



HAL
open science

Incidence des partenaires microbiens sur les interactions des insectes avec leur environnement biotique : approche comportementale des associations symbiotiques

Corentin Sochard

► To cite this version:

Corentin Sochard. Incidence des partenaires microbiens sur les interactions des insectes avec leur environnement biotique : approche comportementale des associations symbiotiques. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2020. Français. NNT : 2020REN1B009 . tel-03240433

HAL Id: tel-03240433

<https://theses.hal.science/tel-03240433v1>

Submitted on 28 May 2021

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

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

THESE DE DOCTORAT DE

UNIVERSITE DE RENNES 1

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation

Spécialité : Ecologie et Evolution

Par

Corentin SOCHARD

Incidence des partenaires microbiens sur les interactions des insectes avec leur environnement biotique : approche comportementale des associations symbiotiques

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 12 juin 2020

Unité de recherche : UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes ;
INRAE / Agrocampus-Ouest / Université de Rennes 1

Rapporteurs avant soutenance :

Marlène Goubault Maître de Conférences, Université de Tours, Tours
Thierry Rigaud Directeur de Recherche, CNRS, Dijon

Composition du Jury :

| | | |
|----------------------|--|---|
| Examineurs : | Marlène Goubault Thierry Rigaud Federica Calevro Natacha Kremer | Maître de Conférences, Université de Tours, Tours Directeur de Recherche, CNRS, Dijon Directrice de Recherche INRAE, Lyon Chargée de Recherche, CNRS, Lyon |
| Président du jury : | Philippe Vandenkoornhuysse | Professeur, Université de Rennes 1, Rennes |
| Directeur de thèse : | Yannick Outreman | Professeur, Agrocampus-Ouest, Rennes |
| Co-dir. de thèse : | Jean-Christophe Simon | Directeur de Recherche, INRAE, Le Rheu |

REMERCIEMENTS

C'est avec émotion que je souhaite commencer par remercier du fond du cœur mes deux directeurs de thèse **Yannick Outreman** et **Jean-Christophe Simon**, merci infiniment. En 2016 vous m'avez fait confiance en acceptant que je rejoigne ce projet de thèse et j'ai vraiment apprécié travailler avec vous deux pendant ces quelques années. J'ai beaucoup appris à votre contact et vous avez su me guider tout au long de la thèse sans m'imposer de choix pour que je puisse développer mes aptitudes scientifiques. Je réalise la chance que j'ai eu de faire ma thèse auprès de chercheurs aussi talentueux, bienveillants et éthiques, et je suis heureux de vous avoir eu comme modèles pour construire le chercheur que je suis aujourd'hui. Jean-Christophe, tu m'as marqué par ton enthousiasme inébranlable à l'égard de la recherche. Je me souviens de ton excitation à l'annonce de nouveaux résultats ou lorsque tu passais une tête dans la chambre climatique pendant les expériences, toujours avec le même plaisir de voir la science se faire. J'espère trouver une voie qui me fera vibrer de cette même passion. Quant à toi Yannick, je garderai en mémoire ton calme légendaire et ton incroyable pédagogie. Qu'il s'agisse d'écologie ou de statistiques, tu as la faculté de tout présenter avec clarté et simplicité. Je suis souvent venu te voir quand mon cerveau surchauffait après avoir longtemps buté sur un problème stat, et je suis toujours ressorti de ton bureau avec les idées beaucoup plus claires. En plus de vos grandes qualités scientifiques à tous les deux, vous avez toujours été à l'écoute dans les moments difficiles, car une thèse en compte forcément. Malgré vos responsabilités et vos emplois du temps chargés, vos portes m'ont toujours été ouvertes. Vous avez su trouver les mots justes pour m'aider à remonter chaque pente qui a marqué ma thèse. C'est grâce à votre soutien sans faille aussi bien scientifique que personnel que je peux aujourd'hui clore fièrement ce chapitre de ma vie, alors encore une fois, merci pour votre engagement, votre bienveillance et votre humanité. Je suis heureux d'avoir pu faire ce bout de recherche avec vous.

Je tiens maintenant à remercier **Marlène Goubault** et **Thierry Rigaud** qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Merci pour l'intérêt que vous lui avez porté et pour vos retours positifs et constructifs, aussi bien dans vos rapports que lors de ma soutenance. Je remercie également **Federica Calevro**, **Natacha Kremer** et **Philippe Vandenkoornhuyse** pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaite également remercier les membres de mon comité de thèse : **Sylvia Anton**, **Ana Rivero**, **Emmanuel Desouhant**, **Jérôme Moreau**, **Fabrice Vavre** et **Maxime Hervé**. Vous avez grandement participé à l'orientation de cette thèse et je suis heureux de pouvoir présenter aujourd'hui le résultat de nos échanges au travers de ces travaux.

Je voudrais aussi remercier **Sylvia Anton** et **Christophe Gadenne**, avec qui j'ai pu étroitement collaborer pour développer une approche olfactométrique pour l'étude du comportement. Même si nous n'avons pas réussi à l'intégrer dans ma thèse, j'ai beaucoup apprécié travailler avec vous à développer cette technique.

Je remercie également chaleureusement toutes les personnes impliquées dans le projet Hmicmac et en particulier *Fabrice Vavre, Laurence Mouton, Federica Calevro, Hubert Charles* et *Diego Santos Garcia*. Merci de l'intérêt et de l'enthousiasme avec lequel vous avez suivi l'avancée de nos travaux sur le site rennais, je suis ravi d'avoir pu participer à un projet aussi ambitieux. Et un grand merci pour votre accueil chaleureux à Lyon.

I would also like to give a special thanks to *Ailsa McLean*, for sharing her expertise on symbiont manipulation. You allowed me to significantly improve my technique and made me save a lot of time that I could invest in many other experiments. I was also happy to meet you and to be able to discuss further during the conference in Rothamsted.

Je remercie l'*Université de Rennes 1* qui m'a permis de réaliser ma thèse, ainsi qu'à *Agrocampus-Ouest* et l'*INRAE*, pour m'avoir accueilli dans leurs locaux et m'avoir donné des conditions de travail optimales pour réaliser mes recherches.

Je voudrais aussi remercier très sincèrement toutes les personnes qui m'ont apporté leur soutien de manière indirecte dans ma thèse, notamment en m'aidant pour les démarches administratives, l'accueil des stagiaires ou la participation à certaines formations. Merci donc à *Anne-Sophie Grenier, Géraldine Blondel, Pascale Le Névé* et *Patricia Nadan* (INRAE), *Ingrid Lévèque* (Agrocampus-Ouest), *Anne-Joëlle Chauvin* (Université de Rennes 1) et *Isabelle Baumgarten* (Ecole doctorale EGAAL) pour tous les services que vous m'avez rendus.

Mon premier vrai contact avec l'univers obscur du doctorat a eu lieu lors de mon stage de master 2 qui s'intégrait dans la thèse de *Mélanie Leclair*. Je ne sais pas si tu liras ces mots un jour Mélanie, mais je tiens à te remercier pour tout ce que j'ai pu apprendre à tes côtés pendant les quelques mois qui ont précédés ma propre thèse. J'ai déjà eu l'occasion de te remercier à l'époque pour ton rôle dans l'encadrement de mon stage, mais aujourd'hui, je voulais te dire merci pour tout ce que tu m'avais apporté et dont je n'avais pas conscience avant de commencer la thèse. Tu as été une source d'inspiration importante pour moi, car tu as influencé sans le savoir ma façon de concevoir la recherche, par les valeurs que tu m'as enseignées, tout comme la manière dont j'ai encadré mes stagiaires. Grâce à toi, j'ai pu aborder la thèse avec beaucoup plus de sérénité et je t'en remercie grandement. J'espère que nous aurons l'occasion de nous revoir un jour.

J'ai réalisé ma thèse au sein de l'*équipe EGI*, dans l'*UMR IGEPP*. Dans cette équipe, j'ai eu la chance d'être entouré et soutenu par de nombreuses personnes aussi passionnées que compétentes, qui m'ont aidé en m'apportant leur expertise ou en m'apprenant les gestes qui m'ont servi au quotidien pendant plus de trois ans.

Grégory, je souhaite te remercier infiniment pour ton aide et ton soutien dans toutes les tâches que nous avons réalisées ensemble, et elles sont nombreuses. Nous avons partagé des échecs, je me souviens notamment des sessions d'injections que nous avons passé des heures à préparer et qui s'étalaient sur plusieurs jours... tout ça pour constater au final que le transfert de symbiote n'avait pas fonctionné. Quel soulagement quand nous y sommes parvenus, je me souviens de notre joie en l'annonçant à Yannick et Jean-Christophe ! Je me suis rendu compte très vite que mes expériences allaient être très ambitieuses en terme de taille et de nombre de lignées de pucerons à suivre et à produire, et sans toi, je n'aurais pas été capable de maintenir un élevage aussi imposant et une production de plantes et d'insectes aussi importante, alors merci pour le cœur et l'énergie que tu as mis dans cette mission. J'ai aussi beaucoup apprécié nos longues discussions pendant les changements des collections, j'ai appris à te connaître et le bureau m'a semblé très vide quand ton contrat s'est terminé. Quel que soit le chemin que tu emprunteras, je te souhaite qu'il te conduise vers tous ces pays dont tu me parlais et que tu voulais visiter.

Jean-François et Gaëtan, je voudrais vous remercier pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée tout au long de ma thèse. Vous avez toujours été présents, que ce soit pour m'aider dans la production de plantes (parfois récalcitrantes à pousser), dans les changements des collections de pucerons ou encore pour que mes expériences et celles de mes stagiaires se passent dans les meilleures conditions possibles. J'ai eu beaucoup de plaisir à partager l'aide technique avec vous.

Stéphanie, merci d'avoir partagé avec moi ton expertise concernant la manipulation des symbiotes de pucerons. Je ne pensais pas que modifier le microbiote d'un insecte pouvait s'avérer être aussi compliqué et demander autant de précision, mais grâce à toi j'ai pu en maîtriser toutes les subtilités. J'ai beaucoup aimé travailler avec toi à améliorer le protocole d'injection, c'était particulièrement plaisant de voir le taux de réussite décoller et de pouvoir ensuite présenter ces résultats avec toi en Angleterre. Je te remercie aussi pour tous les coups de main que tu m'as donnés en biologie moléculaire lorsque j'étais débordé.

Frédérique, en arrivant en thèse, je savais tout juste manier une pipette, mais tu m'as très vite fait rattraper ce retard en m'apprenant tous les rudiments de la biologie moléculaire. Je voulais aussi te remercier de m'avoir aidé à génotyper, symbiotyper et séquencer tous ces pucerons et leurs symbiotes, je n'aurais jamais pu m'en sortir tout seul vu la quantité d'analyses à réaliser. Et encore désolé pour toutes ces fois où tu t'es sentie mal de devoir m'annoncer une contamination dans les lignées, j'espère que l'expérience ne t'aura pas trop marqué en mal.

Nathalie, merci beaucoup d'avoir pris de ton temps pour m'aider à préparer et à envoyer mes plaques à faire séquencer. J'aurais mis beaucoup plus de temps à comprendre comment faire tout seul.

En échangeant sur nos travaux avec d'autres doctorants, je me suis rendu compte que chacun vivait une expérience de la thèse qui lui était propre. Pas étonnant lorsqu'on travaille sur des thématiques différentes, mais c'est aussi parce que chaque thèse se déroule dans des conditions particulières, avec des ressources scientifiques et techniques inégales. Pour ma part, j'ai eu la chance (oui, je suis quelqu'un de chanceux en règle générale) d'avoir deux directeurs de thèse qui en plus d'être au top scientifiquement parlant, ont toujours fait en sorte que je puisse bénéficier du maximum d'aide technique et scientifique. Ils m'ont donné l'opportunité d'encadrer un grand nombre de stages au cours de ma thèse et je les en remercie, car en plus du soutien évident que m'ont apporté les stagiaires, l'exercice complexe de l'encadrement m'a beaucoup appris. Superviser un stage en étant la personne la plus au contact du travail du stagiaire est une responsabilité importante, que j'ai vraiment adoré remplir. En plus d'avoir été une expérience très enrichissante, chaque étudiant que j'ai pu superviser a largement contribué à développer et réaliser les expériences que je présente dans ce manuscrit. Si j'ai parfois été frustré de ne pas avoir pu réaliser moi-même certaines expériences, je ne changerais rien pour autant car les stages m'ont permis d'avancer sur plusieurs questions ou plusieurs volets de ma thèse en parallèle, ce qui était particulièrement plaisant et stimulant. Je remercie d'ailleurs chacun de mes stagiaires pour leur investissement dans ce travail, qui a produit des résultats d'une grande qualité.

En début de thèse, j'ai eu des difficultés à me sentir légitime dans mon rôle d'encadrant, et c'est avec toi *Jimmy* que j'ai fait mes premiers pas en tant qu'encadrant, pour un pour un stage de master 2 qui plus est. Merci d'avoir pardonné mes erreurs d'apprenti doctorant, j'espère que tu auras trouvé cette expérience bénéfique malgré mon encadrement imparfait.

Toujours pendant ma première année, Yannick m'a proposé de co-encadrer un second stage, sur un sujet de master 1 qui s'éloignait un peu de mon sujet de thèse. Comme je suis d'un naturel volontaire et que j'aime me mettre en difficulté, j'ai tout de suite accepté et j'en suis ravi, car j'ai beaucoup appris en supervisant ton stage *Corentin*. Bien que tout n'ait pas fonctionné comme on l'avait espéré, tu as réussi à répondre à un grand nombre de question vu le laps de temps très court dont tu disposais et j'ai beaucoup apprécié travailler avec toi. C'est pour cette raison que j'ai été ravi de pouvoir renouveler l'expérience l'année suivante pour ton stage de master 2, cette fois-ci sur un sujet qui s'inscrivait complètement dans ma thèse. Ce stage était le premier à travailler sur des lignées de pucerons dont j'avais modifié le microbiote, j'étais donc particulièrement excité par les résultats que nous avons pu produire ensemble. Merci de t'être autant investi dans ces expériences, il ne vaut mieux pas compter les heures passées le week-end pour pouvoir faire tourner les manip toute la semaine et tout faire rentrer dans un calendrier toujours trop court pour nos ambitions, mais ça en valait la peine, on peut être fiers de ce que l'on a accompli. Je suis heureux d'avoir pu t'encadrer pendant ces deux années et j'ai été vraiment content d'apprendre que tu avais trouvé une thèse qui te plaisait. J'espère avoir de tes nouvelles quand viendra ton tour de soutenir. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Entre ma première et ma deuxième année de thèse, j'ai également pu encadrer deux autres stages. Bien que leur stage ait été de courte durée, l'expérience menée par **Juliette** et poursuivie par **Nicolas** a permis de produire de premiers résultats très encourageant sur les lignées de pucerons dont le microbiote avait été modifié. Un grand merci pour l'énergie que vous avez mis dans cette expérience.

Comme je l'écrivais plus haut, j'ai pris du retard dans la création des lignées de pucerons nécessaires pour répondre à toutes les questions posées dans ma thèse. Mais grâce au travail acharné et passionné de **Laura** et **Maiwenn**, que j'ai encadré pendant ma troisième année, nous avons pu rattraper ce retard et quantifier l'effet des symbiotes sur un grand nombre de comportements. Merci à toutes les deux, je ne sais pas à quoi ressemblerait ce manuscrit sans le travail phénoménal que vous avez fourni. Quand Yannick et Jean-Christophe m'ont proposé de superviser deux stages de Master 2 en même temps, j'ai un peu hésité, car je savais que je n'allais pas pouvoir m'investir autant que j'aime le faire dans les expériences. Mais j'aime les défis et je ne regrette pas d'avoir accepté. Les deux stages ont été une grande réussite, grâce à votre grande capacité de travail, votre autonomie et à votre volonté de soutenir ce projet jusqu'au bout, merci pour tout le cœur que vous avez mis dans les manip. Comme je n'ai pas pu suivre quotidiennement votre avancée, rédaction oblige, je me suis davantage rendu compte au fil des réunions et de mes visites surprises, de l'évolution de votre réflexion et de votre raisonnement scientifique ou encore de votre confiance en vous. Je suis certain que vous ferez bon usage de tous ces nouveaux acquis, que ce soit pour ta propre thèse Laura ou dans la suite de ton parcours professionnel Maiwenn. J'espère que vous garderez un aussi bon souvenir de votre stage que moi.

Heureusement, même en thèse, on a le temps de se détendre, et quoi de mieux que de se raconter nos joies et nos frustrations entre doctorants autour d'un verre et/ou d'un jeu après une longue journée de manip !

Merci donc avant tout à **Agathe**, **Estelle**, **Cécile** et **Rafaëla**, pour m'avoir aidé à relativiser mes galères en me partageant les vôtres. Mais aussi à **Gérôme**, **Pauline** et **Théo** pour toutes les sorties en bar, resto ou tout simplement pour ces soirées passées autour d'un verre et d'un jeu. Transition parfaite pour évoquer les très (trop ?) nombreuses parties de Tarot du midi, devenues un vrai rituel auquel s'est jointe également **Sidonie**. Merci pour ces moments de déconnexion, même s'il faut bien avouer que j'ai parfois eu du mal à me retourner à mon bureau pour travailler après plusieurs parties.

Un merci tout particulier pour toi **Estelle**, colloc de bureau de la première heure (enfin presque), pour avoir supporté mon besoin irrésistible de discuter et de faire des blagues pourries. En plus d'avoir été un compagnon de route lors des visites de nombreuses villes à l'occasion des colloques pucerons, tu as été pendant toute la thèse une grande source de vitamine C et B9 en approvisionnant régulièrement le bureau en fraises... ça a du bon de bosser en lien direct avec les producteurs n'empêche.

Merci également à toi **Julien**, doctorant discret de l'autre bout du couloir. Je suis triste de n'avoir appris à connaître que trop tard dans la thèse car j'ai beaucoup apprécié nos quelques conversations et t'affronter dans de longues parties de jeu de stratégie. J'espère que l'on aura l'occasion de se revoir et de refaire quelques parties un de ces quatre.

Ayant découvert le jeu de rôle peu avant la thèse, je suis vraiment content d'avoir pu prendre part à l'aventure proposée par notre cher Maître du Jeu **Théo**, avec mes compagnons de route **Estelle** (encore toi ?), **Pauline**, **Théo**, **Rémi**, **Mathilde** et **Luis**. J'ai vraiment passé de très bonnes soirées JDR/pizzas/bières en votre compagnie, et j'ai vraiment aimé prendre part avec vous aux événements épiques que nous proposait notre MJ sadique. J'espère que vous ne m'en avez pas trop voulu de vouloir détrousser tous les PNJ que l'on croisait.

Je souhaite maintenant remercier l'ensemble des doctorants que j'ai malheureusement eu de moins en moins l'occasion de voir au fil de la thèse. Quelle idée aussi de ne travailler qu'au Rheu. Merci donc à **Aude**, **Camille**, **Grégoire**, **Romain** et **Morgane** (mais aussi évidemment à **Stéphane**) pour leur sympathie et les bons moments passés ensemble. Je repense notamment à la soirée SPE où nous avons tous dansé en boîte sur le lac du Connemara ! Mention particulière pour Morgane, parce que ton amitié a beaucoup compté pour moi, depuis notre rencontre en master 1. Je particulièrement nostalgique quand je repense au stage de master 1 avec David et Hervé (déjà à cette époque tu t'intéressais aux mouches). Même si on ne s'est pas beaucoup vu pendant la thèse, tu as été là quand j'en ai eu besoin et je t'en remercie infiniment. Merci aussi pour ces soirées passées au Beer Zone, à discuter autour d'une bière, puis deux, avant de finalement rester pour manger. J'espère que l'on pourra continuer à se voir de temps en temps.

Quelles que soient les épreuves que j'ai traversées dans ma vie, j'ai toujours pu compter sur le soutien de ma famille, et tout naturellement la thèse n'y fait pas exception. Même si vous n'avez pas toujours compris sur quoi je travaillais ou le but de mes travaux, vous avez malgré tout pris le temps de m'écouter en parler pendant de longues heures. J'ai beaucoup évolué pendant cette période un peu hors du temps qu'est la thèse, et je me rends compte que je vous ai rarement remercié pour tous ces gestes de soutien, devenus normaux au fil du temps, alors je souhaiterais profiter de cette occasion pour vous l'écrire. **Maman**, **papa**, **Eléonore**, **Astrid**, **Ysaure** et **Bérénice**, merci. J'espère qu'un jour j'aurai l'occasion de vous rendre la pareille. Quelques mentions spéciales: à toi maman, pour avoir su trouver les mots qui m'ont redonné la force, afin de mener ce projet jusqu'au bout. A vous deux également, Eléonore et **Maxime**, pour votre soutien tout au long de ma thèse, que ce soit en me proposant de venir courir, en vous improvisant déménageurs ou en venant tester mes progrès en pâtisserie.

Tu t'en doutes **Agathe**, ce dernier paragraphe t'est consacré. Je n'arrive pas à trouver les mots pour te remercier de tout ce que tu m'apportes dans la vie. J'espère que ces quelques lignes réussiront à te montrer ma gratitude pour l'immense soutien moral que tu as été pour moi

pendant toute la période de fin de thèse. Tu es une personne au grand cœur, pleine d'empathie pour les autres... mais sûrement aussi la plus têtue que je connaisse. Pour toi, il était naturel de m'aider à aller jusqu'au bout, d'être là au quotidien, quoiqu'il t'en coûte, c'était plus fort que toi. Tu as pourtant dû supporter le stress cumulé d'une première fin de thèse (« tu es Docteur !!!! »), suivie d'une seconde sur fond de pandémie et de confinement... en y repensant, je ne sais pas d'où tu as tiré la force nécessaire. Si le confinement m'a aussi peu affecté mentalement (ce qui n'a pas été le cas de ma fin de thèse), c'est clairement grâce à toi. Dans les moments difficiles, tu étais là pour me rebooster et m'aider à déconnecter pour ne pas me sentir submerger, et c'est ta présence à mes côtés qui a pu rendre la rédaction de ce manuscrit possible. Maintenant que cette période compliquée est derrière nous, j'ai hâte de vivre de nouvelles aventures passionnantes à tes côtés ! Et puisque c'est grâce à toi que je peux aujourd'hui déclarer fièrement « Je suis Docteur \o/ !!! », je voudrais te dédier cette thèse.

TABLES DES MATIERES

| | |
|---|-----------|
| CONTEXTE GENERAL DE LA THESE | 1 |
| I. SYMBIOSE : DEFINITION ET ELEMENTS THEORIQUES | 3 |
| A. Définition de la symbiose | 3 |
| B. Concept d'holobionte et théorie de l'évolution de l'hologéome | 4 |
| C. Diversité des associations hôte-symbiote | 5 |
| 1. <i>Localisation des symbiotes microbiens</i> | 6 |
| 2. <i>Symbiotes primaires et secondaires</i> | 7 |
| 3. <i>Modes de transmission</i> | 7 |
| D. Concept de phénotype étendu et diversité des effets symbiotiques | 10 |
| 1. <i>Concept de phénotype étendu</i> | 10 |
| 2. <i>Diversité des effets phénotypiques associés aux symbiotes</i> | 11 |
| II. DYNAMIQUE DES SYMBIOSES PROTECTRICES VIS-A-VIS DES ENNEMIS NATURELS | 17 |
| A. Forces sélectives affectant la fréquence des associations symbiotiques | 18 |
| 1. <i>Variation du phénotype de protection</i> | 18 |
| 2. <i>Variation des coûts associés à la symbiose</i> | 19 |
| 3. <i>Balance coûts-bénéfices</i> | 20 |
| 4. <i>Infections multiples : épistasie et déséquilibre de liaison</i> | 21 |
| B. Autres facteurs affectant la fréquence des associations symbiotiques | 22 |
| 1. <i>Fidélité de la transmission verticale et événements de transmission horizontale</i> | 22 |
| 2. <i>Migration et dérive</i> | 23 |
| III. SYMBIOSE ET COMPORTEMENTS | 23 |
| A. Influence des symbiotes sur les comportements et mécanismes associés | 24 |
| 1. <i>Activité de dispersion et d'exploration</i> | 24 |
| 2. <i>Comportements alimentaires</i> | 25 |
| 3. <i>Comportements reproducteurs</i> | 27 |
| 4. <i>Interactions entre organismes</i> | 28 |
| B. Conséquences écologiques et évolutives des modifications comportementales | 29 |
| IV. PROBLEMATIQUE DE LA THESE | 30 |
| V. MODELE D'ETUDE : LE PUCERON DU POIS <i>ACYRTHOSIPHON PISUM</i> ET SON CORTEGE DE SYMBIOTES | 31 |
| A. Sa spécialisation écologique | 31 |
| B. Son cortège de symbiotes | 32 |
| C. Son intérêt comme modèle d'étude | 33 |
| VI. OBJECTIFS DE LA THESE | 33 |
| CHAPITRE 1 : OPTIMISATION DES TECHNIQUES DE MANIPULATION DES CORTEGES SYMBIOTIQUES | 37 |
| ARTICLE 1 : EXAMINATION OF THE SUCCESS RATE OF SECONDARY SYMBIONT MANIPULATION BY MICROINJECTION METHODS IN THE PEA APHID SYSTEM | 39 |

| | |
|---|------------|
| CHAPITRE 2 : INCIDENCE DES SYMBIOTES SUR LA RELATION PLANTE-PUCERON | 49 |
| ARTICLE 2 : SECONDARY SYMBIONTS AFFECT FORAGING CAPACITIES OF PLANT-SPECIALIZED GENOTYPES OF THE PEA APHID | 52 |
| ARTICLE 3 : LIMITED INFLUENCE OF GAIN AND LOSS OF SYMBIONTS ON HOST PLANT SELECTION IN SPECIALIZED PEA APHID GENOTYPES | 76 |
| CHAPITRE 3 : INCIDENCE DES SYMBIOTES SUR LA RELATION PUCERON-ENNEMI NATUREL | 91 |
| ARTICLE 4 : INFLUENCE OF 'PROTECTIVE' SYMBIONTS THROUGHOUT THE DIFFERENT STEPS OF AN APHID-PARASITOID INTERACTION | 93 |
| CHAPITRE 4 : INCIDENCE DE LA PLANTE HOTE SUR LES PHENOTYPES CONFERES PAR LES SYMBIOTES PROTECTEURS | 118 |
| ARTICLE 5 : HOST PLANT EFFECTS ON THE OUTCOMES OF DEFENSIVE SYMBIOSES IN THE PEA APHID COMPLEX | 120 |
| DISCUSSION GENERALE | 139 |
| I. VARIABILITE PHENOTYPIQUE ASSOCIEE AUX SYMBIOTES | 141 |
| A. Symbiose et comportements : variations, mécanismes et conséquences | 141 |
| 1. <i>Sources de variation</i> | 141 |
| 2. <i>Mécanismes impliqués</i> | 142 |
| 3. <i>Conséquences pour les hôtes</i> | 143 |
| B. Symbiose et autres phénotypes étudiés | 144 |
| II. DYNAMIQUE DES ASSOCIATIONS SYMBIOTIQUES | 146 |
| A. Symbiotes protecteurs et fréquences intermédiaires | 146 |
| B. Associations préférentielles des symbiotes dans les populations d'hôte | 148 |
| 1. <i>Hypothèses expliquant les associations préférentielles</i> | 148 |
| 2. <i>Les symbiotes ont-ils un rôle dans la spécialisation alimentaire ?</i> | 150 |
| 3. <i>La plante hôte est-elle responsable des associations préférentielles ?</i> | 150 |
| III. CONCLUSION | 151 |
| REFERENCES | 152 |
| ANNEXES | 170 |
| ANNEXE 1 : VIRUS MEDIATED TROPHIC INTERACTION BETWEEN APHIDS AND THEIR NATURAL ENEMIES | 171 |

CONTEXTE GENERAL DE LA THESE

Il ne fait aujourd'hui plus aucun doute que les microorganismes symbiotiques peuvent jouer un rôle dans la plupart des fonctions des espèces hôtes et qu'ils influencent ainsi l'écologie et l'évolution de ces dernières. Les travaux menés au cours des dernières décennies ont mis en évidence l'extraordinaire diversité des effets des symbiotes sur les phénotypes de leurs hôtes. Cependant, l'influence des symbiotes microbiens sur les comportements de leur hôte a reçu beaucoup moins d'attention en comparaison des autres phénotypes, malgré son importance cruciale dans la vie des espèces hôtes. Dans cette thèse, nous avons cherché à déterminer l'incidence des symbiotes des insectes sur leurs relations avec leur environnement biotique, en étudiant à la fois les effets phénotypiques des symbiotes et leur impact sur les comportements des hôtes.

Ce manuscrit commencera par une synthèse bibliographique qui permettra d'introduire les notions clés utilisés et discutés dans les différents travaux de la thèse. Dans une première partie, nous aborderons la notion de symbiose en précisant ses contours et en présentant la grande diversité d'interactions qu'elle regroupe. Cette introduction dressera aussi un état de l'art concernant les effets des microorganismes symbiotiques sur les phénotypes des insectes hôtes. Dans une seconde partie, nous focaliserons notre attention sur les symbioses protectrices chez les insectes en présentant leur dynamique au sein des populations naturelles d'hôtes et les différents facteurs influençant cette dynamique. Dans une troisième partie, nous verrons le lien entre symbiose et modifications comportementales chez les insectes, un sujet qui a gagné en ampleur au cours des dernières décennies. Nous nous attarderons notamment sur les conséquences écologiques et évolutives de tels changements pour les espèces hôtes. Enfin, après avoir présenté la problématique de la thèse et le modèle d'étude utilisé, nous détaillerons les objectifs de cette thèse.

I. SYMBIOSE : DEFINITION ET ELEMENTS THEORIQUES

A. Définition de la symbiose

Si le terme de symbiose semble facile à appréhender au premier abord, sa définition ne fait pas l'unanimité dans la communauté scientifique. De Bary (1879) propose une première définition large de la symbiose (étymologiquement, symbiose signifie 'vivre ensemble') : une association durable entre deux ou plusieurs espèces distinctes. Cette définition ne pose aucune limite quant à la nature des interactions entre les organismes en symbiose, elles peuvent être aussi bien bénéfiques en cas de mutualisme, que délétères en cas de parasitisme. La nature d'une association symbiotique n'est pas toujours évidente à déterminer ni figée dans le temps, elle peut évoluer et dépendre du contexte environnemental dans lequel se trouvent les organismes associés, ce qui justifie d'inscrire les relations symbiotiques le long d'un continuum allant du parasitisme au mutualisme. Une seconde définition, proposée par Nardon et Grenier (1993) limite la symbiose aux seules interactions où les différents partenaires tirent un bénéfice mutuel de l'association. Dans ce cas, seules les associations mutualistes sont considérées comme des symbioses.

Au cours de ma thèse, nous avons retenu la première définition de la symbiose, une association durable entre organismes indépendamment des effets de l'association sur les protagonistes. Cette définition permet d'intégrer la nature variable des effets selon le contexte mais aussi la diversité des effets d'une symbiose selon le trait étudié. Dans cette thèse, nous nous sommes concentrés sur les symbioses dites microbiennes : des symbioses faisant intervenir un hôte eucaryote et un symbiote microbien (virus, bactéries ou champignons microbiens pour les plus répandus).

Dans la nature, les macroorganismes abritent des communautés de microorganismes plus ou moins diversifiées qui forment le microbiote de l'hôte. La diversité de relations précédemment évoquées entre l'hôte et son microbiote a généré de nombreux travaux sur les effets des symbioses sur les organismes en association et l'évolution de ces systèmes biologiques complexes. De nouveaux concepts en ont émergé, notamment ceux d'holobionte et d'hologénome.

B. Concept d'holobionte et théorie de l'évolution de l'hologénome

Au cours des avancées scientifiques, la manière de considérer la symbiose entre organismes a évolué, et plusieurs visions de ces associations symbiotiques se sont opposées et s'opposent encore : celle d'organismes distincts en interaction, évoluant conjointement ou non, et celle de super-organismes où l'hôte et les symbiotes ne sont plus distingués mais considérés comme une entité biologique unique. En 1991, Lynn Margulis propose le terme d'holobionte pour faire référence à une entité biologique composée d'un organisme hôte et d'un symbiote héritable (Margulis 1991). Cette définition est ensuite étendue à un hôte et l'ensemble de son microbiote (Simon *et al.* 2019).

Associée à la notion d'holobionte, on trouve le concept d'hologénome, désignant l'ensemble de l'information génétique contenue dans l'holobionte, c'est-à-dire à la fois le génome de l'hôte et l'ensemble des génomes de son microbiote, appelé aussi microbiome. En 2008, Ilana Zilber-Rosenberg et Eugene Rosenberg proposent une « nouvelle » théorie évolutive : la théorie hologénomique de l'évolution (Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008). Cette théorie considère l'holobionte comme unité de sélection, là où la théorie de l'évolution classique considère l'individu hôte sans ses microorganismes. Cette théorie se base sur plusieurs études empiriques effectuées sur diverses associations symbiotiques. Cette théorie a pour base un premier constat : la majorité des organismes animaux ou végétaux forment des relations symbiotiques avec des microorganismes qui peuvent être transmis fidèlement d'une génération à l'autre (*i.e.*, symbiotes dits héritable). Puis, les études montrent que les phénotypes exprimés par un organisme peuvent résulter des interactions entre le génome de l'hôte et les génomes de son microbiote (*i.e.*, l'hologénome) et influencer sur la *fitness* de l'holobionte. Enfin, la variabilité génétique de l'holobionte est plus importante que celle des organismes hôtes seuls grâce à l'information génétique apportée par les symbiotes, ce qui permettrait à l'holobionte de s'adapter plus rapidement aux fluctuations de son environnement par le jeu de la sélection naturelle (Zilber-Rosenberg & Rosenberg 2008; Rosenberg & Zilber-Rosenberg 2018).

Bien que soutenue par d'autres auteurs (Bordenstein & Theis 2015), cette théorie est aujourd'hui très controversée (Moran & Sloan 2015; Douglas & Werren 2016; Hurst

2017). Si le rôle des symbiotes dans l'évolution des espèces est largement accepté (Brucker & Bordenstein 2012; Hurst 2017), certains éléments avancés pour consolider la théorie hologénomique de l'évolution restent critiquables. Notamment, les principes de cette théorie ne sont valables que si l'association entre l'hôte et son microbiote est stable au cours des générations, permettant à la sélection d'agir sur ce complexe et de retenir les associations selon leurs effets sur les protagonistes. Cependant, les observations montrent que tout le microbiote n'est pas intégralement hérité, seule une partie du microbiote se transmet de génération en génération, le reste étant acquis *de novo* au cours de la vie de l'individu hôte. Cette diversité dans les modes d'acquisition rend l'holobionte particulièrement instable dans sa composition au cours du temps, limitant l'action de la sélection naturelle sur cette entité biologique complexe (Douglas & Werren 2016). Par ailleurs, pour que la théorie hologénomique de l'évolution puisse s'appliquer, il est nécessaire que les partenaires de l'holobionte présentent des intérêts alignés, ce qui est rarement le cas compte-tenu des conflits qui existent soit entre les différents membres du cortège symbiotique ou entre l'hôte et certains de ses symbiotes (Douglas & Werren 2016). Ainsi, la sélection agit de manière hétérogène sur les différents niveaux de l'holobionte. Comme plusieurs générations de microorganismes se succèdent pendant la vie de l'hôte, les génomes microbiens ne sont pas figés et évoluent en réponse aux contraintes qu'ils subissent. Pour cette raison, Hurst (2017) suggère que de nombreux effets positifs des microbes qui favorisent la sélection de l'holobionte peuvent être en réalité la conséquence de l'évolution de certains traits microbiens qui ont été sélectionnés indépendamment de la *fitness* de l'hôte.

Cette théorie et le débat qu'elle suscite ont permis de mettre la symbiose au centre des recherches en biologie et de stimuler des études qui témoignent de la diversité et de la complexité des associations symbiotiques et de leurs conséquences à la fois phénotypiques, écologiques et évolutives.

C. Diversité des associations hôte-symbiote

Les associations symbiotiques sont ubiquistes dans le vivant et font intervenir une grande diversité d'organismes aussi bien chez les hôtes, qu'ils soient végétaux ou animaux, que chez les symbiotes qui appartiennent à différents taxa. On trouve parmi les microorganismes symbiotiques principalement des bactéries et des champignons

(Douglas 1989; Moran 2006; Rivera *et al.* 2009; Card *et al.* 2015), mais également des virus (Moran 2006; Roossinck 2011) ou encore certaines espèces d'archées ou de protistes (Douglas 2015). En plus de cette diversité taxonomique, les symbiotes se différencient selon plusieurs critères comme leur localisation sur ou dans l'hôte, leur importance dans la survie de leur hôte, leur mode de transmission entre individus hôtes ou encore leurs effets sur les phénotypes de l'hôte.

Dans la suite du manuscrit, nous allons nous restreindre aux associations entre les insectes et les symbiotes microbiens. En effet, si l'étude des effets phénotypiques des symbiotes microbiens concernent une grande diversité d'animaux, les modèles insectes offrent une approche plus simple et directe de ces effets phénotypiques car leurs cortèges symbiotiques sont souvent moins complexes que chez d'autres groupes comme les mammifères. Il est ainsi plus facile d'étudier l'écologie, l'évolution et la fonction des associations symbiotiques microbiennes en considérant le modèle hôte insecte (Douglas 2011).

Considérant la définition retenue précédemment, la suite de l'introduction générale présentera la grande diversité de symbioses chez les insectes, aussi bien sur le plan taxonomique que sur le plan des effets qu'elles produisent chez leurs hôtes. Cependant, nous excluons en grande partie les microorganismes pathogènes, ces derniers réduisant fortement la survie de leur hôte, rendant la relation hôte/microbe peu durable. Pour illustrer certains points, nous mentionnerons occasionnellement certaines associations impliquant des pathogènes de plantes ou d'insectes.

1. Localisation des symbiotes microbiens

Chez les insectes, on peut distinguer trois catégories de symbiotes selon leur localisation (Hansen & Moran 2014; Douglas 2015). La première concerne les endosymbiotes qui vivent au sein des cellules ou dans les cavités du corps de l'organisme hôte, elles peuvent se regrouper dans des structures appelées bactériocytes. La seconde catégorie concerne les symbiotes localisés dans le système digestif de l'insecte ; on parle communément de 'microbiote intestinal' (Voirol *et al.* 2018; Douglas 2018; Zheng *et al.* 2018). Enfin, il y a les symbiotes dits environnementaux ; à l'inverse des deux autres catégories, ces microbes vivent à l'extérieur de l'insecte (ectosymbiose). Certaines espèces d'ectosymbiotes colonisent la cuticule des insectes (Douglas 2015) ou encore leur

nourriture ce qui en modifie les propriétés (Hansen & Moran 2014).

2. *Symbiotes primaires et secondaires*

Toutes les associations symbiotiques n'ont pas la même importance dans la survie de leur hôte et certaines symbioses mutualistes sont indispensables aux organismes pour se développer, se nourrir ou se reproduire. On parle alors de symbiose obligatoire ou primaire. Dans de très nombreux cas, les symbiotes primaires des insectes jouent un rôle nutritif en fournissant à leur hôte des nutriments essentiels à leur développement ou leur survie (Moran *et al.* 2008). Par opposition, les symbiotes dits facultatifs ou secondaires ne sont pas nécessaires à la survie et la reproduction de leur hôte, mais peuvent toutefois influencer un grand nombre de traits chez les insectes qu'ils colonisent (Moran *et al.* 2008), comme nous l'aborderons par la suite.

3. *Modes de transmission*

Les symbiotes microbiens peuvent coloniser un nouvel organisme hôte en utilisant deux modes de transmission possibles : la transmission verticale, désignant le passage des symbiotes des parents vers leurs descendants, et la transmission horizontale, désignant l'acquisition d'un symbiote à partir de l'environnement ou d'autres individus porteurs. Le symbiote transmis horizontalement peut être un microorganisme avec un mode de vie libre ou provenir d'un autre organisme ou congénère sans qu'il y ait forcément d'apparentement entre les deux individus (Bright & Bulgheresi 2010). La localisation d'un symbiote et ses effets sur la survie de son hôte déterminent le plus souvent son mode de transmission. Ainsi la majorité des symbiotes obligatoires présente une transmission verticale (Moran *et al.* 2008; Russell 2019). Des études phylogénétiques montrent que la plupart des symbiotes secondaires sont transmis horizontalement, mais aussi que parfois les symbiotes obligatoires peuvent connaître des événements de transmission horizontale (Jaenike 2012). En analysant 528 associations symbiotiques entre des bactéries et des eucaryotes, Russell (2019) montre que 36% des symbiotes présentent un mode de transmission mixte.

➤ La transmission verticale

Les mécanismes de transmission verticale peuvent varier selon la nature des associations symbiotiques et la localisation des microorganismes. Les symbiotes

intracellulaires se transmettent majoritairement par le biais de la lignée germinale des femelles (*i.e.*, les ovocytes) (Szklarzewicz & Michalik 2017). Chez les pucerons, les symbiotes sont transmis de la mère aux embryons pendant leur développement (Koga *et al.* 2012). Chez les coléoptères du genre *Lagria*, la bactérie extracellulaire *Burkholderia*, contenue dans des glandes accessoires de l'appareil reproducteur des femelles, est déposée à la surface des œufs au moment de l'oviposition. Peu avant l'éclosion, les cellules bactériennes pénètrent dans l'œuf pour coloniser un nouvel hôte (Flórez *et al.* 2017). Pour le microbiote intestinal, plusieurs espèces d'insectes transmettent les microbes de manière externe. Chez de nombreuses espèces de punaises, le microbiote intestinal est déposé sur ou à côté des œufs au moment de l'oviposition et les larves l'acquièrent par voie orale au moment de leur éclosion (Taylor *et al.* 2014). Par exemple, la femelle de la punaise *Megacopta punctatissima*, dépose près des œufs des petites capsules qui contiennent les symbiotes obligatoires. Après éclosion, les larves consomment ces capsules, ingérant ainsi les microorganismes (Fukatsu & Hosokawa 2002). D'une manière similaire, la femelle du coléoptère xylophage *Anoplophora glabripennis* transmet ses symbiotes à ses descendants via les sécrétions salivaires laissées près de ses œufs (Mason *et al.* 2019).

➤ La transmission horizontale

Contrairement aux symbiotes transmis verticalement provenant des parents, les symbiotes transmis horizontalement peuvent avoir différentes sources. Certains microbes symbiotiques sont des bactéries libres contenues dans le sol et sont récupérées par certaines espèces d'insectes à chaque nouvelle génération (Kikuchi *et al.* 2011). Cependant, un grand nombre de symbiotes transmis horizontalement proviennent d'un autre insecte hôte, de la même espèce ou d'une espèce différente. Concernant ce type de transfert, il existe plusieurs voies directes ou indirectes par lesquelles l'acquisition peuvent se faire.

La transmission est directe lorsque l'hôte donneur et l'hôte receveur sont en contact. Pour des individus de la même espèce, cela peut se produire au moment de la reproduction. Il a été montré chez les pucerons que lors des contacts sexuels, des bactéries pouvaient être transmises du mâle vers la femelle via le liquide séminal (Moran & Dunbar 2006). Chez d'autres espèces, des femelles infectées peuvent transmettre le symbiote aux mâles. Dans ce cas, la transmission est très instable car les symbiotes ne

s'établissent pas systématiquement chez le partenaire sexuel (Gonella *et al.* 2012). Dans le cas des transferts des mâles vers les femelles, si la symbiose se développe suffisamment chez la femelle et forme une association stable, elle peut ensuite être transmise verticalement à la descendance. Les symbiotes peuvent également être transmis entre individus de la même espèce lors des contacts sociaux ou lors du nourrissage chez les espèces sociales, comme chez l'abeille domestique *Apis mellifera* (Powell *et al.* 2014). Outre la transmission entre individus de la même espèce, des contacts entre espèces différentes peuvent permettre des échanges de symbiotes. Lorsqu'un insecte prédateur se nourrit d'un insecte hôte, il ingère les symbiotes de sa proie et peut éventuellement être infecté ou infecter une autre proie qui pourrait acquérir le symbiote si elle survit au prédateur. Ce phénomène est aussi possible dans le cas des relations hôtes-parasitoïdes sur lesquelles nous reviendrons plus tard. Cependant, ce type de transmission permet rarement la mise en place d'une nouvelle association symbiotique (Chiel *et al.* 2009).

La transmission horizontale indirecte entre insectes peut se produire en passant par l'intermédiaire d'un organisme vecteur. Pour les insectes phytophages, la plante représente une part importante de leur environnement, et peut intervenir dans les échanges de microorganismes symbiotiques (Chrostek *et al.* 2017). La plante peut ainsi jouer le rôle de réservoir pour certains symbiotes et conduire à des événements de transmission horizontale entre organismes se nourrissant sur la même plante. Ce type de transfert a notamment été mis en évidence récemment pour certaines bactéries symbiotiques (Gonella *et al.* 2012; Caspi-Fluger *et al.* 2012; Li *et al.* 2017; Chrostek *et al.* 2017; Pons *et al.* 2019), même si ces études ont toutes été réalisées en conditions de laboratoire. Ce mode de transmission a des implications importantes dans la dispersion des symbiotes au sein des populations hôtes mais également dans l'infection de nouvelles espèces d'insectes (Sintupachee *et al.* 2006). Pour les insectes parasitoïdes, l'hôte peut être un vecteur si plusieurs parasitoïdes se développent dans un même hôte. Dans leur étude, Huigens *et al.* (2004) ont ainsi montré que lorsque deux trichogrammes (l'un infecté par *Wolbachia* et l'autre non) parasitent le même hôte, la bactérie peut alors être transmise entre les deux parasitoïdes. Ils ont observé de tels transferts horizontaux entre trichogrammes de même espèce ou d'espèces différentes. D'autres études montrent que ces ennemis naturels des insectes peuvent également être des vecteurs de symbiotes microbiens. Gehrler et Vorburger (2012) ont ainsi montré que chez les pucerons, un hyménoptère parasitoïde pouvait récupérer des symbiotes sur son ovipositeur lorsqu'il

attaque un hôte infecté et pouvait ensuite les transmettre à un nouvel hôte lors d'une prochaine attaque.

➤ Implication évolutive des modes de transmission

D'un point de vue évolutif, la transmission verticale, lorsqu'elle a une fidélité élevée (peu d'échec de transmission) assure aux partenaires une stabilité de l'association au fil des générations et permet ainsi la coévolution et la codiversification des associations hôte-symbiote (Kaltenpoth *et al.* 2014). Pour la transmission horizontale, les processus de coévolution entre l'hôte et le symbiote peuvent être plus diffus car ils dépendent de la capacité des partenaires à former une association stable qui puisse se transmettre aux générations futures. Cela peut être le cas de certains symbiotes qui se transmettent principalement verticalement mais qui peuvent aussi à l'occasion subir des événements de transmission horizontale (Russell 2019). Cependant, malgré la diversité des voies de transmission horizontale entre espèces hôtes, l'acquisition et le maintien d'un nouveau partenaire symbiotique peuvent être restreints, notamment par la distance génétique qui sépare l'espèce donneuse de l'espèce receveuse. Certaines études ont pu montrer en effet que plus l'hôte donneur et l'hôte receveur sont éloignés génétiquement et moins la symbiose a de chance de se maintenir et de perdurer au fil des générations (Chiel *et al.* 2009; Łukasik *et al.* 2015; Parker *et al.* 2017b). Malgré tout, on trouve quelques espèces de symbiotes qui sont très largement présentes parmi les espèces d'insectes, comme par exemple *Wolbachia* (Weinert *et al.* 2015). Ce symbiote présente une particularité : il manipule la reproduction de son hôte, ce qui a pour conséquence de favoriser sa transmission.

D. Concept de phénotype étendu et diversité des effets symbiotiques

1. Concept de phénotype étendu

Classiquement, on définit le phénotype d'un individu comme étant l'expression de son génome en interaction avec l'environnement dans lequel il évolue ($P = G \times E$). Lors de l'infection par des microorganismes symbiotiques, les phénotypes des individus hôtes peuvent être modifiés, ils sont alors le résultat de l'interaction entre le génome de l'hôte (H), ceux de ses symbiotes (S) et l'environnement (E). On peut le résumer par la formule

suivante : $P = G_H \times G_S \times E$. Chez les insectes, une grande diversité de phénotypes serait sous l'influence de leurs symbiotes microbiens. Ces phénotypes, dits étendus, concernent différents aspects de la vie des organismes, leur nutrition, leur reproduction ou encore leurs défenses face à divers stress environnementaux (Engelstädter & Hurst 2009; Oliver *et al.* 2010; Clark *et al.* 2010; Feldhaar 2011; Douglas 2015; Dicke *et al.* 2020). En terme de *fitness*, ces modifications des phénotypes par les symbiotes peuvent être soit bénéfiques pour l'hôte, soit coûteuses. La symbiose peut notamment être associée à un coût physiologique permanent à son hôte, car les symbiotes puisent dans les ressources de l'hôte pour se multiplier. Cependant, cet « impôt » énergétique peut être masqué par un avantage ou un désavantage plus grand que la symbiose peut conférer à l'hôte par la modification d'un autre trait. Si l'on peut qualifier une symbiose de mutualiste ou de parasitaire selon ses effets phénotypiques, ce statut n'est pas fixe, mais dépend en partie de l'environnement local où a lieu l'association, qui peut atténuer ou exacerber les bénéfiques ou les coûts apportés par les symbiotes.

