285058>. 128
- Lukas, D., and T. H. Clutton-Brock. 2011. Group structure, kinship, inbreeding risk and habitual female dispersal in plural-breeding mammals. *Journal of Evolutionary Biology* **24** :2624–2630. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1420-9101.2011.02385.x/abstract>. 12
- Lumley, A. J., u. Michalczyk, J. J. N. Kitson, L. G. Spurgin, C. A. Morrison, J. L. Godwin, M. E. Dickinson, O. Y. Martin, B. C. Emerson, T. Chapman, and M. J. G. Gage. 2015. Sexual selection protects against extinction. *Nature* **522** :470–473. URL <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/nature/journal/v522/n7557/full/nature14419.html>. 7, 8, 129

- Manna, T. J., and M. E. Hauber. 2016. Recognition, speciation, and conservation : recent progress in brood parasitism research among social insects. *Current Opinion in Behavioral Sciences* **12** :1–5. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352154616301383>. 16
- Marris, G. C., and J. Casperd. 1996. The relationship between conspecific superparasitism and the outcome of in vitro contests staged between different larval instars of the solitary endoparasitoid *Venturia canescens*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **39** :61–69. URL <http://link.springer.com.gate1.inist.fr/article/10.1007/s002650050267>. 30, 94
- Marris, G. C., S. F. Hubbard, and C. Scrimgeour. 1996. The perception of genetic similarity by the solitary parthenogenetic parasitoid *Venturia canescens*, and its effects on the occurrence of superparasitism. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **78** :167–174. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1570-7458.1996.tb00778.x/abstract>. 34, 94, 121
- Martin, S. J., E. Vitikainen, F. P. Drijfhout, and D. Jackson. 2012. Conspecific Ant Aggression is Correlated with Chemical Distance, but not with Genetic or Spatial Distance. *Behavior Genetics* **42** :323–331. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s10519-011-9503-0>. 24
- Martin, S. J., E. Vitikainen, S. Shemilt, F. P. Drijfhout, and L. Sundström. 2013. Sources of Variation in Cuticular Hydrocarbons in the Ant *Formica exsecta*. *Journal of Chemical Ecology* **39** :1415–1423. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s10886-013-0366-0>. 19
- Martinez, J., F. Fleury, and J. Varaldi. 2012. Heritable variation in an extended phenotype : the case of a parasitoid manipulated by a virus. *Journal of Evolutionary Biology* **25** :54–65. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1420-9101.2011.02405.x/abstract>. 96
- Mateo, J. M. 2004. Recognition systems and biological organization : The perception component of social recognition. *Annales Zoologici Fennici* **41** :729–745. URL <http://www.jstor.org/stable/23736140>. 15, 19
- Mateo, J. M. 2010. Self-referent phenotype matching and long-term maintenance of kin recognition. *Animal Behaviour* **80** :929–935. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347210003349>. 21
- Mateo Leach, I., S. Ferber, L. van de Zande, and L. W. Beukeboom. 2012. Genetic variability of arrhenotokous and thelytokous *Venturiacanescens* (Hymenoptera). *Genetica* **140** :53–63. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3386485/>. 31, 34, 47, 63, 129
- Maynard Smith, J. 1978. *The Evolution of Sex*. CUP Archive. 128
- Metzger, M., C. Bernstein, T. S. Hoffmeister, and E. Desouhant. 2010a. Does Kin Recognition and Sib-Mating Avoidance Limit the Risk of Genetic Incompatibility in a Parasitic Wasp? *PLoS ONE* **5** :e13505. URL <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0013505>. 19, 21, 34, 35, 38, 39, 65, 70, 93, 96, 120, 121, 128
- Metzger, M., D. Fischbein, A. Auguste, X. Fauvergue, C. Bernstein, and E. Desouhant. 2010b. Synergy in information use for mate finding : demonstration in a parasitoid

- wasp. *Animal Behaviour* **79** :1307–1315. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000334721000093X>. 34, 35, 38, 131