Chez les insectes, les effets des symbiotes microbiens sur les phénotypes des insectes hôtes ont été principalement étudiés chez les drosophiles (*e.g.*, Douglas 2018), les pucerons (Oliver *et al.* 2010; McLean *et al.* 2016; Guo *et al.* 2017), les moustiques (Minard *et al.* 2013), les abeilles (Zheng *et al.* 2018), les papillons (Voirol *et al.* 2018) ou les hyménoptères parasitoïdes (Dicke *et al.* 2020).

2. Diversité des effets phénotypiques associés aux symbiotes

➤ Symbiotes manipulateurs de la reproduction

L'un des effets majeurs des symbiotes sur leur hôte est la manipulation de sa reproduction. En effet, de nombreuses associations symbiotiques chez les insectes impliquent des microorganismes capables d'influencer de différentes manières la reproduction. Ces manipulations de la reproduction induisent une augmentation de leur prévalence dans les populations d'hôtes. D'un point de vue évolutif, un insecte mâle représente un cul-de-sac pour les symbiotes car la transmission verticale a lieu la plupart du temps de la mère aux descendants. Le mode d'action partagé par les différents symbiotes manipulateurs est de favoriser directement ou indirectement la reproduction des femelles infectées de diverses manières (Engelstädter & Hurst 2009).

Il existe quatre types de manipulation de la reproduction décrits dans la littérature :

la féminisation des mâles, l'induction de la parthénogénèse, le male-killing et l'incompatibilité cytoplasmique. Parmi ces manipulations, trois modifient le sex-ratio des descendants produits par les femelles infectées, ce qui produit une surreprésentation des femelles à la génération suivante : la féminisation, la parthénogénèse et le male-killing (Hurst *et al.* 1999; Arakaki *et al.* 2001; Negri *et al.* 2006; Simon *et al.* 2011). Mais la manipulation de la reproduction peut également passer par un mécanisme plus complexe appelé incompatibilité cytoplasmique (Bourtzis *et al.* 1996). Dans ce cas, les mâles infectés ne peuvent se reproduire qu'avec des femelles infectées, ne produisant aucun descendant avec les femelles dépourvues du symbiote manipulateur. Les femelles infectées quant à elles peuvent se reproduire normalement quel que soit le statut symbiotique du mâle. La fécondité des femelles infectées est ainsi meilleure que celle des femelles saines. Ces différents types de manipulation de la reproduction ont été largement étudiés chez la bactérie symbiotique *Wolbachia*, mais on peut également les retrouver associés à plusieurs autres espèces de bactéries ainsi que chez certains virus (Engelstädter & Hurst 2009).

➤ Symbiotes impliqués dans la nutrition

De nombreux insectes présentent des régimes alimentaires carencés, comme chez les espèces phytophages ou hématophages par exemple. Ces organismes sont très souvent associés à des symbiotes obligatoires qui leur fournissent des éléments nutritifs tels que des acides aminés essentiels, des vitamines ou des stérols non présents dans leur alimentation (Douglas 2009). Une symbiose nutritive très étudiée concerne l'association entre les pucerons et la bactérie endosymbiotique *Buchnera aphidicola*, qui fournit aux pucerons des acides aminés essentiels absents ou en quantité limitée dans la sève élaborée des plantes (Douglas & Prosser 1992; Douglas 1998). Mais *B. aphidicola* n'est pas le seul symbiote bactérien obligatoire chez les pucerons. Certains aphides présentent également un second symbiote co-obligatoire comme entre autres *Wolbachia* ou *Serratia symbiotica* pour compléter les capacités métaboliques du symbiote primaire (Pérez-Brocal *et al.* 2006; Sudakaran *et al.* 2017; Meseguer *et al.* 2017). Chez certains pucerons, *B. aphidicola* a même été remplacé par une autre espèce de symbiote remplissant la même fonction nutritive (Sudakaran *et al.* 2017).

D'autres symbiotes peuvent également participer à la nutrition de l'insecte hôte en dégradant la cellulose (Brune 2014), en réduisant les défenses des plantes (Barr *et al.*

2010; Casteel *et al.* 2012; Chung *et al.* 2013; Lu *et al.* 2019) ou encore en participant à la détoxification des composés secondaires produits par les plantes (Després *et al.* 2007). Ainsi, les fourmis coupeuses de feuilles cultivent des champignons symbiotiques sur des morceaux de feuilles afin d'éliminer les composés toxiques qu'elles contiennent (De Fine Licht *et al.* 2013).

Des symbiotes microbiens peuvent manipuler la physiologie de la plante et améliorer l'alimentation de leur hôte. Chez le coléoptère *Dendroctonus frontalis*, un champignon augmente la quantité d'azote dans le phloème autour de son hôte (Ayres *et al.* 2000). Chez la chenille mineuse *Phyllonorycter blancardella*, une bactérie symbiotique crée un îlot vert autour de la mine sur des feuilles sénescents permettant de maintenir une alimentation de bonne qualité pour son hôte (Kaiser *et al.* 2010).

Chez les pucerons, plusieurs études ont montré que la présence de certaines bactéries endosymbiotiques pouvait modifier les performances des insectes sur différentes plantes hôtes. Par exemple, la bactérie *Regiella insecticola* chez le puceron du pois, *Acyrtosiphon pisum* (Tsuchida *et al.* 2004) et le puceron des céréales, *Sitobion avenae* (Ramírez-Cáceres *et al.* 2019), ou la bactérie *Arsenophonus* chez *Aphis craccivora* (Wagner *et al.* 2015). Cependant, ces effets restent rares car plusieurs autres études n'ont pas réussi à montrer de lien entre les symbiotes et une modification des performances de l'hôte sur une plante particulière (Leonardo 2004; Ferrari *et al.* 2007; McLean *et al.* 2011). En parallèle, des études sur le microbiote intestinal ont mis en évidence le rôle des bactéries symbiotiques dans l'utilisation des plantes par les insectes (Hosokawa *et al.* 2007) ce qui témoigne de l'importance des symbiotes microbiens dans les interactions entre leurs hôtes insectes et leurs plantes hôtes (Clark *et al.* 2010; Frago *et al.* 2012).

➤ Symbiotes impliqués dans d'autres traits

Hormis la reproduction et la nutrition, les symbiotes microbiens peuvent avoir d'autres effets sur le phénotype de leur hôte. Ainsi, les endosymbiotes des insectes peuvent influencer la couleur de leur hôte (Tsuchida *et al.* 2010), sa production de phéromones (Engl & Kaltenpoth 2018), sa sensibilité aux insecticides (Kikuchi *et al.* 2012; Skaljic *et al.* 2018), sa dispersion (Chen *et al.* 2000; Leonardo & Mondor 2006; Ryabov *et al.* 2009; Reyes *et al.* 2019; Parker & Brisson 2019) ou encore sa mémoire olfactive comme chez les parasitoïdes (Farahani *et al.* 2017).

En dehors des études précédemment citées, les microorganismes peuvent également modifier les traits d'histoire de vie des hôtes que ce soit positivement ou négativement. Ainsi, ils peuvent altérer la vitesse de croissance (Chen *et al.* 2000), la taille ou la masse corporelle (Fukatsu *et al.* 2001; Sakurai *et al.* 2005; Castañeda *et al.* 2010), la fécondité (Chen *et al.* 2000; Fukatsu *et al.* 2001; Sakurai *et al.* 2005; Castañeda *et al.* 2010; McLean *et al.* 2011) et la longévité (Chen *et al.* 2000; Fukatsu *et al.* 2001) de leurs hôtes.

Les symbiotes peuvent également influencer la réponse immunitaire des insectes, soit en la régulant pour permettre à l'association symbiotique d'exister (Engel & Moran 2013), soit en l'induisant lorsque l'organisme est infecté par des microorganismes pathogènes (Moreira *et al.* 2009). L'immunité dans les relations hôte-microbiote est un domaine en plein essor qui ne sera pas développé dans cette introduction.

➤ Symbiotes protecteurs

Dans leur milieu naturel, les insectes sont exposés à de nombreux stress abiotiques (*e.g.*, température) et biotiques (*e.g.*, prédateurs, parasitoïdes, pathogènes). Que ce soit chez les insectes ou chez les animaux en général, il existe une grande quantité de microorganismes impliqués dans la protection des organismes hôtes contre ces divers stress environnementaux, on parle alors de symbioses protectrices ou de symbiotes protecteurs (Haine 2008; Oliver & Moran 2009; Flórez *et al.* 2015).

Concernant les contraintes abiotiques auxquelles sont soumis les insectes, la température est un facteur important, un changement brutal de la température ambiante pouvant fortement réduire la survie et la reproduction des individus (Montllor *et al.* 2002). Plusieurs études chez le puceron du pois ont montré que certaines bactéries endosymbiotiques facultatives permettent aux pucerons de récupérer après un choc thermique important (Montllor *et al.* 2002; Russell & Moran 2006; Heyworth *et al.* 2020). La diminution de la *fitness* suite à des fortes températures semble due à la réduction importante de la densité de *B. aphidicola*, qui est alors compensée par ces bactéries facultatives (Heyworth *et al.* 2020). Par ailleurs, chez l'aleurode *Bemisia tabaci*, le symbiote secondaire *Rickettsia* améliore la survie suite à un choc thermique élevé. Ici, la bactérie induit l'expression de gènes chez son hôte qui entrent en jeu dans la tolérance thermique de l'insecte (Brumin *et al.* 2011). En plus d'une protection face aux températures élevées, les microorganismes peuvent également contribuer à la tolérance face au froid. Chez *Drosophila melanogaster*, c'est le microbiote intestinal qui peut jouer

ce rôle. Lorsque le microbiote des mouches est perturbé, ces dernières mettent plus de temps à se remettre d'une exposition à des températures basses et leur survie est réduite (Henry & Colinet 2018).

Les symbiotes d'insectes peuvent également améliorer les défenses de leurs hôtes contre des ennemis naturels. Chez le coléoptère *Paederus sabaeus*, les œufs sont protégés de la prédation par des araignées grâce à un composé toxique produit par la bactérie *Pseudomonas* hébergée par le coléoptère (Kellner 1999, 2003). Il s'agit ici d'une protection symbiotique individuelle, mais dans parfois la protection peut s'étendre à l'échelle de la population. Par exemple, lorsque des coccinelles consomment des pucerons infectés par certains symbiotes bactériens secondaires, leur survie est réduite (Costopoulos *et al.* 2014; Kovacs *et al.* 2017). Par ailleurs, les symbiotes peuvent protéger indirectement leur hôte en le rendant moins attractif pour le prédateur. Polin *et al.* (2015) montrent que les pucerons infectés par *Rickettsiella viridis* sont moins attaqués par les coccinelles que leurs congénères dépourvus de ce symbiote bactérien.

Une part importante de la littérature sur les symbioses protectrices chez les insectes concerne les résistances vis-à-vis des insectes parasitoïdes. L'exemple le plus documenté est celui de la bactérie endosymbiotique facultative des pucerons, *Hamiltonella defensa* pouvant conférer aux pucerons porteurs une résistance vis-à-vis de certaines espèces d'hyménoptères parasitoïdes. Initialement découvert chez le puceron du pois *A. pisum* (Oliver *et al.* 2003), le phénotype de protection associé à *H. defensa* a été montré chez d'autres espèces de pucerons (Oliver & Higashi 2019). La protection symbiotique liée à l'infection par *H. defensa* serait liée à la présence du bactériophage APSE, intégré dans le génome de la bactérie et qui produit des toxines à l'origine de la protection symbiotique (Oliver & Moran 2009). Il a été montré qu'en cas de perte du bactériophage intégré APSE, le puceron porteur de la bactérie n'est plus protégé des attaques du parasitoïde (Weldon *et al.* 2013). De plus, la récupération du phage restaure aussitôt la protection (Lynn-Bell *et al.* 2019). Il est toutefois important de noter qu'il existe une forte variabilité du niveau de protection conféré par l'infection par *H. defensa* qui semble dépendre du variant APSE et de sa cassette de virulence (Oliver *et al.* 2005; Leclair *et al.* 2016). En plus de la protection directe conférée par la bactérie, celle-ci peut également protéger indirectement son hôte car les parasitoïdes sont davantage attirés par les pucerons dépourvus du symbiote (Łukasik *et al.* 2013a). Hormis *H. defensa*, d'autres symbiotes

bactériens facultatifs d'insectes peuvent conférer une protection à leur hôte : *S. symbiotica* (Oliver *et al.* 2003) et *Fukatsuia symbiotica* (Heyworth & Ferrari 2015) chez le puceron du pois, *R. insecticola* chez *Myzus persicae* et *Aphis fabae* (von Burg *et al.* 2008; Vorburger *et al.* 2010), et *Spiroplasma* chez plusieurs espèces de drosophiles (Xie *et al.* 2010; Mateos *et al.* 2016; Paredes *et al.* 2016). Les mécanismes impliqués dans la réduction du parasitisme associés à ces différentes bactéries sont beaucoup moins bien connus (Van Arnam *et al.* 2018). Il a cependant été montré chez *D. melanogaster* que *Spiroplasma* protège son hôte en réduisant la quantité de lipides disponible pour le parasitoïde (Paredes *et al.* 2016) ou en produisant des toxines néfastes pour celui-ci (Ballinger *et al.* 2019). Au-delà de la protection contre les parasitoïdes, *Spiroplasma* peut également défendre les drosophiles contre un parasite nématode (Jaenike *et al.* 2010; Ballinger *et al.* 2019). En dehors de la protection directe contre les ennemis naturels, certains symbiotes peuvent contribuer indirectement à la protection de leur hôte contre les parasitoïdes en réduisant l'émission des composés volatiles produits par les plantes en cas d'attaque d'herbivores (Frago *et al.* 2017).

En plus des prédateurs et des parasitoïdes, les insectes peuvent être la cible d'entomopathogènes (champignons, bactéries, virus, *etc.*). Certains symbiotes bactériens peuvent conférer une protection vis-à-vis de ces pathogènes. Chez les pucerons, trois espèces de bactéries peuvent protéger leur hôte contre le champignon entomopathogène *Pandora neoaphidis* : *R. insecticola*, *Rickettsia* et *Spiroplasma* (Ferrari *et al.* 2004; Scarborough *et al.* 2005; Łukasik *et al.* 2013b, 2015; Heyworth & Ferrari 2015). Chez des coléoptères du genre *Lagria*, une bactérie protectrice limite le développement d'un champignon pathogène de l'insecte (Flórez *et al.* 2017). Chez *D. melanogaster*, deux études ont montré le rôle de *Wolbachia* dans la protection des mouches contre plusieurs virus, retardant la mortalité induite par ces derniers (Hedges *et al.* 2008; Teixeira *et al.* 2008).

Enfin, chez certaines espèces de parasitoïdes, l'association avec un polydnavirus permet aux œufs pondus dans un hôte de contrer les défenses immunitaires de ce dernier et de favoriser ainsi le développement du parasitoïde immature (Roossinck 2011). Ces différents exemples de protections symbiotiques illustrent le rôle important des microorganismes dans l'écologie de leurs hôtes (Clark *et al.* 2010). La compréhension de la dynamique des symbioses protectrices est cruciale pour appréhender les processus évolutifs qui découlent des interactions entre les hôtes, les symbiotes et les ennemis

naturels. C'est ce que nous allons développer dans la prochaine partie.

II. DYNAMIQUE DES SYMBIOSES PROTECTRICES VIS-A-VIS DES ENNEMIS NATURELS

Comme nous avons pu le voir précédemment, un grand nombre de microorganismes symbiotiques sont impliqués dans les défenses de leur hôte face aux stress biotiques et abiotiques du milieu. Étonnamment, malgré le bénéfice évident que représentent de telles associations, leurs fréquences dans les populations d'hôtes restent à des niveaux intermédiaires, voire parfois très faibles (Ferrari *et al.* 2012; Jaenike 2012; Leclair 2016). Pour mieux comprendre leur distribution au sein des populations d'insectes, il est primordial de connaître les différents facteurs qui influencent la dynamique des symbioses protectrices. Plusieurs auteurs ont proposé, à partir de modèles théoriques et d'observations *in situ*, quelles forces évolutives pouvaient maintenir les symbiotes protecteurs à des fréquences intermédiaires dans les populations naturelles (Jaenike 2012; Oliver *et al.* 2014; Vorburger 2014). Parmi ces forces, les bénéfices apportés par la protection symbiotique d'un côté et les coûts qu'impose le symbiote de l'autre jouent un rôle important dans la prévalence des symbiotes dans les populations naturelles. Cette balance coûts-bénéfices détermine l'effet global d'un symbiote protecteur sur la *fitness* de son hôte. En dehors des forces sélectives, plusieurs autres facteurs, non sélectifs, influencent également les fréquences symbiotiques. C'est le cas de la fidélité de la transmission verticale du symbiote, des événements de transmission horizontale, de la migration entre populations et des fluctuations aléatoires des prévalences (**Figure 1**).

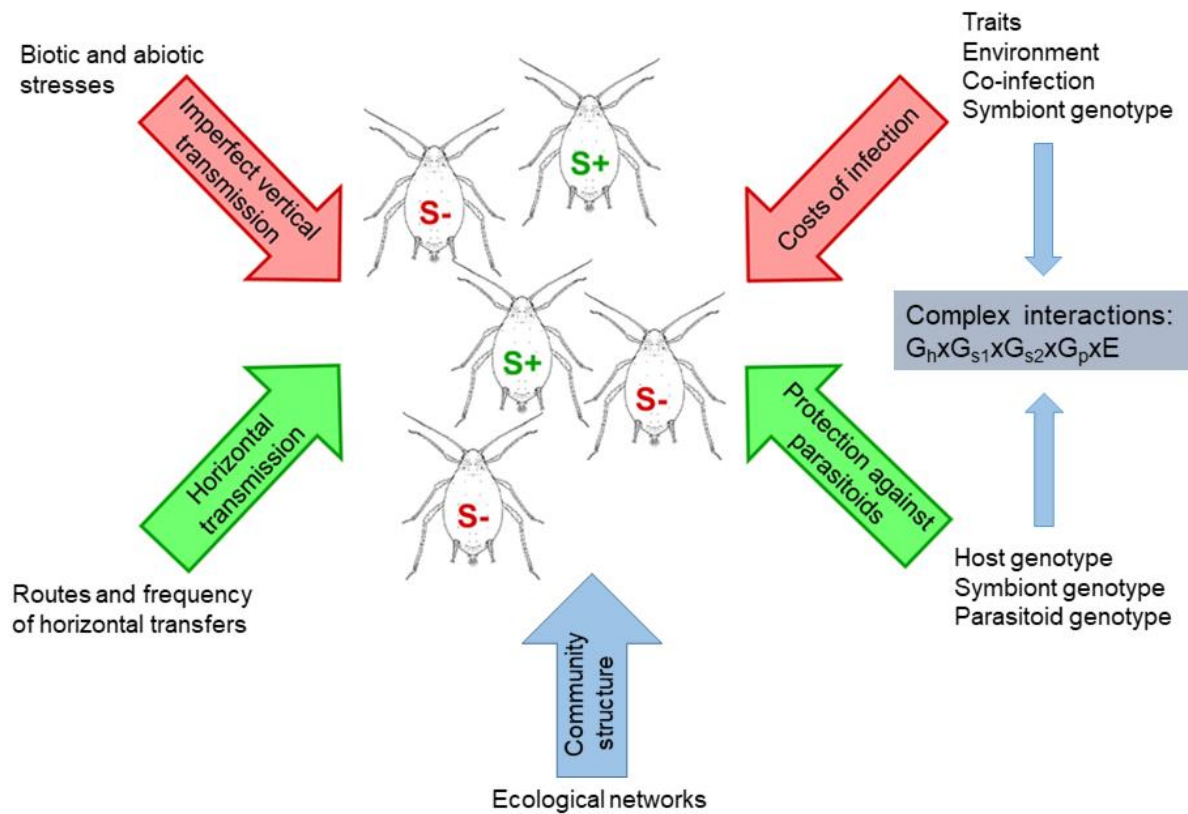


Figure 1 : Facteurs influençant les fréquences des symbiotes protecteurs dans les populations d’hôte (d’après Vorburger 2014).

A. Forces sélectives affectant la fréquence des associations symbiotiques

En modifiant les phénotypes des insectes, les symbiotes protecteurs influencent les réponses aux pressions de sélection qui s’exercent sur leur hôte, ce qui a des répercussions directes sur la dynamique des microorganismes.

1. Variation du phénotype de protection

Les nombreuses études menées sur les symbioses protectrices des insectes ont permis de mettre en évidence la grande variation des phénotypes de protection, qui peut être expliquée en partie par la variabilité génétique qui existe au sein d’une espèce de symbiote (Oliver *et al.* 2005; Russell & Moran 2006; Heyworth & Ferrari 2015; Martinez *et al.* 2017; Parker *et al.* 2017a). Mais si certains symbiotes déterminent à eux seuls le niveau de protection de leur hôte (Martinez *et al.* 2017), ce n’est pas toujours le cas. Chez les pucerons, le niveau de défense contre le champignon pathogène *P. neoaphidis* conféré par une même souche de la bactérie symbiotique *R. insecticola*, varie selon le génotype du

puceron dans lequel elle se trouve (Parker *et al.* 2017a). En plus des variations génétiques de l'hôte et du symbiote, le génotype (individu, population, espèce) de l'antagoniste peut également influencer le succès des défenses symbiotiques. Les études montrent en effet que les protections conférées par les symbiotes sont efficaces uniquement face à certaines espèces ou certains génotypes d'ennemis naturels, qu'il s'agisse de pathogènes (Parker *et al.* 2013, 2017a) ou de parasitoïdes (Schmid *et al.* 2012; Rouchet & Vorburger 2012; Cayetano & Vorburger 2015). Mais le niveau de protection conféré par un symbiote est susceptible d'évoluer au fil des générations, car la place importante de la protection symbiotique dans les défenses de l'hôte et son caractère spécifique peuvent favoriser une coévolution entre les symbiotes protecteurs et les parasites de l'hôte (Vorburger & Perlman 2018). Cela a notamment été observé lors d'une étude d'évolution expérimentale où après quelques générations, des parasitoïdes d'*A. pisum* ont pu contourner une forte résistance associée à la présence d'*H. defensa* (Dion *et al.* 2011b).

En plus des variations génétiques des différents protagonistes, certains paramètres environnementaux comme la température peuvent également affecter les défenses médiées par les microorganismes. Par exemple, la protection contre les parasitoïdes conférée par *H. defensa* ou *F. symbiotica* est réduite lorsque l'hôte est exposé à des températures élevées (Cayetano & Vorburger 2013; Heyworth & Ferrari 2016).

2. Variation des coûts associés à la symbiose

Les symbiotes protecteurs n'apportent pas que des avantages à leurs hôtes car en puisant dans les ressources de l'insecte pour se développer, le symbiote peut induire des coûts de *fitness*. Ces coûts peuvent se manifester de différentes manières : il peut s'agir d'une modification du sex-ratio, d'une réduction de la fécondité ou de la survie, voire d'un retardement de développement (*e.g.*, Chen *et al.* 2000), et ces coûts imposés par les symbiotes peuvent évoluer en fonction de l'âge de l'hôte (Fukatsu *et al.* 2001; Simon *et al.* 2011; Laughton *et al.* 2014). Tout comme le phénotype de protection varie entre les souches d'une même espèce de symbiote, l'intensité des coûts qui leur sont associés varie également : certaines souches diminuent très fortement la *fitness* de l'hôte, d'autres ont peu ou pas d'effet (Dykstra *et al.* 2014) et certaines encore accroissent la *fitness* (Chen *et al.* 2000). Il n'y a pas toujours de trade-off entre le coût imposé par le symbiote et la protection qu'il fournit, un symbiote protégeant son hôte de manière importante peut être

dans certains cas moins coûteux qu'un symbiote faiblement protecteur (Cayetano *et al.* 2015). L'environnement contribue également à la variabilité de l'effet des symbiotes sur les traits d'histoire de vie de l'hôte, car certains coûts ne s'expriment que dans des conditions particulières, comme lorsque l'hôte se nourrit sur certaines espèces de plantes (Leybourne *et al.* 2020a).

En plus de ces coûts constitutifs, les symbiotes peuvent aussi avoir des coûts secondaires (coûts induits ou coûts écologiques) qui peuvent se manifester en présence d'ennemis naturels. Par exemple, *H. defensa* diminue les comportements de défenses de son hôte lorsqu'il est attaqué par un parasitoïde ou un prédateur ce qui peut constituer un coût écologique pour l'hôte, selon le niveau et le type de pression exercée par les ennemis naturels (Dion *et al.* 2011a; Polin *et al.* 2014). Certaines souches de symbiotes protecteurs peuvent également imposer des coûts qui ne se manifestent que lorsque l'hôte est attaqué. Ainsi, chez *A. pisum*, certaines souches d'*H. defensa* peuvent réduire drastiquement la reproduction des pucerons parasités : la protection conduit à la mort du parasitoïde dans l'hôte mais aussi à la stérilité de ce dernier (Leclair *et al.* 2016).

3. Balance coûts-bénéfices

Pour mieux comprendre comment les coûts et les bénéfices liés aux symbiotes peuvent affecter leurs fréquences dans les populations, il est possible de faire le parallèle avec les fréquences des allèles en génétique des populations. Dans un contexte de sélection, les allèles qui sont associés à une meilleure *fitness* vont davantage être transmis aux générations suivantes, augmentant leur fréquence au fil des générations. En assimilant l'acquisition d'un symbiote à l'apparition d'un nouvel allèle par mutation, on peut appliquer un raisonnement similaire (Jaenike 2012) : les symbiotes ayant un effet bénéfique sur la *fitness* de leur hôte devraient accroître leur fréquence dans les populations d'hôte, et ceux qui diminuent la *fitness* devraient décroître en fréquence au fil du temps. Comme les effets phénotypiques des symbiotes sont variables, la variation de *fitness* due à un symbiote protecteur est déterminée par la balance entre les coûts qu'il induit et les bénéfices qu'il confère. Cette balance n'est pas toujours évidente à caractériser car les protocoles expérimentaux ne permettent de mesurer qu'un nombre de traits limité, ce qui donne une vision partielle des effets phénotypiques liés à la symbiose. En revanche, il est possible d'observer la dynamique des symbiotes protecteurs

dans les populations d'hôtes au travers d'expériences d'évolution expérimentale, et ainsi d'identifier la balance coûts-bénéfices en faisant varier différents paramètres environnementaux, comme l'intensité de la pression des ennemis naturels sur les populations hôtes. Dans une étude menée par Oliver *et al.* (2008) sur des pucerons élevés en cage à populations, les chercheurs ont pu mettre en évidence les variations de fréquence d'*H. defensa* en réponse à la présence ou l'absence de parasitoïdes. Lorsque les insectes sont exposés aux ennemis naturels, la fréquence de la bactérie protectrice dans les populations augmente, alors qu'elle diminue en absence de pression. La fréquence intermédiaire des symbiotes protecteurs dans les populations pourrait alors être en partie le résultat d'une sélection fréquence-dépendante négative (Jaenike 2012). En se basant sur l'exemple précédent, cela signifie qu'en augmentant leur fréquence dans la population en réponse à une forte pression parasitaire, les symbiotes protecteurs affectent la population de parasitoïdes en réduisant le nombre de descendants produits. A la génération suivante, la pression parasitaire est donc plus faible et les symbiotes protecteurs moins bénéfiques pour leur hôte, ce qui entraîne la diminution de leur fréquence au sein de la population. Si cette hypothèse est soutenue par une étude de terrain qui montre une corrélation entre la fréquence des symbiotes protecteurs et la prévalence des ennemis naturels au cours du temps (Smith *et al.* 2015), cette observation n'est pas systématique (Leclair 2016), montrant qu'en conditions naturelles, d'autres paramètres environnementaux peuvent également affecter la variation des fréquences de symbiotiques.

4. Infections multiples : épistasie et déséquilibre de liaison

Dans les populations naturelles, il n'est pas rare de trouver plusieurs microorganismes symbiotiques au sein d'un même insecte hôte (Toju & Fukatsu 2011; Ferrari *et al.* 2012). La prise en compte de ces infections multiples est donc primordiale pour pleinement comprendre la dynamique des symbiotes protecteurs, car la présence d'un ou plusieurs partenaires symbiotiques supplémentaires peut affecter la *fitness* de l'hôte de différentes manières.

Si plusieurs symbiotes en coinfection protègent contre un même ennemi naturel, ils peuvent avoir des effets additifs ou encore synergiques sur les défenses de leur hôte (Oliver *et al.* 2014), lui permettant de mieux résister à l'agression que s'il n'était infecté

que par un seul des symbiotes (Oliver *et al.* 2006; Leclair *et al.* 2016). Malgré ce bénéfice, les infections multiples peuvent s'avérer plus coûteuses pour l'hôte en terme de *fitness*, car les besoins des symbiotes augmentent, ce qui peut limiter l'apparition de certaines combinaisons de symbiotes dans les populations naturelles (Oliver *et al.* 2006).

Cependant, comme les microorganismes interagissent entre eux au sein de l'hôte, il arrive que les effets symbiotiques observés en infection multiple diffèrent de ceux en situation de monoinfection. Cela peut conduire à des situations où une coinfection peut être moins coûteuse pour l'hôte qu'une monoinfection, comme par exemple chez *A. pisum* lorsque les pucerons sont coinfectés par *Spiroplasma* et *R. insecticola* (Mathé-Hubert *et al.* 2019a).

En plus de ces différentes situations, il n'est pas rare que les symbiotes en coinfection affectent des traits différents de l'hôte. A l'instar des déséquilibres de liaison en génétique des populations, si dans ce cas de figure le second symbiote affecte positivement la *fitness* de l'insecte ce qui favorise sa transmission à la génération suivante, alors il favorisera également celle du symbiote protecteur (Jaenike 2012). Ce mécanisme peut permettre le maintien des symbiotes protecteurs, en particulier en période de faible pression en ennemis naturels.

B. Autres facteurs affectant la fréquence des associations symbiotiques

Même si les forces sélectives jouent un rôle important dans la dynamique des symbioses protectrices, d'autres facteurs sont également impliqués.

1. Fidélité de la transmission verticale et événements de transmission horizontale

Classiquement, les symbiotes protecteurs sont transmis verticalement, un mode de transmission très fidèle dont le taux de réussite est proche des 100% en conditions contrôlées chez certains insectes comme les pucerons (Chen & Purcell 1997). Cependant, la transmission verticale en conditions naturelles peut être imparfaite, car certaines conditions défavorables, comme des températures extrêmes, peuvent diminuer la fidélité de la transmission (Oliver *et al.* 2014). Dans ce cas, la transmission verticale peut limiter

la dispersion des symbiotes protecteurs dans les populations d'hôtes, c'est notamment le cas pour la bactérie symbiotique *Spiroplasma* chez la drosophile (Jaenike *et al.* 2010).

A l'inverse, les transferts horizontaux de symbiotes peuvent engendrer de nouvelles associations et ainsi favoriser la prévalence de ces symbiotes. Mais la formation d'une nouvelle symbiose n'est pas toujours évidente, comme le montrent les expériences de transfert de symbiotes entre différentes espèces hôtes. Plus l'hôte qui reçoit le symbiote est éloigné génétiquement de celui qui le transmet et moins la nouvelle association est stable, présentant des coûts d'infection parfois très importants pour l'insecte (Łukasik *et al.* 2015; Niepoth *et al.* 2018).

2. Migration et dérive

La migration et la dérive sont deux forces qui, comme leurs équivalents en génétique des populations pour les allèles, peuvent ici affecter les fréquences des symbiotes protecteurs aussi bien positivement que négativement. Les flux migratoires des hôtes peuvent disperser les symbiotes en dehors de leur population d'origine et touchent aussi bien les symbioses qui ont des effets positifs, négatifs ou neutres pour l'hôte. La dérive quant à elle, a généralement lieu plus localement à l'échelle de la population et intervient lorsque les effets des symbiotes sur la *fitness* de l'hôte sont faibles (symbiotes neutres) ou lorsque les conditions locales engendrent une balance coûts-bénéfices équilibrée. Tout comme la dérive génétique, celle qui agit sur les symbiotes affecte de manière stochastique les fréquences des symbiotes neutres, favorisant l'élimination de ceux faiblement représentés dans les populations d'hôtes (Oliver *et al.* 2014). L'intensité de la dérive varie selon la taille de la population d'hôtes, avec un effet fort dans les petites populations et un effet moins important dans les grandes.

III. SYMBIOSE ET COMPORTEMENTS

De nombreuses études ont souligné le rôle primordial des symbiotes dans l'écologie et l'évolution des organismes avec lesquels ils sont associés (Feldhaar 2011; Brucker & Bordenstein 2012; Frago *et al.* 2012). Dans les parties précédentes, nous avons présenté l'importance des symbioses protectrices chez les insectes et les facteurs qui influencent leur dynamique dans les populations d'hôtes. Cependant, certains aspects déterminants

de l'écologie des espèces animales n'ont été encore que très partiellement étudiés par le prisme des microorganismes. C'est le cas des comportements, pourtant capitaux dans la vie des organismes. Ces dix dernières années, un nombre croissant d'études ont démontré l'influence et le rôle potentiellement crucial des symbiotes dans la modulation des traits comportementaux de leurs hôtes, que ce soit chez les insectes (Lewis & Lizé 2015) ou chez des hôtes plus complexes comme les vertébrés (Archie & Theis 2011) dont les humains (Cryan & Dinan 2012). Dans cette partie, nous ferons un point sur les études qui cherchent comment les symbiotes influencent les comportements et quels mécanismes sont suspectés d'intervenir. Puis, nous évoquerons les conséquences évolutives de telles modifications phénotypiques sur les espèces hôtes.

A. Influence des symbiotes sur les comportements et mécanismes associés

Qu'il s'agisse du microbiote intestinal ou des endosymbiotes, les symbiotes peuvent influencer une large gamme de comportements régissant différentes fonctions clés comme la dispersion, l'alimentation, la reproduction.

1. Activité de dispersion et d'exploration

Une étude portant sur les bactéries du microbiote intestinal chez *D. melanogaster* a mis en évidence une augmentation de l'activité locomotrice des individus ainsi que de leur vitesse de déplacement lorsque les mouches ont subi un traitement antibiotique réduisant la diversité de leur microbiote (Schretter *et al.* 2018). Cependant, l'incidence des symbiotes sur les comportements peut varier d'une étude à l'autre : dans un autre travail, les chercheurs n'ont pas trouvé d'effets majeurs du microbiote sur l'activité locomotrice de *D. melanogaster* ou sur d'autres comportements étudiés (Selkrig *et al.* 2018). Comme pour le microbiote intestinal, la présence de certaines bactéries endosymbiotiques comme *Wolbachia* peut affecter l'activité locomotrice de plusieurs espèces d'insectes. Les effets comportementaux associés à ce symbiote peuvent varier selon l'espèce hôte ou la souche de la bactérie, augmentant par exemple l'activité chez une espèce de moustique (Evans *et al.* 2009), mais la réduisant chez une espèce de parasitoïde (Fleury *et al.* 2000). On note également chez certaines espèces de drosophiles des effets symbiotiques qui dépendent de l'association hôte-symbiote considérée (Peng *et al.* 2008).

En plus de l'activité locomotrice basale des organismes, les symbiotes peuvent également influencer les comportements de dispersion des insectes. Chez des espèces de punaises, les bactéries obligatoires sont transmises verticalement de la mère aux descendants de manière externe : la mère dépose les symbiotes sur les œufs ou à côté, puis les larves ingèrent au moment de l'éclosion. Dans deux études portant sur des espèces de punaises différentes, des chercheurs ont pu mettre en évidence des comportements opposés lorsque les insectes sont privés de leur symbiote obligatoire. Chez la punaise *M. punctatissima*, les larves dépourvues de symbiotes présentent une plus forte tendance à explorer leur environnement tandis que les individus avec le symbiote se regroupent et restent immobiles (Hosokawa *et al.* 2008). A l'inverse, chez la punaise *Halyomorpha halys*, les larves dépourvues du symbiote obligatoire sont moins mobiles et continuent de sonder les œufs plus longtemps comparés aux individus ayant pu acquérir le symbiote (Taylor *et al.* 2014). Dans le premier cas où le symbiote semble limiter l'exploration des individus, les auteurs émettent l'hypothèse que ce comportement est une réponse adaptative qui permettrait d'assurer la transmission du symbiote tout en limitant la dépense d'énergie liée à l'activité d'exploration (Hosokawa *et al.* 2008). Chez l'autre espèce où le symbiote favorise la dispersion des individus, les auteurs avancent l'hypothèse que les larves ayant acquis le symbiote obligatoire se dispersent tandis que les individus sans symbiotes continuent de sonder les œufs plus longtemps pour acquérir le symbiote avant de se disperser (Taylor *et al.* 2014). Cependant, dans les deux cas, les mécanismes par lesquels les symbiotes influencent le comportement de leur hôte ne sont pas connus.

2. Comportements alimentaires

En plus d'affecter l'activité locomotrice et la dispersion, les symbiotes peuvent également influencer les comportements liés à la quête et à la sélection des ressources alimentaires. Chez les pucerons, le comportement de ponction, qui permet aux insectes d'évaluer la qualité de la plante hôte, peut être influencé par certains symbiotes secondaires. Par exemple, les individus des espèces *A. craccivora* et *Rhopalosiphum padi* infectés par *H. defensa* réalisent moins de tests gustatifs que les individus sans symbiote (Angelella *et al.* 2018; Leybourne *et al.* 2020b), alors que ceux infectés par *Arsenophonus* présentent une augmentation de la fréquence de ce comportement (Angelella *et al.* 2018).

Chez les mouches, c'est la réceptivité à la source nutritive et la motivation alimentaire des individus qui peuvent être influencées par les endosymbiotes ou le microbiote intestinal. Les études portant sur *Wolbachia* ont ainsi mis en évidence que les drosophiles infectées par cette bactérie sont davantage attirées par une source nutritive, que ce soit au cours d'expériences en laboratoire (Peng *et al.* 2008; Peng & Wang 2009) ou en milieu naturel (Caragata *et al.* 2011). Comme pour les effets sur l'activité locomotrice, l'intensité de la modification comportementale chez les mouches est spécifique à chaque association hôte-symbiote (Peng *et al.* 2008). Dans leur étude, Peng et Wang (2009) ont cherché les mécanismes à l'origine de ces modifications et ils ont pu montrer l'implication de *Wolbachia* dans la régulation de l'expression d'un gène de récepteur olfactif. Ainsi, la modification de l'attractivité d'une source nutritive pourrait être liée à la capacité des symbiotes à moduler la perception des odeurs ou plus généralement des stimuli sensoriels perçus par leur hôte.

Concernant le microbiote, il a été montré que lorsqu'on élimine les bactéries intestinales chez la mouche *Bactrocera dorsalis*, les individus réagissent plus vite à la présence de nourriture lors d'un jeûne, passent plus de temps à se nourrir, consomment plus de nourriture et sont contraints de se nourrir sur des milieux riches en acides aminés essentiels (Akami *et al.* 2019). Les auteurs précisent que les effets comportementaux observés ici sont certainement liés à l'absence des symbiotes, qui a pour conséquence d'abaisser le seuil de réponse aux stimuli visuels et olfactifs associés à la nourriture. Ils font l'hypothèse qu'en temps normal, le microbiote affecte l'état physiologique des individus, les rendant moins réceptifs à la nourriture (Akami *et al.* 2019). Mais la composition du microbiote peut également modifier la préférence alimentaire des mouches. Plusieurs études montrent que les espèces bactériennes qui infectent les individus influencent la préférence pour certaines sources de nourriture en fonction de leur richesse en acides aminés essentiels (Leitão-Gonçalves *et al.* 2017) et des communautés bactériennes présentes dans les différentes sources nutritives (Wong *et al.* 2017; Qiao *et al.* 2019).

Tout comme les bactéries, les virus peuvent également influencer les comportements des organismes qui les portent, que l'insecte soit l'hôte définitif du virus ou un simple vecteur de transmission comme dans le cas des virus de plantes. En effet, il a été montré chez le puceron *R. padi*, que les individus sains (sans virus) évitent les plantes infestées

par des pucerons infectés par le virus RhPV. Dans le cas des virus de plantes, certains peuvent également affecter les comportements alimentaires de leur insecte vecteur afin de favoriser leur transmission (Ingwell *et al.* 2012; Moreno-Delafuente *et al.* 2013; Davis *et al.* 2017). Par exemple, le virus TYLCV peut induire une augmentation des comportements de piquûre et de nourrissage chez *B. tabaci* (Moreno-Delafuente *et al.* 2013). Chez les pucerons, les individus de *R. padi* infectés par le virus BYDV choisissent préférentiellement les plantes saines tandis que les pucerons non porteurs sont davantage attirés par les plantes infectées par le virus (Ingwell *et al.* 2012).

3. Comportements reproducteurs

La reproduction est l'une des fonctions les plus importantes chez un organisme et les symbiotes peuvent également en influencer les comportements. En plus de ses nombreux effets en tant que manipulateur de reproduction, la bactérie *Wolbachia* est impliquée dans la modification de multiples comportements reproducteurs (Goodacre & Martin 2012). Parmi ses effets, la bactérie peut augmenter le taux de reproduction des mâles qui la portent (De Crespigny *et al.* 2006). Par ailleurs, cette bactérie peut aussi jouer un rôle dans le choix du partenaire sexuel comme par exemple chez les drosophiles. Plusieurs études ont ainsi montré que lorsqu'elles sont infectées par *Wolbachia*, les mouches issues de populations ou de sous-populations différentes s'accouplent préférentiellement entre individus apparentés, alors que la suppression du symbiote augmente les chances des accouplements entre individus de populations d'origines différentes (Koukou *et al.* 2006; Miller *et al.* 2010). Le choix du partenaire sexuel se fait très souvent sur la base d'indices olfactifs ; il est donc possible que les microorganismes affectent l'émission de tels composés, modifiant ainsi les choix de leur hôte. Dans le dernier exemple, Koukou *et al.* (2006) font l'hypothèse que *Wolbachia* altère les profils des phéromones sexuels chez les mâles ou les femelles. Cependant, le lien entre les symbiotes, la modification de la chimie de l'hôte et les effets comportementaux reste encore très peu documenté dans la littérature (Engl & Kaltenpoth 2018). Enfin, certaines souches de la bactérie peuvent également influencer le choix du site de ponte. Toujours chez la drosophile, il a été montré que les individus porteurs de *Wolbachia* ne montrent pas de préférence pour un substrat particulier, alors que les individus sans la bactérie choisissent préférentiellement un site de ponte ressemblant à celui dont ils sont originaires (Panteleev *et al.* 2007). Mais d'autres microorganismes peuvent également influencer ce choix, comme par exemple les

bactéries présentes dans l'environnement (Liu *et al.* 2017). Chez les parasitoïdes, le choix de l'hôte peut aussi être influencé par certaines bactéries symbiotiques comme cela a pu être montré chez l'hyménoptère parasitoïde *Encarsia* (Zchori-Fein *et al.* 2001; Kenyon & Hunter 2007).

Outre les préférences de partenaires sexuels, de sites de ponte ou d'hôte, les microorganismes peuvent également affecter d'autres types de comportements liés à la reproduction, comme la durée d'accouplement (Morimoto *et al.* 2017). Certains virus, peuvent aussi induire des comportements rares, comme le superparasitisme chez les insectes parasitoïdes, ce qui favorise la transmission des virus (Varaldi *et al.* 2003, 2006).

4. Interactions entre organismes

En plus de leur influence sur les relations entre les individus d'une même espèce lors de la reproduction, les symbiotes peuvent également jouer un rôle important dans les interactions intra et interspécifiques. Chez les fourmis par exemple, la modification du microbiote intestinal a pour conséquence de modifier les interactions avec les autres organismes. Par exemple, Teseo *et al.* (2019) ont montré que la suppression du microbiote chez *Acromyrmex echinator* entraîne une augmentation des comportements d'agression entre les fourmis, qu'elles soient ou non de la même colonie. Chez d'autres espèces de fourmis, la modification du microbiote peut entraîner une augmentation des agressions interspécifiques, conduisant à une diminution de la survie (Lester *et al.* 2017).

De plus, les symbiotes peuvent affecter les interactions entre proies et ennemis naturels. Chez le puceron du pois, *A. pisum*, la bactérie *H. defensa* peut réduire les défenses comportementales de son hôte lorsque celui-ci se trouve face à un parasitoïde ou un prédateur (Dion *et al.* 2011a; Polin *et al.* 2014). Parfois, l'influence du symbiote s'étend au-delà de son hôte et peut également affecter les comportements des ennemis naturels. Ainsi, la présence d'un symbiote protecteur peut influencer la sélection des hôtes chez les insectes parasitoïdes : les femelles parasitoïdes du puceron des céréales *S. avenae* préfèrent parasiter des hôtes non porteurs d'*H. defensa* (Łukasik *et al.* 2013a). Le statut symbiotique des hôtes peut également influencer le comportement de ponte des femelles parasitoïdes : lorsque les femelles du parasitoïde *Aphidius ervi* parasitent des individus du puceron du pois infectés par *H. defensa*, elles y déposent plusieurs œufs (superparasitisme), un comportement qui permet de supplanter la protection conférée

par le symbiote (Oliver *et al.* 2012).

Les symbiotes des proies ne sont pas les seuls à influencer les relations hôte-parasite. En effet, une étude récente a fait le lien entre la présence d'un virus de parasitoïde et l'altération des comportements de l'hôte du parasitoïde (Dheilly *et al.* 2015). Chez une espèce de parasitoïde de coccinelle, *Dinocampus coccinellae*, les femelles peuvent porter le virus à ARN DcPV, qui est injecté dans la coccinelle au moment de l'oviposition. Dans leur étude, Dheilly *et al.* (2015) ont mis en évidence la coïncidence entre la paralysie qui survient au moment de la pupation du parasitoïde à l'extérieur de la coccinelle et la répllication du DcPV dans les tissus nerveux de la coccinelle. Si aucun lien direct entre les deux événements n'a pu être fait, cette étude montre que le début de la manipulation comportementale est corrélé à l'activité virale et que lorsque le virus disparaît, la coccinelle retrouve des comportements normaux.

Si l'influence des symbiotes sur de nombreux traits comportementaux a été observé chez les insectes, les mécanismes impliqués dans ces modifications sont encore majoritairement inconnus ou peu étudiés. Plusieurs pistes ont pu être proposées en combinant les expériences comportementales et les approches moléculaires. Ainsi, les études suggèrent que l'influence des symbiotes sur les comportements peut se faire de deux manières : soit directement, via la production de molécules par les microorganismes qui pourraient directement interagir avec les neurones ou les organes sensoriels des insectes (Fischer *et al.* 2017) ; soit indirectement via la modification ou la régulation du métabolisme, du système endocrinien, du système immunitaire, des voies neuronales sensorielles ou de la production de phéromones (Engl & Kaltenpoth 2018; Lynch & Hsiao 2019).

B. Conséquences écologiques et évolutives des modifications comportementales

Tout comme lorsqu'ils influencent d'autres traits phénotypiques (Feldhaar 2011; Frago *et al.* 2012), les symbiotes peuvent avoir un impact très important sur l'écologie et l'évolution de leur hôte en altérant ses comportements. Notamment, l'association d'un insecte avec un microorganisme peut modifier ses interactions avec son environnement biotique, comme ses ressources alimentaires, ses partenaires sexuels, ses ennemis naturels (Frago *et al.* 2012) ou ses compétiteurs (Patot *et al.* 2012). Dans certains cas, les

effets négatifs des symbiotes sur les comportements peuvent permettre à des espèces moins compétitives de se maintenir face aux espèces plus compétitives (Patot *et al.* 2012).

En modifiant certains comportements clefs, comme la reproduction ou le choix de la ressource alimentaire par exemple, les symbiotes peuvent également agir sur l'évolution de leur hôte (Goodacre & Martin 2012; Lewis & Lizé 2015). Dans le cas où les symbiotes contribuent directement ou indirectement à l'isolement reproducteur des hôtes entre eux, on peut même s'attendre à ce que la symbiose puisse favoriser les événements de spéciation (Koukou *et al.* 2006; Miller *et al.* 2010; Vavre & Kremer 2014; Shropshire & Bordenstein 2016).

IV. PROBLEMATIQUE DE LA THESE

Comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, le rôle des microorganismes symbiotiques dans l'expression des phénotypes des organismes hôtes est de plus en plus reconnu, tout comme leur implication dans les interactions au sein des réseaux trophiques et dans l'évolution des espèces. Certains chercheurs proposent à ce titre de reconsidérer la théorie de l'évolution, en plaçant les microorganismes au centre des processus de sélection, considérant l'holobionte comme unité de sélection plutôt que chacun des organismes qui le compose.

Malgré les avancées majeures des 30 dernières années qui ont permis de renforcer la compréhension des associations symbiotiques, certaines facettes des effets symbiotiques, comme leur influence sur les comportements et les conséquences écologiques et évolutives qui en découlent restent encore peu explorées. L'objectif de cette thèse est donc de mieux comprendre l'importance des microorganismes symbiotiques dans les interactions entre l'hôte et son environnement biotique en se focalisant notamment sur la dimension comportementale. Pour cela il est primordial de caractériser les effets des symbiotes sur les comportements impliqués dans les interactions biotiques et de les mettre en lien avec les autres modifications phénotypiques qu'ils induisent.

V. MODELE D'ETUDE : LE PUCERON DU POIS *ACYRTHOSIPHON PISUM* ET SON CORTEGE DE SYMBIOTES

Le puceron du pois, *A. pisum*, est une espèce d'insecte phytophage de type piqueur-suceur qui s'attaque à différentes espèces de plantes de la famille des fabacées. Cette espèce de puceron se reproduit à la fois sexuellement et par parthénogénèse selon la période de l'année (Blackman 1987). Du printemps à l'automne, les femelles parthénogénétiques se reproduisent sur plusieurs générations en donnant naissance à de nouvelles femelles parthénogénétiques. Au sein de ces femelles, les embryons se développent en formant une chaîne embryonnaire, permettant une production rapide et régulière de nouveaux descendants. Lorsque la durée du jour commence à diminuer, les femelles produisent alors des mâles et des femelles sexués afin de produire des descendants sous forme d'œuf, plus résistants aux conditions hivernales. Au début du printemps, de nouvelles femelles parthénogénétiques appelées fondatrices émergent des œufs pour former de nouvelles colonies et recommencer le cycle (ce mode de reproduction est appelé parthénogénèse cyclique). Il est à noter que certaines lignées de ce puceron ne réagissent pas aux changements photopériodiques et continuent alors à se reproduire sous forme parthénogénétique (ce mode de reproduction est la parthénogénèse obligatoire).

A. Sa spécialisation écologique

Malgré sa capacité à coloniser une vingtaine de genres de plantes de la famille des légumineuses (Fabacées), les pucerons de l'espèce *A. pisum* possèdent en fait une gamme d'hôte relativement restreinte. En effet, *A. pisum* forme un complexe de biotypes, un ensemble de populations chacune spécialisée sur une ou quelques espèces de plantes uniquement. A ce jour, 15 biotypes ont été décrits dans la littérature, aussi bien sur des espèces de légumineuses cultivées que sauvages (Peccoud *et al.* 2009, 2015). D'un point de vue génétique, les biotypes se différencient les uns des autres (Ferrari *et al.* 2006, 2008; Peccoud *et al.* 2009, 2015) à cause des faibles flux de gènes entre les populations, liés à la contre-sélection des migrants et des hybrides (Via *et al.* 2000). En effet, les pucerons des différents biotypes présentent une meilleure performance sur leur plante hôte que sur les espèces de plantes alternatives, ce qui se traduit par une survie et une fécondité plus

importante (Via *et al.* 2000; Ferrari & Godfray 2006; Ferrari *et al.* 2006, 2008). Il a également été montré chez certains biotypes que ces performances améliorées sur la plante hôte étaient corrélées à une plus grande préférence des pucerons pour cette plante (Via 1999; Caillaud & Via 2000). En plus de leur plante hôte, les pucerons de tous les biotypes peuvent également se reproduire sur la féverole, *Vicia faba* qui est ainsi communément désignée comme la plante universelle du puceron du pois.

B. Son cortège de symbiotes

Comme nous l'avons évoqué dans les parties précédentes, le puceron du pois héberge une bactérie endosymbiotique obligatoire, *B. aphidicola*. Cette bactérie permet aux pucerons de compenser la faiblesse nutritionnelle du phloème des plantes en produisant pour son hôte plusieurs éléments nutritifs (acides aminés essentiels et vitamines) absents de son régime alimentaire (Douglas & Prosser 1992; Douglas 1998). Ce symbiote primaire n'est pas libre dans l'organisme, les bactéries se regroupent dans des cellules particulières appelées bactériocytes, elles-mêmes contenues dans une structure bilobée dans la cavité abdominale des pucerons, le bactériome (Baumann *et al.* 1995). Il s'agit donc d'un endosymbiote intracellulaire.

En plus de leur symbiote obligatoire, le puceron du pois peut également former des symbioses facultatives avec huit autres espèces de bactéries : *F. symbiotica*, *H. defensa*, *R. insecticola*, *Rickettsia sp.*, *Rickettsiella sp.*, *Spiroplasma* et *Wolbachia* (Zytynska & Weisser 2016; Guo *et al.* 2017). A noter qu'il existe un doute sur la réalité des associations du puceron du pois avec *Wolbachia* (Gauthier *et al.* 2015; Guyomar *et al.* 2018). Les pucerons peuvent être infectés par un ou plusieurs symbiotes facultatifs, menant à des situations de co-infection assez répandues dans les populations naturelles. La plupart des pucerons du pois sont infectés par au moins un symbiote facultatif (85% des individus en France, Simon données personnelles). Par contre la répartition des espèces de symbiotes au sein des populations spécialisées de pucerons du pois n'est pas homogène et plusieurs études ont pu mettre en évidence des communautés de symbiotes structurées par le biotype de leur hôte puceron (Simon *et al.* 2003; Ferrari *et al.* 2012; Henry *et al.* 2013; Mathé-Hubert *et al.* 2019b). Concernant les effets phénotypiques des différents symbiotes secondaires d'*A. pisum*, on retrouve une grande partie des phénotypes évoqués dans les parties précédentes, comme par exemple la capacité de dispersion, la tolérance aux stress

environnementaux, les défenses contre les ennemis naturels ou encore la relation à la plante hôte (Oliver *et al.* 2010).

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux symbiotes secondaires du puceron du pois : *H. defensa* et *R. insecticola*. Pour rappel, ces deux espèces sont principalement étudiées pour leur rôle dans la protection des pucerons contre leurs ennemis naturels, plus particulièrement des parasitoïdes pour *H. defensa* (Oliver & Higashi 2019) et des champignons pathogènes pour *R. insecticola* (Ferrari *et al.* 2004; Scarborough *et al.* 2005) même si ce dernier peut conférer une protection contre plusieurs parasitoïdes chez le puceron *M. persicae* (Vorburger *et al.* 2010). Cependant, plusieurs études ont également mis en évidence le potentiel rôle de ces symbiotes dans la relation des pucerons à leur plante hôte. Dans le cas de *R. insecticola*, Tsuchida *et al.* (2004, 2011) ont montré que la présence de la bactérie chez les pucerons améliore leurs performances sur le trèfle alors qu'elle diminue celles sur d'autres espèces de plantes. Pour *H. defensa*, une étude récente montre que l'infection par cette bactérie peut affecter les comportements de nutrition des pucerons (Leybourne *et al.* 2020b).

C. Son intérêt comme modèle d'étude

La diversité des symbiotes secondaires qui infectent *A. pisum* est relativement limitée, ce qui rend plus simple son étude. De plus, les phénotypes étendus associés à plusieurs espèces de symbiotes, dont *H. defensa* et *R. insecticola*, ont été largement étudiés ces dernières années, fournissant une bonne base de connaissance pour appréhender plus largement le rôle des symbiotes dans les interactions avec leur environnement biotique, au-delà de l'aspect comportemental qui sera plus particulièrement étudié ici. Par ailleurs, comme chez de nombreux aphides, *A. pisum* se reproduit de manière clonale la plupart du temps, il est donc possible de décomposer plus facilement les effets du génotype de l'hôte, du (ou des) symbiote(s) et de leur interaction.

VI. OBJECTIFS DE LA THESE

Cette partie introductive de la thèse a permis de rendre compte de la diversité des associations symbiotiques chez les insectes, autant du point de vue des acteurs microbiens en jeu, que du point de vue de leurs effets sur les phénotypes des espèces

hôtes. En altérant les traits des organismes vivants, les symbiotes influencent la manière dont ces organismes perçoivent leur environnement local et interagissent avec lui. La littérature florissante témoigne du rôle primordial des microorganismes symbiotiques dans l'écologie et l'évolution de leurs hôtes. Plus récemment, les chercheurs se sont intéressés aux incidences comportementales des associations symbiotiques, jusque-là quelque peu négligées. Une quantité grandissante d'études montrent l'implication des microorganismes dans des comportements clefs des organismes, comme la reproduction ou la nutrition, révélant davantage l'importance des associations symbiotiques sur l'écologie et évolution de leurs porteurs. Cependant les exemples d'effets des symbiotes sur les comportements impliqués dans les interactions biotiques des insectes sont encore rares et se concentrent sur un petit nombre de modèles d'études. Dans cette thèse, nous proposons donc d'étudier l'influence des symbiotes microbiens sur les interactions biotiques des insectes en insistant sur la composante comportementale de ces interactions. En particulier, nous focaliserons notre attention sur les relations entre les insectes phytophages et leur plante hôte ou leurs ennemis naturels.

Chez notre modèle d'étude, *A. pisum*, de nombreux effets phénotypiques associés aux associations symbiotiques ont été montrés et sont bien documentés. Quelques études prometteuses révèlent également des effets sur les comportements de défenses ou certains comportements alimentaires. Par ailleurs, les communautés symbiotiques chez *A. pisum* sont associés à la spécialisation écologique de cette espèce, ce qui pourrait suggérer l'éventuelle implication des symbiotes dans cette spécialisation, même si d'autres explications sont également possibles.

Le premier objectif de cette thèse a été de créer le matériel biologique qui a permis de répondre aux questions formulées. Le puceron du pois présente l'avantage d'avoir une communauté symbiotique « facilement » manipulable. La manipulation du cortège symbiotique chez cette espèce parthénogénétique permet notamment de comparer dans les expériences des individus génétiquement identiques, ne différant que par leur statut symbiotique, ce qui est un avantage considérable dans l'étude de phénotypes très variables comme les comportements. Le premier chapitre de cette thèse se concentrera donc sur l'optimisation des méthodes de création des lignées de pucerons qui ont ensuite été utilisées dans les différentes expériences de la thèse (cf **Chapitre 1**). Les chapitres suivants reprennent les trois principales questions posées au cours de la thèse. Ces

questions concernent l'influence des symbiotes sur les relations entre les pucerons hôtes et différents éléments de leur réseau d'interactions (**Figure 2**).

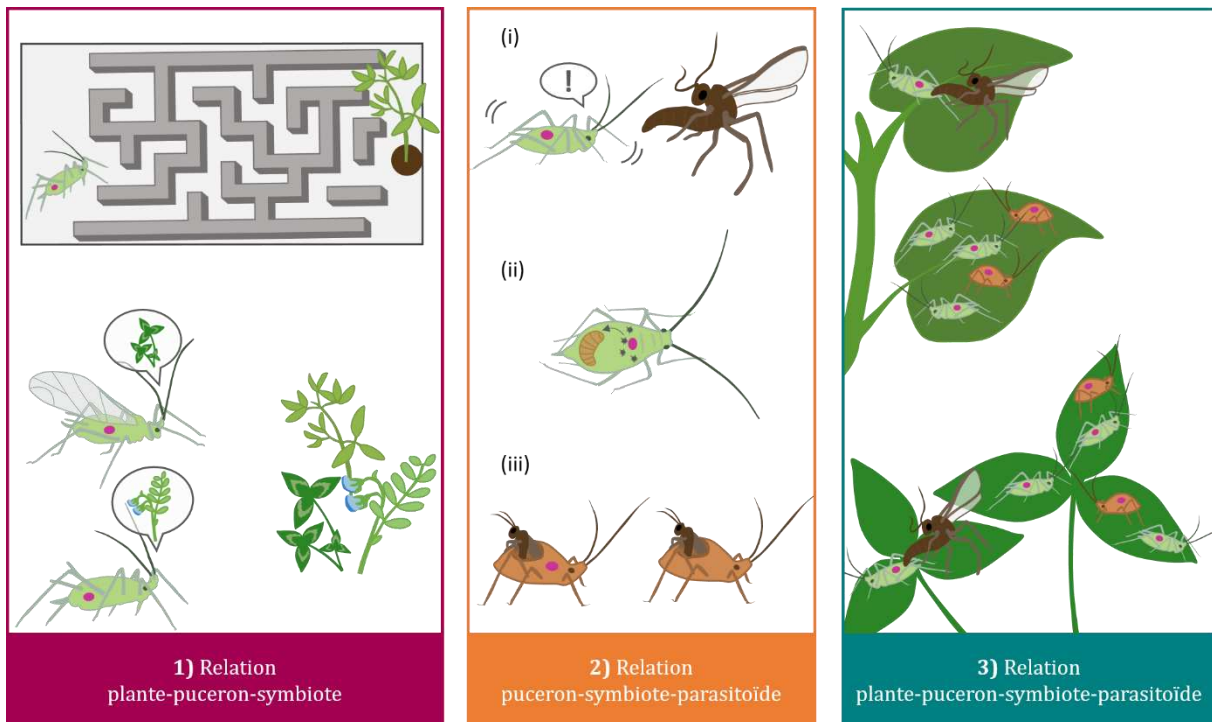


Figure 2 : Schéma représentant les différentes interactions biotiques étudiées au cours de la thèse. 1) Etude de l'incidence des symbiotes sur la relation plante-puceron (effets des symbiotes sur les capacités d'exploration à courte et longue distances, et sur la sélection de la plante hôte) ; 2) Etude de l'incidence des symbiotes sur la relation puceron-ennemi naturel (effets des symbiotes sur (i) les comportements de défense des pucerons, (ii) le niveau de protection et (iii) les traits d'histoire de vie des parasitoïdes émergents des pucerons parasités) ; 3) Incidence de la plante hôte sur les phénotypes conférés par les symbiotes protecteurs (effet de la plante sur les phénotypes de protection et sur les coûts induits par la symbiose et par la protection symbiotique).

Différentes interactions biotiques ont été étudiées au cours de cette thèse :

1) En quoi les symbiotes influencent-ils la relation entre son porteur et sa plante hôte ?

Le chapitre 2 du manuscrit présentera deux études expérimentales ayant eu pour objectifs d'identifier le rôle du statut symbiotique d'un puceron sur ses comportements associés à la recherche et la sélection d'une ressource alimentaire (**Figure 2.1** : relation plante-puceron-symbiote, cf **Chapitre 2**). En utilisant des lignées aphidiennes spécialisées différant par leur composition symbiotique, les comportements suivants ont été étudiés : l'exploration à longue et courte distance, la capacité à trouver une plante dans un environnement plus ou moins complexe et la capacité à sélectionner la plante hôte parmi plusieurs plantes.

2) En quoi les symbiotes influencent-ils les interactions avec les parasitoïdes ?

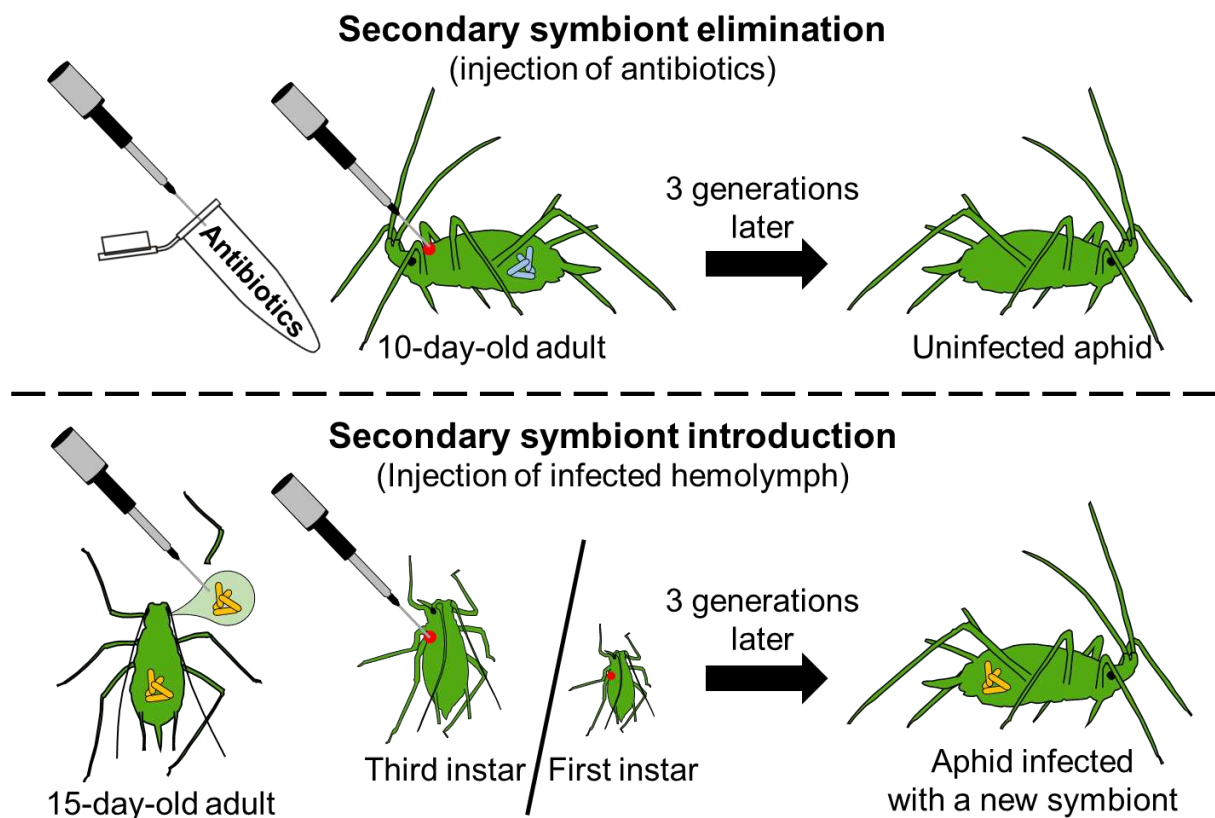
Le chapitre 3 du manuscrit présentera une approche expérimentale dont l'objectif était d'identifier les effets des symbiotes sur les différentes étapes d'une interaction entre un insecte et son insecte parasitoïde (**Figure 2.2** : relation puceron-symbiote-ennemi naturel, cf **Chapitre 3**). En utilisant des lignées aphidiennes différant par leur cortège symbiotique, nous avons étudié l'incidence des symbiotes sur (i) les comportements de défense des pucerons lors de l'attaque du parasitoïde, (ii) en cas de parasitisme, le niveau de résistance des pucerons et (iii) en cas de développement du parasitoïde, les traits d'histoire de vie des parasitoïdes émergents (effets collatéraux des associations symbiotiques sur les ennemis naturels).

3) En quoi la plante influence-t-elle les interactions tripartites hôte-symbiote-ennemi naturel ?

Le chapitre 4 du manuscrit décrira une étude expérimentale faisant le lien entre la plante hôte d'un puceron et son potentiel de résistance vis-à-vis des insectes parasitoïdes, résistance conférée par des symbiotes protecteurs (**Figure 2.3** : relation plante-puceron-symbiote-ennemi naturel, cf **Chapitre 4**). En plaçant sur différentes espèces de plantes des pucerons infectés ou non par des symbiotes protecteurs, nous avons identifié si les phénotypes associés aux symbioses protectrices varient selon la plante utilisée par les pucerons (plasticité des phénotypes symbiotiques).

La discussion générale intégrera les différents résultats obtenus au cours de cette thèse afin de proposer des hypothèses quant aux effets des symbiotes sur les comportements de leurs porteurs, et leurs phénotypes plus généralement ; et les conséquences de ces effets phénotypiques sur les interactions entre les porteurs et leur environnement biotique.

CHAPITRE 1 : OPTIMISATION DES TECHNIQUES DE MANIPULATION DES CORTEGES SYMBIOTIQUES



Afin d'étudier l'incidence des associations symbiotiques sur les comportements et d'autres phénotypes des insectes, l'une des approches expérimentales consiste à créer des lignées d'insectes avec et sans symbiotes et de comparer leurs phénotypes. Deux méthodes peuvent être utilisées voire combinées : l'une repose sur l'élimination des symbiotes et l'autre sur le transfert de symbiotes d'un hôte donneur vers un insecte receveur. En modifiant les cortèges symbiotiques, il est ainsi possible d'estimer plus précisément la contribution relative des symbiotes sur les phénotypes de leur hôte. De plus, ces méthodes permettent d'évaluer la spécificité des effets phénotypiques en observant l'effet d'une même souche de symbiote dans plusieurs génotypes d'hôtes et de plusieurs souches de symbiotes dans un même génotype d'hôte.

Chez les pucerons, les méthodes d'élimination et d'introduction de symbiotes secondaires sont développées depuis le début des années 2000, mais les techniques varient d'un laboratoire à l'autre et les facteurs qui influencent la réussite de la manipulation des cortèges symbiotiques ne sont pas clairement identifiés, rendant parfois difficile l'obtention des associations symbiotiques désirées. Ce premier chapitre (cf **Article 1**) présente la méthode qui a permis de créer les lignées artificielles de pucerons utilisées dans les expériences des chapitres 2 et 3. Dans cet article, nous avons comparé plusieurs méthodes d'élimination et d'introduction de symbiotes secondaires du puceron du pois afin de comprendre quels facteurs influencent leur succès et d'optimiser les protocoles pour manipuler les cortèges symbiotiques des insectes. Pour la technique d'élimination, nous avons testé plusieurs associations symbiotiques naturelles présentant soit *H. defensa* soit *R. insecticola* en leur administrant différents traitements antibiotiques. Pour la technique d'introduction, nous avons créé de nouvelles associations symbiotiques en croisant plusieurs lignées donneuses et receveuses et en examinant l'effet de l'âge des pucerons receveurs sur le succès d'introduction. Cette étude a ainsi montré que ces différents paramètres jouent un rôle important dans le succès de la manipulation des cortèges symbiotiques chez les pucerons, mais aussi que ce taux de réussite dépend du couple puceron-symbiote considéré.

La mise au point de protocoles plus précis, et permettant un succès de manipulation des cortèges symbiotiques plus important nous a permis d'obtenir toutes les lignées de pucerons souhaitées pour réaliser les travaux présentés dans cette thèse.

Examination of the success rate of secondary symbiont manipulation by microinjection methods in the pea aphid system

Corentin Sochard¹ , Stéphanie Morlière², Grégory Toussaint², Yannick Outreman¹, Akiko Sugio² & Jean-Christophe Simon^{2*} 

¹Agrocampus Ouest, UMR IGEPP INRAE, Université de Rennes 1, Rennes, France, and ²IGEPP, Agrocampus Ouest, INRAE, Université de Rennes 1, 35650 Le Rheu, France

Accepted: 23 October 2019

Key words: *Acyrtosiphon pisum*, bacterial symbionts, antibiotics, symbiont horizontal transfer, *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola*, Hemiptera, Aphididae

Abstract

Insects harbor a wide range of microbial symbionts, but their influence on host phenotypes is described in a limited number of biological models. One experimental approach to gain knowledge on the effects of symbionts to their hosts is to create insect lines with and without symbionts and examine their phenotypes. However, the success rate of symbiont elimination and introduction methods is dependent on several parameters that are scarcely tested or described. The pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphididae), is a model insect of symbiosis studies. It harbors a primary symbiont that supplies the host with essential amino acids, and an array of secondary symbionts whose effects have been assessed by manipulating their presence/absence in the insect. Here, we describe the influence of key parameters on the success rate of symbiont manipulation using the pea aphid–secondary symbiont system. We compared two elimination methods differing in antibiotic treatment using several aphid–symbiont combinations. We also created new aphid host–symbiont combinations by secondary symbiont introduction and examined the effects of larval stage of recipient aphids on introduction success. Our study revealed that the aphid–symbiont combination has strong influence on both symbiont introduction and elimination success rates, and that the type of antibiotics and the larval stage of recipient aphids influence the elimination and introduction success rate, respectively.

Introduction

Insects harbor a wide range of microorganisms, and there is growing evidence for the influence of these microbial symbionts on many aspects of their hosts' biology, ecology, and evolution (Feldhaar, 2011). Among insect symbionts, aphid symbionts are some of the best studied. Aphids are known to harbor a primary bacterial symbiont (*Buchnera aphidicola*) which is essential to its hosts and provides amino acids missing in the diet (Douglas, 1998). Aphids can also host an array of secondary symbionts from

different bacterial lineages, which are not essential for host survival but may bring various traits such as protection against natural enemies and tolerance to heat stress (Oliver et al., 2010; Guo et al., 2017). However, in many cases, the actual benefits and costs that these symbionts may entail for their aphid hosts remain unclear and depend on complex interactions between host and symbiont genotypes and environmental conditions (Heyworth & Ferrari, 2016; Sochard et al., 2019; Zytynska et al., 2019). In this context, symbiont studies are facilitated in the aphid system because (1) the composition of secondary symbionts can be manipulated by elimination and transfection methods, and (2) the respective effects of host and symbiont genotypes and their interactions can be disentangled due to clonal reproduction of aphids. As a model system for aphid symbiosis, *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphididae) secondary symbionts have been widely studied and

*Correspondence: Jean-Christophe Simon, IGEPP, Agrocampus Ouest, INRAE, Université de Rennes 1, 35650 Le Rheu, France.
E-mail: jean-christophe.simon@inrae.fr
Yannick Outreman, Akiko Sugio, and Jean-Christophe Simon contributed equally to this work

multiple secondary symbiont manipulation methods were first developed in this species (Chen & Purcell, 1997; Koga et al., 2003; Douglas et al., 2006; McLean et al., 2011). For this reason, we only present secondary symbiont elimination and introduction methods in *A. pisum* hereafter.

Since the discovery of secondary symbionts in *A. pisum* (Griffiths & Beck, 1973), various techniques have been developed to experimentally remove them in order to investigate their effects on their hosts. These techniques eliminate specifically the secondary symbionts, leaving intact the primary symbiont, otherwise aposymbiotic aphids would die without producing any offspring (Griffiths & Beck, 1974). Elimination methods of secondary symbionts of *A. pisum* are summarized in Table 1. Koga et al. (2003) first eliminated *Serratia symbiotica* in *A. pisum* using microinjections of ampicillin. They further tested various doses of antibiotics and had best rate of success by injecting $1 \mu\text{g ampicillin mg}^{-1}$ aphid body weight (Koga et al., 2007). *Regiella insecticola* and *Rickettsia* sp. were also eliminated using microinjections of ampicillin (Leonardo, 2004; Sakurai et al., 2005; Simon et al., 2011), but this method failed to remove *Hamiltonella defensa* (Leonardo,

2004). One study also selectively eliminated *S. symbiotica* with ampicillin using an artificial medium supplemented with the antibiotic to feed *A. pisum* (Skaljic et al., 2018). Other methods using a cocktail of ampicillin, cefotaxime, and gentamicin instead of ampicillin solely allowed elimination of *Fukatsuia symbiotica* (also known as PAXS or Pea aphid X-type), *H. defensa*, *R. insecticola*, and *S. symbiotica* (Douglas et al., 2006; McLean et al., 2011; Simon et al., 2011) but failed to eliminate *Rickettsia* sp., *Rickettsiella viridis*, and *Spiroplasma* sp. (Tsuchida et al., 2010; McLean et al., 2011; Simon et al., 2011; Heyworth & Ferrari, 2016). Administration of the antibiotic treatment can be performed through microinjections (Simon et al., 2011) or through feeding using a plant grown with antibiotics (McLean et al., 2011) or an artificial medium (Douglas et al., 2006).

Chen & Purcell (1997) pioneered secondary symbiont introduction in aphids and succeeded to transfer *S. symbiotica* and *Rickettsia* sp. from donor *A. pisum* by injecting their hemolymph into second instars of recipient aphids that were free of secondary symbionts. In their study, the quantity of hemolymph injected in the recipient aphids

Table 1 Methods used for secondary symbiont elimination in the pea aphid

| Method | Antibiotic | Detailed protocol | Secondary endosymbiont targeted | Reference |
|--------------------|------------------------------------|---|--|---|
| Microinjection | Ampicillin | $1 \mu\text{g mg}^{-1}$ body weight | <i>Serratia symbiotica</i> <i>Rickettsia</i> sp. <i>Regiella insecticola</i> , <i>Rickettsia</i> sp., <i>S. symbiotica</i> <i>Hamiltonella defensa</i> , <i>R. insecticola</i> | Koga et al., 2003 Sakurai et al., 2005 Simon et al., 2011 This study |
| | | $10 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ at constant volume (not measured) | <i>H. defensa</i> , <i>R. insecticola</i> , <i>S. symbiotica</i> | Leonardo, 2004 |
| | | $0.1 \mu\text{l}$ solution mg^{-1} body weight; several doses tested: 1, 10, 100, 1000 ng mg^{-1} body weight | <i>S. symbiotica</i> | Koga et al., 2007 |
| Artificial diet | Ampicillin, cefotaxime, gentamicin | $0.1 \mu\text{l}$ of a mixed solution with $250 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ of each antibiotic 13.8 nl of a mixed solution with 3.7 mg ml^{-1} of each antibiotic | <i>Rickettsiella viridis</i> <i>H. defensa</i> , <i>Spiroplasma</i> sp. <i>H. defensa</i> , <i>R. insecticola</i> | Tsuchida et al., 2010 Simon et al., 2011 This study |
| | Ampicillin | Chemical defined diet added with $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ of ampicillin | <i>S. symbiotica</i> | Skaljic et al., 2018 |
| Via the host plant | Ampicillin, cefotaxime, gentamicin | Chemical defined diet added with $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ of each antibiotic | <i>H. defensa</i> , <i>R. insecticola</i> , <i>S. symbiotica</i> | Douglas et al., 2006 |
| | | Cut leaves of <i>Vicia faba</i> placed in a mixed solution with $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ of ampicillin and $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ of both cefotaxime and gentamicin | <i>Fukatsuia symbiotica</i> , <i>H. defensa</i> , <i>R. insecticola</i> , <i>Rickettsia</i> sp., <i>S. symbiotica</i> , <i>Spiroplasma</i> sp. | McLean et al., 2011 |

was not specified. Adapting this protocol, various works succeeded to introduce *F. symbiotica*, *H. defensa*, *R. insecticola*, *Rickettsia* sp., *R. viridis*, *S. symbiotica*, and *Spiroplasma* sp. into recipient *A. pisum* individuals (Fukatsu et al., 2001; Oliver et al., 2003; Scarborough et al., 2005; Russell & Moran, 2006; Tsuchida et al., 2010; McLean et al., 2011; Simon et al., 2011). Interestingly, in the black bean aphid, *Aphis fabae* Scopoli, secondary symbionts have been successfully introduced by feeding uninfected aphids on an artificial diet complemented with *A. pisum* extracts containing secondary symbionts (Chandler et al., 2008).

Whether the secondary symbionts are being eliminated or introduced, only few studies precisely detail their method (Chen & Purcell, 1997; Fukatsu et al., 2001; Russell & Moran, 2005; Tsuchida et al., 2005; Koga et al., 2007; Łukasik et al., 2015; Parker et al., 2017) and none give their success rate. In this study, we aimed at testing secondary symbiont elimination and introduction protocols using pea aphid–secondary symbiont combinations and described some parameters that influence the success rate of the symbiont manipulation. As several symbiont manipulation methods exist in the literature, we decided to compare two methods of secondary symbiont elimination, performing microinjections that use different antibiotic treatments and to test various parameters that could influence the success of symbiont transfer from a donor to a recipient individual (i.e., symbiont introduction). Because antibiotic quantity is controlled in injection methods, we did not compare elimination success with the other methods whereby unknown quantities of antibiotics are administered (i.e., via the plant or an artificial medium). Among these parameters, we considered the influence of the host and symbiont genotypes as well as the stage of recipient aphids on symbiotic introduction success. As *H. defensa* and *R. insecticola* are the most studied

heritable secondary bacterial symbionts in the pea aphid because of the protective phenotypes they confer to their hosts – *H. defensa* confers protection against parasitic wasps, whereas *R. insecticola* protects against fungal infection (Oliver et al., 2003; Scarborough et al., 2005) – we restricted our study to these two heritable secondary symbionts among the eight described in the pea aphid (Gauthier et al., 2015).

Material and methods

Pea aphid lineages

Ten pea aphid lineages were used in this study, collected in France, UK, or Japan on three legume species (Table 2). These lineages were all genetically distinct based on a set of polymorphic markers used in routine in our laboratory (Peccoud et al., 2008). Their symbiotic status was assessed with a diagnostic PCR using specific primers for primary and secondary symbiont amplification (Peccoud et al., 2014). All 10 lineages only harbored one secondary symbiont, either *H. defensa* or *R. insecticola* as described in Table 2. Aphids harboring *R. insecticola* came from *Trifolium* sp. (except MS3 which was collected on *Medicago sativa* L.), whereas those harboring *H. defensa* originated from either *M. sativa* or *Genista tinctoria* L. Characterization of *H. defensa* strains from the six lineages used here is reported in a previous study (Leclair et al., 2016). According to this work based on housekeeping genes *accD* and *murE* sequences, the *H. defensa* strains from our aphid lineages adapted to *G. tinctoria* belonged to the same genetic group whereas every strain from our lineages adapted to *M. sativa* genetically differed from each other (Leclair et al., 2016). Using the same sequencing approach, we also characterized *R. insecticola* strains associated with the five lineages and found that those hosted by T1, T2, T3, and T4

Table 2 Pea aphid lineages used in the experiments

| Name in this study | Lineage code | Sampling | | Collection plant | Secondary symbiont | Used in | |
|--------------------|--------------|----------|-----------------|--------------------------|-----------------------------|-------------|--------------|
| | | location | Collection date | | | Elimination | Introduction |
| Ms1 | L1S6_03 | France | September 2014 | <i>Medicago sativa</i> | <i>Hamiltonella defensa</i> | × | × |
| Ms2 | L9Ms_07 | France | August 2011 | <i>M. sativa</i> | <i>H. defensa</i> | × | × |
| T1 | KG_wc_10 | Japan | May 2014 | <i>Trifolium</i> | <i>Regiella insecticola</i> | × | × |
| T2 | YR2 | UK | December 2002 | <i>Trifolium</i> | <i>R. insecticola</i> | × | × |
| Gt1 | Gt1a_01 | France | June 2014 | <i>Genista tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> | | × |
| Gt2 | Gt2_01 | France | June 2014 | <i>G. tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> | × | × |
| Gt3 | Gt2_10 | France | June 2014 | <i>G. tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> | × | |
| Ms3 | A_aa_01 | Japan | May 2014 | <i>M. sativa</i> | <i>R. insecticola</i> | × | |
| T3 | BK_wc_02 | Japan | May 2014 | <i>Trifolium</i> | <i>R. insecticola</i> | × | |
| T4 | Tut | Japan | 2001 | <i>Trifolium</i> | <i>R. insecticola</i> | × | |

lineages belonged to one genetic group, which differed from the genetic group of the lineage hosted by Ms3 (A Sugio, S Morlière & JC Simon, unpubl.).

During all the experiments, aphids were reared on broad bean, *Vicia faba* L. (Fabaceae), a favorable host plant for all plant-specialized lineages of *A. pisum* (Peccoud et al., 2009), at 18 °C, 60% relative humidity, and a L16:D8 photoperiod to maintain sustained clonal reproduction.

Secondary symbiont elimination by antibiotic microinjection

The aim of this experiment was to test whether the success of elimination by antibiotic microinjection depends on aphid and symbiont genotypes. Here, four *A. pisum* lineages harboring *H. defensa* and five lineages harboring *R. insecticola* have been tested (Table 2). To eliminate the secondary symbiont, we applied two methods: (1) the 'ampicillin method' from Koga et al. (2003) which consists of microinjecting 1 µg of ampicillin mg⁻¹ aphid body weight, and (2) the 'cocktail method' adapted from Simon et al. (2011) which microinjects a cocktail of ampicillin, cefotaxime, and gentamicin each at 3.7 mg ml⁻¹ solution (equivalent to 0.013 µg mg⁻¹ aphid body weight each).

Ten-day-old adult aphids of each lineage were injected in the back, between the second and third segments of the thorax, with 13.8 nl of an antibiotic solution. All nine lineages were injected with a solution of ampicillin at 290 mg ml⁻¹, which is the concentration that provides 1 µg mg⁻¹ aphid body weight of ampicillin, and among these nine lineages, six (two harboring *R. insecticola* and four harboring *H. defensa*) were also considered for the cocktail method, which injected 13.8 nl of a mixture of ampicillin, cefotaxime, and gentamicin at 3.7 mg ml⁻¹ each. Injections were performed using a Nanoject II microinjector mounted on a micromanipulator (Drummond Scientific Company, Broomall, PA, USA) for accurate manipulation and equipped with a finely stretched glass capillary (0.14 mm diameter), both allowing a high accuracy while injecting. Aphids were kept on ice prior the experiment to lower their motion activity. Individuals were held toward the capillary using a paintbrush to reduce movement and increase precision. After injection, experimental adult aphids were installed individually on a *V. faba* plant. The offspring produced during the next 3 days were removed, as first offspring may be less affected by the antibiotic treatment, and adults were allowed to reproduce for two additional days. The new offspring were transferred to a fresh *V. faba* plant and established the experimental lineages. Three generations after the injection, the adult aphids were screened to check for the elimination of secondary symbionts and the maintenance of *B. aphidicola* by PCR as previously described. For each aphid lineage, between nine and 20 individuals were injected.

Secondary symbiont introduction

In this experiment, six aphid lineages harboring either *R. insecticola* or *H. defensa* have been considered (Table 2). Several generations before the introduction of a new secondary symbiont, all the tested aphid lineages were freed from their original symbionts with one of the elimination methods presented before. Secondary symbionts were either reinjected in their original host (i.e., recipient lineage has the same genetic background as the donor lineage) or swapped between the six aphid lineages (i.e., recipient lineage was different from the donor lineage) as detailed in Table 3. To perform symbiont introduction, we adapted the method used by Fukatsu et al. (2001) by modifying the amount of hemolymph injected (13.8 nl instead of 100 nl), by injecting both first and third instars, and by anesthetizing aphids on ice instead of carbon dioxide.

As different published methods of secondary symbiont introduction use recipient aphids at different developmental stages (from first instar to adult stage), we tested whether the aphid larval stage influenced the symbiont introduction success rates. For this purpose, two larval stages widely used in symbiont introduction protocols were considered here: 0–1 day first instars (1 mm) and 4–5 days third instars (2 mm). As injecting young aphids in the back would result in high mortality (S Morlière & C Sochard, pers. obs.), aphids were injected in the base of the third pair of legs (Fukatsu et al., 2001). Thirty first instars and 16 third instars were injected for each recipient lineage × donor lineage combination. The hemolymph of the donor aphid was collected by cutting off a front leg and then pressing the aphid to get a clear droplet of hemolymph. An ultra-fine glass capillary (0.06 mm diameter) was used to collect the hemolymph of multiple 15-day-old donor aphids before proceeding to the injection of 13.8 nl in the recipient aphids. After the injection, recipient larvae were placed on a new *V. faba* plant. Once the recipient aphids were 15 days old, individuals that survived from

Table 3 Swapping scheme between pea aphid donors and recipients (symbiont-free aphids) in the transfection experiment

| | Donor lineage | | | | | |
|-------------------|-----------------------------|----|-----------------------------|-----|-----|-----|
| | <i>Regiella insecticola</i> | | <i>Hamiltonella defensa</i> | | | |
| | T1 | T2 | Ms1 | Ms2 | Gt1 | Gt2 |
| Recipient lineage | T1 | × | | × | × | |
| | T2 | | × | × | × | |
| | Ms1 | × | | × | | × |
| | Ms2 | × | | | × | × |
| | Gt1 | | | × | × | × |
| | Gt2 | | | | | |

injection were placed individually on a new plant to reproduce. Offspring used to create the introduced lineages were then sampled 12 and 15 days after the injection for first and third instar recipient aphids, respectively. Several studies indeed highlighted that after 12 days, injected symbionts were transmitted at a high rate to offspring (Chen & Purcell, 1997; Fukatsu et al., 2001; Russell & Moran, 2005; Tsuchida et al., 2005). The acquisition of the new secondary symbiont in the introduced lineages was checked by diagnostic PCR in both adults of the first generation (i.e., G1) and adults of the third generation (i.e., G3) after the injection to test for transmission stability over time.

Statistical analysis

For the symbiont elimination experiment, we analyzed the elimination success rate depending on two fixed factors: the antibiotic method and the aphid lineage. As these two factors were not crossed (three aphid lineages harboring *R. insecticola* were only tested with the ampicillin method), and several factor levels had no variance (no elimination success for some lineages), different generalized linear models (GLM) assuming a binomial error and a logit link function were performed. A first GLM tested the effect of the aphid lineage on the success rate of secondary symbiont elimination by using the ampicillin method, whereas the second one tested whether aphid lineage affected the success rate of elimination when using the cocktail method. The last GLM compared both elimination methods by considering aphid lineages used in both treatments.

For the symbiont introduction experiment, two dependent variables were analyzed: the survival rate of recipient aphids and the success rate of secondary symbiont introduction in surviving aphids (i.e., how many surviving aphids were successfully introduced with the symbiont). On one hand, we tested whether both responses varied between *H. defensa* and *R. insecticola* in interaction with the recipient aphid larval stage by using binomial GLM assuming a binomial error and a logit link function. On the other hand, survival rate and the overall success rate of symbiont introduction at third generation after injection (i.e., how many injected aphids were successfully introduced with the symbiont) were compared between the two larval stages for each combination of recipient aphid \times symbiont genotype using χ^2 tests. Since symbionts were injected in both their original aphid host (re-introduction to the same host) and different hosts (introduction to a new host), the overall success rate of symbiont introduction at the third generation after injection was also compared between these two treatments with a Pearson's χ^2 test. As we measured symbiont acquisition success at the first and third generation after infection, we tested the influence of the recipient larval stage (first vs. third

instar) on the proportion of the various positive cases (i.e., symbiont detection at both G1 and G3, symbiont detection at G1 only, symbiont detection at G3 only) with a Pearson's χ^2 test.

For all GLMs, we analyzed the model coefficient estimates to identify significance of the tested factors levels. All statistics were performed with the package lme4 (Bates et al., 2014) in the software R (R Core Team, 2019).

Results

Symbiont elimination experiment

In our experiments, the aphid survival rate ranged from 35 to 77% for the ampicillin treatment and from 33 to 67% for the cocktail treatment. Mortality was either due to the injection, which physically harms the aphid, to the effect of the antibiotics on the primary symbiont, or a combination of the two.

Using the ampicillin method, *H. defensa* was never successfully removed from its aphid hosts, whereas *R. insecticola* was successfully eliminated in all tested aphid lineages (Figure 1A). According to the GLM's coefficients, the elimination success of *R. insecticola* varied from one lineage to another: one lineage had a high elimination success rate (>70%), two had an intermediate elimination success (50%), and the two last ones were poorly eliminated (<30%). The cocktail method allowed to eliminate *H. defensa* in three among four tested lineages and *R. insecticola* in the two tested lineages with success rates depending on the aphid lineage (Figure 1B). Concerning *R. insecticola*, the elimination success rate did not differ between the two methods (Figure 1).

Secondary symbiont introduction

The survival rate of third instars after hemolymph injection was on average twice that of first instars (76 and 35%, respectively; Figure 2A). Recipient aphid survival rate was significantly higher when injected with *H. defensa* than with *R. insecticola* (51 and 43%, respectively; Figure 2A). Moreover, the difference in survival between the two larval stages varied according to the combination of aphid and symbiont genotypes (Table 4).

When focusing on the symbiont acquisition and considering aphid lineages that survived three generations after hemolymph injection, GLM coefficients showed no significant difference between the two secondary symbiont species on success rate (Figure 2B). However, the larval stage significantly affected the introduction success. When surviving the injection, first instars acquired *H. defensa* or *R. insecticola* more successfully than third instars.

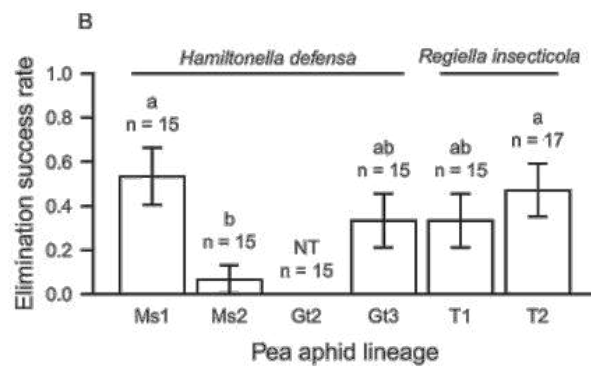
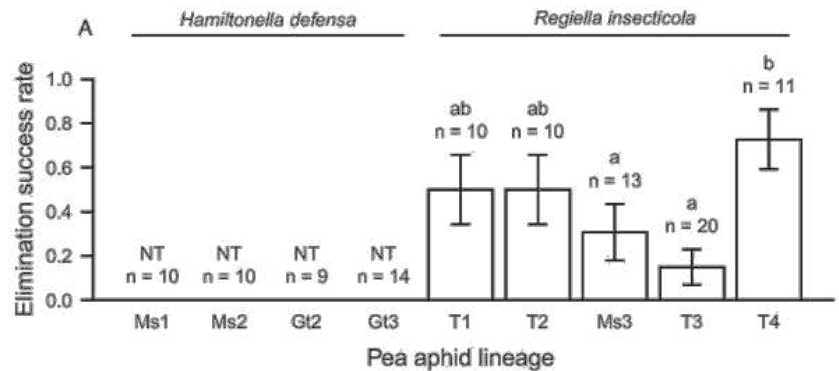


Figure 1 Overall mean (\pm SE; n = number of aphids injected) elimination success rate of aphid lineages harboring *Hamiltonella defensa* or *Regiella insecticola* after injection of (A) ampicillin or (B) ampicillin, cefotaxime, and gentamicin. Means within a panel capped with different letters are significantly different according to the coefficient estimates in the models (NT = not tested).

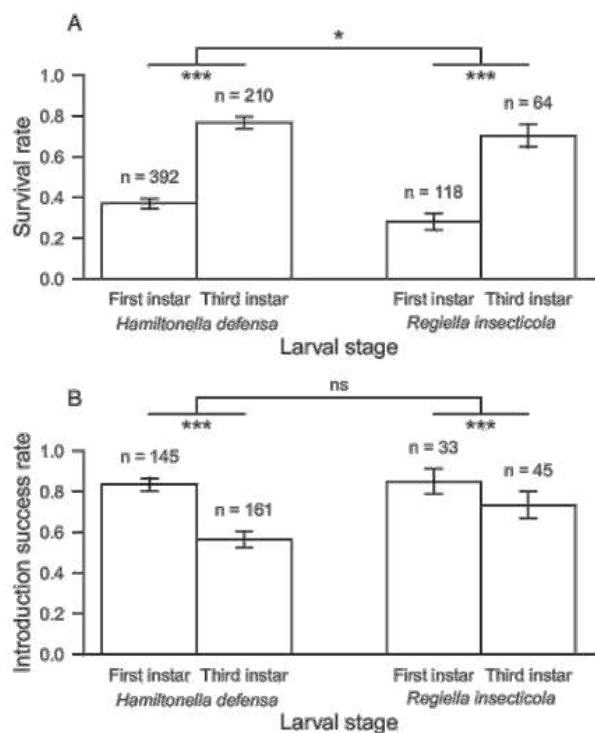


Figure 2 Mean (\pm SE) (A) survival rate and (B) introduction success rate in surviving aphids (n = number of surviving aphids). Asterisks indicate the significant effects of the model (*** $P < 0.001$, * $0.01 < P < 0.05$, ns: not significant).

Although there was an unsuccessful case (Gt1 injected with *H. defensa* from Ms1), overall introduction success rate was globally higher when injecting third instars according to the aphid lineage because of higher survival rate (Table 4). We also noted that the host origin of the injected symbiont (re-introduction or introduction to a new host) did not influence the overall introduction success (37 and 34%, respectively; $\chi^2 = 0.90$, d.f. = 1, $P = 0.34$).

Finally, the analysis of the introduction success rates at both one and three generations (G1 and G3) after the injection showed that most successful introduction events were detected at both G1 and G3 (Figure 3). In only a few cases, symbiont acquisition was detected at G1 only (i.e., symbiont was lost afterwards) or at G3 only (i.e., symbiont multiplication took longer). The larval stage of the recipient aphids did not affect the relative proportions of the three positive situations ($\chi^2 = 4.65$, d.f. = 2, $P = 0.098$).