- Mikheyev, A. S., and T. A. Linksvayer. 2015. Genes associated with ant social behavior show distinct transcriptional and evolutionary patterns. *eLife* **4** :e04775. URL <http://elifesciences.org/content/4/e04775v2>. 122
- Miller, C. W., and E. I. Svensson. 2014. Sexual Selection in Complex Environments. *Annual Review of Entomology* **59** :427–445. URL <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-ento-011613-162044>. 26, 129
- Mitra, A., and R. Gadagkar. 2014. The Dufour’s gland and the cuticle in the social wasp *Ropalidia marginata* contain the same hydrocarbons in similar proportions. *Journal of Insect Science* **14** :9. URL <http://jinsectscience.oxfordjournals.org.gate1.inist.fr/content/14/1/9>. 115, 132
- Moore, A. J., and P. J. Moore. 1988. Female Strategy During Mate Choice : Threshold Assessment. *Evolution* **42** :387–391. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1558-5646.1988.tb04141.x/abstract>. 25
- Moore, H., K. Dvoráková, N. Jenkins, and W. Breed. 2002. Exceptional sperm cooperation in the wood mouse. *Nature* **418** :nature00832. URL <https://www-nature-com.inee.bib.cnrs.fr/articles/nature00832>. 22
- Moradigaravand, D., and J. Engelstädter. 2013. The Evolution of Natural Competence : Disentangling Costs and Benefits of Sex in Bacteria. *The American Naturalist* **182** :E112–E126. URL <http://www.journals.uchicago.edu.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1086/671909>. 128
- Morin, P. A., G. Luikart, R. K. Wayne, and others. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* **19** :208–216. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534704000205>. 64
- Mudd, A., and S. A. Corbet. 1982. Response of the ichneumonid parasite *Nemeritis canescens* to Kairomones from the flour moth, *Ephestia kuehniella*. *Journal of Chemical Ecology* **8** :843–850. URL <http://link.springer.com.gate1.inist.fr/article/10.1007/BF00994784>. 30
- Mudd, A., R. C. Fisher, and M. C. Smith. 1982. Volatile hydrocarbons in the dufour’s gland of the parasite *Nemeritis canescens* (Grav.) (Hymenoptera; ichneumonidae). *Journal of Chemical Ecology* **8** :1035–1042. URL <http://link.springer.com.acces.bibliotheque-diderot.fr/article/10.1007/BF00987884>. 19, 96
- Murphy, C. G., and H. C. Gerhardt. 2002. Mate sampling by female barking treefrogs (*Hyla gratiosa*). *Behavioral Ecology* **13** :472–480. URL <https://academic.oup.com/beheco/article/13/4/472/207748>. 25
- Murray, T. J., T. M. Withers, and S. Mansfield. 2010. Choice versus no-choice test interpretation and the role of biology and behavior in parasitoid host specificity tests. *Biological Control* **52** :153–159. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S104996440900259X>. 93
- Nichols, H. J., M. A. Cant, and J. L. Sanderson. 2015. Adjustment of costly extra-group paternity according to inbreeding risk in a cooperative mammal. *Behavioral Ecology* **26** :1486–1494. URL <https://academic-oup-com.inee.bib.cnrs.fr/beheco/>

[article/26/6/1486/205025/Adjustment-of-costly-extra-group-paternity.](#)
93

- Niehuis, O., J. Büllesbach, A. K. Judson, T. Schmitt, and J. Gadau. 2011. Genetics of cuticular hydrocarbon differences between males of the parasitoid wasps *Nasonia giraulti* and *Nasonia vitripennis*. *Heredity* **107** :61–70. URL <http://www.nature.com/gate1.inist.fr/hdy/journal/v107/n1/full/hdy2010157a.html>. 24
- Niehuis, O., J. Buellesbach, J. D. Gibson, D. Pothmann, C. Hanner, N. S. Mutti, A. K. Judson, J. Gadau, J. Ruther, and T. Schmitt. 2013. Behavioural and genetic analyses of *Nasonia* shed light on the evolution of sex pheromones. *Nature* **494** :nature11838. URL <https://www-nature-com.inee.bib.cnrs.fr/articles/nature11838>. 132