Discussion

Variation in elimination and introduction success rates

The elimination success rate by using antibiotic microinjection varied not only according to the aphid lineages for *R. insecticola* and *H. defensa* but also according to the antibiotic treatment for *H. defensa*. In our elimination experiments, host and symbiont

Table 4 Survival of recipient aphid larvae and overall introduction success rate of *Regiella insecticola* and *Hamiltonella defensa* secondary symbionts of *Acyrtosiphon pisum*, three generations after hemolymph injection. χ^2 tests compare the first and third instars

| Recipient | Donor (symbiont species) | Overall introduction success (%) (introduced/survived/injected) | | χ^2 test on aphid survival | | χ^2 test on overall introduction success | |
|-----------|------------------------------|--|-----------------|---------------------------------|--------|--|-------|
| | | First instar | Third instar | χ^2 (d.f. = 1) | P | χ^2 (d.f. = 1) | P |
| T1 | T1 (<i>R. insecticola</i>) | 36.6 (11/12/30) | 62.5 (10/13/16) | 5.59 | <0.05 | 1.86 | 0.17 |
| | Ms1 (<i>H. defensa</i>) | 41.4 (12/14/29) | 31.3 (5/15/16) | 7.43 | <0.01 | 0.12 | 0.73 |
| | Ms2 (<i>H. defensa</i>) | 30 (9/9/30) | 70.6 (12/13/17) | 7.64 | <0.01 | 5.68 | <0.05 |
| T2 | T2 (<i>R. insecticola</i>) | 26.6 (8/8/30) | 37.6 (6/9/16) | 2.72 | 0.097 | 0.18 | 0.67 |
| | Ms1 (<i>H. defensa</i>) | 26.6 (8/8/30) | 50 (8/9/16) | 2.72 | 0.097 | 1.58 | 0.21 |
| | Ms2 (<i>H. defensa</i>) | 23.3 (7/10/30) | 37.6 (6/12/16) | 5.69 | <0.05 | 0.45 | 0.5 |
| Ms1 | Ms1 (<i>H. defensa</i>) | 16.6 (5/6/30) | 56.3 (9/11/16) | 8.65 | <0.01 | 5.97 | <0.05 |
| | T1 (<i>R. insecticola</i>) | 7.1 (2/2/28) | 43.8 (7/11/16) | 15.72 | <0.001 | 6.29 | <0.05 |
| | Gt1 (<i>H. defensa</i>) | 33.3 (10/11/30) | 62.5 (10/15/16) | 11.61 | <0.001 | 2.52 | 0.11 |
| Ms2 | Gt2 (<i>H. defensa</i>) | 20 (6/8/30) | 56.3 (9/13/16) | 10.43 | <0.01 | 4.7 | <0.05 |
| | Ms2 (<i>H. defensa</i>) | 36.6 (11/11/30) | 75 (12/14/16) | 8.92 | <0.01 | 4.7 | <0.05 |
| | T1 (<i>R. insecticola</i>) | 23.3 (7/11/30) | 62.5 (10/12/16) | 4.7 | <0.05 | 5.29 | <0.05 |
| Gt1 | Gt1 (<i>H. defensa</i>) | 50 (15/16/30) | 37.5 (6/12/16) | 1.25 | 0.26 | 0.25 | 0.62 |
| | Gt1 (<i>H. defensa</i>) | 35.5 (11/14/31) | 37.5 (6/11/16) | 1.51 | 0.22 | 0 | 1 |
| | Ms1 (<i>H. defensa</i>) | 16.6 (5/6/30) | 0 (0/7/16) | 1.85 | 0.17 | 1.52 | 0.22 |
| Gt2 | Ms2 (<i>H. defensa</i>) | 37.5 (12/18/32) | 23.6 (4/14/17) | 2.29 | 0.13 | 0.45 | 0.5 |
| | Gt2 (<i>H. defensa</i>) | 33.3 (10/14/30) | 25 (4/15/16) | 8.01 | <0.01 | 0.06 | 0.8 |

genotypes are confounded, precluding a clear inference of whether variation in elimination success reflects differential susceptibility of symbiont strains to the antibiotic or some effect of the host genotype. Surprisingly, the two aphid lineages specialized on *G. tinctoria* show different elimination success rates when injected with the antibiotic cocktail. These two lineages are genetically close to each other and their *H. defensa* strains are from the same genetic group. The variation in symbiont elimination success is thus likely due to complex interactions between the aphid and symbiont genomes. Such interactions are often found when looking at the effects of the symbiont on the host phenotype (e.g., Ferrari et al., 2007; Leclair et al., 2016).

In accordance with Leonardo (2004), we did not succeed to remove *H. defensa* using ampicillin only. However, using an antibiotic cocktail allowed successful elimination of this symbiont, which could be due to one of the two additional antibiotics or to synergistic effects of the antibiotics in the cocktail. Further experiments are needed to test these antibiotics individually or in different combinations and doses to understand the cause of the successful elimination.

Concerning the introduction success rate, we found that despite a high mortality in first instar caused by injecting tiny aphids, the introduction rate of *H. defensa* was greatly

improved at this stage. Several non-mutually exclusive hypotheses could explain these differences in introduction success. First, symbionts may be more diluted in the aphid body when injected in third instars, as they are twice as big as first instars. In this case, the symbiont may need more time to multiply to such a level that it will be transmitted to the next generation by chance as suggested by the work of Koga et al. (2012). Second, variation in introduction success could be explained by differences in immunity between the two larval stages. Indeed, younger aphids have a weaker immune system than older ones (Laughton et al., 2014), which could explain why secondary symbionts better colonize first instars. Finally, several studies showed that symbionts were better transmitted to offspring when injected aphids had longer time to maintain them (Chen & Purcell, 1997; Fukatsu et al., 2001; Russell & Moran, 2005; Tsuchida et al., 2005). This seems to be also true in our experiments, as symbionts had three additional days to develop when injected in first instars compared to third-instar aphids.

Previous studies on symbiont transfer highlighted some genetic barriers, with greater symbiont introduction rate in intraspecific transfer (Lukasik et al., 2015) or in populations used to carry secondary symbionts (Parker et al., 2017; Niepoth et al., 2018), suggesting some kind of preadaptation between specific aphid populations and symbiont species or strains. Surprisingly, we found no

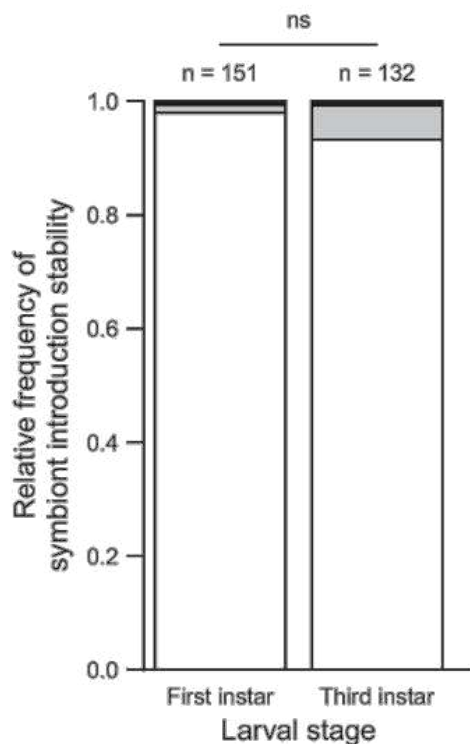


Figure 3 Stability of successful introductions over three generations in relation with recipient larval stage (first or third instar). White: symbiont detected at G1 and G3 after injection; grey: symbiont detected at G1 only; black: symbiont detected at G3 only (n = number of recipient aphids tested). ns: not significant (Pearson's χ^2 test: $P > 0.05$).

evidence of preadaptation between aphid genotypes and their symbionts as the introduction success of the symbionts did not differ between same or different host origins.

Towards successful secondary symbiont elimination and introduction

Various methods of secondary symbiont elimination are available in the literature, such as direct injection or oral administration of antibiotics. Antibiotics can be used singly or in cocktails. To successfully eliminate secondary symbionts, the method may be adjusted to best suit the targeted symbiont. For example, elimination of *H. defensa* in *A. pisum* does not work when injecting ampicillin but is successful by injecting a cocktail of antibiotics. Furthermore, our study highlighted that the efficiency of the antibiotic treatment varied between aphid lineages, even when symbiotic strains were closely related. In difficult cases, increasing antibiotic concentration may be a good option to improve symbiont elimination (Koga et al., 2007; McLean & Godfray, 2015). However, certain symbiont species/strains (e.g., *Spiroplasma* sp.) remain

difficult or impossible to eliminate with the current methods (McLean et al., 2011; Simon et al., 2011). In these cases, new elimination techniques need to be developed.

Symbiont introduction by hemolymph injection is widely used in aphids. Although some works studied the optimal conditions of secondary symbiont acquisition in a few *A. pisum*-symbiont combinations (Chen & Purcell, 1997; Fukatsu et al., 2001; Tsuchida et al., 2005; Russell & Moran, 2005), most studies that used transfected lines did not detail experimental conditions, give success rates, or provide advices to improve introduction success. Our work shows higher introduction success rate in first instars. However, we would advise to inject preferentially third instars as they show higher survival rate and thus a better overall introduction success rate with only one case of exception in our study. In fact, injecting younger aphids requires higher skills and leads to higher mortality rates due to the injection. First instars should be favored when symbiont introduction fails in older aphids. Another way to improve secondary symbiont introduction, which we did not test here, is by increasing the time between the injection and the next generation. In fact, the proportion of infected offspring increases along the post-injection period (Chen & Purcell, 1997; Fukatsu et al., 2001; Tsuchida et al., 2005) but Russell & Moran (2005) also highlighted a decrease of secondary symbiont transmission after a long period.

Another important result of our study is that, whatever the larval stage injected, symbiont acquisition check can be performed on the first generation after the injection as we have seen that this early detection reflects well the success rate. This early detection will allow to quickly check whether the introduction experiment worked and to eliminate unsuccessful lineages.

Studies on secondary symbionts manipulation in aphids do not present success rates of their method in most cases. In our study, we found several factors to affect the chance to obtain a manipulated lineage, such as recipient aphid larval stage that affects both survival and symbiont acquisition. However, technical challenges still remain, notably in secondary symbiont elimination, where two symbiont species persist in aphids after antibiotic treatments. New methods need to be developed to improve symbionts manipulation and to help in investigating the role of bacterial symbionts on their insect hosts.

Acknowledgments

We thank Ryuichi Koga, Ailsa Mclean, and Tsutomu Tsuchida for their advice and their discussion about symbiont elimination and introduction. This research was supported by the project ANR Hmicmac 16-CE02-0014 to

AS, JCS, and YO, and Marie Curie Career Integration Grants (APHISPIT) Ref 333937 to AS. We thank the three anonymous reviewers for their helpful comments.

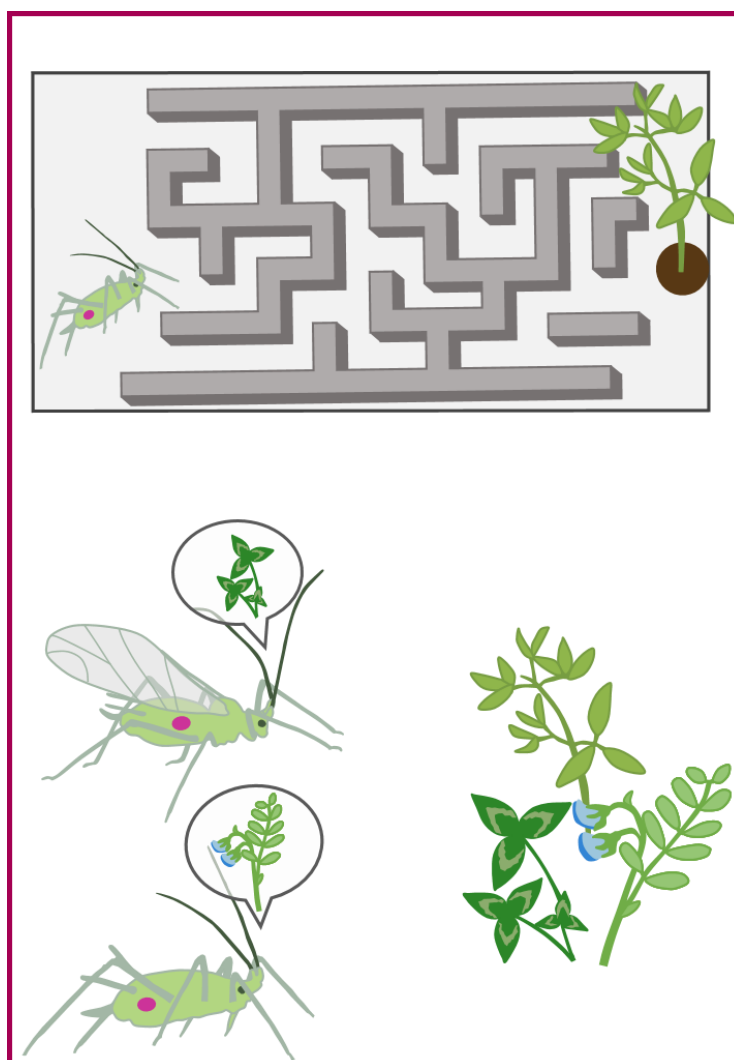
References

- Bates D, Mächler M, Bolker B & Walker S (2014) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 67: 1–48.
- Chandler SM, Wilkinson TL & Douglas AE (2008) Impact of plant nutrients on the relationship between a herbivorous insect and its symbiotic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B* 275: 565–570.
- Chen D-Q & Purcell AH (1997) Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. *Current Microbiology* 34: 220–225.
- Douglas AE (1998) Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology* 43: 17–37.
- Douglas AE, François CLMJ & Minto LB (2006) Facultative ‘secondary’ bacterial symbionts and the nutrition of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Physiological Entomology* 31: 262–269.
- Feldhaar H (2011) Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology* 36: 533–543.
- Ferrari J, Scarborough CL & Godfray HCJ (2007) Genetic variation in the effect of a facultative symbiont on host-plant use by pea aphids. *Oecologia* 153: 323–329.
- Fukatsu T, Tsuchida T, Nikoh N & Koga R (2001) *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology* 67: 1284–1291.
- Gauthier J-P, Outreman Y, Mjeuzet L & Simon J-C (2015) Bacterial communities associated with host-adapted populations of pea aphids revealed by deep sequencing of 16S ribosomal DNA. *PLoS ONE* 10(3): e0120664.
- Griffiths GW & Beck SD (1973) Intracellular symbiotes of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology* 19: 75–84.
- Griffiths GW & Beck SD (1974) Effects of antibiotics on intracellular symbiotes in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Cell and Tissue Research* 148: 287–300.
- Guo J, Hatt S, He K, Chen J, Francis F & Wang Z (2017) Nine facultative endosymbionts in aphids. A review. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20: 794–801.
- Heyworth ER & Ferrari J (2016) Heat stress affects facultative symbiont-mediated protection from a parasitoid wasp. *PLoS ONE* 11(11): e0167180.
- Koga R, Tsuchida T & Fukatsu T (2003) Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society B* 270: 2543–2550.
- Koga R, Tsuchida T, Sakurai M & Fukatsu T (2007) Selective elimination of aphid endosymbionts: effects of antibiotic dose and host genotype, and fitness consequences: selective elimination of aphid endosymbionts. *FEMS Microbiology Ecology* 60: 229–239.
- Koga R, Meng X-Y, Tsuchida T & Fukatsu T (2012) Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte-embryo interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109: E1230–E1237.
- Laughton AM, Fan MH & Gerardo NM (2014) The combined effects of bacterial symbionts and aging on life history traits in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 470–477.
- Leclair M, Pons I, Mahéo F, Morlière S, Simon J-C & Outreman Y (2016) Diversity in symbiont consortia in the pea aphid complex is associated with large phenotypic variation in the insect host. *Evolutionary Ecology* 30: 925–941.
- Leonardo TE (2004) Removal of a specialization-associated symbiont does not affect aphid fitness. *Ecology Letters* 7: 461–468.
- Lukasik P, Guo H, van Asch M, Henry LM, Godfray HCJ & Ferrari J (2015) Horizontal transfer of facultative endosymbionts is limited by host relatedness. *Evolution* 69: 2757–2766.
- McLean AHC & Godfray HCJ (2015) Evidence for specificity in symbiont-conferred protection against parasitoids. *Proceedings of the Royal Society B* 282: 20150977.
- McLean AHC, van Asch M, Ferrari J & Godfray HCJ (2011) Effects of bacterial secondary symbionts on host plant use in pea aphids. *Proceedings of the Royal Society B* 278: 760–766.
- Niepoth N, Ellers J & Henry LM (2018) Symbiont interactions with non-native hosts limit the formation of new symbioses. *BMC Evolutionary Biology* 18: 27.
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA & Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100: 1803–1807.
- Oliver KM, Degan PH, Burke GR & Moran NA (2010) Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual Review of Entomology* 55: 247–266.
- Parker BJ, McLean AHC, Hrček J, Gerardo NM & Godfray HCJ (2017) Establishment and maintenance of aphid endosymbionts after horizontal transfer is dependent on host genotype. *Biology Letters* 13: 20170016.
- Peccoud J, Figueroa CC, Silva AX, Ramirez CC, Mjeuzet L et al. (2008) Host range expansion of an introduced insect pest through multiple colonizations of specialized clones. *Molecular Ecology* 17: 4608–4618.
- Peccoud J, Ollivier A, Plantegenest M & Simon J-C (2009) A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106: 7495–7500.
- Peccoud J, Bonhomme J, Mahéo F, de la Huerta M, Cosson O & Simon J-C (2014) Inheritance patterns of secondary symbionts during sexual reproduction of pea aphid biotypes: sex and inheritance of aphid symbionts. *Insect Science* 21: 291–300.
- R Core Team (2019) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Russell JA & Moran NA (2005) Horizontal transfer of bacterial symbionts: heritability and fitness effects in a novel aphid host. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 7987–7994.
- Russell JA & Moran NA (2006) Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proceedings of the Royal Society B* 273: 603–610.
- Sakurai M, Koga R, Tsuchida T, Meng X-Y & Fukatsu T (2005) *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4069–4075.
- Scarborough CL, Ferrari J & Godfray HCJ (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* 310: 1781.
- Simon J-C, Boutin S, Tsuchida T, Koga R, Le Gallic J-F et al. (2011) Facultative symbiont infections affect aphid reproduction. *PLoS ONE* 6(7): e21831.
- Skaljac M, Kirfel P, Grotmann J & Vilcinskas A (2018) Fitness costs of infection with *Serratia symbiotica* are associated with greater susceptibility to insecticides in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: *Serratia symbiotica* correlates with susceptibility to insecticides in pea aphid. *Pest Management Science* 74: 1829–1836.
- Sochard C, Leclair M, Simon J-C & Outreman Y (2019) Host plant effects on the outcomes of defensive symbioses in the pea aphid complex. *Evolutionary Ecology* 33: 651–669.
- Tsuchida T, Koga R, Meng XY, Matsumoto T & Fukatsu T (2005) Characterization of a facultative endosymbiotic bacterium of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Microbial Ecology* 49: 126–133.
- Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, Tsunoda T, Maoka T et al. (2010) Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science* 330: 1102–1104.
- Zytynska SE, Thighiouart K & Frago E (2019) A meta-analysis on the benefits and costs of hosting secondary endosymbionts in sap-sucking insects. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/563031>

CHAPITRE 2 :

INCIDENCE DES SYMBIOTES SUR LA RELATION PLANTE-PUCERON



De nombreuses espèces d'insectes phytophages, comme le puceron du pois, présentent un degré plus ou moins fort de spécialisation vis-à-vis des plantes consommées. Cette spécialisation écologique restreint leur spectre de plantes hôtes, ce qui fait de la recherche et du choix de la plante une étape cruciale pour la survie et la reproduction de ces insectes. Nous avons vu dans l'introduction que certains symbiotes peuvent influencer les comportements alimentaires de leurs hôtes, cependant l'influence des symbiotes sur les comportements alimentaires des insectes phytophages spécialistes n'a reçu que peu d'attention.

Dans ce chapitre, nous avons abordé cette question au travers de deux études qui ont testé l'influence des symbiotes sur plusieurs phénotypes associés à la recherche et à la sélection d'une plante hôte. Plusieurs lignées d'*A. pisum* provenant de trois populations spécialisées (*i.e.*, biotypes) ont été testées dans ces deux études.

Dans la première étude (cf **Article 2**), nous avons caractérisé l'effet des symbiotes secondaires sur les différentes étapes de la recherche et de la sélection d'une plante hôte. Nous avons ainsi examiné l'influence du statut symbiotique des pucerons sur leur capacité à explorer à longue distance (estimée par la production de descendants ailés) ou à courte distance et leur capacité à sélectionner leur plante hôte parmi plusieurs plantes disponibles. Dans cette étude, nous avons utilisé des lignées naturelles de pucerons présentant ou non leur symbiote d'origine. Nos résultats montrent une forte influence des symbiotes sur la production de descendants ailés, affectant ainsi les capacités d'exploration à longue distance de leur hôte. A l'inverse, les capacités d'exploration à courte distance des pucerons ne sont que marginalement influencées par leur statut symbiotique. Enfin, le comportement de sélection d'une plante hôte n'est pas influencé par le symbiote abrité par l'insecte. Une hypothèse avancée pour expliquer ce dernier résultat, est la possibilité que la sélection naturelle ait éliminé toute association symbiotique altérant la phase de sélection de la plante hôte, tant cette étape est importante dans la survie des organismes.

Pour tester cette hypothèse, nous avons mené une seconde étude (cf **Article 3**) dans laquelle nous avons échangé les symbiotes des lignées de pucerons appartenant aux trois biotypes, afin de tester l'effet de l'acquisition d'un symbiote provenant d'un autre biotype sur les comportements de choix alimentaires. Comme pour l'étude précédente, nous

n'avons montré que des effets marginaux du statut symbiotique sur la sélection de la plante hôte par les pucerons.

Ainsi, les résultats de ces deux études suggèrent une implication limitée des symbiotes secondaires associés aux biotypes du puceron du pois sur les comportements d'exploration et de sélection de leur plante hôte.

ARTICLE 2 :

SECONDARY SYMBIONTS AFFECT FORAGING CAPACITIES OF PLANT-SPECIALIZED GENOTYPES OF THE PEA APHID

Corentin Sochard^{ab}, Corentin Dupont^{ab}, Jean-Christophe Simon^{b\$}, Yannick Outreman^{a\$*}

^a IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35000 Rennes, France

^b IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35650 Le Rheu, France

^{\$} YO and JCS contributed equally to this paper

* Corresponding author: Yannick Outreman (yannick.outreman@agrocampus-ouest.fr)

Article en cours de révision dans **Microbial Ecology** (avril 2020)

Abstract

Ecological specialization is widespread in animals, especially in phytophagous insects, which are often specialized on a limited range of host plant species. This host plant specialization results from divergent selection on insect populations, which differ consequently in traits like behaviors involved in plant use. Although recent studies highlighted the influence of symbionts on food preference of their insect hosts, whether these microbial partners influence the foraging capacities of plant-specialized insects has received little attention. In this study, we used the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*, which presents distinct plant-specialized populations and several secondary bacterial symbionts, to examine the possible effects of symbionts on different foraging steps from plant searching to host plant selection. In particular, we tested the effect of secondary symbionts on (1) the aphid capacity to explore habitat at long-distance (estimated through the production of winged offspring), (2) the aphid capacity to explore habitat at short-distance and (3) the aphid capacity to select its host plant. We found that secondary symbionts had a strong influence on the production of winged offspring, with consequences on long-distance dispersal potential. By contrast, symbionts influenced both short-distance exploration and host plant selection only marginally. The implication of symbionts' influence on insect foraging strategies and potential relevance to Optimal Foraging Theory were discussed.

Keywords: Foraging behaviors, host plant choice, ecological specialization, *Acyrtosiphon pisum*, *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola*

Introduction

Ecological specialization refers to the reduction of species niche in one or several dimensions and typically involves traits adapted to locate and exploit specific resources [1]. Most phytophagous insects are specialized on particular host plant species used as food source, habitat or reproduction site [2]. This host plant specialization may shape multiple traits of the insect such as morphology, physiology and behavior [3]. Among these traits, foraging behaviors are under particularly strong selective pressure to optimize resource exploitation and could participate to ecological differentiation when environments select for different behaviors. For example, the fruit fly specialist *Drosophila sechellia* differs from its generalist sibling species, *D. melanogaster*, in the searching and selection of its exclusive host plant, *Morinda*, with a much stronger olfactory attraction to this plant compared to *D. melanogaster* [4].

There is growing evidence that symbionts affect many functions of their insect hosts, in particular resource utilization. Historically, studies on symbiotic microorganisms highlighted the role of primary (obligatory) symbionts in providing insects with essential nutrients lacking in their diet [5]. Furthermore, secondary (facultative) symbionts may affect indirectly plant specialization of their hosts by enhancing insect performance on specific host plants while reducing it on alternative plants [6–8]. More recent studies found that symbionts could also affect directly food preferences of their host, by influencing their choice of food source (e.g., *Drosophila melanogaster*, [9, 10]). Despite these recent advances on symbiotic effects on host nutrition, little is known on whether and how symbionts influence the insect foraging capacities (*i.e.*, habitat exploration, plant location and host-plant selection). In case of convergent interests between the host and its symbionts, these latter could provide a benefit to its host toward optimal foraging capacities, while divergent interests would accentuate the associated costs of symbiosis and result in neutral to negative effects on host capacities to forage.

The pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, is a very well-studied insect species presenting both a high degree of plant specialization and a diverse community of symbionts influencing host phenotype. This aphid colonizes various legume species but actually forms a complex of biotypes, each being specialized on one or a few plant species and having its proper genetic profile [11–14]. As a result of plant adaptation, each biotype shows a higher survival and reproduction on their preferred host plant compared to

alternative plants [11, 12, 15, 16]. In addition, in the two biotypes where it has been studied, this higher performance on the host plant correlates with a higher preference - *i.e.*, aphids of the clover biotype have a stronger attraction for clover and less for alfalfa while it is the opposite for the alfalfa biotype [17, 18]. Like virtually all aphids, *A. pisum* is associated with the primary bacterial symbiont, *Buchnera aphidicola*, which provides essential nutrients lacking in the diet of its hosts. In addition, this species can be infected by several secondary bacterial symbionts (singly or in coinfection), which are unevenly distributed among biotypes [19, 20] and show various effects on host phenotype [21, 22]. Among these phenotypic effects, some studies suggest that aphid symbionts can affect their dispersal capacity by modulating the amount of individuals presenting wings, which would directly affect their exploration capacities [23–25]. Furthermore, secondary symbionts were also found to affect the defensive behaviors of their hosts [26–28]. However, no study focused on symbiont effects on aphid exploration and host plant foraging. In this study, we tested whether symbionts could influence their aphid hosts in the different steps of plant exploration and selection: (1) long-distance exploration capacity (considering the winged offspring production as proxy), (2) short-distance exploration capacity and (3) host plant choice (see Fig. 1). Symbiotic effects were examined in three aphid biotypes originating from three plant species presenting various physiological and ecological challenges for their aphid hosts. Thus, we expected that these differences would allow us to have a broader view of symbiotic effects as aphids from different biotypes may vary in their plant specialization traits.

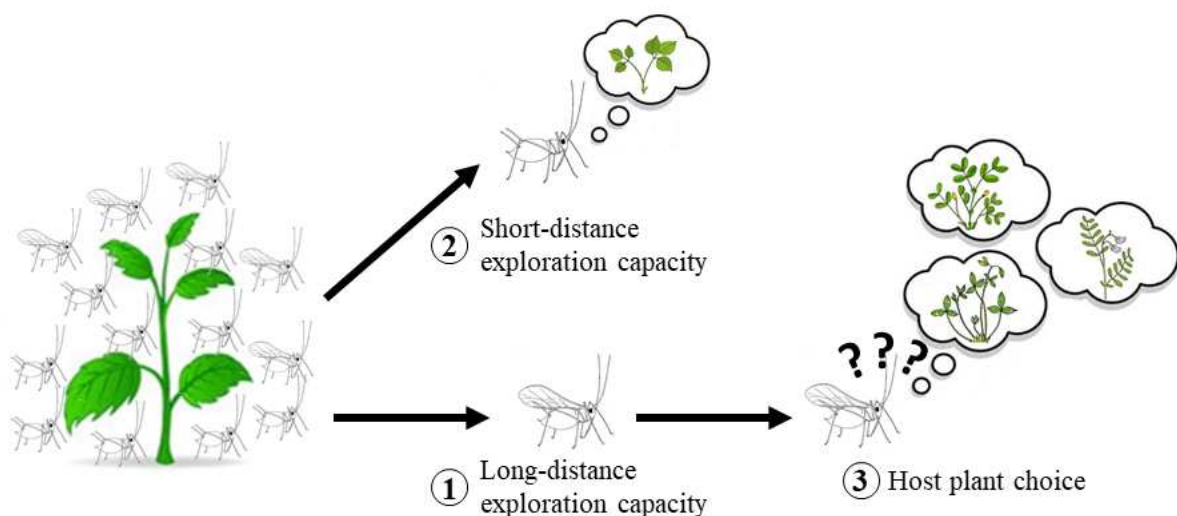


Fig 1: Overview of the aphid foraging capacities investigated in this study.

Material and methods

Aphid lineages

In this study, three aphid biotypes respectively specialized on *Medicago sativa*, *Trifolium sp.* and *Genista tinctoria*, and hereafter refer to as “*Medicago* biotype”, “*Trifolium* biotype” and “*Genista* biotype”, were considered. For each biotype, we used two representative genotypes differing by their microsatellite profiles (method in Peccoud et al. [29]). These genotypes were collected as single parthenogenetic females from various origins (see details in Table 1). All these genotypes carried secondary symbionts and were selected for this study based on the dominant secondary symbiont of their biotype: *Hamiltonella defensa*, which is highly prevalent in the *Medicago* biotype and fixed in the *Genista* biotype; and *Regiella insecticola*, which predominates in the *Trifolium* biotype [20, 30]. To assess the symbiotic effects on aphid foraging capacities, we created uninfected lineages by removing the secondary symbiont in these six aphid genotypes using antibiotic treatments described in Sochard et al. [31]. Then, we compared for the same genotype, aphids with or without the original symbiont. We thus considered 12 aphid lineages in total (3 pea aphid biotypes × 2 aphid genotypes × 2 symbiotic status). Before carrying out the experiments, the genotypic and symbiotic status of all 12 lineages were checked following Peccoud et al. [32]. All aphid lineages were reared on the broad bean (*Vicia faba*), a “universal” host plant on which all pea aphid biotypes develop and reproduce well [13], under controlled climatic conditions: 20°C, 60% relative humidity and a 16:8 L:D photoperiod that maintain sustained clonal reproduction.

Table 1: Features of the pea aphid genotypes used in the experiments

| Name in this study | Sampling location | Collection date | Biotype | Secondary symbiont |
|--------------------|----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------|
| Ms1 | Noyal (France) | September 2014 | <i>Medicago sativa</i> | <i>Hamiltonella defensa</i> |
| Ms2 | Bugey (France) | August 2011 | <i>M. sativa</i> | <i>H. defensa</i> |
| T1 | Ibaraki prefecture (Japan) | May 2014 | <i>Trifolium sp</i> | <i>Regiella insecticola</i> |
| T2 | York (UK) | December 2002 | <i>Trifolium sp</i> | <i>R. insecticola</i> |
| Gt1 | Bugey (France) | June 2014 | <i>Genista tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> |
| Gt2 | Bugey (France) | June 2014 | <i>G. tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> |

Experiment 1: Long distance exploration capacity

To study the effects of secondary symbionts on long-distance exploration capacities of plant-specialized aphid genotypes, we measured for each of the 12 lineages their ability

to produce winged offspring as a proxy of dispersal potential. To induce the production of winged offspring, aphids were exposed to a one-day crowding/starvation treatment, as this combined treatment triggers winged offspring production for one to five days depending on aphid lineage [33, 34]. Absence of food during the crowding aimed at enhancing aphids' mobility and thus antennal contacts between congeners that are responsible for winged morph induction [35]. Prior to crowding, aphids were reared on healthy plants with a low density of individuals (max 5 adults per plant for few days) for at least two generations, because maternal and grand-maternal environment can influence winged offspring production [33, 36]. Thirty standardized 9-day-old adults were placed in a small Petri dish (5cm diameter) with no nutritional source during 24 hours. After this treatment, five subsets of three aphids were installed on new *V. faba* plants and allowed to reproduce for two days. The remaining crowded adults were discarded or used to produce winged offspring for the experiment 3. After 48 hours, adults were removed while their offspring were kept on the plant until adulthood to determine their morph (winged vs. wingless). Because the crowding/starvation treatment was stressful, some adults died during the experiment, so the number of living adults after the two days of production was noted (as dying aphids may have not contributed effectively to fecundity). The experiment was repeated 10 times for each lineage, for a total of 25,573 individuals identified for their dispersal morph (*i.e.*, winged or wingless).

Experiment 2: Short-distance exploration capacity and environment complexity

To study the effects of secondary symbionts on short-distance exploration capacities of plant-specialized aphid genotypes, we measured for each of the 12 lineages their ability to find a host plant in two artificial environments differing by their degree of complexity. The experimental design consisted in a 25 x 28 cm Plexiglas plate placed at the water's edge to avoid aphids to escape from the system (Fig. 2). At one plate side, experimental wingless aphids were aligned on a starting line while a *V. faba* plant was placed in a tube filled with soil at the opposite side (22 cm apart). In this experiment, aphids were facing more or less challenging environments: a simple environment, which presented no obstacles between the starting line and the plant, and a complex environment presented several obstacles: a bottleneck right after the starting line followed by three series of holes filled with water (Fig. 2). To increase their motivation to explore the environment, aphids were starved in a Petri dish (9 cm diameter) for 20 hours prior the experiment. One

experiment consisted in 40 aphids split into two batches (20 aphids per environment treatment). At the beginning of the experiment, aphids were aligned on the starting line in a given environment and 4 hours later, the number of aphids on the plant was recorded. The experiment was repeated 5 to 7 times for each lineage, overall 2,598 individuals were considered in the data analyses.

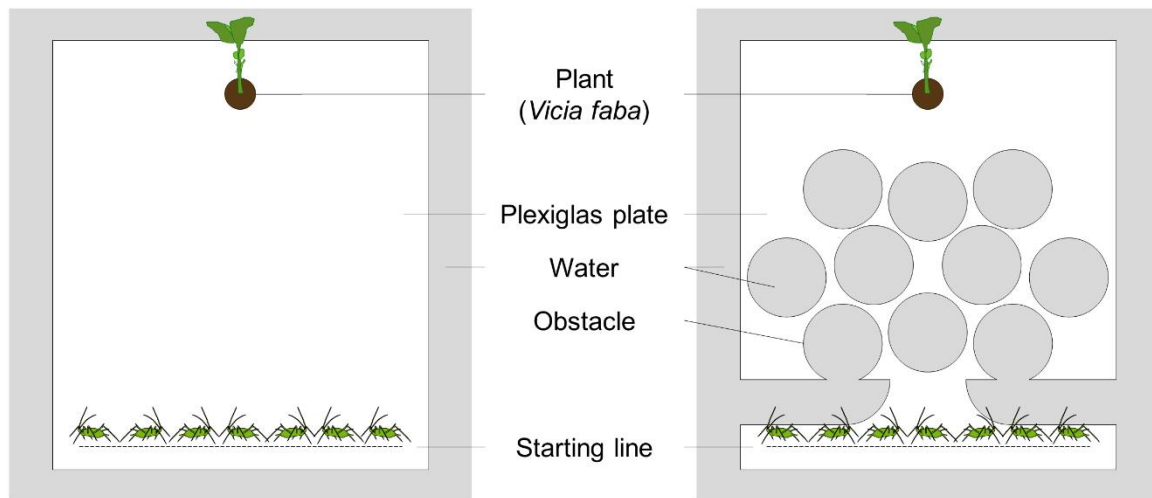


Fig 2: Experimental design to test the ability of wingless aphids to find a host plant in two environments: (left) simple and (right) complex environment.

Experiment 3: Host-plant choice

To study the effects of secondary symbionts on host-plant choice of plant-specialized aphid genotypes, we measured for each of the 12 lineages their ability to choose their host plant among three different legume species. The experimental design consisted in a Plexiglas cage (50 cm × 50 cm × 50 cm) containing three plants, one of each species preferred by the three aphid biotypes tested here (*i.e.*, *M. sativa*, *T. repens* and *G. tinctoria*). Plants were cut to fit 11-12 cm high and disposed in triangle, 22 cm away from the center of the cage. The cage was covered outside with white paper to limit the influence of the surrounding environment on aphid behaviors. At the beginning of the experiment, twenty young winged adults (8-11 days) of a given aphid lineage were introduced in the center of the cage, in a paper tube (6 cm high) to force them flying. During the course of the experiment, the number of individuals on each plant was recorded at 1, 6, 24 and 48 hours after their release. The experiment was repeated 7 to 16 times for each lineage, overall 7,855 individuals were analyzed in the dataset.

Statistical analysis

I – Univariate analyses

As we were primarily interested in testing secondary symbiont effects on foraging capacities of plant-specialized aphid genotypes, each pea aphid biotype was analyzed separately in this first set of analyses.

To test whether secondary symbionts affect long-distance exploration capacities of plant-specialized aphid genotypes, the proportion of winged offspring produced after the crowding treatment was analyzed against the symbiotic status of aphids, the aphid genotype and the interaction between both, by using a Generalized Linear Mixed Model (noted hereafter GLMM) assuming a binomial distribution with a logit link function. Because aphid density influences winged offspring production [37], we included the total number of offspring as a covariate in the GLMMs. Because some experimental aphids originated from the same crowding treatment, we introduced the ID experiment as a random factor in models to include data substructure (see Equation 1).

$$\text{Offspring morph}_{ij} \sim \text{Binomial}(n_{ij}; \pi_{ij})$$

$$\text{logit}(\text{Offspring morph})_{ij} = \text{Symbiotic status}_{ij} + \text{Aphid lineage}_{ij} + \text{Symbiotic status}_{ij} \times \text{Aphid lineage}_{ij} + \text{Number of offspring}_{ij} + (\text{ID}_i)$$

(eqn 1)

where $\text{Offspring morph}_{ij}$ is the j^{th} observation in the replicate i , n_{ij} is the number of observations, π_{ij} is the probability of being winged and ID is the random intercept.

To test whether secondary symbionts affect short-distance exploration capacities of plant-specialized aphid genotypes in the two environments, the proportion of aphids that reached the plant was analyzed against three fixed factors and their interactions: the symbiotic status of aphids, the aphid genotype and the environment treatment (*i.e.*, simple vs. complex) by using GLMMs assuming a binomial distribution with a logit link function. Because some experimental aphids originated from the same starving treatment, we introduced the ID experiment as a random factor in models to include data substructure (see Equation 2).

$$\text{Aphid on plant}_{ij} \sim \text{Binomial}(n_{ij}; \pi_{ij})$$

$$\text{logit}(\text{Aphid on the plant})_{ij} = \text{Symbiotic status}_{ij} + \text{Aphid lineage}_{ij} + \text{Environment complexity}_{ij} + \text{Symbiotic status}_{ij} \times \text{Aphid lineage}_{ij} + \text{Symbiotic status}_{ij} \times \text{Environment complexity}_{ij}$$

$$\text{complexity}_{ij} + \text{Aphid lineage}_{ij} \times \text{Environment complexity}_{ij} + \text{Symbiotic status}_{ij} \times \text{Aphid lineage}_{ij} \times \text{Environment complexity}_{ij} + (\text{ID}_i)$$

(eqn 2)

where $\text{Aphid on plant}_{ij}$ is the j^{th} observation in the replicate i , n_{ij} is the number of observations, π_{ij} is the probability of reaching the plant and ID is the random intercept.

To test whether secondary symbionts affect host plant choice of plant-specialized aphid genotypes, two dependent variables were analyzed: the proportion of aphids on a plant (either *M. sativa*, *T. repens* or *G. tinctoria*) and among these aphids, the proportion of those that were on their host plant (e.g. aphids of the *Medicago* biotype on *M. sativa*). Each dependent variable was analyzed against three fixed factors and their interactions: the symbiotic status of aphids, the aphid genotype and the observation time (*i.e.*, a four-level factor: 1h, 6h, 24h, 48h) by using a GLMMs assuming a binomial distribution with a logit link function. Because some experimental aphids were tested in the same cage, we introduced the ID experiment as a random factor in models to include data substructure (see Equation 3).

$$\text{Dependent}_{ij} \sim \text{Binomial}(n_{ij}; \pi_{ij})$$

$$\text{logit}(\text{Dependent}_{ij}) = \text{Symbiotic status}_{ij} + \text{Aphid lineage}_{ij} + \text{Time}_{ij} + \text{Symbiotic status}_{ij} \times \text{Aphid lineage}_{ij} + \text{Symbiotic status}_{ij} \times \text{Time}_{ij} + \text{Aphid lineage}_{ij} \times \text{Environment}_{ij} \text{ complexity}_{ij} + \text{Symbiotic status}_{ij} \times \text{Aphid lineage}_{ij} \times \text{Time}_{ij} + (\text{ID}_i)$$

(eqn 3)

where Dependent_{ij} is the proportion of aphids on a plant or the proportion of those that were on their host plant of the j^{th} observation in the replicate i , n_{ij} is the number of observations, π_{ij} is the probability of reaching the plant and ID is the random intercept.

For each GLMM, the significance of the explanatory variables was tested using likelihood ratio tests. For each significant covariate, the associated estimated regression parameters were analysed to interpret the fitted models. All statistics were performed by using the package *lme4* [38] in the software R [39] to fit model in Equations (1-3). Model assumptions were verified by plotting residuals versus fitted values for all models.

II – Multivariate analysis

To visualize simultaneously the effects of plant specialization and secondary symbionts on the foraging capacities of aphid genotypes, we conducted a principal

component analysis (PCA) by considering five variables measured in the three experiments: the proportion of winged offspring (1) (experiment 1), the proportion of aphids that reached a plant in a simple (2) and a complex (3) environment (experiment 2), the proportion of aphids on a plant (4) and on their host plant (5) (experiment 3). As each experimental aphid individual was tested in one experiment only, the mean value of these five variables was used in this PCA for all 12 aphid lineages. To complement the PCA analysis, we assessed the differences in foraging capacities between biotypes in uninfected individuals only, for the six genotypes using GLMMs (Supplementary material Table 1).

All GLMMs in supplementary were analyzed using the same method as described in the previous sections and the PCA analysis was computed using the package *ade4* [40] and plotted using the package *RVAideMemoire* (Hervé 2019) in R.

Results

Variation in winged offspring production

In the *Medicago* biotype, the symbiotic status influenced the winged offspring production depending on the aphid genotype (Table 2). While the symbiont infection had no effect on winged offspring production in Ms2 genotype, it increased by 55% in individuals of Ms1 genotype infected with *H. defensa* (Fig. 3). In the *Trifolium* biotype, the production was strongly influenced by the aphid genotype, the symbiotic status and the interaction between both factors (Table 2). In T1 and T2 genotypes, aphids produced about 50% and 7% of winged offspring respectively. Aphids infected with *R. insecticola* produced less winged than uninfected ones, especially in T2 genotype infected aphids, where virtually no winged offspring was produced. In the *Genista* biotype, the symbiotic status had an effect on the proportion of winged offspring depending on the aphid genotype but in opposite direction for Gt1 and Gt2. While the infection with *H. defensa* reduced the proportion by 48% in Gt1, it increased by 51% in Gt2. As expected, the density (number of offspring produced in two days) positively influenced the winged offspring production in the three biotypes.

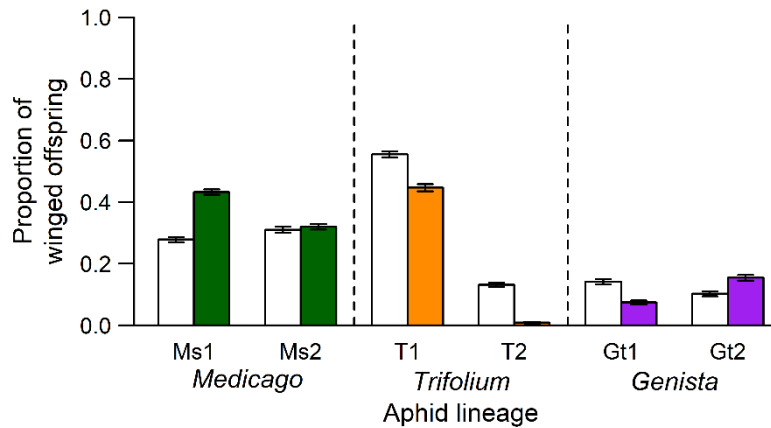


Fig 3: Plant specialization and symbiont effects on the rate of winged offspring produced after a crowding/starvation treatment. White bars represent uninfected aphids and colored bars represent infected aphids (with *H. defensa* for the *Medicago* and the *Genista* biotypes (green and purple respectively) and with *R. insecticola* for genotypes of the *Trifolium* biotype (orange)). Error bars correspond to standard errors.

Variation in short-distance exploration

In the *Medicago* biotype, the effect of the symbiotic status on the proportion of aphids that reached the plant depended on both the environmental treatment and the aphid genotype (Table 2). In Ms1 genotype, the proportion of aphids reaching the plant was higher in individuals infected with *H. defensa* in the complex environment only. In Ms2 genotype, symbiotic effect was opposed in the two environments, with more aphids on the plant when infected with *H. defensa* in the simple environment and less infected aphids reaching the plant in the complex environment (Fig. 4). In the *Trifolium* biotype, the proportion of aphids that reached the plant was only influenced by the environment treatment, with less aphids finding the plant in the complex environment (Fig. 4). In the *Genista* biotype, the proportion of aphids reaching the plant was reduced in the complex environment and varied between genotypes. Individuals of the Gt2 genotype were less performant to find the plant (Fig. 4).

Table 2: Significance of covariates included in linear models to explain variation in the proportion of winged offspring production, the proportion of wingless aphids that reached the plant, the proportion of winged aphids that found a plant and that found their host plant in pea aphid, *A. pisum*. (-) means that the covariate was not included in the models. χ^2 values refer to likelihood ratio tests. Grey cells designate significant fixed-effects.

| | | Variables (distribution family) | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------------|---------------------------------|-----------------|----------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|--------------------------------|-----------------|
| | | Experiment 1 | | Experiment 2 | | Experiment 3 | | | |
| | | Winged production (Binomial) | | Reach the plant (Binomial) | | Find a plant (Binomial) | | Find the host plant (Binomial) | |
| Pea aphid biotype | Covariates | χ^2 (d.f.) | <i>P</i> -value | χ^2 (d.f.) | <i>P</i> -value | χ^2 (d.f.) | <i>P</i> -value | χ^2 (d.f.) | <i>P</i> -value |
| <i>Medicago sativa</i> | Aphid genotype (1) | 0.04 (1) | 0.84 | 2.54 (1) | 0.11 | 4.82 (1) | < 0.05 | 0.34 (1) | 0.56 |
| | Symbiotic status (2) | 3.06 (1) | 0.08 | 0.57 (1) | 0.45 | 2.10 (1) | 0.15 | 2.35 (1) | 0.13 |
| | Density (3) | 21.64 (1) | < 0.001 | - | - | - | - | - | - |
| | Environment complexity (4) | - | - | 74.77 (1) | < 0.001 | - | - | - | - |
| | Time (5) | - | - | - | - | 158.54 (3) | < 0.001 | 105.1 (3) | < 0.001 |
| | Interaction (1) * (2) | 5.03 (1) | < 0.05 | 0.23 (1) | 0.63 | 5.35 (1) | < 0.05 | 0.95 (1) | 0.33 |
| | Interaction (1) * (4) | - | - | 8.72 (1) | < 0.01 | - | - | - | - |
| | Interaction (2) * (4) | - | - | 0.31 (1) | 0.58 | - | - | - | - |
| | Interaction (1) * (2) * (4) | - | - | 19.12 (1) | < 0.001 | - | - | - | - |
| | Interaction (1) * (5) | - | - | - | - | 31.54 (3) | < 0.001 | 4.11 (3) | 0.25 |
| | Interaction (2) * (5) | - | - | - | - | 14.67 (3) | < 0.01 | 2.48 (3) | 0.48 |
| | Interaction (1) * (2) * (5) | - | - | - | - | 0.35 (3) | 0.95 | 3.08 (3) | 0.38 |
| <i>Trifolium sp.</i> | Aphid genotype (1) | 71.05 (1) | < 0.001 | 0.44 (1) | 0.51 | - | - | - | - |
| | Symbiotic status (2) | 18.45 (1) | < 0.001 | 3.05 (1) | 0.08 | 0.035 (1) | 0.85 | 0.36 (1) | 0.55 |
| | Density (3) | 25.28 (1) | < 0.001 | - | - | - | - | - | - |
| | Environment complexity (4) | - | - | 62.09 (1) | < 0.001 | - | - | - | - |
| | Time (5) | - | - | - | - | 87.84 (3) | < 0.001 | 119.43 (3) | < 0.001 |
| | Interaction (1) * (2) | 32.14 | < 0.001 | 1.98 (1) | 0.16 | - | - | - | - |
| | Interaction (1) * (4) | - | - | 1.76 (1) | 0.19 | - | - | - | - |
| | Interaction (2) * (4) | - | - | 0.51 (1) | 0.48 | - | - | - | - |
| | Interaction (1) * (2) * (4) | - | - | 0.41 (1) | 0.52 | - | - | - | - |
| | Interaction (2) * (5) | - | - | - | - | 0.99 (3) | 0.81 | 2.68 (3) | 0.44 |
| <i>Genista tinctoria</i> | Aphid genotype (1) | 4.60 (1) | < 0.05 | 5.25 (1) | < 0.05 | 0.86 (1) | 0.35 | 8.57 (1) | < 0.01 |
| | Symbiotic status (2) | 0.66 (1) | 0.42 | 0.99 (1) | 0.32 | 0.44 (1) | 0.51 | 2.35 (1) | 0.13 |
| | Density (3) | 51.79 (1) | < 0.001 | - | - | - | - | - | - |
| | Environment complexity (4) | - | - | 10.70 (1) | < 0.01 | - | - | - | - |
| | Time (5) | - | - | - | - | 249.56 (3) | < 0.001 | 269.99 (3) | < 0.001 |
| | Interaction (1) * (2) | 6.28 (1) | < 0.05 | 0.17 (1) | 0.68 | 1.26 (1) | 0.26 | 0.10 (1) | 0.76 |
| | Interaction (1) * (4) | - | - | 0.70 (1) | 0.40 | - | - | - | - |
| | Interaction (2) * (4) | - | - | 3.53 (1) | 0.06 | - | - | - | - |
| | Interaction (1) * (2) * (4) | - | - | 0.09 (1) | 0.77 | - | - | - | - |
| | Interaction (1) * (5) | - | - | - | - | 4.87 (3) | 0.18 | 6.96 (3) | 0.07 |
| | Interaction (2) * (5) | - | - | - | - | 2.01 (3) | 0.57 | 1.43 (3) | 0.70 |
| | Interaction (1) * (2) * (5) | - | - | - | - | 5.33 (3) | 0.15 | 1.76 (3) | 0.62 |

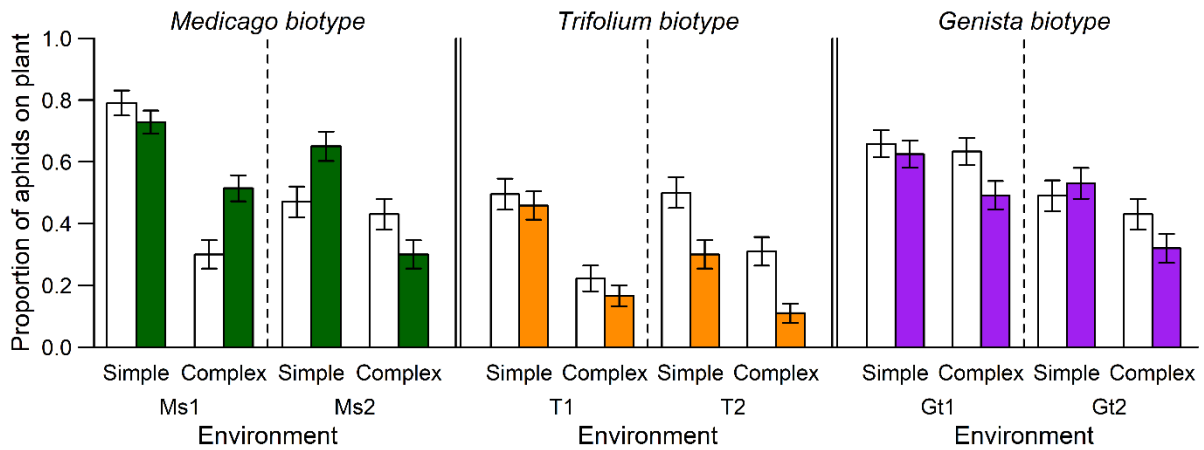


Fig 4: Plant specialization, symbiont and environment complexity effects on the rate of wingless aphids that reached a plant after 4 hours trial. White bars represent uninfected aphids and colored bars represent infected aphids (with *H. defensa* for the *Medicago* and the *Genista* biotypes (green and purple respectively) and with *R. insecticola* for genotypes of the *Trifolium* biotype (orange)). Error bars correspond to standard errors.