- Nissen, I., M. Müller, and M. Beye. 2012. The *Am-tra2* Gene Is an Essential Regulator of Female Splice Regulation at Two Levels of the Sex Determination Hierarchy of the Honeybee. *Genetics* **192** :1015–1026. URL <http://www.genetics.org/content/192/3/1015>. 32
- Ode, P. J., M. F. Antolin, and M. R. Strand. 1995. Brood-mate avoidance in the parasitic wasp *Bracon hebetor* Say. *Animal Behaviour* **49** :1239–1248. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000334728570156X>. 19, 20, 27, 127
- Olofsson, H., and P. Lundberg. 2007. The twofold cost of sex unfolded. *Evolutionary Ecology Research* **9** :1119–1129. URL <http://evolutionary-ecology.com/abstracts/v09/2220.html>. 128
- Olson, L. E., D. T. Blumstein, J. R. Pollinger, and R. K. Wayne. 2012. No evidence of inbreeding avoidance despite demonstrated survival costs in a polygynous rodent : NO INBREEDING AVOIDANCE IN A POLYGYNOUS RODENT. *Molecular Ecology* **21** :562–571. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.2011.05389.x>. 8, 68
- O’Riain, M. J., N. C. Bennett, P. N. M. Brotherton, G. McIlrath, and T. H. Clutton-Brock. 2000. Reproductive suppression and inbreeding avoidance in wild populations of co-operatively breeding meerkats (*Suricata suricatta*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **48** :471–477. URL <http://link.springer.com/gate1.inist.fr/article/10.1007/s002650000249>. 12, 25, 68
- Otto, S. P. 2001. Eliminating the cost of sex with sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* **16** :602. URL [http://www.cell.com/trends/ecology-evolution/abstract/S0169-5347\(01\)02324-2](http://www.cell.com/trends/ecology-evolution/abstract/S0169-5347(01)02324-2). 128
- Partan, S. R. 2013. Ten unanswered questions in multimodal communication. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **67** :1523–1539. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s00265-013-1565-y>. 23
- Pelosse, P., C. Bernstein, and E. Desouhant. 2007. Differential energy allocation as an adaptation to different habitats in the parasitic wasp *Venturia canescens*. *Evolutionary Ecology* **21** :669–685. URL <://000248941500008>. 34, 129
- Peters, R. S., L. Krogmann, C. Mayer, A. Donath, S. Gunkel, K. Meusemann, A. Kozlov, L. Podsiadlowski, M. Petersen, R. Lanfear, P. A. Diez, J. Heraty, K. M. Kjer, S. Klopstein, R. Meier, C. Polidori, T. Schmitt, S. Liu, X. Zhou, T. Wappler, J. Rust,

- B. Misof, and O. Niehuis. 2017. Evolutionary History of the Hymenoptera. *Current Biology* **27** :1013–1018. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982217300593>. 115
- Pfefferle, D., A. J. N. Kazem, R. R. Brockhausen, A. V. Ruiz-Lambides, and A. Widdig. 2014. Monkeys Spontaneously Discriminate Their Unfamiliar Paternal Kin under Natural Conditions Using Facial Cues. *Current Biology* **24** :1806–1810. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096098221400774X>. 17
- Pichon, A., A. Bézier, S. Urbach, J.-M. Aury, V. Jouan, M. Ravallec, J. Guy, F. Cousserans, J. Thézé, J. Gauthier, E. Demettre, S. Schmieder, F. Wurmser, V. Sibut, M. Poirié, D. Colinet, C. d. Silva, A. Couloux, V. Barbe, J.-M. Drezen, and A.-N. Volkoff. 2015. Recurrent DNA virus domestication leading to different parasite virulence strategies. *Science Advances* **1** :e1501150. URL <http://advances.sciencemag.org/content/1/10/e1501150>. 31, XVII
- Poláček, M., M. Bartíková, and H. Hoi. 2017. Intraclutch eggshell colour variation in birds : are females able to identify their eggs individually? *PeerJ* **5** :e3707. URL <https://peerj.com/articles/3707>. 16
- Polerstock, A. R., S. D. Eigenbrode, and M. J. Klowden. 2002. Mating Alters the Cuticular Hydrocarbons of Female *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **39** :545–552. URL <http://www.bioone.org/inee.bib.cnrs.fr/doi/full/10.1603/0022-2585-39.3.545>. 19, 131
- Price, G. R. 1970. Selection and Covariance. *Nature* **227** :520–521. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/227520a0>.
- Pusey, A., and M. Wolf. 1996. Inbreeding avoidance in animals. *Trends in Ecology & Evolution* **11** :201–206. 8, 68
- Putman, A. I., and I. Carbone. 2014. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecology and Evolution* **4** :4399–4428. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/gate1.inist.fr/doi/10.1002/ece3.1305/abstract>. 64
- Puurtinen, M. 2011. Mate Choice for Optimal (k)inbreeding. *Evolution* **65** :1501–1505. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1558-5646.2010.01217.x/abstract>. 11, 13, 16, 68
- Queller, D. C., E. Ponte, S. Bozzaro, and J. E. Strassmann. 2003. Single-Gene Green-beard Effects in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Science* **299** :105–106. URL <http://science.sciencemag.org/inee.bib.cnrs.fr/content/299/5603/105>. 22
- Rachlin, H. 2017. Group selection in behavioral evolution. *Behavioural Processes* URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376635717302784>. 14
- Ratnieks, F. L. W., K. R. Foster, and T. Wenseleers. 2006. Conflict Resolution in Insect Societies. *Annual Review of Entomology* **51** :581–608. URL <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151003>. 15, 16

- Reineke, A., H. L. S. Roberts, and O. Schmidt. 2004. Two coexisting lines of the endoparasitoid *Venturia canescens* show differences in reproductive success under conspecific superparasitism. *Journal of Insect Physiology* **50** :167–173. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022191003002452>. 34
- Reynolds, S. M., J. A. C. Uy, G. L. Patricelli, S. W. Coleman, M. J. Braun, and G. Borgià. 2014. Tests of the kin selection model of mate choice and inbreeding avoidance in satin bowerbirds. *Behavioral Ecology* **25** :1005–1014. URL <http://beheco.oxfordjournals.org.gate1.inist.fr/content/25/4/1005>. 9, 26
- Robert, A., A. Peppuy, E. Sémon, F. D. Boyer, M. J. Lacey, and C. Bordereau. 2004. A new C12 alcohol identified as a sex pheromone and a trail-following pheromone in termites : the diene (Z,Z)-dodeca-3,6-dien-1-ol. *Naturwissenschaften* **91** :34–39. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s00114-003-0481-9>. 96
- Roberts, H. L. S., O. Trüe, and O. Schmidt. 2004. The development of the endoparasitoid wasp *Venturia canescens* in superparasitised *Epehstia kuehniella*. *Journal of Insect Physiology* **50** :839–846. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002219100400112X>. 34
- Robinson, G. E., R. D. Fernald, and D. F. Clayton. 2008. Genes and Social Behavior. *Science* **322** :896–900. URL <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1159277>. 24
- Robinson, M. D., D. J. McCarthy, and G. K. Smyth. 2010. edgeR : a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)* **26** :139–140. XVII
- Robinson, S. P., W. J. Kennington, and L. W. Simmons. 2012. Assortative mating for relatedness in a large naturally occurring population of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology* **25** :716–725. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1420-9101.2012.02466.x/abstract>. 11, 27, 68
- Roff, D. A. 2015. The evolution of mate choice : a dialogue between theory and experiment. *Annals of the New York Academy of Sciences* pages n/a–n/a. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/nyas.12743/abstract>. 26
- Rogers, D. 1972. The Ichneumon Wasp *Venturia Canescens* : Oviposition and Avoidance of Superparasitism. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **15** :190–194. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1570-7458.1972.tb00195.x/abstract>. 30, 31
- Roldán, M., and M. Soler. 2011. Parental-care parasitism : how do unrelated offspring attain acceptance by foster parents? *Behavioral Ecology* **22** :679–691. URL <https://academic-oup-com.inee.bib.cnrs.fr/beheco/article/22/4/679/296943/Parental-care-parasitism-how-do-unrelated>. 16
- Rosenthal, G. G., and C. S. Evans. 1998. Female preference for swords in *Xiphophorus helleri* reflects a bias for large apparent size. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95** :4431–4436. URL <http://www.pnas.org/content/95/8/4431>. 6