Variation in host plant choice

In the *Medicago* biotype, the proportion of aphids on a plant significantly increased between one and six hours, then stabilized until 48h, with a greater proportion of aphids reaching a plant in Ms2 genotype. The symbiotic status of aphids influenced the proportion of aphids finding a plant in Ms1 genotype only, and this effect was observed at both 24h and 48h. For these two time points, infection with *H. defensa* reduced this proportion by 35% (Fig. 5a). Among individuals that found a plant, the proportion of aphids on their host plant (*i.e.* on *M. sativa*) varied with time only and reached about 72% at the end of experiment (Fig. 5b). In the *Trifolium* biotype, T2 genotype was excluded as it produced virtually no winged individuals (Fig. 3). For T1 genotype, the symbiotic status had no effect neither on the proportion of aphids on a plant nor on the proportion of aphids on their host plant. These two variables varied with time in a different manner: while the proportion of aphids on a plant stabilized at 67% after six hours, the proportion on their host plant increased gradually to reach 79% after 48h (Fig. 5a-b). In the *Genista* biotype, we found no effect of the symbiotic status on the proportion of aphids on a plant. However, there was a time effect on this proportion regardless of the aphid genotype, with an average of 57% aphids on a plant from six hours (Fig. 5a). The proportion of aphids that found their host plant depended on both the time and the aphid genotype, Gt2 genotype performing less than Gt1 one to find *G. tinctoria*. Between 82 and 90% of aphids

of this biotype that found a plant were on their host plant at the end of the experiment (Fig. 5b).

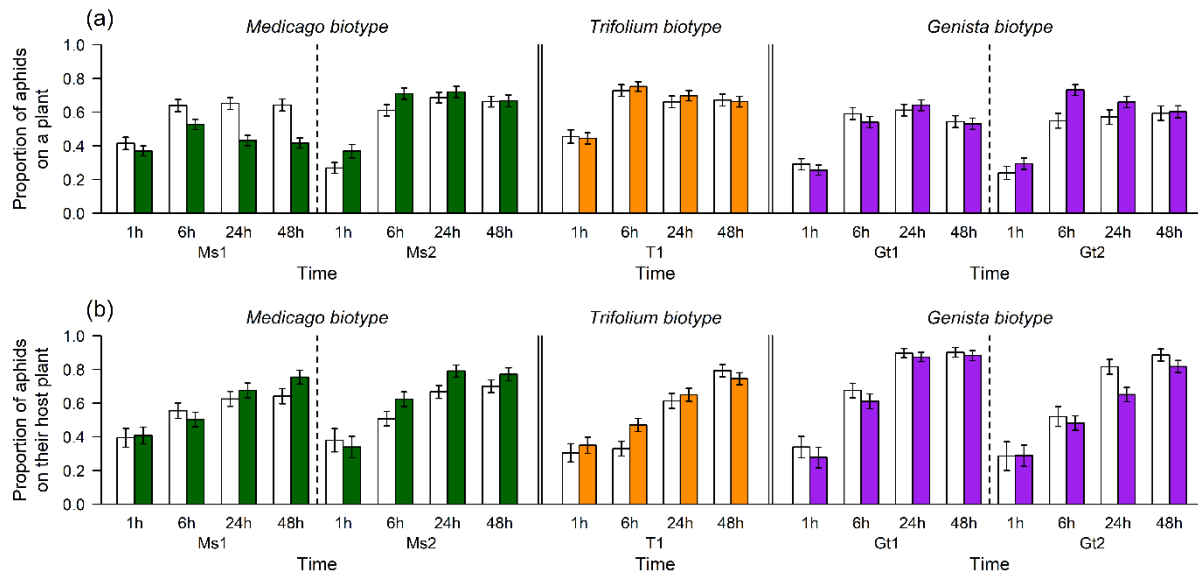


Fig 5: Plant specialization and symbiont effects on the rate of winged aphids (a) on a plant whatever the plant species or (b) on their host plant at 1h, 6h, 24h and 48h after release. White bars represent uninfected aphids and colored bars represent infected aphids (with *H. defensa* for the *Medicago* and the *Genista* biotypes (green and purple respectively) and with *R. insecticola* for genotypes of the *Trifolium* biotype (orange)). Error bars correspond to standard errors.

Global analysis

The two first axes of the PCA represented about 79% of the multivariate data variation. Individual plot showed that the aphid lineages were mostly differentiated according to the host genotype (i.e. between biotypes and between genotypes within biotypes) (Fig. 6A). For all dependent variables analyzed, the biotype had a significant effect (Supplementary material Table 1) and we showed in the previous sections that aphid genotype also affected most variables (Table 2). Relatively, the symbiotic status of aphids had a limited effect on those variables, except in the Ms1 genotype in which infection with *H. defensa* induced significant variation in three out of five dependent variables analyzed (Table 2).

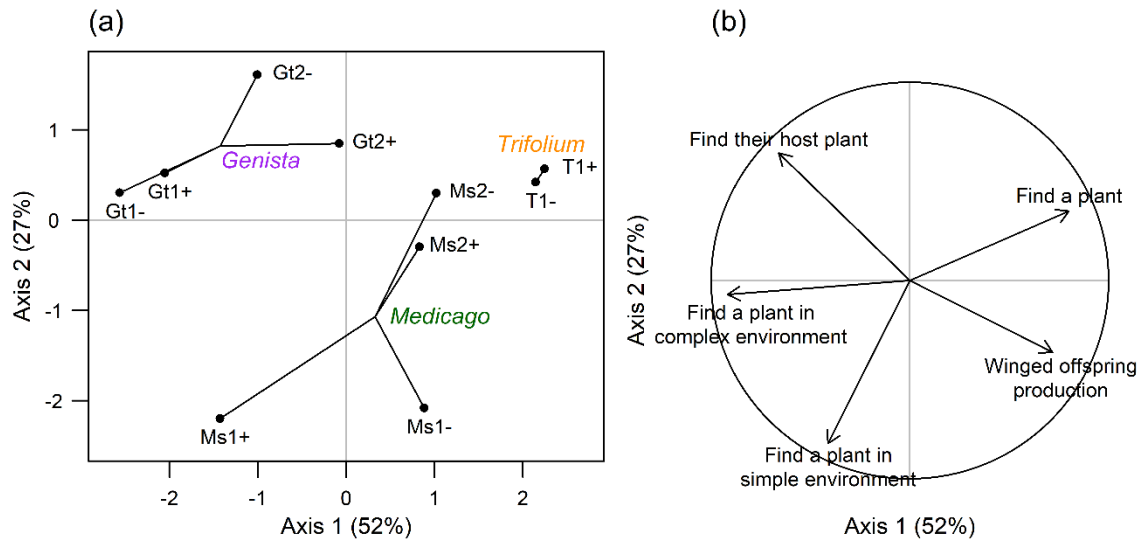


Fig 6: Principal component analysis on the data from experiments 1, 2 and 3 (see text). (A) Scatter plot (two first axes) of the PCA showing the position of each lineage grouped by their biotype and (B) Correlation circle of the variables used in the PCA. (-) corresponds to uninfected lineages and (+) corresponds to lineages infected with either *H. defensa* or *R. insecticola*.

Discussion

Whether symbionts influence the foraging capacities of their hosts is an open question. Here, we used plant-specialized aphid genotypes to test if associated symbionts could affect their foraging capacities in controlled conditions. We found that the overall effect of symbionts on foraging capacities was moderate relative to the variation due to host genotype and biotype. However, symbionts significantly influenced, alone or in interaction with the insect genotype, most of the traits examined here, which would have consequences on aphid population dynamics and the optimization of their foraging behaviors.

Symbiont influence on foraging capacities

We found that symbionts influence winged offspring production in different manners: while the presence of *R. insecticola* was associated with a decrease in winged production in our experiments, *H. defensa* produced opposite or no effects depending on host genotypes. Previous studies reported repeatedly some effects of *R. insecticola* on winged aphid production, but in a direction which varies from one study to another [23–25]. These differences between studies and symbionts could reflect the specificity of symbiont effects as well as the interactions of the host and symbiont genotypes. The mechanism by

which symbionts may influence the winged offspring production of their host is intriguing but could take place during either the induction phase (i.e., stimulation by crowding) or the determination phase (i.e., morph orientation). In the case symbionts affect the morph induction, they might alter aphid activity and motion [26], thus reducing or increasing the antennal contacts necessary to induce the production of winged individuals [35]. In the case symbionts affect the morph determination, as winged offspring are induced hormonally [41–43], they may act more directly by interfering with molecular pathways involved in wing determination [44]. Further experiments combining genetic and molecular approaches are needed to elucidate how symbionts modulate wing morph production.

Similarly to Schretter et al. [45] who showed that the microbiota of *D. melanogaster* modulates the locomotion of its host, we found some effects of symbionts on aphid short-distance exploration. In our case, effects were however not so clear as we found opposite effects of symbionts between aphid genotypes and environments (i.e. simple vs complex). In addition, these effects on exploration were not systematic as they only occurred in one biotype. This variation in symbiotic effects is consistent with another study that found only moderate and non-persistent effects of the microbiota on multiple behaviors of *D. melanogaster* including locomotion [46]. Symbiotic effects on aphids' exploration could be linked with differences in neural stimulation, as it was suggested by Schretter et al. [45]. Furthermore, symbionts could interfere with the sensory system, modifying the perception of olfactory cues of the plant or affecting insect's motivation toward a potential host. However, the modulation of aphids' exploration could also be a by-product of the symbiont infection, because they are costly to maintain [47].

Concerning host plant choice, we found no effect of symbionts on the proportion of aphids on their host plant. These results are in contradiction with recent studies on fruit flies showing that insect microbiota affects foraging behavior and more specifically food choice [9, 10, 48]. Absence of symbiotic effects on host plant choice in our experiment does not necessarily mean that symbionts cannot affect this plant selection behavior. In natural populations, symbionts and hosts are under the same selective pressures, which may favor associations between partners with common interests. So as host plant selection is a major component of aphid survival and fitness [17, 18], host-symbiont coevolution may have eliminated those associations where symbionts altered host plant

fidelity. To test this hypothesis, new associations mixing symbionts and aphids from different biotypes should be used in host plant choice experiment to see if acquisition of a new symbiont from a different plant-specialized population can affect aphid preference.

Respective influence of symbionts and aphid genotypes on foraging capacities

Our global analysis revealed that both aphid biotype and genotype had a strong influence on foraging capacities, relative to symbionts. In accordance with previous studies, we found that aphid biotypes varied in the proportion of winged offspring they produce [49, 50] or in their host plant selection [11, 18], even if only a small number of genotypes has been considered for each biotype in this study. Consistent with previous works, our results highlighted that host plant choice relies on trials and errors, with most aphids being settled on their host plant after 24h [18]. We can hypothesize that the differences observed between biotypes on the proportion of aphids on their host plant are linked either to their capacity to colonize another plant species or to different sensory capacities to detect a suitable host. Our multivariate analysis showed that aphids from the same biotype shared similar foraging strategies, which is not very surprising as aphid biotypes differ in many other aspects of their biology such as their genome [51, 52], gene expression [53], defensive behaviors [54, 55], attachment to host plants [56] and relative performance on various plants [12, 16]. Despite that host plant specialization plays a crucial role in foraging capacities, certain traits present an intra-biotype variation as for example the winged offspring production, which commonly varies between genotypes [33, 57].

Symbiosis and the Optimal Foraging Theory (OFT)

In their OFT's seminal paper '*Animal foraging: past, present and future*', Perry and Pianka [58] reviewed the main factors affecting animal foraging behavior: animal decision rules can be modulated by external (e.g. resources availability, social interaction, local risk, habitat structure), internal (e.g. hunger, age, learned experience, reproductive state) and historical factors (e.g. sensory systems, morphological characteristics, physiology parameters). Since the end of the 20th century, ecologists are witnessing a paradigm shift where individual phenotypes are now seen as the result of host-microbe interactions, leading to the notion of the holobiont [59, 60]. Our results and other recent studies are revealing the importance of microbial partners on individual foraging behaviors [9, 10,

48, 61]. Behavioral ecologists should now consider the influence of microbial partners on animal decision rules and by extent, on the optimal state of the observed behaviors. Undoubtedly, considering animal individuals as holobionts will advance theoretical and empirical research on animal behaviors.

Declarations

Funding

This research was supported by the project ANR Hmicmac 16-CE02-0014.

Conflicts of interest/Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest.

Availability of data and material

All datasets detailed in the present manuscript will be submitted to DRYAD online repository once the paper accepted for publication.

Authors' contributions

All authors conceived and designed the experiments. Sochard and Dupond conducted the experiments. Sochard and Outreman analyzed the data. Outreman and Simon supervised this study. All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication.

Acknowledgments

We thank Gaëtan Denis and Jean-François Le Gallic for the maintenance of aphid cultures and their help in plant production, and Frédérique Mahéo for regular checking of aphid genotype and symbiotic status using molecular tools. We thank Agence Nationale de la Recherche (ANR) for funding support.

References

1. Futuyma DJ, Moreno G (1988) The evolution of ecological specialization. *Annu Rev Ecol Syst* 19:207–233
2. Jaenike J (1990) Host Specialization in Phytophagous Insects. *Annu Rev Ecol Syst* 21:243–273

3. Forister ML, Dyer LA, Singer MS, et al (2012) Revisiting the evolution of ecological specialization, with emphasis on insect–plant interactions. *Ecology* 93:981–991. <https://doi.org/10.1890/11-0650.1>
4. Dekker T, Ibba I, Siju KP, et al (2006) Olfactory shifts parallel superspecialism for toxic fruit in *Drosophila melanogaster* sibling, *D. sechellia*. *Curr Biol* 16:101–109. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.11.075>
5. Hansen AK, Moran NA (2014) The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Mol Ecol* 23:1473–1496. <https://doi.org/10.1111/mec.12421>
6. Tsuchida T, Koga R, Fukatsu T (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* 303:1989–1989. <https://doi.org/10.1126/science.1094611>
7. Tsuchida T, Koga R, Matsumoto S, Fukatsu T (2011) Interspecific symbiont transfection confers a novel ecological trait to the recipient insect. *Biol Lett* 7:245–248. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2010.0699>
8. Wagner SM, Martinez AJ, Ruan Y-M, et al (2015) Facultative endosymbionts mediate dietary breadth in a polyphagous herbivore. *Funct Ecol* 29:1402–1410. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12459>
9. Leitão-Gonçalves R, Carvalho-Santos Z, Francisco AP, et al (2017) Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. *PLoS Biol* 15:e2000862. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000862>
10. Wong AC-N, Wang Q-P, Morimoto J, et al (2017) Gut microbiota modifies olfactory-guided microbial preferences and foraging decisions in *Drosophila*. *Curr Biol* 27:2397–2404.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.022>
11. Ferrari J, Godfray HCJ, Faulconbridge AS, et al (2006) Population differentiation and genetic variation in host choice among pea aphids from eight host plant genera. *Evolution* 60:1574–1584. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb00502.x>
12. Ferrari J, Via S, Godfray HCJ (2008) Population differentiation and genetic variation in performance on eight hosts in the pea aphid complex. *Evolution* 62:2508–2524. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00468.x>
13. Peccoud J, Ollivier A, Plantegenest M, Simon J-C (2009) A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proc Natl Acad Sci* 106:7495–7500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0811117106>
14. Peccoud J, Mahéo F, de la Huerta M, et al (2015) Genetic characterisation of new host-specialised biotypes and novel associations with bacterial symbionts in the pea aphid complex. *Insect Conserv Divers* 8:484–492. <https://doi.org/10.1111/icad.12131>

15. Via S, Bouck AC, Skillman S (2000) Reproductive isolation between divergent races of pea aphids on two hosts. ii. selection against migrants and hybrids in the parental environments. *Evolution* 54:1626–1637. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2000.tb00707.x>
16. Ferrari J, Godfray HCJ (2006) The maintenance of intraspecific biodiversity: the interplay of selection on resource use and on natural enemy resistance in the pea aphid. *Ecol Res* 21:9–16. <https://doi.org/10.1007/s11284-005-0136-8>
17. Via S (1999) Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. I. Gene flow restriction and habitat choice. *Evolution* 53:1446–1457. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb05409.x>
18. Caillaud MC, Via S (2000) Specialized feeding behavior influences both ecological specialization and assortative mating in sympatric host races of pea aphids. *Am Nat* 156:606–621. <https://doi.org/10.1086/316991>
19. Ferrari J, West JA, Via S, Godfray HCJ (2012) Population genetic structure and secondary symbionts in host-associated populations of the pea aphid complex. *Evolution* 66:375–390. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01436.x>
20. Henry LM, Peccoud J, Simon J-C, et al (2013) Horizontally transmitted symbionts and host colonization of ecological niches. *Curr Biol* 23:1713–1717. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.029>
21. Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran NA (2010) Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu Rev Entomol* 55:247–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085305>
22. Heyworth ER, Ferrari J (2015) A facultative endosymbiont in aphids can provide diverse ecological benefits. *J Evol Biol* 28:1753–1760. <https://doi.org/10.1111/jeb.12705>
23. Leonardo TE, Mondor EB (2006) Symbiont modifies host life-history traits that affect gene flow. *Proc R Soc B Biol Sci* 273:1079–1084. <https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3408>
24. Tan W-H, Reyes ML, Hoang KL, et al (2018) How symbiosis and ecological context influence the variable expression of transgenerational wing induction upon fungal infection of aphids. *PLoS ONE* 13:e0201865. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201865>
25. Reyes ML, Laughton AM, Parker BJ, et al (2019) The influence of symbiotic bacteria on reproductive strategies and wing polyphenism in pea aphids responding to stress. *J Anim Ecol* 88:601–611. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12942>
26. Dion E, Polin SE, Simon J-C, Outreman Y (2011) Symbiont infection affects aphid defensive behaviours. *Biol Lett* 7:743–746. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0249>
27. Polin S, Simon J-C, Outreman Y (2014) An ecological cost associated with protective symbionts of aphids. *Ecol Evol* 4:836–840. <https://doi.org/10.1002/ece3.991>

28. Ramírez-Cáceres GE, Moya-Hernández MG, Quilodrán M, et al (2019) Harbours the secondary endosymbiont *Regiella insecticola* increases predation risk and reproduction in the cereal aphid *Sitobion avenae*. *J Pest Sci* 92:1039–1047. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01090-z>
29. Peccoud J, Figueroa CC, Silva AX, et al (2008) Host range expansion of an introduced insect pest through multiple colonizations of specialized clones. *Mol Ecol* 17:4608–4618. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03949.x>
30. Leclair M, Pons I, Mahéo F, et al (2016) Diversity in symbiont consortia in the pea aphid complex is associated with large phenotypic variation in the insect host. *Evol Ecol* 30:925–941. <https://doi.org/10.1007/s10682-016-9856-1>
31. Sochard C, Morlière S, Toussaint G, et al (2020) Examination of the success rate of secondary symbiont manipulation by microinjection methods in the pea aphid system. *Entomol Exp Appl* eea.12878. <https://doi.org/10.1111/eea.12878>
32. Peccoud J, Bonhomme J, Mahéo F, et al (2014) Inheritance patterns of secondary symbionts during sexual reproduction of pea aphid biotypes: Sex and inheritance of aphid symbionts. *Insect Sci* 21:291–300. <https://doi.org/10.1111/1744-7917.12083>
33. Sutherland ORW (1969) The role of crowding in the production of winged forms by two strains of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol* 15:1385–1410. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(69\)90199-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(69)90199-1)
34. Weisser WW, Braendle C (2001) Body colour and genetic variation in winged morph production in the pea aphid. *Entomol Exp Appl* 99:217–223. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00820.x>
35. Kunert G, Weisser WW (2005) The importance of antennae for pea aphid wing induction in the presence of natural enemies. *Bull Entomol Res* 95:125–131. <https://doi.org/10.1079/BER2004342>
36. Sutherland ORW (1970) An intrinsic factor influencing alate production by two strains of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol* 16:1349–1354. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(70\)90134-4](https://doi.org/10.1016/0022-1910(70)90134-4)
37. Müller CB, Williams IS, Hardie J (2001) The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. *Ecol Entomol* 26:330–340. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2001.00321.x>
38. Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
39. R Core Team (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
40. Chessel D, Dufour AB, Thioulouse J (2004) The ade4 package - I: One-table methods. *R News* 4:5–10

41. Vellichirammal NN, Madayiputhiya N, Brisson JA (2016) The genomewide transcriptional response underlying the pea aphid wing polyphenism. *Mol Ecol* 25:4146–4160. <https://doi.org/10.1111/mec.13749>
42. Vellichirammal NN, Gupta P, Hall TA, Brisson JA (2017) Ecdysone signaling underlies the pea aphid transgenerational wing polyphenism. *Proc Natl Acad Sci* 114:1419–1423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617640114>
43. Grantham ME, Shingleton AW, Dudley E, Brisson JA (2019) Expression profiling of winged- and wingless-destined pea aphid embryos implicates insulin/insulin growth factor signaling in morph differences. *Evol Dev* ede.12326. <https://doi.org/10.1111/ede.12326>
44. Hu L, Gui W, Chen B, Chen L (2019) Transcriptome profiling of maternal stress-induced wing dimorphism in pea aphids. *Ecol Evol* 9:11848–11862. <https://doi.org/10.1002/ece3.5692>
45. Schretter CE, Vielmetter J, Bartos I, et al (2018) A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in *Drosophila*. *Nature* 563:402–406. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0634-9>
46. Selkrig J, Mohammad F, Ng SH, et al (2018) The *Drosophila* microbiome has a limited influence on sleep, activity, and courtship behaviors. *Sci Rep* 8:10646. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28764-5>
47. Simon J-C, Boutin S, Tsuchida T, et al (2011) Facultative Symbiont Infections Affect Aphid Reproduction. *PLoS ONE* 6:e21831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021831>
48. Qiao H, Keesey IW, Hansson BS, Knaden M (2019) Gut microbiota affects development and olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 222:jeb192500. <https://doi.org/10.1242/jeb.192500>
49. Frantz A, Plantegenest M, Simon J-C (2010) Host races of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* differ in male wing phenotypes. *Bull Entomol Res* 100:59–66. <https://doi.org/10.1017/S0007485309006750>
50. Sentis A, Bertram R, Dardenne N, et al (2019) Different phenotypic plastic responses to predators observed among aphid lineages specialized on different host plants. *Sci Rep* 9:9017. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45220-0>
51. Duvaux L, Geissmann Q, Gharbi K, et al (2015) Dynamics of copy number variation in host races of the pea aphid. *Mol Biol Evol* 32:63–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu266>
52. Nouhaud P, Gautier M, Guin A, et al (2018) Identifying genomic hotspots of differentiation and candidate genes involved in the adaptive divergence of pea aphid host races. *Mol Ecol* 27:3287–3300. <https://doi.org/10.1111/mec.14799>

53. Eyres I, Jaquiéry J, Sugio A, et al (2016) Differential gene expression according to race and host plant in the pea aphid. *Mol Ecol* 25:4197–4215. <https://doi.org/10.1111/mec.13771>
54. Kunert G, Belz E, Simon J-C, et al (2010) Differences in defensive behaviour between host-adapted races of the pea aphid. *Ecol Entomol* 35:147–154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2009.01146.x>
55. Ben-Ari M, Outreman Y, Denis G, et al (2019) Differences in escape behavior between pea aphid biotypes reflect their host plants' palatability to mammalian herbivores. *Basic Appl Ecol* 34:108–117. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2018.10.005>
56. Friedemann K, Kunert G, Gorb E, et al (2015) Attachment forces of pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) on different legume species. *Ecol Entomol* 40:732–740. <https://doi.org/10.1111/een.12249>
57. Grantham ME, Antonio CJ, O'Neil BR, et al (2016) A case for a joint strategy of diversified bet hedging and plasticity in the pea aphid wing polyphenism. *Biol Lett* 12:20160654. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0654>
58. Perry G, Pianka ER (1997) Animal foraging: past, present and future. *Trends Ecol Evol* 12:360–364. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(97\)01097-5](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01097-5)
59. Margulis L, Fester R (1991) Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis. MIT press, Cambridge, Massachusetts
60. Simon J-C, Marchesi JR, Mougél C, Selosse M-A (2019) Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome* 7:1–5. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0619-4>
61. Akami M, Andongma AA, Zhengzhong C, et al (2019) Intestinal bacteria modulate the foraging behavior of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *PLoS ONE* 14:e0210109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210109>

Supplementary material

Supplementary material Table 1: Significance of covariates included in linear models testing the effect of pea aphid biotype on the proportion of winged offspring production, the proportion of wingless aphids that reached the plant, the proportion of winged aphids that found a plant and that found their host plant. The models were performed on uninfected aphids only. (-) means that the covariate was not included in the models. χ^2 values refer to likelihood ratio tests. Grey cells designate significant fixed-effects.

| Covariates | Variables (distribution family) | | | | | | | |
|--------------------------------------|---------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|----------------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|
| | Experiment 1 | | Experiment 2 | | Experiment 3 | | | |
| | Winged production (Binomial) | | Reach the plant (Binomial) | | Find a plant (Binomial) | | Find the host plant (Binomial) | |
| | χ^2 (d.f.) | <i>P</i> - value | χ^2 (d.f.) | <i>P</i> - value | χ^2 (d.f.) | <i>P</i> - value | χ^2 (d.f.) | <i>P</i> - value |
| Biotype (1) | 17.23 (2) | < 0.001 | 5.31 (2) | 0.07 | 6.18 (2) | < 0.05 | 15.99 (2) | < 0.001 |
| Aphid genotype nested in Biotype (2) | 44.96 (3) | < 0.001 | 4.06 (3) | 0.26 | 0.07 (2) | 0.97 | 2.65 (2) | 0.27 |
| Density (3) | 17.89 (1) | < 0.001 | - | - | - | - | - | - |
| Environment complexity (4) | - | - | 43.39 (1) | <0.001 | - | - | - | - |
| Time (5) | - | - | - | - | 249.23 (3) | < 0.001 | 199.11 (3) | < 0.001 |
| Interaction (1) * (4) | - | - | 13.89 (2) | <0.001 | - | - | - | - |
| Interaction (1) * (5) | - | - | - | - | 7.00 (6) | 0.32 | 38.52 (6) | < 0.001 |

ARTICLE 3 :

**LIMITED INFLUENCE OF GAIN AND LOSS OF SYMBIONTS ON HOST
PLANT SELECTION IN SPECIALIZED PEA APHID GENOTYPES**

Corentin Sochard^a, Maïwenn Le Floch^a, Sylvia Anton^b,
Yannick Outreman^{a§}, Jean-Christophe Simon^{c§*}

^a UMR IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ. Rennes, 35000 Rennes, France

^b UMR IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ. Rennes, 49000 Angers, France

^c UMR IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ. Rennes, 35650 Le Rheu, France

§ Equal contribution last author

* Corresponding author: Jean-Christophe Simon (jean-christophe.simon@inrae.fr)

Article soumis dans **Entomologia Generalis** (avril 2020)

Abstract

Recent advances in insect-microbe interactions show that microbial associates can modulate the behaviors of their hosts, such as defensive or food choice behaviors. For phytophagous insects, host plant choice is of utmost importance, because most of them are specialized on a few plant species, which represent not only their food source but often their habitat and reproduction site. Therefore, identifying how microbial symbionts could influence host plant selection provides valuable information on their potential role in the evolution of the diet breadth of phytophagous insects. In this study, we investigated whether bacterial symbiont loss or acquisition modulate host plant selection in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* Harris (Hemiptera: Aphididae). Several aphid lineages were considered, originating from three plant-specialized populations, each adapted to a different plant species. The symbiotic status of aphid lineages was experimentally manipulated to mimic natural events of symbiont loss and acquisition through horizontal transfer. Host plant selection was then tested by releasing aphids in a cage containing three plant species (1 host and 2 non-hosts) and determining the proportion of aphids on each plant. Our results show minor effects of the symbiotic status on aphid host plant choice, indicating that this trait is determined primarily by the aphid genome.

Keywords: Host plant choice; foraging behaviors; secondary symbionts; *Acyrtosiphon pisum*; *Hamiltonella defensa*; *Regiella insecticola*

Introduction

Over the last two decades, evidence has accumulated that plant-associated microorganisms are involved in many aspects of plant-herbivore interactions (Shikano et al. 2017; Grunseich et al. 2019). It has been shown that these microorganisms can modulate the attractiveness of host plants for phytophagous insects but also impact insect performance, either positively or negatively depending on the microorganism, the plant or the insect species (Grunseich et al. 2019). Phytophagous insects also harbor their own microbiota, which can mediate a wide range of phenotypes in their hosts, including traits involved in plant-insect interactions (Sugio et al. 2015). Indeed, several microbial symbionts have been shown to alter the performance of their insect hosts on particular plant species (reviewed in Janson et al. 2008). Yet, less is known about symbiont influence on host plant selection by phytophagous insects. Recent studies on *Drosophila melanogaster* showed that the gut microbiota inoculated in flies can modify food choice (Leitão-Gonçalves et al. 2017, Wong et al. 2017, Qiao et al. 2019). However, we lack more evidence to assess the generality of this phenomenon across a wide range of insect-microbiota associations. In particular, many insect species harbor symbionts, which are vertically transmitted over generations but can also be transmitted horizontally, so identifying their influence on host plant choice would be valuable to better assess their potential role in diversification or specialization of diet breadth of phytophagous insects.

Aphids are associated with the primary endosymbiont *Buchnera aphidicola*, which provides essential amino acids and vitamins lacking in the aphid diet (i.e., plant sap). In addition, they harbor secondary heritable symbionts, which are not essential for host survival but can bring several benefits such as protection from biotic and abiotic stresses (Oliver et al. 2010; Guo et al. 2017). In several aphid species, symbiont communities differ between aphid populations depending on host plants (Henry et al. 2013; Mathé-Hubert et al. 2019; Xu et al. 2019), suggesting symbiont effects on host plant exploitation (Zytynska and Weisser 2016). A few studies gave more direct evidence for an involvement of secondary symbionts in plant-aphid interactions. For example, it has been shown that the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* performs better on clover when infected by the *Regiella insecticola* bacterial symbiont (Tsuchida et al. 2004), although other studies could not reproduce this finding (Sugio et al. 2015). Similarly, Wagner et al. (2015) provided evidence that *Arsenophonus* bacteria promote specialization of the cowpea aphid *Aphis*

craccivora on locust plants.

The pea aphid presents plant-specialized populations, referred to as biotypes, with each biotype specialized on one or a few legume species, leading to genetic differentiation between specialized populations (Ferrari et al. 2006, 2008; Peccoud et al. 2009, 2015). This plant specialization is characterized by higher preference for the plant species of the specific biotype (i.e., the host plant) (Via 1999, Caillaud and Via 2000), increased performance (i.e., higher fitness) on the host plant compared with the alternative ones (Via et al. 2000; Ferrari and Godfray 2006; Ferrari et al. 2006, 2008) and behavioral differences in plant exploitation (Schwarzkopf et al. 2013), exploration and foraging capacities (Sochard et al. submitted_a). In a previous study, we found little effect of secondary symbionts on host plant choice in a small set of lineages from different biotypes, with or without their original secondary heritable symbiont (Sochard et al. submitted_a). Here, we have extended this earlier work by analyzing a larger number of lineages and by testing whether horizontal transfer (gain of a new symbiont) or suppression (loss of the original symbiont) of secondary bacterial symbionts influence host plant selection in plant-specialized genotypes of *A. pisum*. From six pea aphid genotypes belonging to three biotypes, we created twenty-five lineages using symbiont elimination and introduction techniques described in Sochard et al. (2020), each differing by their symbiotic status (i.e., with the original symbiont, without secondary symbiont, and with a new symbiont strain or symbiont species). We then measured the host selection behavior of each lineage in plant choice tests performed in controlled conditions. We found little influence of symbiont loss (two cases) or symbiont acquisition (one case) on host plant search and selection, showing that these behavioral traits are mainly determined by the insect genotype.

Material and methods

Aphid lineages

In this study, we considered three pea aphid biotypes specialized on *Genista tinctoria*, *Medicago sativa* or *Trifolium sp.* (hereafter called ‘*Genista* biotype’, ‘*Medicago* biotype’ and ‘*Trifolium* biotype’). For each biotype, two distinct aphid genotypes naturally infected with the most prevalent heritable secondary bacterial symbiont were considered (Tab.1). Each of these six aphid genotypes originated from a single individual sampled in natural

populations on their respective host plants. Genetic differences between aphid genotypes and their assignation to the corresponding biotype were assessed by characterizing seven polymorphic microsatellite markers following Peccoud et al. (2008) and comparing these genetic profiles to a reference dataset (Peccoud et al. 2009). All six aphid genotypes were screened for the eight symbiont species commonly infecting the pea aphid using diagnostic PCR (Peccoud et al. 2014). The two representative genotypes of each biotype were originally infected with only one secondary symbiont species: the genotypes of the *Genista* and the *Medicago* biotypes with *Hamiltonella defensa* and the genotypes of the *Trifolium* biotype with *R. insecticola* (see Tab.1). The different symbiont strains of *H. defensa* and *R. insecticola* were genetically characterized in previous works, based on housekeeping genes *accD* and *murE* sequences. The two strains of *H. defensa* from the *Medicago* biotype (i.e., Hd^{Ms1} and Hd^{Ms2}) were differentiated from each other as well as from the two strains from the *Genista* biotype, as opposed to these two (i.e., Hd^{Gt1} and Hd^{Gt2}), which showed no sequence differences for the two genes (Leclair et al. 2016; Sochard et al. 2020). The two strains of *R. insecticola* (i.e., Ri^{T1} and Ri^{T2}) did not differ from each other (Sochard et al. 2020). Despite that some symbiont strains belong to the same genetic group defined using two housekeeping genes, we cannot exclude the possibility they differ at other loci, so each symbiont strain was treated separately in subsequent experiments and analyses. To assess the effect of a shift in the symbiotic status on host plant selection, we first created artificial lineages of aphids deprived of the original symbiont (i.e., to mimic symbiont loss) and then we introduced symbionts either in its original hosts or into a new host (i.e., to mimic symbiont acquisition) following Sochard et al. (2020). In brief, adult aphids from natural lineages were injected with a solution of antibiotics to eliminate specifically the secondary symbionts but not the primary symbiont *Buchnera aphidicola*, creating six 'cured' aphid lineages. Two types of host-symbiont associations were then created from the cured aphids by injecting first instar larvae with the hemolymph of one of the six initial aphid lineages, which contains the corresponding symbiont strain. Symbionts were re-introduced in their original host genotype (i.e., control lineages) or transferred to new aphid genotypes (i.e., new lineages), which allows to compare aphids with the same genotype but different symbiotic statuses (comparison between control lineages and cured or new lineages). Because we could not study all the combinations of aphid genotype and symbiont strains or species, we tested lineages of the *Medicago* biotype that received symbionts from both the *Genista* and the

Trifolium biotypes, and lineages of the *Genista* and the *Trifolium* biotypes that received symbionts from the *Medicago* biotype. Unfortunately, three new host-symbiont associations were lost before the experiments, probably due to the instability of new symbiotic associations (Łukasik et al. 2015; Niepoth et al. 2018), limiting the number of combinations that were tested here (Tab.2).

Table 1: Natural lineages of *Acyrtosiphon pisum* considered in this study

| Code | Sampling location | Collection date | Pea aphid biotype | Secondary symbiont |
|------|----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------|
| Gt1 | Bugey (France) | June 2014 | <i>Genista tinctoria</i> | <i>Hamiltonella defensa</i> |
| Gt2 | Bugey (France) | June 2014 | <i>G. tinctorial</i> | <i>H. defensa</i> |
| Ms1 | Noyal (France) | September 2014 | <i>Medicago sativa</i> | <i>H. defensa</i> |
| Ms2 | Bugey (France) | August 2011 | <i>M. sativa</i> | <i>H. defensa</i> |
| T1 | Ibaraki prefecture (Japan) | May 2014 | <i>Trifolium sp.</i> | <i>Regiella insecticola</i> |
| T2 | York (UK) | December 2002 | <i>Trifolium sp.</i> | <i>R. insecticola</i> |

Table 2: Artificial lineages of *Acyrtosiphon pisum* considered in this study

| Lineage code | Type of lineage | Aphid genotype | Secondary symbiont species | Symbiont strain |
|-----------------------|-----------------|----------------|-----------------------------|-----------------|
| Gt1-Hd ⁻ | 'Cured' | Gt1 | No SS | - |
| Gt1-Hd ^{Gt1} | 'Control' | Gt1 | <i>Hamiltonella defensa</i> | Gt1 |
| Gt1-Hd ^{Ms1} | 'New' | Gt1 | <i>H. defensa</i> | Ms1 |
| Gt1-Hd ^{Ms2} | 'New' | Gt1 | <i>H. defensa</i> | Ms2 |
| Gt2-Hd ⁻ | 'Cured' | Gt2 | No SS | - |
| Gt2-Hd ^{Gt2} | 'Control' | Gt2 | <i>H. defensa</i> | Gt2 |
| Ms1-Hd ⁻ | 'Cured' | Ms1 | No SS | - |
| Ms1-Hd ^{Ms1} | 'Control' | Ms1 | <i>H. defensa</i> | Ms1 |
| Ms1-Hd ^{Gt1} | 'New' | Ms1 | <i>H. defensa</i> | Gt1 |
| Ms1-Hd ^{Gt2} | 'New' | Ms1 | <i>H. defensa</i> | Gt2 |
| Ms1-Ri ^{T1} | 'New' | Ms1 | <i>R. insecticola</i> | T1 |
| Ms1-Ri ^{T2} | 'New' | Ms1 | <i>R. insecticola</i> | T2 |
| Ms2-Hd ⁻ | 'Cured' | Ms2 | No SS | - |
| Ms2-Hd ^{Ms2} | 'Control' | Ms2 | <i>H. defensa</i> | Ms2 |
| Ms2-Hd ^{Gt1} | 'New' | Ms2 | <i>H. defensa</i> | Gt1 |
| Ms2-Ri ^{T1} | 'New' | Ms2 | <i>R. insecticola</i> | T1 |
| Ms2-Ri ^{T2} | 'New' | Ms2 | <i>R. insecticola</i> | T2 |
| T1-Ri ⁻ | 'Cured' | T1 | No SS | - |
| T1-Ri ^{T1} | 'Control' | T1 | <i>Regiella insecticola</i> | T1 |
| T1-Hd ^{Ms1} | 'New' | T1 | <i>H. defensa</i> | Ms1 |
| T1-Hd ^{Ms2} | 'New' | T1 | <i>H. defensa</i> | Ms2 |
| T2-Ri ⁻ | 'Cured' | T2 | No SS | - |
| T2-Ri ^{T2} | 'Control' | T2 | <i>R. insecticola</i> | T2 |
| T2-Hd ^{Ms1} | 'New' | T2 | <i>H. defensa</i> | Ms1 |
| T2-Hd ^{Ms2} | 'New' | T2 | <i>H. defensa</i> | Ms2 |

Before the experiments, all aphid lineages were reared on broad bean, *Vicia faba*, the universal host plant of *A. pisum* at 20°C, 70% of relative humidity and 16L:8D photoperiod.

Plant choice experiments

To study the effect of both symbiont loss and symbiont acquisition on host plant choice, we assessed the ability of the different aphid lineages to find their host plant among three plant species. One plant of each species, corresponding to the preferred host plants of the three biotypes (i.e., *M. sativa*, *T. repens* and *G. tinctoria*) was placed in a Plexiglas cage (50 cm × 50 cm × 50 cm) covered outside with white paper to limit visual cues from the surroundings. Plants used in the cage were systematically cut to a height of 11-12 cm one day before being used in the test, and were disposed equidistantly in the corners of a triangle, 22cm away from the center of the cage. Although winged aphids present a more elaborated chemosensory system than wingless ones and should be favored in plant choice experiments (Powell et al. 2006), we used wingless aphids because several aphid lineages did not produce sufficient winged offspring to conduct the experiment (Sochard et al. submitted_a). To facilitate insect movements from one plant to another, the cage was filled with soil to bury plant pots and provide a flat walking surface. The experiment consisted in releasing about 30 wingless adults (8-11 days old) of one aphid lineage in a small Petri dish (5cm diameter) in the center of the cage. Previous studies reported that 24h was a sufficient time for pea aphid settlement on a plant (Caillaud and Via 2000, Sochard et al. submitted_a), so the number of aphids on each plant was counted 24h after the beginning of the experiment. On average 240 aphids, distributed among 8 replicates, were tested per aphid lineage. Overall, 5 967 individuals were tested in this device.

Statistical analyses

As we searched for differences between aphids with various symbiotic status and this factor was not crossed between the different biotypes and genotypes of a same biotype, the dataset was analyzed for each aphid genotype separately.

To test whether the alteration of symbiotic associations affects plant choice made by aphids, we analyzed two dependent variables against the symbiotic status of the aphids separately: the proportion of aphids on a plant, whatever the plant species, and among them, the proportion of aphids on their host plant. Data were analyzed using a Generalized Linear Mixed Model (hereafter GLMM) assuming a binomial distribution with a logit link function. As the number of aphids actively searching a host plant varied among replicates,

we introduced the number of searching aphids (i.e., total number of aphids introduced in the arena – the number of aphids in the Petri dish after 24h (i.e. non active individuals)) as covariate in the models. Because some experimental aphids were tested in the same cage, we introduced the experiment ID as a random factor in models to include data substructure.

For each GLMM, the fixed factor effect on a dependent variable was estimated through GLMMs' coefficients significance. By changing the baseline level in models, we conducted pairwise comparisons between all factor levels (Zuur et al. 2009). All statistics were performed by using the package *lme4* (Bates et al. 2015) in the software R (R Core Team 2019) to fit the models. Model assumptions were verified by plotting residuals versus fitted values for all models.

Results

Influence of symbiotic status on plant search

In the *Genista* biotype, the symbiotic status of aphids did not influence the proportion of individuals that found a plant regardless of the aphid genotype (Tab.3). On average, 69% and 81% of individuals were found on a plant after 24h, whatever the infection status in the Gt1 and the Gt2 genotypes respectively (Fig.1). In the *Medicago* biotype, the symbiotic status influenced the two aphid genotypes differently. For aphids of the Ms1 genotype, while a similar proportion of the 'control' and 'cured' aphids were found on a plant after 24h, more aphids infected with Hd^{Gt2} reached a plant compared to 'control' ones (91% vs 77%, respectively) (Tab.3, Fig.1). In the Ms2 genotype, neither the symbiont loss nor the symbiont acquisition affected this proportion: on average, 81% of the aphids of the 'control', the 'cured' or the 'new' lineages reached a plant at the end of the experiment (Tab.3, Fig.1). In the *Trifolium* biotype, the symbiotic status did not affect the proportion of aphids on a plant in the T2 genotype: 84% of aphids reached a plant on average across the different lineages. By contrast, this proportion was affected in the T1 genotype, but only in the 'cured lineage': compared to the 'control' lineage, with 83% of the aphids found on a plant after 24h, whereas this proportion was much higher in 'cured' aphids with 96% of aphids on a plant (Tab.3).

Table 3: Estimated regression coefficients (β), standard errors (SE) and P-values associated with symbiotic status and the number of released aphids on (1) the proportion of aphids on a plant and (2) the proportion of aphids on their host plant. Highlighted cells: regression coefficients associated with a significant fixed effect in the GLMMs.

| Pea aphid genotype | Covariates | Variables | | | | | |
|--------------------|-------------------------|--------------|----------------|----------|-----------------------|----------------|----------|
| | | Find a plant | | | Find their host plant | | |
| | | β | SE (β) | Pr(> z) | β | SE (β) | Pr(> z) |
| Gt1 | Symbiotic status | | | | | | |
| | Control | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Cured | 0.42 | 0.41 | 0.309 | 0.17 | 0.47 | 0.712 |
| | Infected with HdMs1 | -0.10 | 0.40 | 0.791 | 0.00 | 0.48 | 0.999 |
| | Infected with HdMs2 | 0.17 | 0.40 | 0.668 | -0.17 | 0.46 | 0.708 |
| | Number of aphids | 0.10 | 0.07 | 0.139 | -0.17 | 0.09 | < 0.05 |
| Gt2 | Symbiotic status | | | | | | |
| | Control | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Cured | 0.41 | 0.40 | 0.305 | -0.82 | 0.66 | 0.214 |
| | Number of aphids | 0.16 | 0.13 | 0.199 | -0.03 | 0.22 | 0.902 |
| Ms1 | Symbiotic status | | | | | | |
| | Control | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Cured | 0.26 | 0.36 | 0.483 | -1.25 | 0.49 | < 0.05 |
| | Infected with HdGt1 | -0.15 | 0.35 | 0.670 | 0.08 | 0.52 | 0.876 |
| | Infected with HdGt2 | 1.10 | 0.39 | < 0.01 | -0.73 | 0.49 | 0.137 |
| | Infected with RiT1 | -0.30 | 0.35 | 0.399 | -0.41 | 0.51 | 0.418 |
| | Infected with RiT2 | -0.42 | 0.36 | 0.241 | -0.44 | 0.52 | 0.397 |
| | Number of aphids | -0.01 | 0.02 | 0.504 | -0.08 | 0.03 | < 0.01 |
| Ms2 | Symbiotic status | | | | | | |
| | Control | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Cured | 0.47 | 0.41 | 0.249 | 0.05 | 0.58 | 0.938 |
| | Infected with HdGt1 | 0.08 | 0.40 | 0.833 | 0.04 | 0.59 | 0.949 |
| | Infected with RiT1 | -0.40 | 0.40 | 0.320 | 0.78 | 0.65 | 0.226 |
| | Infected with RiT2 | 0.00 | 0.39 | 0.996 | 0.67 | 0.61 | 0.276 |
| | Number of aphids | 0.12 | 0.04 | < 0.01 | 0.05 | 0.07 | 0.448 |
| T1 | Symbiotic status | | | | | | |
| | Control | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Cured | 1.73 | 0.65 | < 0.01 | 0.25 | 0.46 | 0.592 |
| | Infected with HdMs1 | 0.81 | 0.59 | 0.170 | -0.77 | 0.42 | 0.068 |
| | Infected with HdMs2 | 0.46 | 0.57 | 0.419 | -0.70 | 0.43 | 0.101 |
| | Number of aphids | 0.05 | 0.05 | 0.304 | -0.03 | 0.03 | 0.415 |
| T2 | Symbiotic status | | | | | | |
| | Control | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Cured | -0.02 | 0.52 | 0.966 | -0.27 | 0.69 | 0.701 |
| | Infected with HdMs1 | 0.17 | 0.52 | 0.742 | -0.94 | 0.65 | 0.148 |
| | Infected with HdMs2 | 0.96 | 0.55 | 0.081 | 0.85 | 0.78 | 0.273 |
| | Number of aphids | 0.09 | 0.07 | 0.226 | -0.03 | 0.10 | 0.798 |

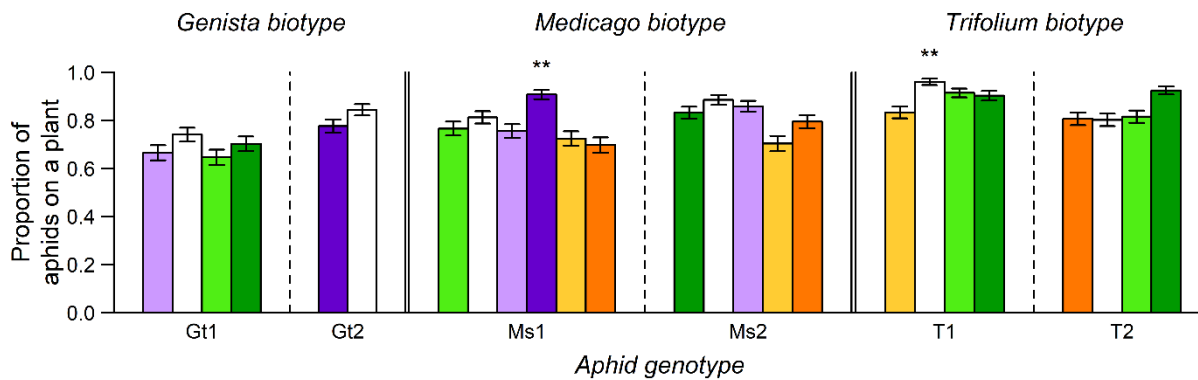


Figure 1: Effect of the symbiotic status on the proportion of aphids that reached a plant after 24h. White bars correspond to cured aphids and colored bars to aphids infected with different symbiont strains (light purple = Hd^{Gt1}, dark purple = Hd^{Gt2}, light green = Hd^{Ms1}, dark green = Hd^{Ms2}, light orange = Ri^{T1} and dark orange = Ri^{T2}). Error bars correspond to standard errors. Stars represent significant differences between a lineage and the 'control' lineage (**: P < 0.01).