- Ross, K. G., E. L. Vargo, L. Keller, and J. C. Trager. 1993. Effect of a Founder Event on Variation in the Genetic Sex-Determining System of the Fire Ant *Solenopsis invicta*. *Genetics* **135** :843–854. URL <://A1993MD63600019>. 45
- Rousset, F., and D. Roze. 2007. Constraints on the Origin and Maintenance of Genetic Kin Recognition. *Evolution* **61** :2320–2330. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1558-5646.2007.00191.x/abstract>. 22
- Roze, D., and F. Rousset. 2005. Inbreeding Depression and the Evolution of Dispersal Rates : A Multilocus Model. *The American Naturalist* **166** :708–721. URL <http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/497543>. 9
- Rubi, T. L., and D. W. Stephens. 2016. Does multimodality per se improve receiver performance? An explicit comparison of multimodal versus unimodal complex signals in a learned signal following task. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **70** :409–416. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s00265-016-2061-y>. 23
- Ruf, D., S. Dorn, and D. Mazzi. 2011. Females leave home for sex : natal dispersal in a parasitoid with complementary sex determination. *Animal Behaviour* **81** :1083–1089. URL <://WOS:000289214300025>. 9
- Ruf, D., S. Dorn, and D. Mazzi. 2013. Unexpectedly low frequencies of diploid males in an inbreeding parasitoid with complementary sex determination. *Biological Journal of the Linnean Society* **108** :79–86. URL <://WOS:000312543100007>. 44
- Salt, G. 1976. The hosts of *Nemeritis canescens* : a problem in the host specificity of insect parasitoids. *Ecological Entomology* **1** :63–67. 30
- Santure, A. W., J. Stapley, A. D. Ball, T. R. Birkhead, T. Burke, and J. Slate. 2010. On the use of large marker panels to estimate inbreeding and relatedness : empirical and simulation studies of a pedigreed zebra finch population typed at 771 SNPs. *Molecular Ecology* **19** :1439–1451. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.2010.04554.x/abstract>. 64
- Schiestl, F. P., and M. Ayasse. 2000. Post-mating odor in females of the solitary bee, *Andrena nigroaenea* (Apoidea, Andrenidae), inhibits male mating behavior. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **48** :303–307. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s002650000241>. 131
- Schmid-Hempel, P., R. Schmid-Hempel, P. C. Brunner, O. D. Seeman, and G. R. Allen. 2007. Invasion success of the bumblebee, *Bombus terrestris*, despite a drastic genetic bottleneck. *Heredity* **99** :414–422. URL <http://www.nature.com/doi/10.1038/sj.hdy.6801017>. 45
- Schmieder, S., D. Colinet, and M. Poirié. 2012. Tracing back the nascence of a new sex-determination pathway to the ancestor of bees and ants. *Nature Communications* **3** :895. URL <http://www.nature.com/gate1.inist.fr/ncomms/journal/v3/n6/abs/ncomms1898.html>. 34
- Schneider, M. V., L. W. Beukeboom, G. Driessen, L. Lapchin, C. Bernstein, and J. J. M. Van Alphen. 2002. Geographical distribution and genetic relatedness of sympatrical thelytokous and arrhenotokous populations of the parasitoid

- Venturia canescens (Hymenoptera). *Journal of Evolutionary Biology* **15** :191–200. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1420-9101.2002.00394.x/abstract>. 31, 32, 129
- Schneider, M. V., G. Driessen, L. W. Beukeboom, R. Boll, K. van Eunen, A. Selzner, J. Talsma, and L. Lapchin. 2003. Gene flow between arrhenotokous and thelytokous populations of *Venturia canescens* (Hymenoptera). *Heredity* **90** :260–267. URL <http://www.nature.com.gate1.inist.fr/hdy/journal/v90/n3/full/6800245a.html>. 34
- Scott, D., R. C. Richmond, and D. A. Carlson. 1988. Pheromones exchanged during mating : a mechanism for mate assessment in *Drosophila*. *Animal Behaviour* **36** :1164–1173. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347288800757>. 131
- Setchell, J. M., M. J. E. Charpentier, K. M. Abbott, E. J. Wickings, and L. A. Knapp. 2010. Opposites attract : MHC-associated mate choice in a polygynous primate. *Journal of Evolutionary Biology* **23** :136–148. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1420-9101.2009.01880.x/abstract>. 7
- Sinervo, B., and J. Clobert. 2003. Morphs, Dispersal Behavior, Genetic Similarity, and the Evolution of Cooperation. *Science* **300** :1949–1951. URL <http://science.sciencemag.org.inee.bib.cnrs.fr/content/300/5627/1949>. 22
- Siracusa, E., S. Boutin, M. M. Humphries, J. C. Gorrell, D. W. Coltman, B. Dantzer, J. E. Lane, and A. G. McAdam. 2017. Familiarity with neighbours affects intrusion risk in territorial red squirrels. *Animal Behaviour* **133** :11–20. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003347217302828>. 20
- Smadja, C., and R. K. Butlin. 2008. On the scent of speciation : the chemosensory system and its role in premating isolation. *Heredity* **102** :hdy200855. URL <https://www-nature-com.inee.bib.cnrs.fr/articles/hdy200855>. 132
- Smith, B. H., and M. Ayasse. 1987. Kin-based male mating preferences in two species of halictine bee. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **20** :313–318. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/BF00300676>. 21
- Smukalla, S., M. Caldara, N. Pochet, A. Beauvais, S. Guadagnini, C. Yan, M. D. Vences, A. Jansen, M. C. Prevost, J.-P. Latgé, G. R. Fink, K. R. Foster, and K. J. Verstrepen. 2008. FLO1 Is a Variable Green Beard Gene that Drives Biofilm-like Cooperation in Budding Yeast. *Cell* **135** :726–737. URL <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867408011938>. 22
- Steiger, S., T. Schmitt, and H. M. Schaefer. 2010. The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences* page rspb20102285. URL <http://rspb.royalsocietypublishing.org.inee.bib.cnrs.fr/content/early/2010/12/17/rspb.2010.2285>. 131
- Stephan, J. G., J. A. Stenberg, and C. Björkman. 2015. How far away is the next basket of eggs? Spatial memory and perceived cues shape aggregation patterns in a leaf beetle. *Ecology* **96** :908–914. URL <http://doi.wiley.com/10.1890/14-1143.1>. 9, 16

- Stoeger, A. S., and A. Baotic. 2017. Male African elephants discriminate and prefer vocalizations of unfamiliar females. *Scientific Reports* **7** :srep46414. URL <https://www-nature-com.inee.bib.cnrs.fr/articles/srep46414>. 18
- Stoffer, B., and G. W. Uetz. 2016. Tuft size matters : the effects of adult visual social experience on female mate preferences in a wolf spider. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **70** :2211–2221. URL <https://link-springer-com.inee.bib.cnrs.fr/article/10.1007/s00265-016-2225-9>. 26, 93
- Summers, K., and B. Crespi. 2005. Cadherins in maternal–foetal interactions : red queen with a green beard ? *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences* **272** :643–649. URL <http://rspb.royalsocietypublishing.org.inee.bib.cnrs.fr/content/272/1563/643>. 22
- Symonds, M. R. E., and M. A. Elgar. 2008. The evolution of pheromone diversity. *Trends in Ecology & Evolution* **23** :220–228. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534708000542>. 131
- Szulkin, M., and B. C. Sheldon. 2008. Dispersal as a means of inbreeding avoidance in a wild bird population. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences* **275** :703–711. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2596843/>. 8
- Szulkin, M., K. V. Stopher, J. M. Pemberton, and J. M. Reid. 2013. Inbreeding avoidance, tolerance, or preference in animals? *Trends in Ecology & Evolution* **28** :205–211. URL <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169534712002893>. 8, 11, 13, 27, 68, 120
- Szulkin, M., P. Zelazowski, G. Nicholson, and B. C. Sheldon. 2009. Inbreeding avoidance under different null models of random mating in the great tit. *Journal of Animal Ecology* **78** :778–788. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/j.1365-2656.2009.01544.x/abstract>. 11, 13, 68
- Tarazona, S., F. García, A. Ferrer, J. Dopazo, and A. Conesa. 2012. NOIseq : a RNA-seq differential expression method robust for sequencing depth biases. *EMBnet.journal* **17** :pp. 18–19. URL <http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/265>. XVII