Influence of symbiotic status on host plant selection

In the *Genista* biotype, the proportion of aphids on their host plant after 24h was not affected by their symbiotic status whatever the aphid genotype (Tab.3): 85% and 81% of the individuals settled on *G. tinctoria* after 24h, respectively for the Gt1 and the Gt2 genotypes (Fig.2). In the *Medicago* biotype, the two aphid genotypes were differently affected by symbionts. In the Ms2 genotype, no difference was noticed between aphid lineages, with an average of 83% individuals on *M. sativa* after 24h. Conversely, the symbiotic status influenced host plant selection in the cured lineage of the Ms1 genotype. Compared to the 'control' lineage, where 82% of the aphids found their host plant, this proportion dropped to 59% in the 'cured' lineage. Introducing new symbiont strains did not modify host plant selection in this genotype (Tab.3, Fig.2). In the *Trifolium* biotype, symbionts did not influence the proportion of aphids that found their host plant, with in average 87% and 94% of the individuals on *T. repens* for the lineages of the T1 and the T2 genotypes respectively (Tab.3, Fig.2).

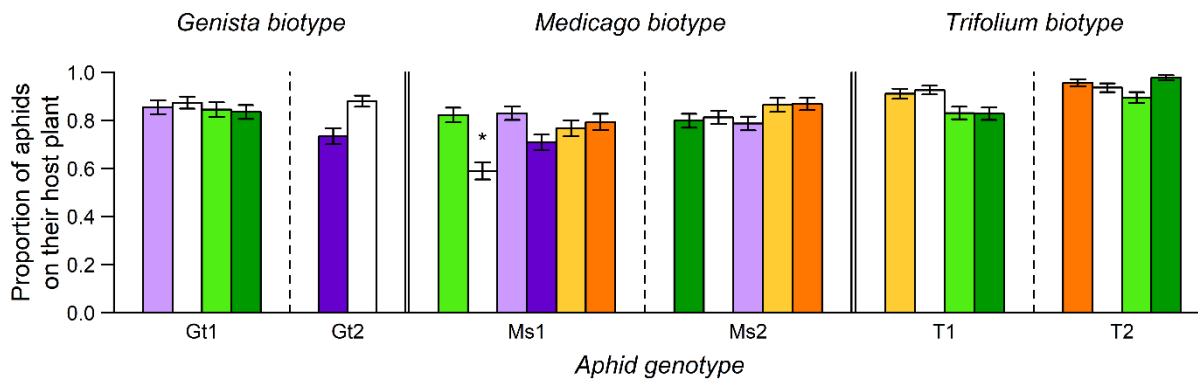


Figure 2: Effect of the symbiotic status on the proportion of aphids on their host plant after 24h. White bars correspond to cured aphids and colored bars to aphids infected with different symbiont strains (light purple = Hd^{Gt1}, dark purple = Hd^{Gt2}, light green = Hd^{Ms1}, dark green = Hd^{Ms2}, light orange = Ri^{T1} and dark orange = Ri^{T2}). Error bars correspond to standard errors. Stars represent significant differences between a lineage and the 'control' lineage (*: P < 0.05).

Discussion

Symbionts can influence a wide range of biological host traits and functions. While they have received increasing attention in the past decades, the role of symbionts on essential behaviors of their hosts, such as foraging and food choice, remains to be explored. Here, we investigated whether secondary heritable symbionts of the pea aphid *A. pisum* affect host plant search and selection by manipulating their symbiotic status to mimic symbiont loss and acquisition events that happen occasionally in nature (Oliver et al. 2010; Guyomar et al. 2018). We found that secondary symbionts had little effect on host plant search and selection, suggesting that foraging decisions in the tested pea aphid genotypes are mostly governed by the insect genome.

Previous studies on host plant selection on winged pea aphids showed that 24h was a sufficient time for these insects to explore a small environment and select a host plant among several species (Via 1999, Caillaud and Via 2000, Sochard et al. submitted_a). In addition, pea aphids show a high selectivity for the plant species that they colonize, with aphids of a given biotype choosing preferentially the plant on which they are specialized in choice experiments (i.e. the plant of their biotype) (Via 1999; Caillaud and Via 2000; Ferrari et al. 2006). Our results confirm these observations and extend them to wingless individuals, which are also able to locate and select their preferred host plant in a choice experiment with high fidelity: over 80% of the individuals reached their host plant within 24h in most lineages, with the genotypes from the *Trifolium* biotype being the most selective (up to 94% for T2). Thus, applying this experimental device on numerous host-

symbiont associations allowed us to finely test whether the alteration of symbiotic status affects host plant selection of specialized pea aphid genotypes.

Recent work showed that gut microbiota of *D. melanogaster* can influence foraging behaviors and food source choice of flies (Leitão-Gonçalves et al. 2017; Wong et al. 2017; Qiao et al. 2019). Here, we found only few effects of secondary symbionts on aphid foraging behaviors, a result in accordance with our previous study on winged aphids (Sochard et al. submitted_a). Complementary to our earlier work, here we introduced symbionts into new aphid hosts, which allowed us to extend our findings that the modification of symbiotic status has limited consequences on host plant selection even in the early steps of the new symbiotic associations. Although secondary symbionts may exert costs on their aphid hosts expressed by reduced defensive behaviors in presence of natural enemies (Dion et al. 2011, Polin et al. 2014, Sochard et al. submitted_b), our previous and present results show no such cost on behavioral traits involved in plant choice in our conditions. Nevertheless, we noted a few cases where plant search and selection were affected by modification of aphid symbiotic status, suggesting that symbionts could interfere in some way with foraging behaviors. In two cases, removal of the original symbionts altered foraging behaviors but in opposite directions in the affected aphid lineages. In only one case the gain of a symbiont had an effect on plant search, and in this case the acquisition increased the percentage of aphids found on a plant. This last result is in line with recent studies on different aphid species showing that *H. defensa* could alter feeding behaviors, affecting plant probing in various ways depending on the host plant (Angelella et al. 2018; Leybourne et al. 2020). Since we examined here the two first steps of the aphid-plant interactions, further experiments should be conducted on acceptance and feeding behavior, in order to investigate more globally the influence of symbionts on the different steps of the host plant selection and exploitation process. In addition, individual observations of foraging behaviors during the first hours of experiment may reveal further symbiont-induced differences between aphid lineages.

Acknowledgements

We thank Gaëtan Denis and Jean-François Le Gallic for their help in maintaining aphid lineages and in producing plants for the experiments, as well as Frédérique Mahéo for

regular checking of the symbiotic and genotypic profiles of pea aphid lineages using molecular techniques. This research was supported by the HMICMAC project 16-CE02-0014 funded by the French Research Agency (ANR) to JCS and YO and the SYMBIOGATE project funded by the Plant Health and Environment Division of INRAE to SA.

References

- Angelella G, Nalam V, Nachappa P, White J, Kaplan I (2018): Endosymbionts differentially alter exploratory probing behavior of a nonpersistent plant virus vector. *Microb Ecol* 76: 453–458.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015): Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67: 1–48.
- Caillaud MC, Via S (2000): Specialized feeding behavior influences both ecological specialization and assortative mating in sympatric host races of pea aphids. *Am Nat* 156: 606–621.
- Dion E, Polin SE, Simon J-C, Outreman Y (2011): Symbiont infection affects aphid defensive behaviours. *Biol Lett* 7: 743–746.
- Ferrari J, Godfray HCJ (2006): The maintenance of intraspecific biodiversity: the interplay of selection on resource use and on natural enemy resistance in the pea aphid. *Ecol Res* 21: 9–16.
- Ferrari J, Godfray HCJ, Faulconbridge AS, Prior K, Via S (2006): Population differentiation and genetic variation in host choice among pea aphids from eight host plant genera. *Evolution* 60: 1574–1584.
- Ferrari J, Via S, Godfray HCJ (2008): Population differentiation and genetic variation in performance on eight hosts in the pea aphid complex. *Evolution* 62: 2508–2524.
- Grunseich JM, Thompson MN, Aguirre NM, Helms AM (2019): The role of plant-associated microbes in mediating host-plant selection by insect herbivores. *Plants* 9: 6, Doi:10.3390/plants9010006.
- Guo J, Hatt S, He K, Chen J, Francis F, Wang Z (2017): Nine facultative endosymbionts in aphids. A review. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 20: 794–801.
- Guyomar C, Legeai F, Jousselin E, Mougél C, Lemaitre C, Simon J-C (2018): Multi-scale characterization of symbiont diversity in the pea aphid complex through metagenomic approaches. *Microbiome* 6: 181, Doi:10.1186/s40168-018-0562-9.
- Henry LM, Peccoud J, Simon J-C, Hadfield JD, Maiden MJC, Ferrari J, et al. (2013): Horizontally transmitted symbionts and host colonization of ecological niches. *Curr Biol* 23: 1713–1717.
- Janson EM, Stireman JO, Singer MS, Abbot P (2008): Phytophagous insect-microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. *Evolution* 62: 997–1012.

- Leclair M, Pons I, Mahéo F, Morlière S, Simon J-C, Outreman Y (2016): Diversity in symbiont consortia in the pea aphid complex is associated with large phenotypic variation in the insect host. *Evol Ecol* 30: 925–941.
- Leitão-Gonçalves R, Carvalho-Santos Z, Francisco AP, Fioreze GT, Anjos M, Baltazar C, et al. (2017): Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. *PLoS Biol* 15: e2000862, Doi:10.1371/journal.pbio.2000862.
- Leybourne DJ, Valentine TA, Bos JIB, Karley AJ (2020): A fitness cost resulting from *Hamiltonella defensa* infection is associated with altered probing and feeding behaviour in *Rhopalosiphum padi*. *J Exp Biol* 223: jeb207936, Doi:10.1242/jeb.207936.
- Łukasik P, Guo H, van Asch M, Henry LM, Godfray HCJ, Ferrari J (2015): Horizontal transfer of facultative endosymbionts is limited by host relatedness. *Evolution* 69: 2757–2766.
- Mathé-Hubert H, Kaech H, Hertaeg C, Jaenike J, Vorburger C (2019): Nonrandom associations of maternally transmitted symbionts in insects: the roles of drift versus biased cotransmission and selection. *Mol Ecol* 28: 5330–5346.
- Niepoth N, Ellers J, Henry LM (2018): Symbiont interactions with non-native hosts limit the formation of new symbioses. *BMC Evol Biol* 18: 27, Doi:10.1186/s12862-018-1143-z.
- Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, Moran NA (2010): Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu Rev Entomol* 55: 247–266.
- Peccoud J, Bonhomme J, Mahéo F, de la Huerta M, Cosson O, Simon J-C (2014): Inheritance patterns of secondary symbionts during sexual reproduction of pea aphid biotypes. *Insect Sci* 21: 291–300.
- Peccoud J, Figueroa CC, Silva AX, Ramirez CC, Mieuze L, Bonhomme J, et al. (2008): Host range expansion of an introduced insect pest through multiple colonizations of specialized clones. *Mol Ecol* 17: 4608–4618.
- Peccoud J, Mahéo F, de la Huerta M, Laurence C, Simon J-C (2015): Genetic characterisation of new host-specialised biotypes and novel associations with bacterial symbionts in the pea aphid complex. *Insect Conserv Divers* 8: 484–492.
- Peccoud J, Ollivier A, Plantegenest M, Simon J-C (2009): A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proc Natl Acad Sci* 106: 7495–7500.
- Polin S, Simon J-C, Outreman Y (2014): An ecological cost associated with protective symbionts of aphids. *Ecol Evol* 4: 836–840.
- Powell G, Tosh CR, Hardie J (2006): Host plant selection by aphids: Behavioral, evolutionary, and applied perspectives. *Annu Rev Entomol* 51: 309–330.
- Qiao H, Keesey IW, Hansson BS, Knaden M (2019): Gut microbiota affects development and olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* 222: jeb192500, Doi:10.1242/jeb.192500.

R Core Team (2019): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Schwarzkopf A, Rosenberger D, Niebergall M, Gershenson J, Kunert G (2013): To feed or not to feed: plant factors located in the epidermis, mesophyll, and sieve elements influence pea aphid's ability to feed on legume species. *PLoS ONE* 8: e75298, Doi:10.1242/jeb.192500.

Shikano I, Rosa C, Tan C-W, Felton GW (2017): Tritrophic Interactions: Microbe-Mediated Plant Effects on Insect Herbivores. *Annu Rev Phytopathol* 55: 313–331.

Sochard C, Morlière S, Toussaint G, Outreman Y, Sugio A, Simon J (2020): Examination of the success rate of secondary symbiont manipulation by microinjection methods in the pea aphid system. *Entomol Exp Appl* 168: 174–183.

Sugio A, Dubreuil G, Giron D, Simon J-C (2015): Plant-insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. *J Exp Bot* 66: 467–478.

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

Via S (1999): Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. I. Gene flow restriction and habitat choice. *Evolution* 53: 1446–1457.

Via S, Bouck AC, Skillman S (2000): Reproductive isolation between divergent races of pea aphids on two hosts. ii. selection against migrants and hybrids in the parental environments. *Evolution* 54: 1626–1637.

Wagner SM, Martinez AJ, Ruan Y-M, Kim KL, Lenhart PA, Dehnel AC, et al. (2015): Facultative endosymbionts mediate dietary breadth in a polyphagous herbivore. *Funct Ecol* 29: 1402–1410.

Wong AC-N, Wang Q-P, Morimoto J, Senior AM, Lihoreau M, Neely GG, et al. (2017): Gut microbiota modifies olfactory-guided microbial preferences and foraging decisions in *Drosophila*. *Curr Biol* 27: 2397-2404.e4, Doi:10.1016/j.cub.2017.07.022.

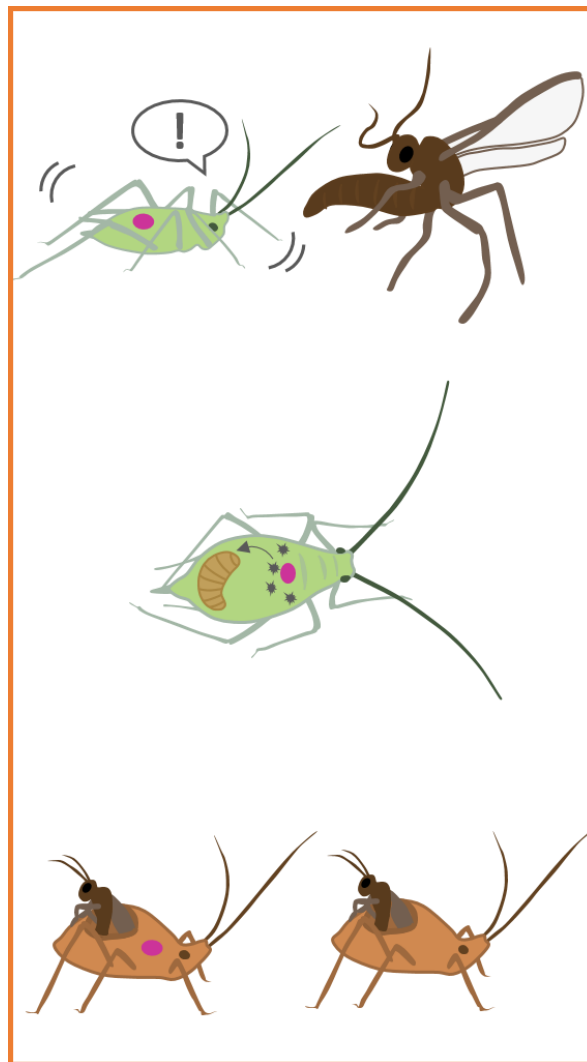
Xu S, Jiang L, Qiao G, Chen J (2019): The bacterial flora associated with the polyphagous aphid *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) is strongly affected by host plants. *Microb Ecol*, In Press, Doi:10.1007/s00248-019-01435-2.

Zuur AF, Ieno EN, Walker N, Saveliev AA, Smith GM (2009): Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer, New-York.

Zytyńska SE, Weisser WW (2016): The natural occurrence of secondary bacterial symbionts in aphids. *Ecol Entomol* 41: 13–26.

CHAPITRE 3 :

INCIDENCE DES SYMBIOTES SUR LA RELATION PUCERON-ENNEMI NATUREL



Chez les insectes, certains symbiotes microbiens protègent leur hôte contre leurs ennemis naturels comme les parasitoïdes. Ces symbiotes protecteurs peuvent affecter les relations entre leur hôte et les parasitoïdes aux différentes étapes de l'interaction, de l'attaque jusqu'à l'émergence du parasitoïde. Cependant, les effets des symbiotes protecteurs sur les interactions entre un insecte et ses parasitoïdes ont rarement été considérés dans leur globalité.

Dans ce chapitre (cf **Article 4**), nous avons examiné l'incidence de différents symbiotes protecteurs sur toute la séquence de l'interaction entre *A. pisum* et l'un de ses parasitoïdes principaux, *A. ervi* (*i.e.*, des comportements de défense des pucerons au moment de l'attaque jusqu'aux traits des parasitoïdes émergents des pucerons). Les lignées de pucerons utilisées dans cette étude sont les mêmes que celles utilisées dans les articles du chapitre précédent, ce qui nous permet de mesurer divers effets phénotypiques pour les mêmes souches de symbiotes.

Les résultats présentés dans l'article 4 montrent la variabilité des effets symbiotiques en fonction de l'espèce du symbiote et de la souche considérée. Nous avons ainsi montré que les phénotypes de protection conférés par les symbiotes sont principalement déterminés par l'espèce et la souche du symbiote, alors que les modifications comportementales varient plus largement d'un couple puceron-symbiote à l'autre. Concernant les traits d'histoire de vie des parasitoïdes émergents, aucune des bactéries symbiotiques n'affecte cette étape de l'interaction. Il est intéressant de noter que cette étude a révélé une absence de corrélation entre les effets des symbiotes aux différentes étapes de l'interaction pucerons-parasitoïdes. En effet, dans certaines associations, les symbiotes diminuent les comportements de défense mais protègent totalement leur hôte contre les parasitoïdes, alors que dans d'autres, la diminution des comportements est associée à une absence de protection. Les conséquences écologiques et évolutives ainsi que les mécanismes impliqués dans les modifications comportementales associées aux symbiotes sont discutés dans cet article.

ARTICLE 4 :

**INFLUENCE OF ‘PROTECTIVE’ SYMBIONTS THROUGHOUT THE
DIFFERENT STEPS OF AN APHID-PARASITOID INTERACTION**

Corentin Sochard^a, Laura Bellec^a, Jean-Christophe Simon^{b§}, Yannick Outreman^{a§*}

^a IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35000 Rennes, France

^b IGEPP, INRAE, Institut Agro, Univ Rennes, 35650 Le Rheu, France

§ Equal contribution last author

* Corresponding author: Yannick Outreman (yannick.outreman@agrocampus-ouest.fr)

Article soumis dans **Current Zoology** (avril 2020)

Abstract

Microbial associates are widespread in insects, some conferring a protection to their hosts against natural enemies like parasitoids. These protective symbionts may affect the different steps of the host-parasitoid interaction by modifying behavioral defenses of their hosts, arresting parasitoid development or altering life-history traits of emerging parasitoids. However, we know little on the actual outcomes of these different effects that protective symbionts may exert during the whole sequence of the antagonistic interaction. Here, we assessed the effects of different protective bacterial symbionts on the entire sequence of the host-parasitoid interaction (i.e. from parasitoid attack to parasitoid offspring emergence) between the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and its main parasitoid, *Aphidius ervi*. To test whether symbiont-mediated phenotypes were general or specific to particular aphid-symbiont associations, we considered several aphid lineages, each harboring a different strain of either *Hamiltonella defensa* or *Regiella insecticola*, two protective symbionts commonly found in aphids. We found that symbiont species and strains affected differently the different steps of host-parasitoid interaction, with strong variation on defensive behaviors and parasitism rates, and no effect on life-history traits of emerging parasitoids. While parasitism resistance was mainly determined by symbionts, their effects on host defensive behaviors varied largely from one aphid-symbiont association to another. No correlations between symbiont effects on the steps of a host-parasitoid interaction was thus observed. Our study highlights the need to consider the whole sequence of the interaction to better assess the outcomes of protective symbioses and understand the ecological and evolutionary dynamics of host-symbionts in natural populations.

Keywords: Protective symbioses, defensive behaviors, host-parasitoid interactions, *Acyrtosiphon pisum*, *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola*

Introduction

Associations between macro and microorganisms are widespread in animals, and recent research has highlighted the roles of these microbial partners on many aspects of their hosts' biology, ecology and evolution. In particular, there is increasing evidence that microbial symbionts contribute to the protection of their host individual against natural enemies such as pathogens, parasitoids or predators (Flórez et al. 2015). In insects, bacterial symbionts have been shown to protect their hosts in different ways, either directly by producing compounds that are toxic or repellent for the natural enemies or indirectly by enhancing the immune system of their hosts or by competing with the enemy for the same host resources (Oliver et al. 2014).

The first case of protective symbiosis in insects was found in an aphid-parasitoid interaction (Oliver et al 2004). This seminal work has stimulated a wealth of studies devoted to better understand the influence of protective bacterial symbionts on host-parasitoid interactions, including issues related to protection mechanisms, costs and benefits of symbiotic infection, and impacts on both parasitoid ecology and trophic networks (Vorburger and Gouskov 2011; Cayetano et al. 2015; Monticelli et al. 2019; Oliver and Higashi 2019; Leybourne et al. 2020). Parasitoids exploit insect hosts for resources necessary for their survival and are important biological control agents of crop pests. The host-parasitoid interaction involves three successive steps: (1) the attack of the host individual, during which the parasitoid female oviposits (i.e. lays an egg with its ovipositor) on or in the attacked host, (2) the development of the parasitoid immature on or in the host, which consumes the host until it dies, and (3) the emergence of the parasitoid offspring from the host (Godfray 1994). The host is however not defenseless and can use a range of protective strategies to counter the parasitoid in the different steps of the interaction. Defensive behaviors can be first used to escape or repel the parasitoid attack. When the parasitoid succeeds to lay an egg in the host, the host immune system can preclude the development of the parasitoid immature. Finally, if physiological defenses are not sufficient to stop parasitoid development, the host can nevertheless have sublethal effects on its parasitoid, which would emerge with altered life history traits (Godfray 1994).

Microbial symbionts can contribute to the defense of their hosts by protecting them against parasitoids at these three different steps of the host-parasitoid interaction. One of

the best known cases of protective symbiosis against parasitoids concerns the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, which is associated with several secondary symbiotic species involved in parasitism protection (Oliver et al. 2003; Vorburger et al. 2010; Cayetano and Vorburger 2015; Donald et al. 2016; Leclair et al. 2016; Jamin and Vorburger 2019). The protective bacterial symbiont *Hamiltonella defensa* is well known to provide resistance to pea aphids through the production of toxins encoded by the APSE associated phage that results in parasitoid immature development abortion (Degnan and Moran 2008; Oliver et al. 2009; Weldon et al. 2013; Brandt et al. 2017). Aphid secondary symbionts can also have indirect beneficial effects on aphid populations by exerting sublethal effects on the life history traits of the emerging parasitoids (Nyabuga et al. 2010; Schmid et al. 2012; Pons et al. 2019). These microbial partners can also modify host-parasitoid interactions by influencing the defensive behaviors of their hosts. Indeed, previous studies found that aphids harboring *H. defensa* exhibited less defensive behaviors than uninfected aphids when facing a natural enemy (Dion et al. 2011; Polin et al. 2014). Although this may sound counter-intuitive, reduction of defensive behaviors could be beneficial to the aphid by avoiding costly and redundant protection against parasitoids (Dion et al. 2011). However, the generality of this phenomenon across the different types of protective symbioses is little known (Dion et al. 2011; Ramírez-Cáceres et al. 2019).

Previous studies on the influence of protective symbionts on host-parasitoid interactions have in most cases focused on one of the three different steps of the interaction. As a consequence, we know little on the actual outcomes of the different defenses that protective symbionts may provide during the whole sequence of the interaction, as well as correlations between symbiont effects on the different steps.

The present study aimed at answering three questions: (i) Do protective symbionts influence all three steps of host-parasitoid interactions? (ii) Are there defense phenotype patterns associated with symbiont infection? (iii) How general are these symbiont-mediated phenotypes and patterns displayed during aphid-parasitoid interactions? To answer these questions, we used several lineages of the pea aphid *A. pisum* harboring different symbiont species and measured their defensive behaviors, their resistance against parasitoid parasitism and the life-history traits of parasitoids emerging from parasitized aphids. Two bacterial symbionts were considered in this study: *H. defensa*, which provides variable protection against parasitoids, ranging from no protection to a

full protection against parasitism, which depends mainly on both symbiont and APSE strains (Oliver et al. 2005; Leclair et al. 2016); and *Regiella insecticola*, which protects *A. pisum* against pathogenic fungi but with no evidence so far against parasitoids in the pea aphid (Oliver et al. 2003; Ferrari et al. 2004; Scarborough et al. 2005; Hansen et al. 2012). However, a strain of *R. insecticola* has been found to provide resistance against parasitoids in the green peach aphid, *Myzus persicae* (Vorburger et al. 2010; Jamin and Vorburger 2019). In addition, one study investigated the influence of *R. insecticola* on aphid defensive behaviors in the cereal aphid *Sitobion avenae* (Ramírez-Cáceres et al. 2019). Authors found no effect of the infection with *R. insecticola* on the defensive behaviors when aphids were exposed to ladybirds, although aphids infected with *R. insecticola* were more predated than uninfected aphids. To properly assess the variation of *H. defensa* effects on aphid defensive behaviors and search for a possible link between protection levels against parasitoid and aphid defensive behaviors, we considered symbiont strains with contrasted protective phenotypes: two strains provided a full protection against parasitoids while two others provided no protection to their aphid host. To evaluate the symbiont influence on the different traits recorded here, secondary symbionts were first eliminated from the aphid lineages by antibiotics before being reintroduced to control for the potential effect of the antibiotic treatment. The specificity of symbiont-mediated phenotypes was tested by introducing symbiont strains and species into new aphid genotypes. We found that symbiont genotypes affected differently the three steps of host-parasitoid interaction, with strong effects on defensive behaviors and protection against parasitism rates, and no effect on life-history traits of emerging parasitoids. Finally, our study raises the question of what qualifies a symbiont as protective or not.

Material and methods

Aphid lineages

The pea aphid forms a complex of plant-adapted biotypes, each specialized on one or a few legume species (Peccoud et al. 2009; Peccoud et al. 2015). Bacterial secondary symbionts are not randomly distributed among pea aphid biotypes but instead form preferential associations with some biotypes (Henry et al. 2013; Mathé-Hubert et al. 2019). In this study, we focused on three *A. pisum* biotypes, respectively specialized on *Genista tinctoria* (dyer's broom), on *Medicago sativa* (alfalfa) or on *Trifolium* (clover),

hereafter noted ‘*Genista* biotype’, ‘*Medicago* biotype’ and ‘*Trifolium* biotype’. In natural populations, *H. defensa* is fixed in the *Genista* biotype, at intermediate to high frequencies in the *Medicago* biotype and rare in the *Trifolium* biotype, while *R. insecticola* is found at high prevalence in the *Trifolium* biotype, at a lower prevalence in the *Medicago* biotype and absent in the *Genista* biotype (Peccoud et al. 2015; Leclair 2016).

For each biotype, we used two genetically distinct aphid lineages singly infected with its dominant secondary symbiont: *H. defensa* for the *Medicago* and the *Genista* biotypes, and *R. insecticola* for the *Trifolium* biotype. All strains of *H. defensa* used in this study presented the APSE phage (Leclair et al. 2016), responsible for parasitoid resistance (Oliver et al. 2009; Lynn-Bell et al. 2019). These six natural aphid lineages came from single aphid females sampled in the field on their respective host plants (details in Table 1). They were assigned to their corresponding biotype by genotyping and comparing their microsatellite profile to a reference database (Peccoud et al. 2009; Peccoud et al. 2015). To ensure that they were only infected with either *H. defensa* or *R. insecticola*, their symbiotic status was assessed with a diagnostic PCR using specific primers for symbiont amplification (Peccoud et al. 2014). Based on our previous study, we know that the two *H. defensa* strains from the lineages of the *Genista* biotype belong to the same genetic group and provide a complete protection to their aphid host against *Aphidius ervi* while the two strains from the lineages of the *Medicago* biotype differ genetically and provide no protection against *A. ervi* (Leclair et al. 2016). Note that *H. defensa* strains from the lineages of the *Genista* and the *Medicago* biotypes also differ genetically. Interestingly, aphids from the *Genista* biotype infected with *H. defensa* present a particular phenotype: when these aphid individuals are parasitized by *A. ervi* parasitoid, they become swollen, whitish and cannot produce any offspring (Leclair et al. 2016). The two strains of *R. insecticola* from the lineages of the *Trifolium* biotype belong to the same genetic group (Sochard et al. 2020), but their level of protection against parasitoids was unknown prior this study.

Table 1: Natural pea aphid lineages considered in the present study

| Name | Sampling location | Collection date | Biotype | Secondary symbiont |
|------|----------------------------|-----------------|--------------------------|-----------------------------|
| Gt1 | Bugey (France) | June 2014 | <i>Genista tinctoria</i> | <i>Hamiltonella defensa</i> |
| Gt2 | Bugey (France) | June 2014 | <i>G. tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> |
| Ms1 | Noyal (France) | September 2014 | <i>Medicago sativa</i> | <i>H. defensa</i> |
| Ms2 | Bugey (France) | August 2011 | <i>M. sativa</i> | <i>H. defensa</i> |
| T1 | Ibaraki prefecture (Japan) | May 2014 | <i>Trifolium sp</i> | <i>Regiella insecticola</i> |
| T2 | York (UK) | December 2002 | <i>Trifolium sp</i> | <i>R. insecticola</i> |

For our experiments, we considered three types of aphid lineages: the ‘cured lineages’, the ‘control lineages’ and the ‘new lineages’. First, we created uninfected lineages (hereafter called ‘cured lineages’) by removing the secondary symbiont in the six natural aphid lineages using antibiotic treatments (Sochard et al. 2020). Second, each cured aphid lineage was re-infected with its original secondary symbiont (hereafter called ‘control lineages’) as described in Sochard et al. (2020). Third, *H. defensa* and *R. insecticola* from the six natural lineages were introduced in the cured lineages to create lineages with the same genotype by different symbiont strains (hereafter called ‘new lineages’). The symbiont strains and aphid genotypes were crossed as followed: aphids from the *Genista* and the *Trifolium* biotypes received *H. defensa* strains of the *Medicago* biotype and aphids from the *Medicago* biotype received the symbionts of both the *Genista* and the *Trifolium* biotype in exchange. Transfer of some symbionts in new aphid hosts did not work (Sochard et al. 2020) and a few lineages were lost between their creation and the experiments (Gt2-Hd^{Ms1}, Gt2-Hd^{Ms2} and Ms2-Hd^{Gt2}), so we could not test all possible combinations. Finally, by comparing the control lineages with the cured ones, we measured the influence of the secondary symbionts on the three main steps of the host-parasitoid interactions while by comparing the control lineages with the new ones, we tested whether the symbiont-mediated phenotypes are general or specific to host-symbiont association.

All these artificial aphid lineages (i.e. 6 ‘cured lineages’ + 6 ‘control lineages’ + 13 ‘new lineages’ – see Table 2) were kept and maintained at least 20 generations before experiments to remove the antibiotics effect and allow symbiont colonization in new aphid host individuals after transfer (table 1). All aphid lineages were reared on broad bean, *Vicia faba*, the universal host plant of *A. pisum* biotypes, at 20°C, 70% of relative humidity and 16:8 L:D photoperiod, before and during the experiments.

Parasitoids

For our experiments, we used the solitary parasitoid wasp *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Braconidae). The mass rearing of *A. ervi* started from at least 50 males and females produced by Koppert Biological Systems©. Parasitoids were produced on a pea aphid lineage free of any secondary symbiont and highly susceptible to *A. ervi* parasitism (Leclair et al. 2016). For the experiments, parasitoid females were standardized: 2-3 days

after emergence, mated and fed (honey and water). Before each experiment, the parasitoid female was exposed to one third-instar larva of the tested aphid lineage for oviposition experience. To avoid any generational effects of parasitoids, females were randomized for experiments with different aphid lineages.

Table 2: Artificial pea aphid lineages used in the present study

| Lineage code | Aphid genotype | Type of lineage | Secondary symbiont (SS) | Symbiont strain |
|-----------------------|----------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
| Gt1-Hd ⁻ | Gt1 | Cured | No SS | - |
| Gt1-Hd ^{Gt1} | Gt1 | Control | <i>Hamiltonella defensa</i> | Gt1 |
| Gt1-Hd ^{Ms1} | Gt1 | New | <i>H. defensa</i> | Ms1 |
| Gt1-Hd ^{Ms2} | Gt1 | New | <i>H. defensa</i> | Ms2 |
| Gt2-Hd ⁻ | Gt2 | Cured | No SS | - |
| Gt2-Hd ^{Gt2} | Gt2 | Control | <i>H. defensa</i> | Gt2 |
| Ms1-Hd ⁻ | Ms1 | Cured | No SS | - |
| Ms1-Hd ^{Ms1} | Ms1 | Control | <i>H. defensa</i> | Ms1 |
| Ms1-Hd ^{Gt1} | Ms1 | New | <i>H. defensa</i> | Gt1 |
| Ms1-Hd ^{Gt2} | Ms1 | New | <i>H. defensa</i> | Gt2 |
| Ms1-Ri ^{T1} | Ms1 | New | <i>R. insecticola</i> | T1 |
| Ms1-Ri ^{T2} | Ms1 | New | <i>R. insecticola</i> | T2 |
| Ms2-Hd ⁻ | Ms2 | Cured | No SS | - |
| Ms2-Hd ^{Ms2} | Ms2 | Control | <i>H. defensa</i> | Ms2 |
| Ms2-Hd ^{Gt1} | Ms2 | New | <i>H. defensa</i> | Gt1 |
| Ms2-Ri ^{T1} | Ms2 | New | <i>R. insecticola</i> | T1 |
| Ms2-Ri ^{T2} | Ms2 | New | <i>R. insecticola</i> | T2 |
| T1-Ri ⁻ | T1 | Cured | No SS | - |
| T1-Ri ^{T1} | T1 | Control | <i>Regiella insecticola</i> | T1 |
| T1-Hd ^{Ms1} | T1 | New | <i>H. defensa</i> | Ms1 |
| T1-Hd ^{Ms2} | T1 | New | <i>H. defensa</i> | Ms2 |
| T2-Ri ⁻ | T2 | Cured | No SS | - |
| T2-Ri ^{T2} | T2 | Control | <i>R. insecticola</i> | T2 |
| T2-Hd ^{Ms1} | T2 | New | <i>H. defensa</i> | Ms1 |
| T2-Hd ^{Ms2} | T2 | New | <i>H. defensa</i> | Ms2 |

Experimental design

The aim of the experiment was to measure the effects of single infection by either *H. defensa* or *R. insecticola* on (i) the defensive behaviors of aphids in response to *A. ervi* attacks, (ii) their level of resistance when parasitized by *A. ervi* and (iii) the parasitoid life-history traits once emerging from aphid individuals.

Fifteen third-instar larvae from a given pea aphid lineage were introduced singly into a glass Petri dish (40 x 12mm, Steriplan©) containing a leaf disk of *V. faba*. Few hours later, these single aphid individuals were successively exposed to an *A. ervi* female. The observation began once the parasitoid was introduced into a Petri dish and ended after aphid stabbing or after 5 minutes if no attack happened. Behaviors of both aphid and parasitoid were recorded. When the parasitoid had a contact with the aphid, the event was recorded as an attack. The outcome of an attack was either a success or a failure. A

successful attack was defined as any encounter leading to the parasitoid piercing the aphid skin with its ovipositor. Conversely, any encounter between an aphid and a parasitoid that did not lead to stabbing was counted as an attack failure. An attack can occur with or without aphid defensive behaviors. Here, we considered three classes of aphid behavioral defenses: (1) aphid aggressive behaviors (i.e., quick legs or body motions), (2) escaping by walking and (3) emission of cornicular secretions (i.e., secretion containing alarm pheromone, that can glue the parasitoid in case of contact, Wu et al. 2010). After this observation, the parasitoid female was then transferred to a new Petri dish containing another single aphid from the same lineage. The experiment ended when the 15 single aphids of the same lineage were exposed to the same female parasitoid. The aphid individuals which were stabbed by the parasitoid female were transferred on a single *V. faba* plant and kept under laboratory conditions. After 14 days, stabbed aphids were inspected in order to measure the parasitism rate. This latter was estimated by dividing the number of aphid mummies (i.e. dead aphids containing a parasitoid immature) by the total number of stabbed aphids transferred onto the host plant and recovered at that time (i.e., dead or missing individuals were excluded from analyses). All aphid mummies from the same experiment were then isolated in a Petri dish and parasitoid offspring emerging from these mummies were left into the device until they died. We then sexed parasitoid offspring and measured the size of their left-hind tibia (the tibia length is a good fitness proxy in parasitic wasp – Godfray 1994). The parasitoid females used in parasitism experiments (i.e. the mothers) were also kept for tibia measurement. The tibia length of parasitoids was measured under binocular with a graduated scale (Leica MZ16, magnification: $\times 16$).

For each aphid lineage, the experiment was conducted five to seven times (i.e., 75 to 105 of aphid individuals exposed to *A. ervi* attack per lineage).

Statistical analyses

As aphid genotype and aphid symbiotic status are not crossed factors, each pea aphid genotype of a given pea aphid biotype was analyzed separately. We compared the ‘cured lineages’ with the ‘control lineages’ and the ‘new lineages’ for each genotype except the aphid genotype Gt2 from the *Genista* biotype, which only presented the ‘cured lineage’ and the ‘control lineage’.

To test whether the symbiotic status of aphids influenced their defensive behaviors, the occurrence of each class of defensive behaviors (i.e., aphid aggressiveness, escaping by walking or emission of cornicular secretions) was analyzed against the symbiotic status of aphids by using a Generalized Linear Mixed Model assuming a binomial distribution with a logit link function (noted hereafter binomial GLMM). Because some experimental aphids were exposed to the same parasitoid female, we introduced the parasitoid ID as a random factor in models to include data substructure (see Equation 1).

$$\begin{aligned} \text{Defensive behavior}_{ij} &\sim \text{Binomial}(n_{ij}; \pi_{ij}) \\ \text{logit}(\text{Defensive behavior})_{ij} &= \text{Symbiotic status}_{ij} + (\text{ID}_i) \end{aligned} \quad (\text{eqn 1})$$

where $\text{Defensive behavior}_{ij}$ is the j^{th} observation in the replicate i , n_{ij} is the number of observations, π_{ij} is the probability of exhibiting a defensive behavior and ID is the random intercept. Each class of defensive behavior (i.e., aggressive behaviors, escaping or emission of cornicular secretions) was analyzed separately.

To test whether the symbiotic status of aphids influenced their level of resistance against *A. ervi* parasitoid, the parasitism rate was analyzed against the symbiotic status of aphids by using a binomial GLMM. Because some experimental aphids were exposed to the same parasitoid female, we introduced the parasitoid ID as a random factor in models (see Equation 2).

$$\begin{aligned} \text{Parasitism rate}_{ij} &\sim \text{Binomial}(n_{ij}; \pi_{ij}) \\ \text{logit}(\text{Parasitism rate})_{ij} &= \text{Symbiotic status}_{ij} + (\text{ID}_i) \end{aligned} \quad (\text{eqn 2})$$

where $\text{Parasitism rate}_{ij}$ is the j^{th} observation in the replicate i , n_{ij} is the number of observations, π_{ij} is the probability of being mummified and ID is the random intercept.

To test whether the symbiotic status of aphids influenced the sex-ratio of the emerging parasitoids, the proportion of parasitoid female offspring emerging from aphids was analyzed against the symbiotic status of aphids by using a binomial GLMM. Because some parasitoid offspring originated from the same parasitoid female (i.e. their mother), we introduced the parasitoid mother ID as a random factor in models (see Equation 3).

$$\text{Sex-ratio}_{ij} \sim \text{Binomial}(n_{ij}; \pi_{ij})$$

$$\text{logit}(\text{Sex-ratio}_{ij}) = \text{Symbiotic status}_{ij} + (\text{ID}_i) \quad (\text{eqn 3})$$

where Sex-ratio_{ij} is the j^{th} observation in the replicate i , n_{ij} is the number of observations, π_{ij} is the probability of being a daughter and ID is the random intercept.

To test whether the symbiotic status of aphids influenced the tibia size of the emerging parasitoids, this dependent variable was analyzed against the symbiotic status of aphids by using a General Linear Mixed Model (noted hereafter LMM). We included the tibia size of the parasitoid mother as a covariate in the LMMs. Because some parasitoid offspring developed on the same aphid host plant and environmental conditions, we introduced the replicate ID as a random factor in models (see Equation 4).

$$\begin{aligned} \text{Tibia size}_{ij} &\sim \text{Normal}(\mu_{ij}; \sigma^2_{ij}) \\ \text{Tibia size}_{ij} &= \text{Symbiotic status}_{ij} + \text{Mother tibia size}_{ij} + (\text{ID}_i) \end{aligned} \quad (\text{eqn 4})$$

where Tibia size_{ij} is the j^{th} observation in the replicate i , and ID is the random intercept.

The GLMMs and LMMs were fitted using the lme4 and the nlme packages respectively (Bates et al. 2015; Pinheiro et al. 2019) in R version 3.6.2 (R Core Team 2019). For each model, the significance of the covariates was determined by using a likelihood ratio test. For each significant covariate, we analyzed the estimated regression coefficients to interpret fitted models. Data with no variability (e.g., all aphids of a given lineage resisted against parasitism) were not included in models as coefficients cannot be estimated correctly.

Results

Aphid defensive behaviors in relation with symbiotic status

In the *Genista* biotype, the symbiotic status of aphids did not influence escaping behavior and emission of cornicular secretions but significantly affected their aggressiveness when attacked by *A. ervi* for both Gt1 and Gt2 genotypes (figure 1A, table 3). Individuals harboring their own strain of *H. defensa* ('control lineages') showed on average 14% less aggressive behaviors during the attack compared to uninfected ones ('cured lineages') in the two genotypes (figure 1A). Introducing either Hd^{Ms1} or Hd^{Ms2} in

Gt1 ('new lineages') also resulted in a similar reduction of the aggressive behaviors. In the *Trifolium* biotype, aphid defensive behaviors were affected by the symbiotic status. Contrarily to the infection with *R. insecticola* that did not influence the defensive behaviors whatever the aphid genotype, the infection with the two strains of *H. defensa* from the *Medicago* biotype decreased defensive behaviors with differences between host genotypes (figure 1, table 3). Aphids infected with Hd^{Ms2} showed reduced aggressive behaviors in T2 and reduced escaping behaviors and cornicular secretions in T1 compared to uninfected lineages, while aphids infected with Hd^{Ms1} underwent a reduction in aggressive behaviors and cornicular secretions only in T2 (figure 1, table 3). In the *Medicago* biotype, aphid symbiotic status affected differently all three defensive behaviors depending on the aphid genotype. Infection with the original strain of *H. defensa* resulted in 10% and 19% less aggressive and escaping behaviors, respectively, compared to uninfected aphids in both genotypes and in 63% less cornicular secretions in Ms1 only (figure 1, table 3). Introducing symbiont strains or species (i.e., Hd^{Gt1}, Hd^{Gt2}, Ri^{T1} and Ri^{T2}) into both aphid genotypes from the *Medicago* biotype also affected defensive behaviors but depended on the behavior type and aphid genotype. In Ms1, aphids infected with strains of *H. defensa* from the *Genista* biotype showed reduced aggressiveness and evasion compared to uninfected ones, and aphids infected with Hd^{Gt2} further emitted less cornicular secretions. For *R. insecticola*, while Ri^{T2} did not affect behaviors, Ri^{T1} decreased both escaping behaviors and cornicular secretions. In Ms2, Hd^{Gt1} decreased the three defensive behaviors while the two strains of *R. insecticola* affected none of them (figure 1, table 3).