- Thünken, T., T. C. M. Bakker, S. A. Baldauf, and H. Kullmann. 2007. Active Inbreeding in a Cichlid Fish and Its Adaptive Significance. *Current Biology* **17** :225–229. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982206025711>. 11, 68
- Thomson, R. C., I. J. Wang, and J. R. Johnson. 2010. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology* **19** :2184–2195. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1365-294X.2010.04650.x/abstract>. 63
- Tibbetts, E. A. 2002. Visual signals of individual identity in the wasp *Polistes fuscatus*. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences* **269** :1423–1428. URL <http://rspb.royalsocietypublishing.org.inee.bib.cnrs.fr/content/269/1499/1423>. 18

- Tibbetts, E. A., and J. Dale. 2007. Individual recognition : it is good to be different. *Trends in Ecology & Evolution* **22** :529–537. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534707002376>. 17
- Tomkins, J. L., J. Radwan, J. S. Kotiaho, and T. Tregenza. 2004. Genic capture and resolving the lek paradox. *Trends in Ecology & Evolution* **19** :323–328. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169534704000849>. 128
- Trapnell, C., L. Pachter, and S. L. Salzberg. 2009. TopHat : discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25** :1105–1111. URL <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/25/9/1105/203994/TopHat-discovering-splice-junctions-with-RNA-Seq>. XVII
- Tregenza, T., and N. Wedell. 2000. Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage : invited review. *Molecular Ecology* **9** :1013–1027. 6, 7, 68
- Tregenza, T., and N. Wedell. 2002. Polyandrous females avoid costs of inbreeding. *Nature* **415** :71–73. URL <http://www.nature.com.inee.bib.cnrs.fr/nature/journal/v415/n6867/full/415071a.html>. 9, 10
- Tsuchida, K., K. Kudô, and N. Ishiguro. 2014. Genetic structure of an introduced paper wasp, *Polistes chinensis antennalis* (Hymenoptera, Vespidae) in New Zealand. *Molecular Ecology* **23** :4018–4034. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.gate1.inist.fr/doi/10.1111/mec.12852/abstract>. 45, 63
- van Santen, S. M., M.C.P. 2002. Courtship description in the solitary parasitoid wasp *Venturia canescens* (Hymenoptera). *Proceedings of Experimental and Applied Entomology* **13** :87–92. 34
- van Wilgenburg, E., G. Driessen, and L. W. Beukeboom. 2006. Single locus complementary sex determination in Hymenoptera : an "unintelligent" design ? *Frontiers in Zoology* **3** :1. URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1360072/>. 32, 45
- van Zweden, J. S. 2010. Nestmate recognition in social insects and the role of hydrocarbons. *Insect Hydrocarbons* pages 222–243. 15
- van Zweden, J. S., E. Vitikainen, P. d'Ettoire, and L. Sundström. 2011. Do cuticular hydrocarbons provide sufficient information for optimal sex allocation in the ant *Formica exsecta* ? *Journal of Chemical Ecology* **37** :1365–1373. 18
- Vayssade, C., 2014. Interaction entre démographie et génétique dans les petites populations : études sur un Hyménoptère parasitoïde avec incompatibilités génétiques. Ph.D. thesis. URL <http://www.theses.fr/17697640X>. 48
- Vayssade, C., C. de Fazio, B. Quaglietti, A. Auguste, N. Ris, and X. Fauvergue. 2014. Inbreeding Depression in a Parasitoid Wasp with Single-Locus Complementary Sex Determination. *PLoS ONE* **9** :e97733. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0097733>. 94, 120, 128
- Wang, C., and X. Lu. 2011. Female ground tits prefer relatives as extra-pair partners : driven by kin-selection ? : EXTRA-PAIR MATING WITH RELATIVES IN A BIRD. *Molecular Ecology* **20** :2851–2863. URL <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-294X.2011.05070.x>. 93

- Waser, P. M., S. N. Austad, and B. Keane. 1986. When Should Animals Tolerate Inbreeding? *The American Naturalist* **128** :529–537. URL <http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/284585>. 13, 68
- Weis, J. J., P. J. Ode, and G. E. Heimpel. 2017. Balancing selection maintains sex determining alleles in multiple-locus complementary sex determination. *Evolution* **71** :1246–1257. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/evo.13204/abstract>. 46