Table 3: Estimated regression coefficients (β), standard errors (SE) and P-value associated with symbiotic status tested on defensive behaviors, parasitism rate and parasitoid life-history traits. Grey cells correspond to significant effects.

| | | Variables | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|---------------------|---------------------------|----------------|----------|------------------|----------------|----------|-----------------------|----------------|----------|-----------------|----------------|----------|-------------------|----------------|----------|---------------------|----------------|----------|
| | | Aphid defensive behaviors | | | | | | Parasitism resistance | | | | | | Parasitoid traits | | | | | |
| Pea aphid genotype | Symbiotic status | Aggressive behaviors | | | Escape behaviors | | | Cornicular secretions | | | Parasitism rate | | | Sex-ratio | | | Tibia size | | |
| | | β | SE (β) | Pr(> z) | β | SE (β) | Pr(> z) | β | SE (β) | Pr(> z) | β | SE (β) | Pr(> z) | β | SE (β) | Pr(> z) | β | SE (β) | Pr(> t) |
| Gt1 | Uninfected | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Infected with HdGt1 | -1.14 | 0.41 | < 0.01 | -0.53 | 0.36 | 0.138 | 0.04 | 0.47 | 0.927 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Infected with HdMs1 | -1.04 | 0.42 | < 0.05 | -0.70 | 0.37 | 0.056 | 0.05 | 0.48 | 0.918 | -0.04 | 0.42 | 0.912 | 1.43 | 1.29 | 0.268 | -4 ^e -03 | 0.04 | 0.913 |
| | Infected with HdMs2 | -0.85 | 0.41 | < 0.05 | 0.28 | 0.36 | 0.441 | 0.53 | 0.44 | 0.226 | -0.78 | 0.41 | 0.055 | 0.26 | 1.26 | 0.838 | -0.07 | 0.04 | 0.108 |
| Gt2 | Uninfected | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Infected with HdGt2 | -1.03 | 0.50 | < 0.05 | -0.48 | 0.42 | 0.255 | 0.02 | 0.38 | 0.948 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Ms1 | Uninfected | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Infected with HdMs1 | -1.93 | 0.78 | < 0.05 | -1.21 | 0.44 | < 0.01 | -1.18 | 0.48 | < 0.05 | -0.55 | 0.41 | 0.183 | 0.41 | 0.76 | 0.593 | 0.01 | 0.03 | 0.706 |
| | Infected with HdGt1 | -1.79 | 0.78 | < 0.05 | -0.92 | 0.45 | < 0.05 | -0.66 | 0.42 | 0.119 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Infected with HdGt2 | -1.93 | 0.78 | < 0.05 | -1.25 | 0.44 | < 0.01 | -0.92 | 0.45 | < 0.05 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Infected with RiT1 | -1.44 | 0.80 | 0.073 | -0.98 | 0.45 | < 0.05 | -1.07 | 0.46 | < 0.05 | -1.00 | 0.41 | < 0.05 | -0.67 | 0.77 | 0.380 | 2 ^e -03 | 0.04 | 0.964 |
| | Infected with RiT2 | -1.17 | 0.83 | 0.157 | -0.65 | 0.46 | 0.159 | -0.44 | 0.41 | 0.285 | -0.06 | 0.44 | 0.892 | 0.51 | 0.76 | 0.499 | 0.02 | 0.03 | 0.623 |
| Ms2 | Uninfected | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Infected with HdMs2 | -1.81 | 0.78 | < 0.05 | -1.76 | 0.53 | < 0.001 | -0.67 | 0.40 | 0.089 | -0.50 | 0.59 | 0.396 | -1.95 | 1.27 | 0.125 | -0.02 | 0.04 | 0.695 |
| | Infected with HdGt1 | -2.32 | 0.76 | < 0.01 | -2.05 | 0.52 | < 0.001 | -0.81 | 0.40 | < 0.05 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Infected with RiT1 | 0.03 | 1.01 | 0.975 | -1.01 | 0.56 | 0.707 | -0.32 | 0.39 | 0.403 | 0.26 | 0.61 | 0.665 | -0.52 | 1.09 | 0.632 | 9 ^e -03 | 0.03 | 0.766 |
| | Infected with RiT2 | -0.81 | 0.88 | 0.359 | -0.73 | 0.59 | 0.217 | -0.56 | 0.41 | 0.171 | 1.19 | 0.71 | 0.095 | -0.16 | 1.14 | 0.891 | 0.01 | 0.03 | 0.731 |
| T1 | Uninfected | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Infected with RiT1 | 0.02 | 0.56 | 0.963 | 0.43 | 0.46 | 0.350 | -0.44 | 0.37 | 0.235 | 0.68 | 0.44 | 0.125 | -0.75 | 0.73 | 0.304 | -9 ^e -03 | 0.03 | 0.745 |
| | Infected with HdMs1 | -0.78 | 0.46 | 0.091 | -0.17 | 0.40 | 0.675 | -0.46 | 0.34 | 0.185 | -0.08 | 0.35 | 0.828 | -0.41 | 0.69 | 0.556 | 0.02 | 0.03 | 0.407 |
| | Infected with HdMs2 | -0.83 | 0.45 | 0.065 | -0.77 | 0.39 | < 0.05 | -1.02 | 0.37 | < 0.01 | -0.31 | 0.33 | 0.347 | -1.18 | 0.74 | 0.113 | 0.02 | 0.03 | 0.525 |
| T2 | Uninfected | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | | 0.00 | | |
| | Infected with RiT2 | -2.08 | 1.08 | 0.054 | -0.13 | 0.59 | 0.830 | 0.06 | 0.35 | 0.872 | -0.34 | 0.37 | 0.358 | -0.77 | 1.08 | 0.478 | 0.02 | 0.03 | 0.628 |
| | Infected with HdMs1 | -2.62 | 1.06 | < 0.05 | -0.49 | 0.58 | 0.395 | -1.06 | 0.39 | < 0.01 | -0.27 | 0.37 | 0.453 | -0.91 | 1.04 | 0.385 | -4 ^e -03 | 0.03 | 0.912 |
| | Infected with HdMs2 | -2.68 | 1.05 | < 0.05 | -0.46 | 0.58 | 0.425 | -0.63 | 0.37 | 0.083 | -0.19 | 0.37 | 0.597 | -1.05 | 1.10 | 0.343 | -9 ^e -03 | 0.04 | 0.796 |

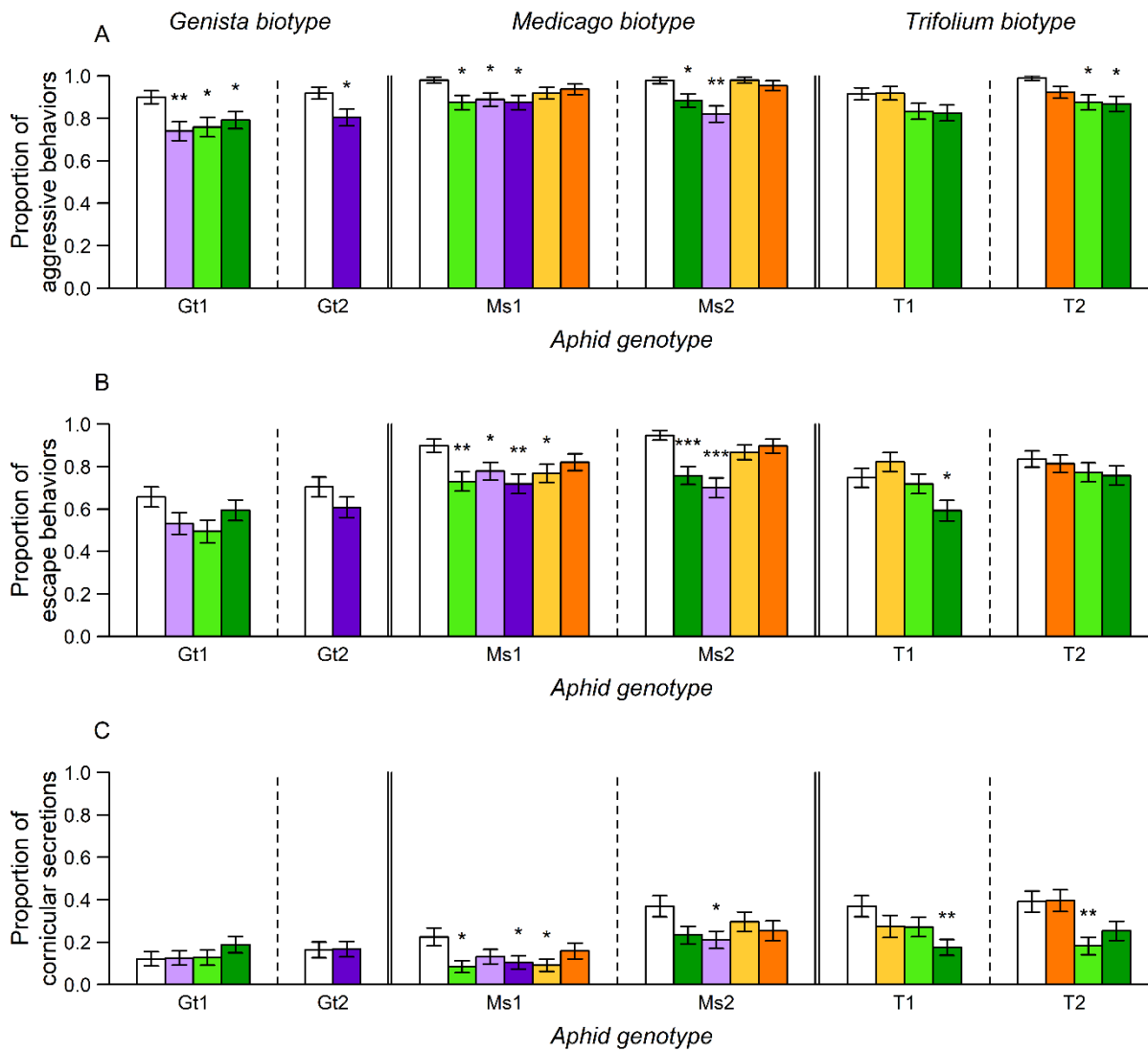


Figure 1: Effects of the symbiotic status of pea aphid individuals on three aphid defensive behaviors during the attack of an *Aphidius ervi* parasitoid female: (A) The proportion of aphids expressing legs and body movements (i.e. aphid aggressiveness); (B) the proportion of aphids walking away during or after the attack (i.e. aphid escaping); (C) the proportion of aphids emitting conicular secretions. White bars represent aphids with no secondary symbiont (i.e., cured lineages) and colored bars represent aphids infected with a given secondary symbiont strain/species: light purple = Hd^{Gt1}, dark purple = Hd^{Gt2}, light green = Hd^{Ms1}, dark green = Hd^{Ms2}, light orange = Ri^{T1} and dark orange = Ri^{T2}. Error bars correspond to standard errors. The asterisk mark shows significant differences between one symbiotic status and the cured lineage within each genotype (significance of the GLMMs parameters). *: P < 0.05; **: P < 0.01; ***: P < 0.001.

Aphid resistance to parasitism in relation with symbiotic status

In the *Genista* biotype, the influence of symbionts on parasitism resistance strongly depended on symbiont strain. Once stabbed by an *A. ervi* parasitoid female, a high proportion of aphids of the *Genista* biotype free of *H. defensa* were mummified (70 to 83% for Gt1 and Gt2 respectively) while lineages infected with the original strain of *H. defensa* were totally resistant to parasitism regardless of the aphid genotype (figure 2). Introducing either Hd^{Ms1} or Hd^{Ms2} in Gt1 provided no protection against parasitoids

(figure 2, table 3). In the *Trifolium* biotype, infection with secondary symbionts did not change aphid resistance to parasitism. Aphids harboring either *R. insecticola* or *H. defensa* presented similar mummification rates than uninfected ones (figure 2, table 3). In aphid lineages from the *Medicago* biotype, we confirmed the protection levels associated with symbionts assessed previously (Leclair et al. 2016): the two strains of *H. defensa* from the *Medicago* biotype showed no protection against parasitism. Introducing *H. defensa* from the *Genista* biotype in Ms1 and Ms2 genotypes protected completely their hosts against *A. ervi* parasitism (figure 2, table 3). In addition, all surviving aphids of these new lineages became whitish and swollen few days after the parasitoid attack and stopped reproducing. The introduction of the two strains of *R. insecticola* into new hosts (Ms1 and Ms2) resulted in different phenotypes depending on symbiont strains and aphid genotypes. Whereas there was no difference in parasitism rate between aphids infected with Ri^{T2} and uninfected aphids, the proportion of mummified aphids was reduced in Ms1 infected with Ri^{T1} but not in Ms2 (figure 2, table 3).

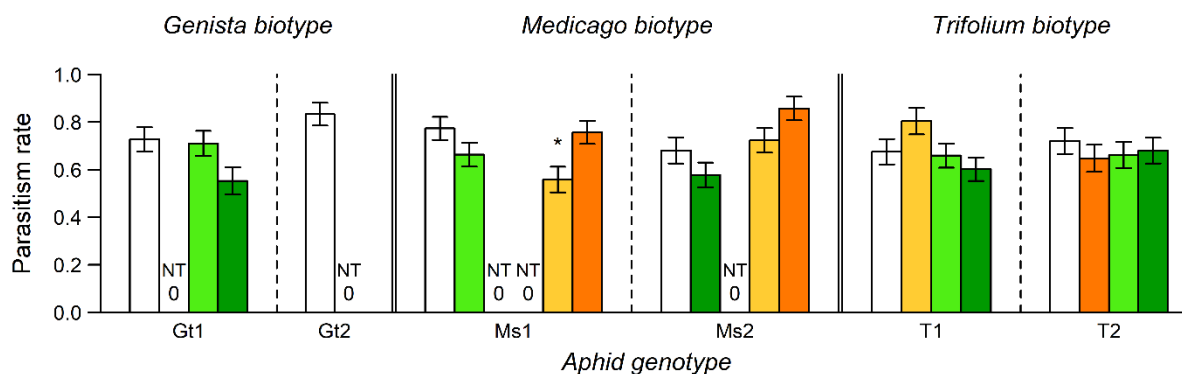


Figure 2: Effect of the symbiotic status of pea aphid individuals on the parasitism rate by *Aphidius ervi* parasitoid. White bars represent aphids with no secondary symbiont (i.e., cured lineages) and colored bars represent aphids infected with a given secondary symbiont strain/species: light purple = Hd^{Gt1}, dark purple = Hd^{Gt2}, light green = Hd^{Ms1}, dark green = Hd^{Ms2}, light orange = Ri^{T1} and dark orange = Ri^{T2}. Error bars correspond to standard errors. The asterisk marks show significant differences between one symbiotic status and the cured lineage within each genotype (significance of the GLMMs parameters). NT: Not tested as no parasitism found; *: P < 0.05.

Fitness traits of parasitoids in relation with aphid symbiotic status

As aphids infected with *H. defensa* from the *Genista* biotype were 100% resistant against *A. ervi*, all lineages carrying Hd^{Gt1} or Hd^{Gt2} were excluded from all data analyses. Whatever the aphid genotype, the life history traits of parasitoids were not influenced by the symbiotic status of their aphid hosts: neither the infection with the original symbiont

nor the infection with new symbiont strains influenced sex-ratio and tibia size of emerging parasitoids (figure 3, table 3).

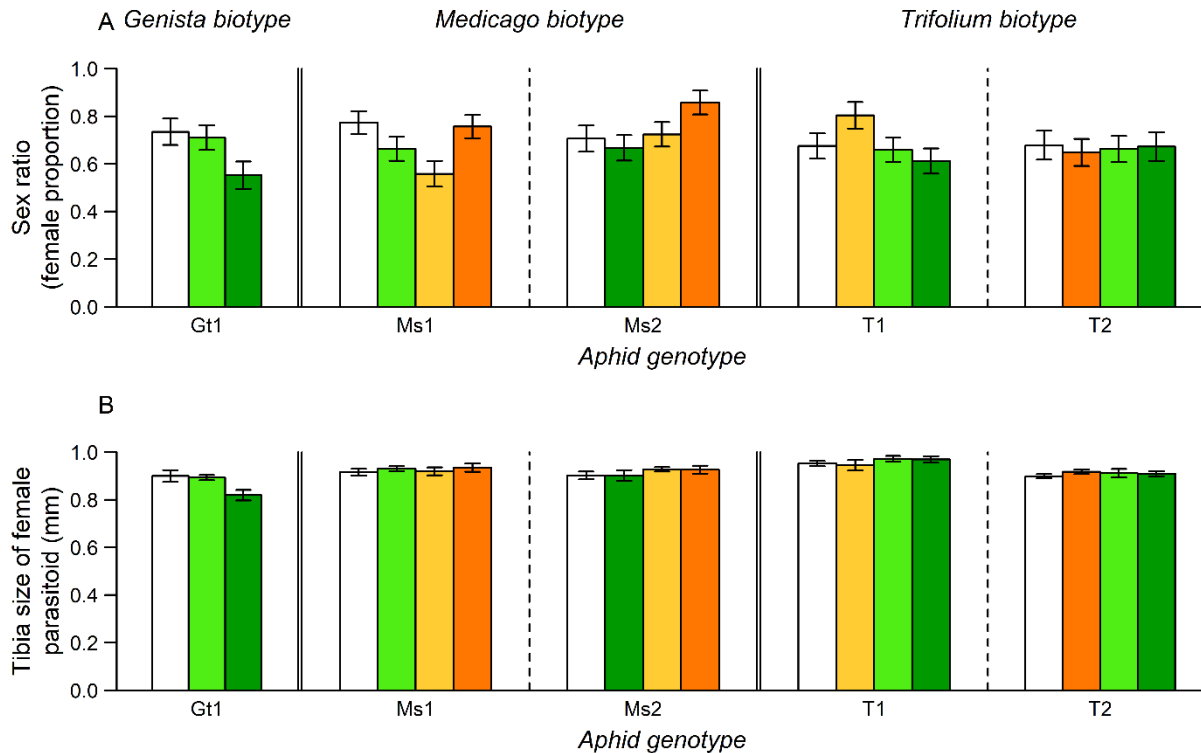


Figure 3: Effects of the symbiotic status of parasitized pea aphid individuals on life-history traits of emerging *Aphidius ervi* parasitoids: (A) sex-ratio (proportion of females) and (B) left tibia size. White bars represent aphids with no secondary symbiont (i.e., cured lineages) and colored bars represent aphids infected with a given secondary symbiont strain/species: light green = Hd^{Ms1}, dark green = Hd^{Ms2}, light orange = Ri^{T1} and dark orange = Ri^{T2}. Error bars correspond to standard errors.

Discussion

How microbial symbionts influence animal protection against natural enemies is an important open question in ecology. Here, we tested whether protective bacterial symbionts associated with aphids influence the different steps of a host-parasitoid interaction. While we found symbiont effects on both aphid defensive behaviors and their level of resistance against parasitism with a large variation depending on symbiont genotypes and host-symbiont associations, we did not detect sublethal effects due to symbiont infection on emerging parasitoids.

Variation of symbiont-mediated phenotypes associated with parasitism

Consistent with previous studies, we found that aphids harboring *H. defensa* presented reduced defensive behaviors with less aggressive movements and escaping responses

(Dion et al. 2011; Polin et al. 2014). However, we showed that symbiont strains varied in their effects on aphid behaviors with the two *H. defensa* strains from the *Medicago* biotype reducing all considered behavioral defenses whereas the two *H. defensa* strains from the *Genista* biotype reducing aphid aggressiveness only. Additionally, we found no effect of *R. insecticola* infection on aphid defensive behaviors, a result in line with another study on lineages of the cereal aphid *Sitobion avenae* infected or not with *R. insecticola* and exposed to a predatory ladybird (Ramírez-Cáceres et al. 2019). These results highlighted that the effects of symbionts on defensive behaviors depend on symbiont strains and are not specifically associated with resistance to parasitism.

When aphids were stabbed by *A. ervi*, the different strains of *H. defensa* provided various levels of protection against the parasitism whereas *R. insecticola* did not protect aphids, except in one case (Ri^{T1} introduced in Ms1). The strains of *H. defensa* from the *Genista* biotype precluded the development of the parasitoid while the *H. defensa* strains from the *Medicago* biotype, despite harboring the APSE phage (Leclair et al. 2016), provided no protection against *A. ervi* parasitism. The reasons for this protection variation have been already proposed in previous papers and involve aphid, parasitoid, symbiont and phage genotypes and their interactions (Oliver et al. 2005; Oliver et al. 2009; Leclair et al. 2016; Oliver and Higashi 2019). Concerning *R. insecticola*, our results confirm previous studies on the pea aphid showing little or no influence of this symbiont on parasitism resistance (Oliver et al. 2003; Hansen et al. 2012). The only exception was when the *R. insecticola* strain from T1 was introduced in Ms1. This reduction in parasitism rate could be an indirect effect of the symbiont cost in this specific aphid lineage. In another study, *A. fabae* infected with *Serratia symbiotica* showed a reduced parasitism rate (Pons et al. 2019) which may result from size reduction of infected aphids and parasitoid preference for larger hosts. In addition, since *R. insecticola* can confer protection against parasitoids in other aphid species such as *Myzus persicae* (Vorburger et al. 2010), we cannot exclude that some *R. insecticola* strains originating from other *A. pisum* hosts can protect pea aphids against *A. ervi* or other parasitoid species (Vorburger et al. 2010; Asplen et al. 2014; McLean and Godfray 2015).

Some studies showed that symbionts could impose sublethal effects on parasitoids emerging from infected aphid hosts, such as a reduction of parasitoid body mass (Nyabuga et al. 2010; Schmid et al. 2012; Luo et al. 2017; Pons et al. 2019), a lower

emergence rate (Schmid et al. 2012; Pons et al. 2019) or a delayed development (Schmid et al. 2012). Here, we found no effect of symbiont infection on the measured traits on emerging parasitoids. It has been hypothesized that sublethal effects induced by *H. defensa* are due to the toxins produced by the APSE phage of the bacteria (Oliver et al. 2009), which would affect parasitoid fitness traits when the toxin does not kill it (Monticelli et al. 2019). As these toxins differ from one APSE variant to another, we can hypothesize that in our study, the APSE phage of the *H. defensa* from the *Medicago* biotype does not produce the toxins that are effective or sufficiently harmful to *A. ervi*. Concerning the possible influence of aphid symbionts on parasitoid sex-ratio, Monticelli et al. (2019) hypothesized that parasitoids could discriminate infected aphids as low quality hosts and choose to oviposit more male eggs, what would result in male-biased offspring. However, our results along with those of Nyabuga et al. (2010) on a wide range of pea aphid-symbiont associations did not show sex ratio bias associated with protective and non-protective symbionts.

Do symbionts induce defensive syndromes in their host?

Our results highlighted the influence of symbionts on one or several steps of the host-parasitoid interaction and revealed patterns in symbiont-mediated phenotypes. The two strains of *R. insecticola* had a very limited influence on the three steps of the interaction. The two *H. defensa* strains from the *Genista* biotype decreased slightly defensive behaviors, by affecting aphids' aggressiveness only, but protected completely their host against parasitoids. Finally, the two *H. defensa* strains from the *Medicago* biotype had a stronger impact on defensive behaviors but did not protect their host nor influence parasitoid traits. These patterns suggest no association between effects at the different steps of the interaction, in particular between defensive behaviors and parasitoid resistance. However, in our study we could compare only a few associations and additional lineages should be examined to have a broader insight into correlations between symbiont effects at the different steps of aphid-parasitoid interactions. In Dion et al. (2011) we first reported that bacterial symbionts could affect the defensive behaviors of their hosts and hypothesized that this reduction could be either an adaptive response to the parasitism resistance conferred by the symbiont or a cost imposed by the symbiosis. By showing an absence of link between symbiont effects on defensive behaviors and parasitism rate, our study suggests that the reduction of aphid behaviors

is a by-product of the infection. Furthermore, if adaptive, the reduction of defensive behaviors should be counter-selected as it would leave aphids defenseless against other natural enemies like predators (Polin et al. 2014) or other parasitoid genotypes or species against which the symbiont is not effective (Vorburger et al. 2010; Asplen et al. 2014; McLean and Godfray 2015).

Specificity of symbiont-mediated phenotypes

When studying the influence of symbionts on their hosts, it is important to consider and assess the specificity of their effects as they can either be mainly driven by the symbiont or result from the interaction between the host and symbiont genomes.

In our study, although there is a trend that *H. defensa* reduces defensive behaviors while *R. insecticola* does not, the introduction of symbionts into new aphid hosts often resulted in different behavioral patterns compared to the original host-symbiont association. This suggests that symbiont effects on aphid defensive behaviors are more specific to host-symbiont associations than just driven by the symbiont. If we consider the reduction in defensive behaviors as a cost rather than an adaptive response, we should expect that new associations undergo greater costs of the infection (i.e., greater reduction in defensive behaviors or more behaviors affected), because co-evolution would attenuate these costs in older symbiotic associations. Indeed, several studies in aphids (Łukasik et al. 2015; Niepoth et al. 2018) and in *Drosophila* (Suh et al. 2009) highlighted that the acquisition of new symbionts could have pathogenic effects on their host, with fitness reduction and a higher mortality rates. However, in our study, several symbionts with important effects on behaviors in their original host had lower influence in other aphid genotypes. Experimental evolution would be a valuable approach to test whether changes in defensive behaviors occur throughout time after acquisition of a new symbiont into an aphid host lineage.

Contrarily to symbiont effects on defensive behaviors, symbiont-mediated protection against parasitoids have been extensively studied and previous works underlined that the influence of symbionts on the level of parasitism resistance did not vary much between host genotypes or species (Oliver et al. 2005; Vorburger et al. 2010; Hansen et al. 2012). In the same vein, we observed that symbiont introduction in new hosts induced the same protection phenotype than in their original host (i.e., complete protection or no

protection), except for Ri^{T1} introduced in Ms1. The protection conferred by *H. defensa* from the *Genista* biotype is peculiar in that infected aphids attacked by parasitoid develop a particular phenotype: they become swollen, whitish and stop reproducing (Leclair et al. 2016). In our experiments we also observed this phenotype in aphids of the *Medicago* biotype infected with Hd^{Gt1} and Hd^{Gt2}, providing evidence that the phenotype could be transferred horizontally and is determined by the symbiont only.

When are 'protective' symbionts protective?

Considering our results and other studies on symbiont-mediated protection against parasitoids, we would like to discuss here what is required to qualify a symbiont as protective. The reduction of defensive behaviors caused by the infection with several symbiont species turns out more harmful than beneficial to the host, because they are more vulnerable to predators or parasitoids against which they are not protected (Dion et al. 2011; Polin et al. 2014; this study). There is also no evidence so far of any symbiont able to enhance the defensive behaviors of its host. Concerning the resistance of host against the parasitism, studies show that many symbiont species are able to protect their host against different parasitoid species (Oliver et al. 2003; Vorburger et al. 2010; Cayetano and Vorburger 2015; Donald et al. 2016; Leclair et al. 2016; Jamin and Vorburger 2019), but for the same symbiont species, the level of protection may differ greatly from one strain to another (Oliver et al. 2005; Leclair et al. 2016) and depends on the parasitoid species or genotype (Schmid et al. 2012; Cayetano and Vorburger 2015). We also know that environmental parameters can also influence this protection, such as temperature (Heyworth and Ferrari 2016; Doremus et al. 2018) or the plant used by the host (Sochard et al. 2019). Symbiont-mediated protection may also induce fitness costs to their hosts when expressed (Vorburger et al. 2013; Leclair et al. 2016; Sochard et al. 2019), which can go to reproduction arrest in the case of the *Genista* biotype infected with *H. defensa*. Certain symbionts have also been found to affect parasitoid life-history traits once emerging from infected hosts (Nyabuga et al. 2010; Schmid et al. 2012; Pons et al. 2019). Although these sublethal effects of symbionts do not provide a direct benefit to the host as it dies at the end, they would have a negative impact on parasitoids at both individual and population scales. This large variation in symbiont-mediated types and levels of protection leads to a better definition of what a protective symbiont is. From the host individual scale, a protective symbiont would be a microbial partner that limits the

development of the enemy without sacrificing the reproduction. Considering this definition, protective symbioses would be not so frequent and would be not always displayed by a symbiont species as a whole.

Conclusion

In our study, we showed that symbionts may influence different steps of the host-parasitoid interactions, highlighting the need to consider the whole sequence of the process to better assess the outcomes of protective symbiosis and understand the dynamics of host-symbionts in natural populations. These different effects, alone or in combination, as well as their specificity in terms of host-symbiont associations, may be added to the factors explaining why protective symbionts are only found in intermediate frequencies in host populations. Finally, our study underlines the need for a better definition of the notion of protective symbioses.

Acknowledgements

We thank Gaëtan Denis and Jean-François Le Gallic for the maintenance of aphid cultures and Frédérique Mahéo for regular checking of aphid genotype and symbiotic status using molecular tools.

Funding resources

This study was supported by the project ANR Hmicmac 16-CE02-0014 to JCS and YO.

Author contribution statement

All authors conceived and designed the experiments. C.S. and L.B. conducted the experiments. C.S. and Y. O. analyzed the data. Y. O. and J-C.S. contributed to the supervision of this study. All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Data availability

The datasets generated and analyzed during the current study will be available as additional supporting files once the manuscript accepted for publication.

References

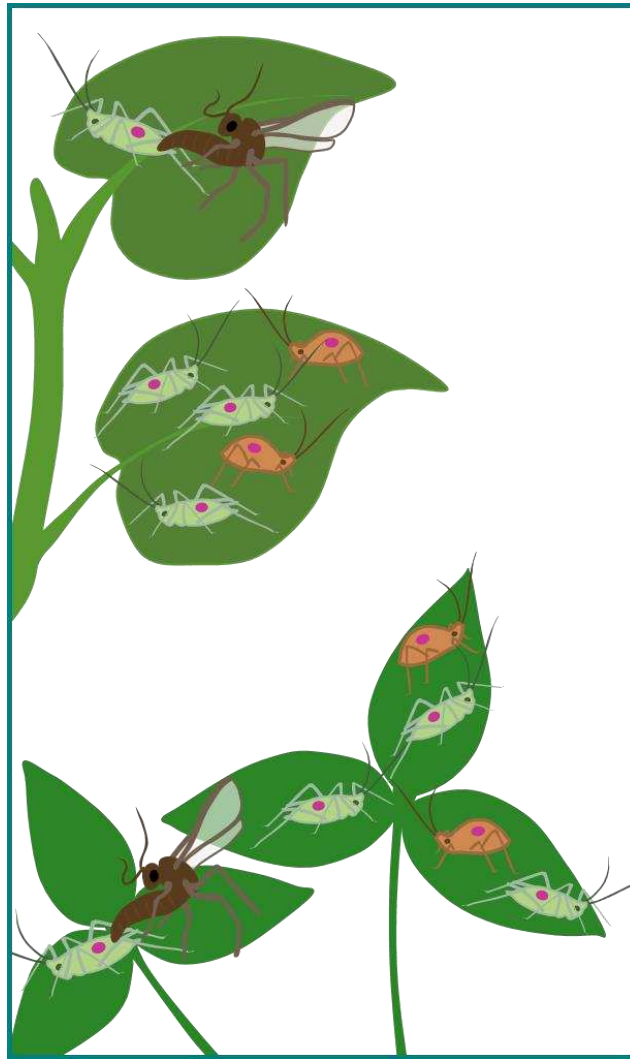
- Asplen MK, Bano N, Brady CM, Desneux N, Hopper KR, et al., 2014. Specialisation of bacterial endosymbionts that protect aphids from parasitoids: Defensive symbiosis in the cowpea aphid. *Ecol Entomol* 39:736–739.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, and Walker S, 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48.
- Brandt JW, Chevignon G, Oliver KM, and Strand MR, 2017. Culture of an aphid heritable symbiont demonstrates its direct role in defence against parasitoids. *Proc R Soc B* 284:20171925.
- Cayetano L, Rothacher L, Simon J-C, and Vorburger C, 2015. Cheaper is not always worse: strongly protective isolates of a defensive symbiont are less costly to the aphid host. *Proc R Soc B* 282:20142333.
- Cayetano L and Vorburger C, 2015. Symbiont-conferred protection against Hymenopteran parasitoids in aphids: how general is it? *Ecol Entomol* 40:85–93.
- Degnan PH and Moran NA, 2008. Diverse phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. *Appl Environ Microbiol* 74:6782–6791.
- Dion E, Polin SE, Simon J-C, and Outreman Y, 2011. Symbiont infection affects aphid defensive behaviours. *Biol Lett* 7:743–746.
- Donald KJ, Clarke HV, Mitchell C, Cornwell RM, Hubbard SF, et al., 2016. Protection of pea aphids associated with coinfecting bacterial symbionts persists during superparasitism by a braconid wasp. *Microb Ecol* 71:1–4.
- Doremus MR, Smith AH, Kim KL, Holder AJ, Russell JA, et al., 2018. Breakdown of a defensive symbiosis, but not endogenous defences, at elevated temperatures. *Mol Ecol* 27:2138–2151.
- Ferrari J, Darby AC, Daniell TJ, Godfray HCJ, and Douglas AE, 2004. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. *Ecol Entomol* 29:60–65.
- Flórez LV, Biedermann PHW, Engl T, and Kaltenpoth M, 2015. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Nat Prod Rep* 32:904–936.
- Godfray HCJ, 1994. Parasitoids: behavioral and evolutionary ecology. Princeton: Princeton University Press.

- Hansen AK, Vorburger C, and Moran NA, 2012. Genomic basis of endosymbiont-conferred protection against an insect parasitoid. *Genome Res* 22:106–114.
- Henry LM, Peccoud J, Simon J-C, Hadfield JD, Maiden MJC, et al., 2013. Horizontally transmitted symbionts and host colonization of ecological niches. *Curr Biol* 23:1713–1717.
- Heyworth ER and Ferrari J, 2016. Heat Stress Affects Facultative Symbiont-Mediated Protection from a Parasitoid Wasp. *PLOS ONE* 11:e0167180.
- Jamin AR and Vorburger C, 2019. Estimating costs of aphid resistance to parasitoids conferred by a protective strain of the bacterial endosymbiont *Regiella insecticola*. *Entomol Exp Appl* 167:252–260.
- Leclair M, 2016. Dynamique évolutive des symbioses protectrices chez les insectes. [Rennes, France]: Université de Rennes 1.
- Leclair M, Pons I, Mahéo F, Morlière S, Simon J-C, et al., 2016. Diversity in symbiont consortia in the pea aphid complex is associated with large phenotypic variation in the insect host. *Evol Ecol* 30:925–941.
- Leybourne DJ, Valentine TA, Bos JIB, and Karley AJ, 2020. A fitness cost resulting from *Hamiltonella defensa* infection is associated with altered probing and feeding behaviour in *Rhopalosiphum padi*. *J Exp Biol* 223:jeb207936.
- Łukasik P, Guo H, Asch M van, Henry LM, Godfray HCJ, et al., 2015. Horizontal transfer of facultative endosymbionts is limited by host relatedness. *Evolution* 69:2757–2766.
- Luo C, Monticelli L, Meng L, Li D, Fan J, et al., 2017. Effect of the endosymbiont *Regiella insecticola* on an aphid parasitoid. *Entomol Gen* 36:300–307.
- Lynn-Bell NL, Strand MR, and Oliver KM, 2019. Bacteriophage acquisition restores protective mutualism. *Microbiology* 165:985–989.
- Mathé-Hubert H, Kaech H, Hertaeg C, Jaenike J, and Vorburger C, 2019. Nonrandom associations of maternally transmitted symbionts in insects: the roles of drift versus biased cotransmission and selection. *Mol Ecol* 28:5330–5346.
- McLean AHC and Godfray HCJ, 2015. Evidence for specificity in symbiont-conferred protection against parasitoids. *Proc R Soc B Biol Sci* 282:20150977.
- Monticelli LS, Outreman Y, Frago E, and Desneux N, 2019. Impact of host endosymbionts on parasitoid host range — from mechanisms to communities. *Curr Opin Insect Sci* 32:77–82.
- Niepoth N, Ellers J, and Henry LM, 2018. Symbiont interactions with non-native hosts limit the formation of new symbioses. *BMC Evol Biol* 18:27.
- Nyabuga FN, Outreman Y, Simon J-C, Heckel DG, and Weisser WW, 2010. Effects of pea aphid secondary endosymbionts on aphid resistance and development of the aphid parasitoid *Aphidius ervi*: a correlative study. *Entomol Exp Appl* 136:243–253.

- Oliver KM, Degnan PH, Hunter MS, and Moran NA, 2009. Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. *Science* 325:992–994.
- Oliver KM and Higashi CH, 2019. Variations on a protective theme: *Hamiltonella defensa* infections in aphids variably impact parasitoid success. *Curr Opin Insect Sci* 32:1–7.
- Oliver K and Moran N, 2009. Defensive symbionts in aphids and other insects. In: *Defensive mutualism in microbial symbiosis*. CRC Press.
- Oliver KM, Moran NA, and Hunter MS, 2005. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc Natl Acad Sci* 102:12795–12800.
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA, and Hunter MS, 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci* 100:1803–1807.
- Oliver KM, Smith AH, and Russell JA, 2014. Defensive symbiosis in the real world - advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond. *Funct Ecol* 28:341–355.
- Peccoud J, Bonhomme J, Mahéo F, Huerta M de la, Cosson O, et al., 2014. Inheritance patterns of secondary symbionts during sexual reproduction of pea aphid biotypes. *Insect Sci* 21:291–300.
- Peccoud J, Mahéo F, Huerta M de la, Laurence C, and Simon J-C, 2015. Genetic characterisation of new host-specialised biotypes and novel associations with bacterial symbionts in the pea aphid complex. *Insect Conserv Divers* 8:484–492.
- Peccoud J, Ollivier A, Plantegenest M, and Simon J-C, 2009. A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proc Natl Acad Sci* 106:7495–7500.
- Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, and R Core Team, 2019. nlme: linear and nonlinear mixed effects models.
- Polin S, Simon J-C, and Outreman Y, 2014. An ecological cost associated with protective symbionts of aphids. *Ecol Evol* 4:836–840.
- Pons I, Renoz F, Noël C, and Hance T, 2019. New insights into the nature of symbiotic associations in aphids: infection process, biological effects, and transmission mode of cultivable *Serratia symbiotica* bacteria. *Appl Environ Microbiol* 85:e02445-18.
- R Core Team, 2019. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ramírez-Cáceres GE, Moya-Hernández MG, Quilodrán M, Nespolo RF, Ceballos R, et al., 2019. Harboring the secondary endosymbiont *Regiella insecticola* increases predation risk and reproduction in the cereal aphid *Sitobion avenae*. *J Pest Sci* 92:1039–1047.
- Scarborough CL, Ferrari J, and Godfray HCJ, 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* 310:1781–1781.

- Schmid M, Sieber R, Zimmermann Y-S, and Vorburger C, 2012. Development, specificity and sublethal effects of symbiont-conferred resistance to parasitoids in aphids. *Funct Ecol* 26:207–215.
- Sochard C, Leclair M, Simon J-C, and Outreman Y, 2019. Host plant effects on the outcomes of defensive symbioses in the pea aphid complex. *Evol Ecol* 33:651–669.
- Sochard C, Morlière S, Toussaint G, Outreman Y, Sugio A, et al., 2020. Examination of the success rate of secondary symbiont manipulation by microinjection methods in the pea aphid system. *Entomol Exp Appl* 168:174–183.
- Suh E, Mercer DR, Fu Y, and Dobson SL, 2009. Pathogenicity of life-shortening *Wolbachia* in *Aedes albopictus* after transfer from *Drosophila melanogaster*. *Appl Environ Microbiol* 75:7783–7788.
- Vorburger C, Ganesanandamoorthy P, and Kwiatkowski M, 2013. Comparing constitutive and induced costs of symbiont-conferred resistance to parasitoids in aphids. *Ecol Evol* 3:706–713.
- Vorburger C, Gehrler L, and Rodriguez P, 2010. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biol Lett* 6:109–111.
- Vorburger C and Gouskov A, 2011. Only helpful when required: a longevity cost of harbouring defensive symbionts. *J Evol Biol* 24:1611–1617.
- Weldon SR, Strand MR, and Oliver KM, 2013. Phage loss and the breakdown of a defensive symbiosis in aphids. *Proc R Soc B* 280:20122103.
- Wu G-M, Boivin G, Brodeur J, Giraldeau L-A, and Outreman Y, 2010. Altruistic defence behaviours in aphids. *BMC Evol Biol* 10:19.

CHAPITRE 4 :
INCIDENCE DE LA PLANTE HOTE
SUR LES PHENOTYPES CONFERES
PAR LES SYMBIOTES PROTECTEURS



La plupart des études qui s'intéressent aux phénotypes conférés par les symbiotes protecteurs portent uniquement sur les variations liées aux génotypes de l'hôte et du symbiote. Cependant, l'environnement local, et en particulier la plante pour les insectes phytophages, pourrait également représenter un facteur de variation des effets phénotypiques des symbiotes. Dans ce dernier chapitre (cf **Article 5**), nous avons testé l'effet de la plante hôte sur les phénotypes de protection et les coûts associés à différents symbiotes protecteurs. Cette dernière étude permet ainsi de faire le lien entre les différentes interactions biotiques étudiées dans les chapitres 2 et 3, en s'intéressant à la relation plante-puceron-symbiote-ennemi naturel.

Considérant plusieurs biotypes d'*A. pisum*, nous avons comparé les réponses phénotypiques des individus infectés ou non par les symbiotes sur deux espèces de plantes : la plante sur laquelle le biotype est spécialisée et la féverole, la plante sur laquelle tous les biotypes peuvent se nourrir. En plus de la protection conférée par les symbiotes, nous avons également déterminé les coûts associés à l'infection en mesurant la fécondité et la survie des individus, mais également les coûts de *fitness* induits par la résistance aux parasitoïdes. Contrairement aux études précédentes, nous avons considéré ici des lignées naturelles d'*A. pisum*, c'est-à-dire des lignées qui sont naturellement infectées ou non par des symbiotes. Nous avons également considéré parmi les lignées testées, plusieurs cas de coinfections impliquant *H. defensa* et *F. symbiotica*, une autre espèce de symbiote protecteur fréquemment retrouvée chez les pucerons infectés par *H. defensa*.

Les résultats montrent que la plante hôte des pucerons a un effet limité sur les phénotypes de protection. En revanche, les coûts liés à l'infection ou induits par le parasitisme varient selon la plante utilisée. A partir de ces observations, nous avons pu discuter dans l'article des différents facteurs qui influencent les phénotypes associés aux symbiotes.



Host plant effects on the outcomes of defensive symbioses in the pea aphid complex

Corentin Sochard¹ · Mélanie Leclair¹ · Jean-Christophe Simon² · Yannick Outreman¹ 

Received: 15 May 2019 / Accepted: 29 August 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

There is increasing evidence that microbial symbionts play pivotal roles in protecting their hosts. Most studies on defensive symbioses have analyzed interaction effects of host-symbiont genotypes on fitness value of defense but very few have considered how local environment could influence symbiont-mediated phenotypes. Our study assessed the effects of environmental variation on the intensity and cost of protection against adverse organisms in lineages of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* differing by their composition in secondary symbionts. This aphid is frequently infected by *Hamiltonella defensa*, singly or in co-infection with *Fukatsuia symbiotica*, and both bacterial symbionts generally confer a resistance against parasitoids but also induce fitness costs to their hosts. The pea aphid forms a complex of plant-adapted biotypes, each specialized on one or a few legume species (i.e., native host). These biotypes can all feed on broad bean, considered as a “universal” host plant. Since plants constitute the primary environment of aphids in providing both habitat and resources, we tested if symbiont-mediated protection was influenced by whether plant-specialized aphids fed on their native or universal hosts. For this purpose, parasitism resistance as well as constitutive and induced fitness costs of 21 pea aphid lineages differing in biotype and symbiotic complement were measured on both native and universal host plants. We showed that host plant could exert some influence on the outcomes of symbiotic defenses: while the host plant species had very little effect on the protection level against parasitoids, we showed that both costs of symbiotic association and costs induced by parasitism challenge varied in a plant-dependent manner.

Keywords Protective symbionts · Genetic variation · *Hamiltonella defensa* · Fitness costs · Local environment · Parasitism resistance

Corentin Sochard and Mélanie Leclair have contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10682-019-10005-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Yannick Outreman
yannick.outreman@agrocampus-ouest.fr

¹ IGEPP, Agrocampus Ouest, INRA, Université de Rennes 1, Université Bretagne-Loire, 65, rue de Saint-Brieuc CS 84215, 35042 Rennes Cedex, France

² IGEPP, Agrocampus Ouest, INRA, Université de Rennes 1, 35650 Le Rheu, France

Introduction

All organisms are included in food webs and suffer the risks of being attacked by a wide range of natural enemies. In response, they evolved a complex array of defensive strategies to cope with these recurrent threats and to protect themselves against antagonists. An active area in defense theory focuses on understanding how variable defense traits co-occur and are maintained within natural populations (Hakes and Cronin 2011). Different studies have shown that the fitness value of a defense depends on the genetic makeup of the individuals (i.e. genotypes) (e.g., Fellowes and Godfray 2000; Tinsley et al. 2006) but also on the local environment in which preys live. Differential selective pressures exerted by natural enemies, resource-mediated constraints and trade-offs between growth, reproduction and defense have been identified as important factors in maintaining defense variation within natural populations (Schmid-Hempel 2003). Complex interactions between genotypes and local environment are thus major determinants of the evolution of defensive phenotypes in ecosystems.

Until now, research on the effect of gene-by-environment interaction on defensive phenotypes has mainly focused on organism-controlled mechanisms of defense (e.g., immune systems, behavioral defenses, physical/chemical defenses). There is however growing evidence that microbial symbionts harbored by animals can confer to their hosts a defense against natural enemies (Flórez et al. 2015). Defensive symbioses are particularly well documented in insects where distinct bacterial lineages (e.g., *Wolbachia*, *Spiroplasma*, *Rickettsia*, *Regiella*, *Hamiltonella*) can provide a protection against pathogens, parasitoids or predators (Oliver et al. 2014). Bacteria engaged in defensive symbioses are often vertically transmitted. In threatened habitats, individuals hosting these symbionts can then be selected for. However, defensive symbioses may lead to detrimental effects on host fitness as protective microbes exploit the resources of their hosts to meet their own needs (e.g., Oliver et al. 2008; Vorburger and Perlman 2018). Although the cost/benefit value of protective symbioses has been well studied in constant environment, few works have considered whether and to what extent this value is context-dependent. Therefore, our aim was to better document how gene-by-environment interactions modulate the benefit-cost balance of defense provided by microbial symbionts.

For this purpose, we considered the well-studied bacterial defensive symbioses in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. This sap-feeding insect is the host of heritable bacterial symbionts, including the obligate endosymbiont, *Buchnera aphidicola*, and an array of secondary symbionts (Oliver et al. 2010; Gauthier et al. 2015; Guyomar et al. 2018). Some of these secondary symbionts can confer to their hosts a protection against pathogens (Ferrari et al. 2004), parasitoids (Oliver et al. 2003, 2005; Ferrari et al. 2004; McLean and Godfray 2015) and predators (Polin et al. 2015). A famous example of a defensive symbiont is the γ -proteobacterium *Hamiltonella defensa* which protects pea aphids against one of their main enemies, the hymenopteran parasitoid *Aphidius ervi* Haliday (Oliver et al. 2003, 2005; Ferrari et al. 2004), singly or in coinfection with *Fukatsuia symbiotica* (also termed as PAXS for Pea Aphid X-type Symbiont) (Guay et al. 2009; Leclair et al. 2016a). The protection provided by *H. defensa* is associated with the APSE phage (*A. Pisum* Secondary Endosymbiont): this APSE phage encodes toxins responsible for parasitoid immature elimination (Moran et al. 2005; Oliver et al. 2009; Brandt et al. 2017). Infection with *H. defensa* symbiont could however reduce host fitness, either directly through physiological costs (e.g., survival and fecundity reduction; Oliver et al. 2008; Simon et al. 2011; Leclair et al. 2016a), or indirectly through ecological costs (e.g., higher vulnerability to predators

and parasitoids; Dion et al. 2011; Polin et al. 2014, 2015; lower competitive ability; Oliver et al. 2008). In the pea aphid, the strength of symbiont-based protection and its associated costs depend on the APSE phage variants, symbiotic bacterial strains, aphid genotype and parasitoid genotypes/species (Leclair et al. 2016b; Oliver and Higashi 2018), but little is known about the context-dependency of this benefit-cost balance.

The pea aphid forms a complex of plant-adapted biotypes each specialized on one or a few legume species (Peccoud et al. 2009). In nature, the frequency of the protective symbiont *H. defensa* strongly varies between the pea aphid biotypes (Simon et al. 2003; Frantz et al. 2009; Ferrari et al. 2012; Henry et al. 2013; Smith et al. 2015): *H. defensa* is found, singly or in coinfection, in high proportion (and even fixed in some cases) in five biotypes respectively specialized on *Medicago sativa*, *Lotus pedunculatus*, *Ononis* sp. (Ferrari et al. 2004, 2012; Henry et al. 2013), *Genista tinctoria* and *G. sagittalis* (Peccoud et al. 2015). Despite their high degree of specialization, all pea aphid biotypes feed on *Vicia faba*, the broad bean, which will be referred as *universal host plant* hereafter (Pettersson et al. 1994). On this host plant, all aphids can survive and reproduce well regardless of their specific host plant, which will be referred as *native host plant* hereafter. Up to now, the symbiont-based defenses in the pea aphid have been mostly studied on the universal plant, *V. faba*. Because a host plant represents a major component of aphid environment as both food source and habitat, one can expect that the plant would affect the aphid fitness and the strength as well as resource allocation in symbiotic defenses through its nutritive value and secondary metabolites.

Here, we assessed the effects of host plant on the intensity and costs of parasitoid protection in plant-specialized pea aphid lineages differing in their composition in protective symbionts. First, we tested whether the plant source (i.e. universal vs native host plant) modulates the level of parasitoid protection associated with defensive symbionts. We then measured the context-dependency of costs associated with protection towards *Aphidius ervi*, the most common parasitoid enemy of *A. pisum*. Two types of costs were considered here. The first concerns the possible costs of being infected with defensive symbionts, sublethal effects that are borne irrespective of whether an aphid is parasitized or not. These costs associated with symbiont infections were termed *constitutive costs* hereafter. The second type of cost relates to the one induced under parasitism challenge. These costs induced by parasitism, termed *induced costs* hereafter, can be triggered by both external (e.g., stress due to parasitoid presence) and internal processes (e.g., parasitoid venom injected with egg, toxins produced by the APSE phage, intrinsic defense physiological costs). While the host plant status had little influence on the intensity of parasitoid protection, we showed that both constitutive and induced costs of symbiont-associated defenses varied in a plant-dependent manner.

Materials and methods

Aphid lineages

Twenty-one pea aphid lineages (i.e. a lineage is a clone of pea aphid with its own symbiotic complement) were used in the present study (Table 1). These pea aphid lineages were selected according to both biotype and symbiotic status. Three plant-adapted biotypes in which *H. defensa* is found in a large proportion of individuals (*Medicago sativa*, *Ononis spinosa* biotypes) or fixed (*Genista tinctoria* biotype) and three symbiotic statuses (i.e.