- Welch, R. B., and D. H. Warren. 1980. Immediate perceptual response to intersensory discrepancy. *Psychological Bulletin* **88** :638–667. URL <https://insights.ovid.com/psychological-bulletin/plbul/1980/11/000/immediate-perceptual-response-intersensory/7/00006823>. 23
- Wenseleers, T. 2007. Nepotism absent in insect societies — or is it? *Molecular Ecology* **16** :3063–3065. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-294X.2007.03313.x/abstract>. 16
- Wenseleers, T., and F. Ratnieks. 2006. Comparative Analysis of Worker Reproduction and Policing in Eusocial Hymenoptera Supports Relatedness Theory. *The American Naturalist* **168** :E163–E179. URL <http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/508619>. 16
- Whitfield, J. B. 1998. Phylogeny and evolution of host-parasitoid interactions in hymenoptera. *Annual Review of Entomology* **43** :129–151. 115
- Whitfield, J. B., 2003. Phylogenetic Insights into the Evolution of Parasitism in Hymenoptera. Pages 69–100 *in* *Advances in Parasitology*, volume 54. Academic Press. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065308X03540027>. 115
- Whiting, P. 1943. Multiple alleles in complementary sex determination of *Habrobracon*. *Genetics* **28** :365–382. 32
- Whiting, P. W. 1933. Selective fertilization and sex-determination in hymenoptera. *Science* **78** :537–538. 32
- Whitlock, M. C., and A. F. Agrawal. 2009. Purging the Genome with Sexual Selection : Reducing Mutation Load Through Selection on Males. *Evolution* **63** :569–582. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/j.1558-5646.2008.00558.x/abstract>. 128
- Wittenberger, J. F., 1983. Tactics of mate choice. Pages 435–447 *in* *Mate Choice*. Cambridge University Press. 25
- Wong, R. Y., and H. A. Hofmann, 2001. Behavioural Genomics : An Organismic Perspective. *in* eLS. John Wiley & Sons, Ltd. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1002/9780470015902.a0022554/abstract>. 122
- Yamazaki, K., E. A. Boyse, V. Miké, H. T. Thaler, B. J. Mathieson, J. Abbott, J. Boyse, Z. A. Zayas, and L. Thomas. 1976. Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *Journal of Experimental Medicine* **144** :1324–1335. URL <http://jem.rupress.org/content/144/5/1324>. 7

- Young, A. J., G. Spong, and T. Clutton-Brock. 2007. Subordinate male meerkats prospect for extra-group paternity : alternative reproductive tactics in a cooperative mammal. *Proceedings of the Royal Society of London B : Biological Sciences* **274** :1603–1609. URL <http://rspb.royalsocietypublishing.org.inee.bib.cnrs.fr/content/274/1618/1603>. 12, 25
- Zahavi, A. 1975. Mate selection—A selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* **53** :205–214. URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022519375901113>. 6
- Zahavi, A., and A. Zahavi. 1999. *The Handicap Principle : A Missing Piece of Darwin's Puzzle*. Oxford University Press. 6
- Zandberg, L., G. Gort, K. van Oers, and C. A. Hinde. 2017. Direct fitness benefits explain mate preference, but not choice, for similarity in heterozygosity levels. *Ecology Letters* **20** :1306–1314. URL <http://onlinelibrary.wiley.com.inee.bib.cnrs.fr/doi/10.1111/ele.12827/abstract>. 27
- Zareba, J., P. Blazej, A. Laszkiewicz, L. Sniezewski, M. Majkowski, S. Janik, and M. Cebrat. 2017. Uneven distribution of complementary sex determiner (csd) alleles in *Apis mellifera* population. *Scientific Reports* **7**. URL <http://www.nature.com/articles/s41598-017-02629-9>. 33, 34, 45
- Zayed, A., and L. Packer. 2005. Complementary sex determination substantially increases extinction proneness of haplodiploid populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102** :10742–10746. 38, 45, 47, 63
- Zhang, T., B. S. Coates, X. Ge, S. Bai, K. He, and Z. Wang. 2015. Male- and Female-Biased Gene Expression of Olfactory-Related Genes in the Antennae of Asian Corn Borer, *Ostrinia furnacalis* (Guenée) (Lepidoptera : Crambidae). *PLoS ONE* **10** :e0128550. URL <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0128550>. 24