Table 1 Pea aphid lineages used in the present study

| Lineage code | Sampling location | Collection date | Pea aphid biotype | Secondary symbiont(s) | Used to ^a | | |
|--------------|-------------------|-----------------|---------------------|--|----------------------|----|----|
| | | | | | P | CC | IC |
| MsApo1 | Bugey (01) | August 2011 | <i>M. sativa</i> | None | X | X | |
| MsApo2 | Lusignan (86) | May 1985 | <i>M. sativa</i> | None | X | X | |
| MsApo3 | NY (USA) | October 2007 | <i>M. sativa</i> | None | X | X | |
| MsHd2 | Domagne (35) | September 2014 | <i>M. sativa</i> | <i>H. defensa</i> | X | X | |
| MsHd3 | Le Rheu (35) | June 2015 | <i>M. sativa</i> | <i>H. defensa</i> | X | X | X |
| MsHd4 | Le Rheu (35) | June 2015 | <i>M. sativa</i> | <i>H. defensa</i> | X | X | X |
| MsCo2 | Noyal (35) | July 2014 | <i>M. sativa</i> | <i>H. defensa</i> + <i>F. symbiotica</i> | X | X | X |
| MsCo3 | Le Rheu (35) | July 2014 | <i>M. sativa</i> | <i>H. defensa</i> + <i>F. symbiotica</i> | X | X | X |
| MsCo5 | Le Rheu (35) | June 2015 | <i>M. sativa</i> | <i>H. defensa</i> + <i>F. symbiotica</i> | X | | |
| OsApo1 | Bugey (01) | June 2014 | <i>O. spinosa</i> | none | X | X | |
| OsApo2 | Bugey (01) | June 2014 | <i>O. spinosa</i> | none | X | X | |
| OsApo3 | Bugey (01) | June 2014 | <i>O. spinosa</i> | none | X | X | |
| OsHd1 | Bugey (01) | June 2014 | <i>O. spinosa</i> | <i>H. defensa</i> | X | X | |
| OsHd3 | Bugey (01) | June 2014 | <i>O. spinosa</i> | <i>H. defensa</i> | X | X | |
| OsHd6 | Bugey (01) | June 2014 | <i>O. spinosa</i> | <i>H. defensa</i> | X | X | |
| GtHd1 | Bugey (01) | June 2014 | <i>G. tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> | X | X | X |
| GtHd2 | Bugey (01) | June 2014 | <i>G. tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> | X | X | X |
| GtHd3 | Bugey (01) | June 2014 | <i>G. tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> | X | X | X |
| GtCo2 | Bugey (01) | June 2014 | <i>G. tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> + <i>S. symbiotica</i> | X | X | X |
| GtCo3 | Bugey (01) | June 2014 | <i>G. tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> + <i>S. symbiotica</i> | X | X | X |
| GtCo4 | Bugey (01) | June 2014 | <i>G. tinctoria</i> | <i>H. defensa</i> + <i>S. symbiotica</i> | X | X | X |

^aP parasitism experiment, CC constitutive costs measurement, IC induced costs measurement

without any secondary symbiont, with *H. defensa* singly or with *H. defensa* in coinfection) were considered here (Table 1). In the present study, pea aphid biotype and symbiotic status were not crossed factors. In pea aphid populations, co-infection status differs between biotypes: *H. defensa* is commonly found in association with the secondary symbiont *F. symbiotica* in the *Medicago* biotype and with *Serratia symbiotica* in the *Genista* biotype; by contrast, co-infections involving *H. defensa* are rare in the *Ononis* biotype (Ferrari et al. 2012; Henry et al. 2013). In the *Genista* biotype, no lineage free of *H. defensa* could be tested as this symbiont is fixed in natural populations (Peccoud et al. 2015). Overall, seven biotype-symbiotic status combinations were considered in the present study and for each combination, three genetically distinct lineages were studied (i.e. 21 genetically distinct clonal lineages in total).

The selected lineages were established from single aphids sampled in natural populations of *A. pisum* during several sampling sessions in 2014 and 2015 (except six lineages sampled between 1985 and 2011). Genetic characterization was performed using polymorphic microsatellite markers and correct assignation of these lineages to their

corresponding biotype was checked by comparing their genotypes with a reference dataset (Peccoud et al. 2009). Since their sampling, the lineages have been maintained on the universal plant, *V. faba*, at 20 °C, 60% relative humidity and a 16:8 h L:D cycle. Three generations before the experiments, each aphid lineage was split into two sublines: the first subline was maintained on the universal plant, *V. faba*, while the second one was reared on its respective native host plant (i.e. *M. sativa*, *O. spinosa* and *G. tinctoria*). Three generations are necessary to remove “grand-maternal effect” known in aphids (parthenogenetic females contain not only their daughters as embryos but also their grand-daughters as ovocytes) (Kindlmann and Dixon 1989). From now, a *subline* refers to an aphid lineage feeding on a given plant (universal or native host plant). All sublines (i.e. 21 × 2) were maintained at 20 °C, 60% RH and LD 16:8 h.

Parasitoids

The mass rearing of the parasitoid *A. ervi*, the most prevalent parasitoid species of the pea aphid, started from about fifty males and fifty females produced by Koppert©. Parasitoids were reared during several generations on a culture of a pea aphid lineage belonging to the *M. sativa* biotype and free of any known secondary symbionts, fed on the universal host plant, *V. faba*. This implies that parasitoids had experience of universal host but not of native host plant before attack. This would have no or little impact on the outcomes of interactions because our experiments involved a no-choice scenario and attacks were observed in all the treatments. For the experiment, parasitoid females were standardized: 1–2 days-as adults, mated, maintained with honey and water. Before the assay, the experimental female was exposed to one third-instar aphid nymph originated from the tested subline in order to acquire oviposition experience. Parasitoids were maintained at 20 °C, 60% HR and LD 16:8 h.

Aphid parasitism resistance

For each subline, fifteen third-instar aphid nymphs were introduced in a 3.5-cm diameter glass Petri dish containing a piece of leaf of their host plant (i.e. native or universal host plant). Two hours later, a single *A. ervi* female was added into the dish and monitored continuously. Once an aphid was attacked by a wasp, it was removed from the arena immediately. Here, a parasitoid attack corresponds to an ovipositor insertion which, in this species, leads to a single egg injection into the host (McBrien and Mackauer 1990). The experiment ended when the parasitoid attacked all aphids or after 30 min. All the attacked aphids were then transferred onto their host plant and kept under laboratory conditions. Twelve days later, attacked aphids were inspected in order to measure the parasitism rate. This latter was estimated by dividing the number of aphid mummies (i.e., dead aphid containing a parasitoid immature) by the total number of attacked aphids transferred onto the host plant and recovered at that time (i.e., dead or missing individuals were excluded from analyses). For each aphid subline, five experimental replicates were performed (i.e., 50–60 aphid individuals attacked per subline). Overall, 2567 attacked aphids were recovered and used in statistical analyses.

Aphid fitness when exposed or not to parasitism challenge

This experiment consisted of testing whether the aphid host plant modulates the costs when exposed (i.e. induced costs) or not (i.e. constitutive costs) to parasitoids. For this purpose, we compared the components of aphid fitness between a control group that was not attacked by parasitoids and a treatment group that was attacked but survived from parasitism. To do so, we used the following experimental design. For each replicate of a given aphid subline, six third-instar aphid nymphs were considered and split into two batches in two distinct 3.5-cm diameter Petri dishes: a first batch (control group), made of three aphids randomly chosen among the six ones and a second batch (attacked group), containing the remaining aphids. Each Petri dish contained a piece of host plant on which the subline was reared in order to allow aphids' settlement. For the attacked group, a single female of *A. ervi* was introduced into the dish. Once attacked by the parasitoid, the three individuals were removed from the arena and placed individually on a new host plant covered with a cellophane bag. Aphids of the control group were placed in the dish without any parasitoid during 20 min and then transferred onto a new host plant individually. In this experiment, we considered only aphid lineages experiencing a high survivorship after *A. ervi* attacks (see Table 1). For each aphid subline, five replicates per parasitoid attack status were performed (about 15 aphids/subline/attack status).

Two aphid fitness components (i.e., total fecundity and longevity) were measured in this experiment. Eleven days after exposure/non-exposure to the parasitoid, we recorded the survival (checked daily) as well as the total number of offspring produced by the focal aphids. The fecundity was checked every 3 days and at each record, the offspring found were removed from the plant to avoid overcrowding. Overall, aphid lifespan and fecundity were measured on 453 control aphids and 270 aphids that survived parasitoid attacks.

Statistical analysis

As pea aphid biotypes present divergent evolutionary trajectories and different symbiotic complements (Peccoud et al. 2015), data analyses were performed on each biotype separately.

The first set of analyses concerned both aphid resistance against *A. ervi* parasitism and their life-history traits without parasitism challenge. The rate of parasitism, the aphid longevity and the fecundity were tested against the three following fixed factors: the aphid symbiotic status, the aphid lineage and the host plant used by aphids (i.e., universal vs. native). In these statistical models, the aphid lineage factor was nested within the symbiotic status factor and we included two second-order interactions: the interaction between symbiotic status and host plant and the interaction between aphid lineage and host plant. By including these interactions, we tested whether the effect of the host plant on the dependent variables may vary according to the aphid symbiotic status and/or the aphid lineage. To model both longevity and fecundity without parasitism challenge, linear mixed models (LMMs) were used. In the fecundity models, the aphid's longevity was included as continuous covariate because longevity of an individual may influence its total fecundity. As several aphid individuals were enclosed in the same Petri dish, the replicate number was considered as a random factor in models in order to include data substructure (see Eqs. 1 and 2).

$$\begin{aligned} \text{Longevity}_{ij} &\sim \text{Normal}(\mu_{ij}; \sigma_{ij}^2) \\ \text{Longevity}_{ij} &= \text{Symbiotic status}_{ij} \\ &+ \text{Aphid lineage}_{ij}(\text{Symbiotic status}_{ij}) + \text{Host plant}_{ij} + \text{Symbiotic status}_{ij} \\ &\times \text{Host plant}_{ij} + \text{Aphid lineage}_{ij}(\text{Symbiotic status}_{ij}) \times \text{Host plant}_{ij} + (\text{Replicate}_i) \end{aligned} \quad (1)$$

where Longevity_{ij} is the j th observation in the replicate i and Replicate is the random intercept.

$$\begin{aligned} \text{Fecundity}_{ij} &\sim \text{Normal}(\mu_{ij}; \sigma_{ij}^2) \\ \text{Fecundity}_{ij} &= \text{Symbiotic status}_{ij} \\ &+ \text{Aphid lineage}_{ij}(\text{Symbiotic status}_{ij}) + \text{Host plant}_{ij} + \text{Longevity}_{ij} \\ &+ \text{Symbiotic status}_{ij} \times \text{Host plant}_{ij} + \text{Aphid lineage}_{ij}(\text{Symbiotic status}_{ij}) \\ &\times \text{Host plant}_{ij} + (\text{Replicate}_i) \end{aligned} \quad (2)$$

where Fecundity_{ij} is the j th observation in the replicate i and Replicate is the random intercept.

To model the parasitism rates, generalized linear mixed models (GLMMs) were used by assuming a Binomial error and a logit link function. As several aphid individuals were enclosed in the same Petri dish and exposed to the same parasitoid individual, the replicate number was included as a random factor in models in order to consider data dependency (see Eq. 3).

$$\begin{aligned} \text{Parasitism}_{ij} &\sim \text{Binomial}(n_{ij}; \pi_{ij}) \\ \text{logit}(\text{Parasitism}_{ij}) &= \text{Symbiotic status}_{ij} \\ &+ \text{Aphid lineage}_{ij}(\text{Symbiotic status}_{ij}) + \text{Host plant}_{ij} + \text{Symbiotic status}_{ij} \\ &\times \text{Host plant}_{ij} + \text{Aphid lineage}_{ij}(\text{Symbiotic status}_{ij}) \times \text{Host plant}_{ij} + (\text{Replicate}_i) \end{aligned} \quad (3)$$

where Parasitism_{ij} is the j th observation in the replicate i , n_{ij} is the number of observations, π_{ij} is the probability of being parasitized and Replicate is the random intercept.

The second set of analyses concerned the study of the induced costs of parasitism in aphid lineages surviving from *A. ervi* parasitism and their possible modulation by the host plant. For this purpose, the life-history traits (i.e., longevity and fecundity) of a given aphid lineage were tested against the parasitism exposure (i.e. control vs attacked), the host plant used by aphids (i.e., universal vs native) and the interaction between these two fixed factors (see Eq. 4) by using general linear mixed models (i.e., LMMs). As several aphid individuals were enclosed in the same Petri dish, the replicate number was considered as a random factor in models in order to include data substructure (see Eq. 4).

$$\begin{aligned} \text{Life-history trait}_{ij} &\sim \text{Normal}(\mu_{ij}; \sigma_{ij}^2) \\ \text{Life-history trait}_{ij} &= \text{Parasitism exposure}_{ij} \times \text{Host plant}_{ij} + (\text{Replicate}_i) \end{aligned} \quad (4)$$

where $\text{Life-history trait}_{ij}$ is the longevity or fecundity of the j th observation in the replicate i and Replicate is the random intercept.

In these LMMS and GLMMs (Eqs. 1–4), the significance of the covariates was determined by using a likelihood ratio test (i.e., this test estimates the contribution of a single covariate by comparing the fit for models with and without the covariate). For each significant covariate, the associated estimated regression parameters were analysed to interpret the fitted models.

The estimated regression parameters of Eqs. 1–3 are detailed in supplementary Table 1. All statistics were performed by using the package *lme4* (Bates et al. 2015) in the software R (R Core Team 2018) to fit model in Eqs. (1–4). Model assumptions were verified by plotting residuals versus fitted values for all models and checking residuals normality for LMMs.

Results

Aphid parasitism resistance

The significance tests for the effects of covariates on parasitism rates (Eq. 3) are given in Table 2. For the *Medicago* biotype, aphid lineages harboring secondary symbionts presented a resistance against *A. ervi* parasitism (Fig. 1). All individuals co-infected with *H. defensa* and *F. symbiotica* resisted parasitism while the aphid lineages singly infected with *H. defensa* presented a significant variation in parasitism rate. Host plant had no influence on parasitism rate except in the MsHd3 lineage infected by *H. defensa* singly where the parasitism rate was lower when aphids fed upon the universal host plant (see Host plant \times Aphid genotype interaction in Table 2 and Supp. Table S1). For the *Ononis* biotype, about 80% of the attacked aphids were mummified. The parasitism rate was not influenced by the symbiotic status of *Ononis* aphids (Fig. 1) but varied between aphid lineages harboring *H. defensa*: the OsHd3 lineage presented a lower level of parasitism compared to the two other lineages infected with the bacterial symbiont (see Table 2 and Supp. Table S1). In this pea aphid biotype, host plant used by aphids had no effect on the parasitism rates. Finally, all lineages of the *Genista* biotype were 100% resistant against parasitism regardless of both their host plant and symbiotic complement (*H. defensa* singly or in coinfection with *S. symbiotica*, Fig. 1).

Aphid fitness when exposed or not to parasitism challenge

Figure 2 presents the longevity and fecundity without parasitism challenge of the 21 aphid lineages and Table 2 details the significance of the covariates tested for their effects on these fitness traits (Eq. 1–2). In the *Medicago* biotype, the symbiotic status of aphids influenced their fitness significantly: aphids infected with *H. defensa* singly or in coinfection with *F. symbiotica* presented a shorter lifespan and a reduced fecundity compared to individuals free of secondary symbionts (Fig. 2a). Within each symbiotic status, we detected no variation in fitness traits between the aphid lineages. Regardless of their symbiotic status, aphid individuals lived longer on native host plant but presented a reduced fecundity on that plant (Fig. 2a, see Host plant effect in Table 2 and Supp. Table S1). In the *Ononis* biotype, aphids infected with *H. defensa* presented a reduced fecundity but similar life span compared to individuals free of secondary symbionts (Fig. 2b). Within each symbiotic status, we found significant variation in longevity between aphid lineages. Host plant also influenced the aphid individuals' life-history traits. Regardless of their symbiotic status, aphid individuals lived longer on the universal than on the native host plant. In addition, aphids produced more offspring when feeding on the universal plant but this host plant effect was less pronounced in aphid lineages harboring *H. defensa* (Fig. 2b, see Host plant \times Symbiotic status interaction in Table 2 and Supp. Table S1). In the *Genista* biotype, symbiotic status of aphids had

Table 2 Significance of covariates included in linear mixed models (see Eqs. 1–3 in text) explaining the parasitism rate, the longevity and the fecundity in biotypes of *Acyrtosiphon pisum*

| Pea aphid biotype covariates | | Variables (distribution family) | | | | | |
|------------------------------|---|---------------------------------|---------|----------------------|---------|----------------------|---------|
| | | Parasitism rate Binomial) | | Longevity (Gaussian) | | Fecundity (Gaussian) | |
| | | χ^2 (d.f.) | P value | χ^2 (d.f.) | P value | χ^2 (d.f.) | P value |
| Medicago sativa | Symbiotic status (1) | 19.03 (1) | <0.001 | 36.346 (2) | <0.001 | 8.088 (2) | <0.05 |
| | Aphid genotype nested in Symbiotic status (2) | 33.73 (3) | <0.001 | 8.952 (5) | 0.111 | 7.929 (5) | 0.160 |
| | Host plant (3) | 1,431 (1) | 0.231 | 32.07 (1) | <0.001 | 9.125 (1) | <0.005 |
| | Aphid longevity(4) | – | – | – | – | 61.964 (1) | <0.001 |
| | Interaction (1) * (3) | 0.039 (1) | 0.842 | 0.921 (2) | 0.612 | 0.486 (2) | 0.784 |
| | Interaction (2) * (3) | 8.086 (3) | <0.05 | 4.865 (5) | 0.432 | 1.862 (5) | 0.867 |
| Ononis spinosa | Symbiotic status (1) | 1.911 (1) | 0.166 | 0.657(1) | 0.417 | 8.141 (1) | <0.005 |
| | Aphid genotype nested in Symbiotic status (2) | 17.966 (4) | <0.005 | 20.031(4) | <0.001 | 4.761 (4) | 0.312 |
| | Host plant (3) | 0.373 (1) | 0.542 | 8.257 (1) | <0.005 | 27.797 (1) | <0.001 |
| | Aphid longevity (4) | – | – | – | – | 36.788 (1) | <0.001 |
| | Interaction (1) * (3) 0.069 (1) | 0.069 (1) | 0.792 | 3.566 (1) | 0.059 | 4.472 (1) | <0.05 |
| | Interaction (2) * (3) 3.648 (4) | 3.648 (4) | 0.455 | 6.609 (4) | 0.158 | 2.411 (4) | 0.660 |
| Genista tinctoria | Symbiotic status (1) | No modelling as no parasitism | | 10.123 (1) | <0.005 | 0.531 (1) | 0.465 |
| | Aphid genotype nested in Symbiotic status (2) | | | 10.438 (4) | <0.05 | 2.989 (4) | 0.559 |
| | Host plant (3) | | | 12.605 (1) | <0.001 | 65.1 (1) | <0.001 |
| | Aphid longevity(4) | | | – | – | 41.132 (1) | <0.001 |
| | Interaction (1) * (3) | | | 0.018 (1) | 0.891 | 0.305 (1) | 0.580 |
| | 0.580Interaction (2) * (3) | | | 3.357 (4) | 0.499 | 3.499 (4) | 0.477 |

(–) means that the covariate was not included in the models. χ^2 values refer to likelihood ratio tests

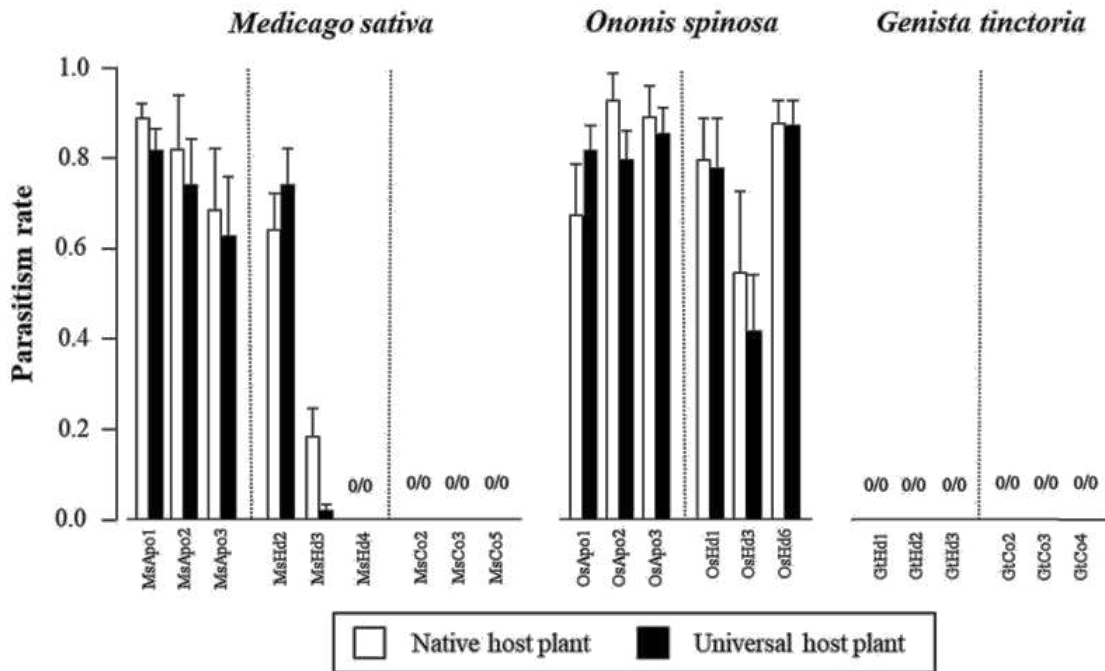


Fig. 1 Effect of the aphid symbiotic status, the aphid lineages and the host plant on the parasitism rate for three biotypes of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*: *Medicago sativa*, *Ononis spinosa* and *Genista tinctoria*. White bars correspond to aphids reared on their native host plant and black bars correspond to aphids reared on the universal host plant, *Vicia faba*. For each aphid subline (i.e., one bar), five parasitoid females were used, each female attacking between 10 and 15 aphid individuals. See Table 1 for the aphid lineage code. '0' means no parasitism found. Error bars show the standard error. Pea aphid biotypes were analyzed separately

an effect on the aphid longevity only: individuals infected with *H. defensa* in coinfection with *F. symbiotica* had lower life span (Fig. 2c). Within each symbiotic status, we found variation in longevity between aphid lineages. Aphid fecundity on the universal host was almost two folds higher than on the native plant in all *Genista* aphid lineages regardless of their symbiotic status but *Genista* aphids had a longer lifespan on their native host plant (Fig. 2c, see Host plant effect in Table 2 and Supp. Table S1).

Figures 3 and 4 show the fitness traits of aphids when exposed to a parasitism challenge. For all *Medicago* adapted lineages harboring *H. defensa* singly or in coinfection with *F. symbiotica*, no induced cost of parasitism exposure was found regardless of the host plant: both aphid lifespan and fecundity did not differ between control and attacked aphids (Fig. 3a, b). By contrast, induced costs of parasitism were found in the *Genista* biotype where parasitoid exposure induced a significant reduction in fecundity in all infected lineages and a lifespan diminution in two lineages infected by *H. defensa* alone (i.e., GtHd2 and GtHd3) (Fig. 4a, b). These induced costs of parasitism depended on the host plant: fecundity reduction due to parasitism challenge was higher when infected aphids fed on the universal host plant.

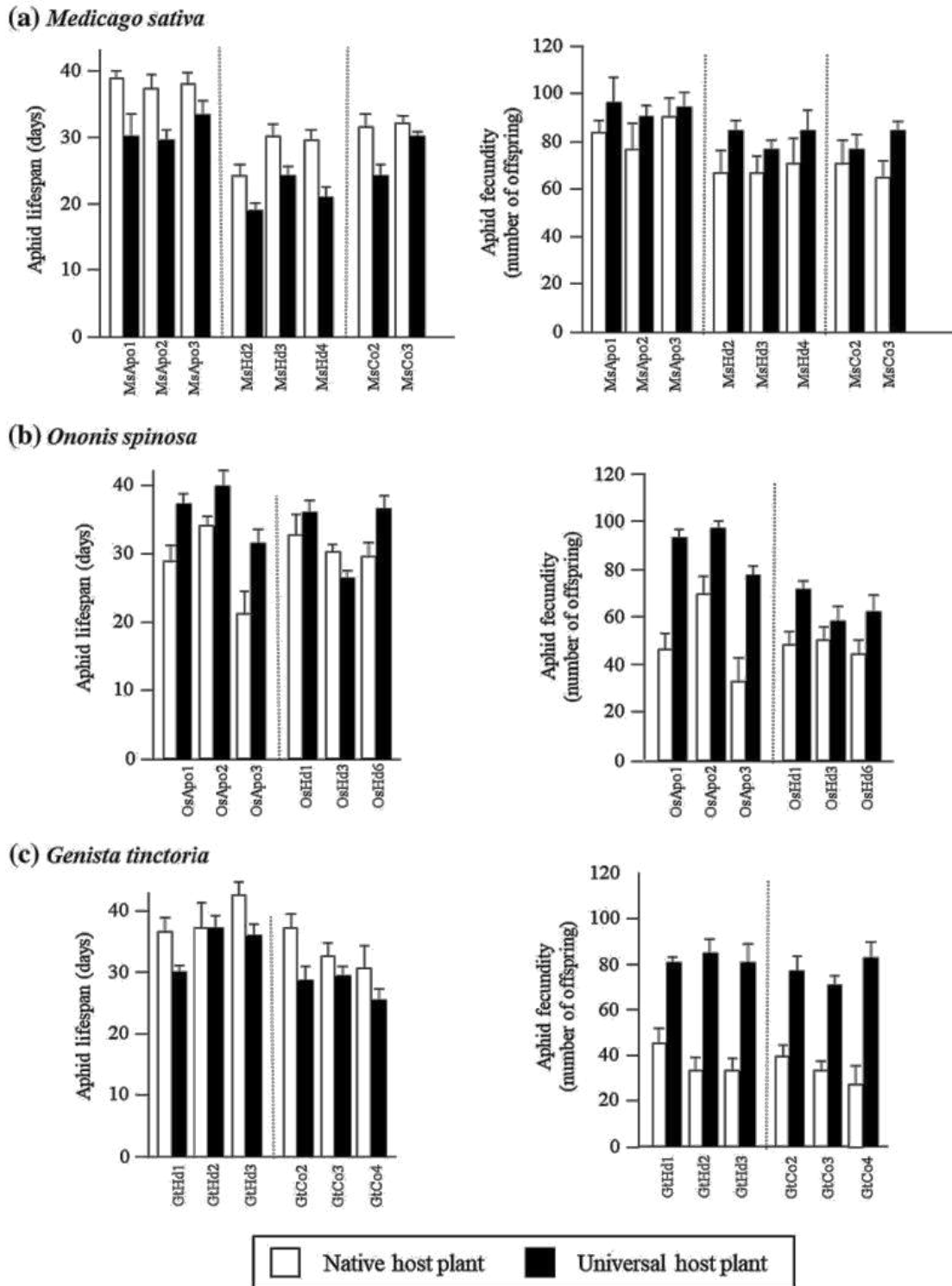


Fig. 2 Effect of the aphid symbiotic status, the aphid lineages and the host plant on the lifespan and fecundity for pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*, originated from three biotypes: *Medicago sativa*, *Ononis spinosa* and *Genista tinctoria*. White bars correspond to aphids reared on their native host plant and black bars correspond to aphids reared on the universal host plant, *Vicia faba*. See Table 1 for the aphid lineage code. Pea aphid biotypes were analyzed separately

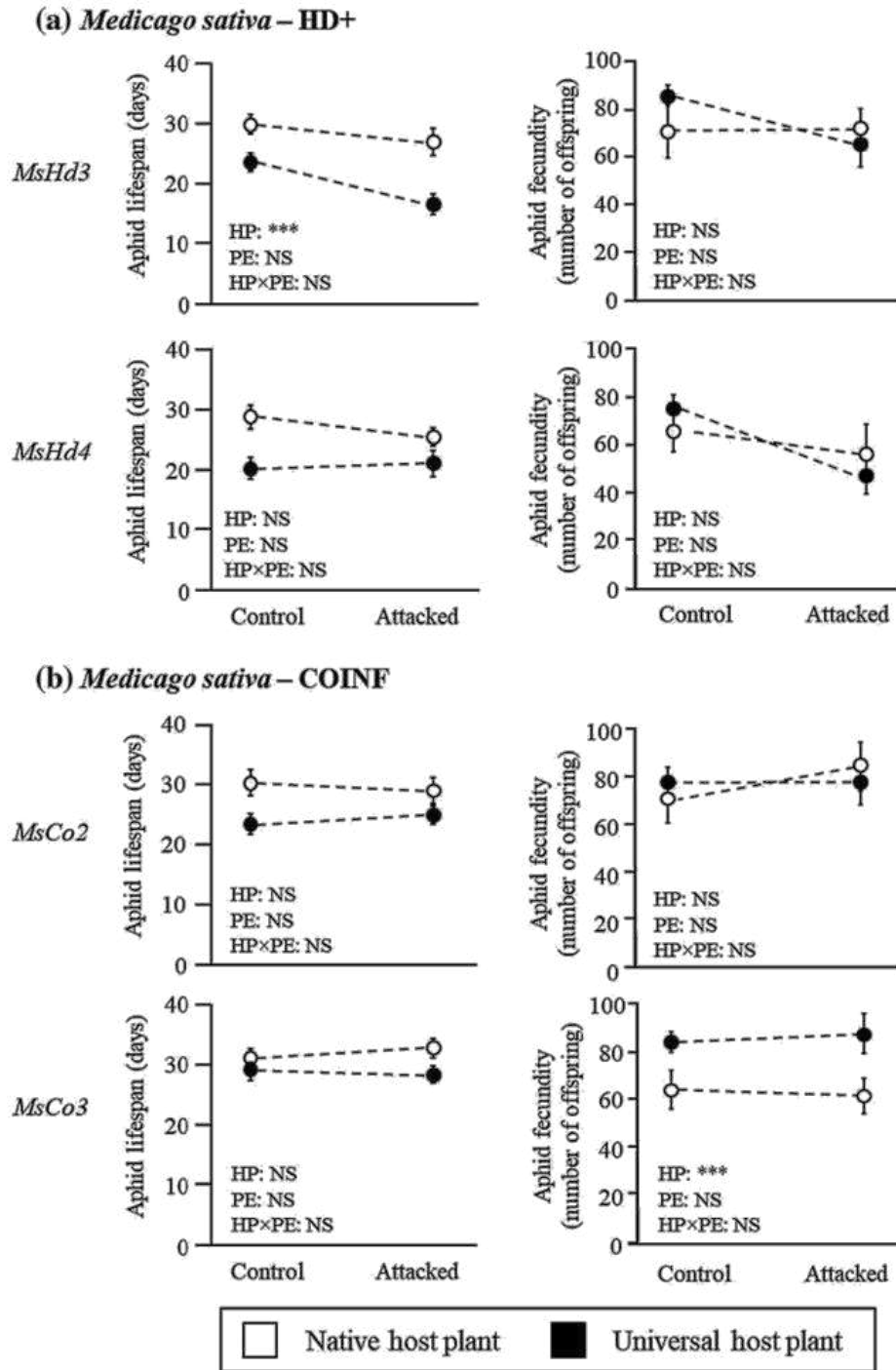


Fig. 3 Lifespan and fecundity of pea aphid, *Acyrthosiphon pisum*, from the *Medicago* biotype, attacked or not (i.e. control) by the parasitic wasp, *Aphidius ervi*. **a** *Medicago* pea aphid lineages infected with *Hamiltonella defensa* singly (i.e. HD+); **b** *Medicago* pea aphid lineages infected with *H. defensa* in coinfection *Fukatsua symbiotica*, another secondary symbiont (i.e. COINF). White dots correspond to aphids reared on their native host plant while black dots correspond to aphids reared on the universal host plant, *Vicia faba*. Error bars show the standard error. Stars or NS indicates significance or not of the effects of host plant (native vs universal—coded HP), parasitism exposure (control vs attacked—coded PE) and interaction between both factors (coded—HP×PE) from linear mixed models

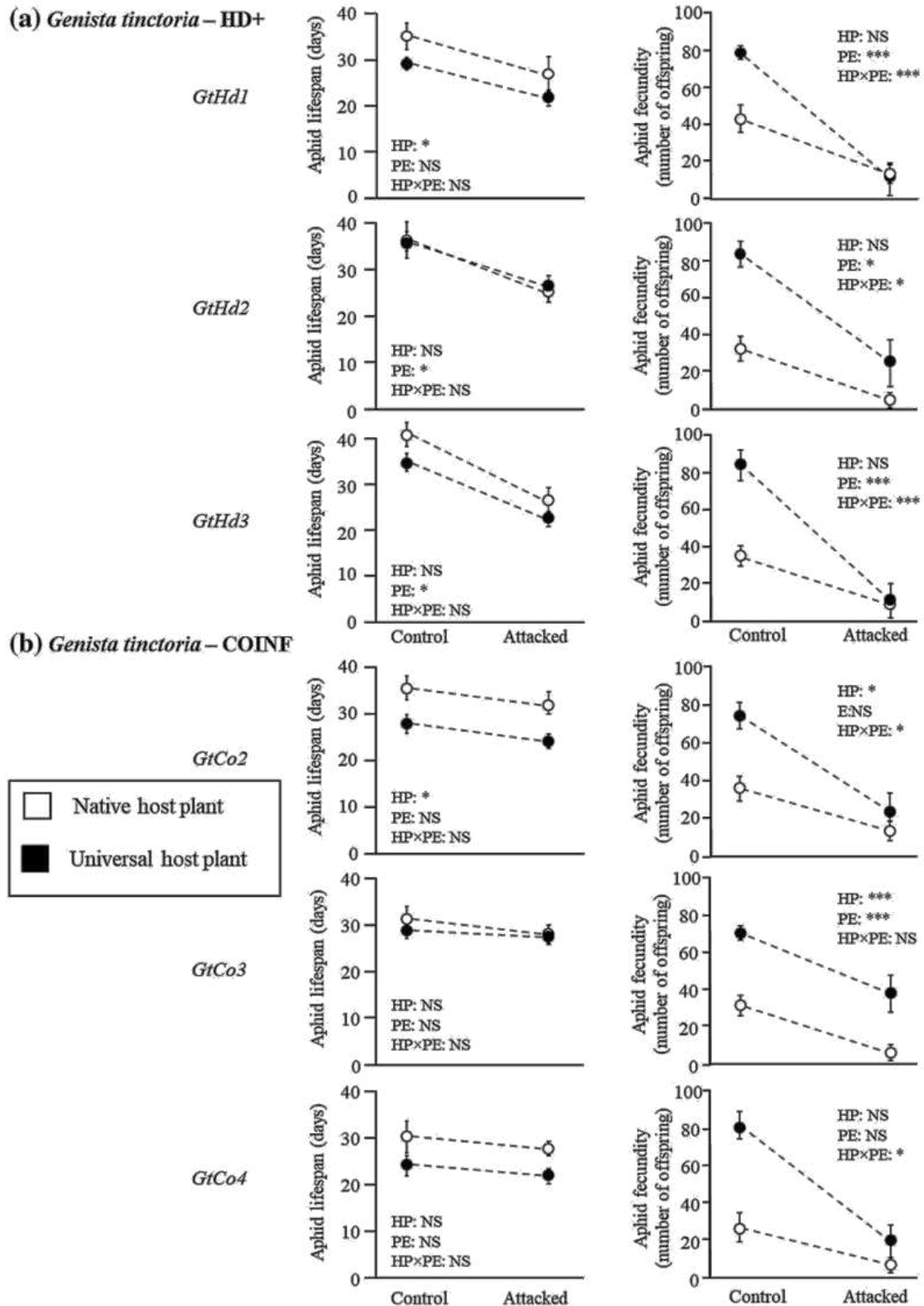


Fig. 4 Lifespan and fecundity of pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*, from the *Genista* biotype, attacked or not (i.e. control) by the parasitic wasp, *Aphidius ervi*. **a** *Genista* aphid lineages infected with *Hamiltonella defensa* singly (i.e. HD+); **b** *Genista* aphid lineages infected with *H. defensa* in coinfection with another secondary symbiont (i.e. COINF). White dots correspond to aphids reared on their native host plant while black dots correspond to aphids reared on the universal host plant, *Vicia faba*. Error bars show the standard error. Stars or NS indicates significance or not of the effects of host plant (native vs. universal—coded HP), parasitism exposure (control vs. attacked—coded PE) and interaction between both factors (coded—HP×PE) from linear mixed models

Discussion

The evolution of defensive traits is commonly considered in terms of trade-offs between the benefits gained from protection against enemies and the various costs associated with those defenses (Bowers 1992; Camara 1997). Here, we showed that the local biotic environment may influence the outcomes of parasitoid attack on aphids with and without secondary symbionts in different ways. While the level of protection associated with bacterial symbionts was affected by the plant used by aphids in only one situation, host plant species had a larger effect on both the constitutive costs of harboring defensive symbionts and the costs induced by parasitism challenge. These results confirm our main hypothesis of possible context-dependency of the fitness value of symbiont-based defenses and this conditional effect would influence the evolutionary dynamics of defensive symbionts in pea aphid populations using various host plant species.

A correlative study

Although secondary symbionts in pea aphid can be selectively eliminated with antibiotics and transfected from infected to uninfected aphids (Oliver et al. 2010), we considered here aphid lineages with their original symbiont composition rather than manipulated ones. Symbiont elimination/transfection helps to disentangle the respective roles of the symbiont and host genotype on aphid phenotypes. To achieve this goal in a rigorous way, it is necessary to compare cured or transfected lines with control lines that have been cured and re-infected with their own symbionts (to control for a potential effect of the antibiotic treatment). Here, the aim was not to disentangle effects arising from aphid and secondary symbiont genotypes but to test the impacts of host plant type on protective symbioses in a large number of pea aphid natural lineages differing in their symbiont complement. Using natural lines did not invalidate our findings, which should nevertheless be interpreted as correlations or associations rather than direct evidence for effects of secondary symbionts on host phenotypes.

Variation in resistance against parasitism

In our selection of aphid lineages free of secondary symbionts, only a few individuals survived from *A. ervi* parasitism. Although intrinsic resistance could exist in some pea aphid lineages (Martinez et al. 2014), this type of protection is very low in our dataset where parasitism resistance is largely explained by the association with secondary symbionts. However, the protective phenotype associated with the presence of secondary bacterial symbionts is highly variable, confirming earlier works (Oliver et al. 2003; Cayetano et al. 2014; Leclair et al. 2016a; Oliver and Higashi 2018). In the *Genista* biotype, no parasitoid mummy was formed regardless of the symbiotic complement (i.e. mono- or co-infected with *H. defensa*) and we recently provided direct evidence for the involvement of *H. defensa* in this complete parasitoid resistance (Leclair et al. 2016a). For the *Medicago* biotype, lineages harboring *H. defensa* singly presented a significant protection against parasitoids, with a large variation between aphid lineages (i.e. from complete to intermediate level of resistance), and a complete resistance when co-infected with *F. symbiotica*. However, these two symbionts are not always protective singly or in co-infection in pea aphids

from *M. sativa* (Heyworth and Ferrari 2015; Martinez et al. 2018; Doremus et al. 2018). On the other hand, we found one aphid lineage of the *Ononis* biotype infected with *H. defensa* singly that presented an intermediate level of resistance against *A. ervi* parasitism, a situation rarely reported before (McLean and Godfray 2015; Leclair et al. 2016a).

The observed variation in protection level could be linked to differences between *H. defensa* strains infecting the different aphid lineages (Oliver et al. 2003; Vorburger et al. 2009; Leclair et al. 2016a; Guyomar et al. 2018), and to a minor extent (as discussed above), to variation in intrinsic resistance brought by the aphid genome (Martinez et al. 2014). In particular, *H. defensa* is known to be associated with different APSE phage variants that produce distinct toxins and may account for variation in protection (Oliver et al. 2005; Degnan and Moran 2008; Oliver et al. 2009; Brandt et al. 2017).

In the three pea aphid biotypes tested here, feeding on the native or universal host plants had no effect on *A. ervi* parasitism rates except for one aphid lineage from the *Medicago* biotype infected with *H. defensa* singly (i.e., MsHd3, Fig. 1). In this aphid lineage, individuals feeding on the native host plant had a reduced parasitism resistance level compared to the universal plant. These results indicate that, in specific plant-aphid-symbiont interactions, the intensity of parasitism protection may be influenced by the host plant but this effect would be limited compared to other factors influencing parasitoid resistance. As plant nutrients and other compounds like secondary metabolites can affect the density of microbial populations within insects (Chandler et al. 2008; Zhang et al. 2016), a change in bacterial titre would affect the protection phenotype and this could explain the specific case of the MsHd3 aphid lineage. Up to now, there is however no evidence that intensity of *H. defensa*-mediated protection would be related to the secondary symbiont titre (Leclair et al. 2016b).

Symbiont infection and aphid fitness without parasitism challenge

In absence of parasitism challenge, carrying *H. defensa* singly induced reduction of aphid fitness in both *Medicago* and *Ononis* biotypes. Fitness costs associated with *H. defensa* infection have been reported in previous studies (Simon et al. 2011; Cayetano et al. 2014; Dykstra et al. 2014; Leclair et al. 2016a; Martinez et al. 2018). However, infection costs are not systematically found (Vorburger et al. 2013) and some studies even showed a boost of fecundity for the infected individuals (Oliver et al. 2006, 2008; Castaneda et al. 2010). In natural pea aphid populations, *H. defensa* is often associated with other secondary symbionts (Ferrari et al. 2012) and multiple infections could translate into additional reduction in host fitness (Leclair et al. 2016a). Here, while the *H. defensa*-*F. symbiotica* co-infection induced no fitness reduction in the *Medicago* biotype, individuals of the *Genista* biotype co-infected with these symbionts lived shorter compared to those infected with *H. defensa* singly. Variation between pea aphid biotypes and discrepancies between studies suggest bacterial strain-specific costs, dependent on aphid genotype or influence of considering artificial or natural aphid-symbiont associations.

Aphid fitness and parasitism challenge

Although essential for studying the evolution of symbiont-mediated resistance, the costs induced by parasitism after deploying the resistance have not been investigated much. In agreement with our results, Martinez et al. (2018) found reduced aphid fecundity and survivorship when enemy challenged while Vorburger et al. (2013) showed that resisting

parasitoids stimulates fecundity and longevity. In the latter study, the induced costs have been measured in a single lineage of the black bean aphid *Aphis fabae* harboring *H. defensa*. Here, the induced costs of parasitism have been measured on ten *A. pisum* lineages. We showed that induced costs of parasitism challenge could also vary according to the aphid biotype. No induced costs of parasitism were observed in the *Medicago* biotype, while in the *Genista* biotype, parasitism induced both a drastic fecundity reduction and a significant decrease in survivorship regardless of the symbiotic status. Induced costs in the *Genista* biotype might be due to the production of the APSE phage toxins involved in the protective phenotype (Oliver et al. 2009; Brandt et al. 2017) but which may somehow injure the aphid host. However, whether these phage-encoded factors are constitutively expressed or released only upon parasitoid attack is unknown. Alternatively, the stress induced by parasitoid exposure may translate into a reduction in aphid fecundity (Fievet et al. 2008). Also, as parasitoid females inject with their eggs a cocktail of venoms to manipulate the physiology, development and immunity of the hosts (Moreau and Asgari 2015), these venoms might also induce host fitness reduction (Digilio et al. 2000). Both venoms injection and/or parasitoid exposure stress would explain fitness reduction after attack. In addition, as some attacked aphids presented no fitness decline, resilience to venoms injection and/or parasitoid exposure stress might be suspected. Further studies are needed to determine why parasitism challenge induces or not huge fitness costs in some aphid lineages.

Host plant, symbiotic status and insect fitness

Interestingly, whatever their symbiotic status, the three pea aphid biotypes studied generally had a much higher fecundity on the universal host plant than on their native one. At first sight, these results may appear illogical. However, in the wild, *Vicia faba* is not available all year round and has a patchy distribution depending on the importance of this crop in agricultural systems. Then, pea aphid biotypes could reproduce better on *V. faba* while being specialized on a less favorable host plant but which could offer more stable resources and also represent a better habitat (e.g. enemy-free space, Vosteen et al. 2016).

Secondary symbionts can impact differently the aphid fitness according to the host plant species (Ferrari et al. 2007; McLean et al. 2011; Wagner et al. 2015; but see Hrček et al. 2018). McLean et al. (2011) showed that *H. defensa* increases the fecundity of aphids on their native host plant but not on the universal one. Here, we showed that in both the *Medicago* and the *Genista* biotypes, the effect of host plant on aphid fitness traits was not related to the symbiotic status. On contrary, aphids of the *Ononis* biotype and infected by *H. defensa* had a reduced fecundity on the universal host plant compared to uninfected aphids. In addition, in the *Medicago* biotype, no induced cost of parasitism was found whatever the host plant used while aphids of the *Genista* biotype suffered higher fecundity reduction under parasitism exposure on the universal host plant than on the native one. This variation in protective phenotype due to host plant would be related to the nutritional composition and/or chemical defenses of the plant and by extent, the physiology of the aphids. Further studies are needed to determine the underlying mechanisms of the host plant effect on symbiont-mediated resistance costs.

Conclusion

Here we showed that symbiont-associated phenotypes could be influenced to some extent by the local environment, highlighting the importance of considering context-dependency when assessing the ecological and evolutionary impacts of symbiotic associations. We also pointed out the need to examine various types of fitness costs as these costs may strongly vary depending on populations of hosts and symbionts, with implications for the dynamics of symbioses. We considered the role of the plant in the interactions between *A. pisum* populations, their secondary symbionts and one natural enemy. However, other biotic (e.g., pathogens, predators, other parasitoid species) and abiotic (e.g., temperature, Doremus et al. 2018) factors may also modulate the expression of symbiont-based phenotypes and deserve further studies.

Acknowledgements We are very grateful to all people who helped in sampling aphid lineages in natural populations and to Jean-François Le Gallic for plant production. The associate editor and three anonymous reviewers are also acknowledged for their perceptive and helpful comments on an earlier draft. This work was supported by French ‘Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche’ and by a grant from INRA ‘Santé des Plantes et Environnement’ department. The authors declare no conflict of interest.

Author’s contribution All authors conceived and designed the experiments. CS and ML conducted the experiments. YO analyzed the data. YO led the writing of the manuscript. YO and J-CS contributed to the supervision of this study. All authors contributed critically to the drafts and gave final approval for publication.

Data availability The datasets on parasitism resistance, fecundity and lifespan assays will be submitted to DRYAD online repository once the paper accepted for publication.

References

- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48
- Bowers MD (1992) The evolution of unpalatability and the cost of chemical defense in insects. *Insect chemical ecology*. In: Roitberg BD, Isman MB (eds) *An evolutionary approach*. Chapman and Hall, New York, pp 216–244
- Brandt JW, Chevignon G, Oliver KM, Strand MR (2017) Culture of an aphid heritable symbiont demonstrates its direct role in defence against parasitoids. *Proc R Soc B Biol Sci* 284:20171925
- Camara MD (1997) Physiological mechanisms underlying the costs of chemical defence in *Junonia coenia* Hubner (Nymphalidae): a gravimetric and quantitative genetic analysis. *Evol Ecol* 11:451–469
- Castaneda LE, Sandrock C, Vorburger C (2010) Variation and covariation of life history traits in aphids are related to infection with the facultative bacterial endosymbiont *Hamiltonella defensa*. *Biol J Linn Soc* 100:237–247
- Cayetano L, Rothacher L, Simon J-C, Vorburger C (2014) Cheaper is not always worse: strongly protective isolates of a defensive symbiont are less costly to the aphid host. *Proc R Soc B Biol Sci* 282:20142333
- Chandler S, Wilkinson T, Douglas A (2008) Impact of plant nutrients on the relationship between a herbivorous insect and its symbiotic bacteria. *Proc R Soc B Biol Sci* 275:565–570
- Degnan PH, Moran NA (2008) Diverse Phage-encoded toxins in a protective insect endosymbiont. *Appl Environ Microbiol* 74:6782–6791
- Digilio MC, Isidoro N, Tremblay E, Pennacchio F (2000) Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. *J Insect Physiol* 46:1041–1050
- Dion E, Polin SE, Simon J-C, Outreman Y (2011) Symbiont infection affects aphid defensive behaviours. *Biol Lett* 7:743–746
- Doremus MR, Smith AH, Kim KL et al (2018) Breakdown of a defensive symbiosis, but not endogenous defences, at elevated temperatures. *Mol Ecol* 27:2138–2151

- Dykstra HR, Weldon SR, Martinez AJ et al (2014) Factors limiting the spread of the protective symbiont *Hamiltonella defensa* in *Aphis craccivora* aphids. *App Environ Microbiol* 80:5818–5827
- Fellowes MDE, Godfray HCJ (2000) The evolutionary ecology of resistance to parasitoids by *Drosophila*. *Heredity* 84:1–8
- Ferrari J, Darby AC, Daniell TJ et al (2004) Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. *Ecol Entomol* 29:60–65
- Ferrari J, Scarborough CL, Godfray HCJ (2007) Genetic variation in the effect of a facultative symbiont on host-plant use by pea aphids. *Oecologia* 153:323–329
- Ferrari J, West JA, Via S, Godfray HCJ (2012) Population genetic structure and secondary symbionts in host-associated populations of the pea aphid complex: population genetics and symbionts in the pea aphid. *Evolution* 66:375–390
- Fievet V, Lhomme P, Outreman Y (2008) Predation risk cues associated with killed conspecifics affect the behavior and reproduction of prey animals. *Oikos* 117:1380–1385
- Flórez LV, Biedermann PHW, Engl T, Kaltenpoth M (2015) Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Nat Prod Rep* 32:904–936
- Frantz A, Calcagno V, Mieuze L et al (2009) Complex trait differentiation between host-populations of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris): implications for the evolution of ecological specialisation. *Biol J Linn Soc* 97:718–727
- Gauthier J-P, Outreman Y, Mieuze L, Simon J-C (2015) Bacterial communities associated with host-adapted populations of pea aphids revealed by deep sequencing of 16S ribosomal DNA. *PLoS ONE* 10:e0120664
- Guay J-F, Boudreault S, Michaud D, Cloutier C (2009) Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: role of *Hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. *J Insect Physiol* 55:919–926
- Guyomar C, Legeai F, Jousset E, Mougé C, Lemaître C, Simon J-C (2018) Multi-scale characterization of symbiont diversity in the pea aphid complex through metagenomic approaches. *Microbiome* 6:181
- Hakes AS, Cronin JT (2011) Environmental heterogeneity and spatiotemporal variability in plant defense traits. *Oikos* 120:452–462
- Henry LM, Peccoud J, Simon J-C et al (2013) Horizontally transmitted symbionts and host colonization of ecological niches. *Curr Biol* 23:1713–1717
- Heyworth ER, Ferrari J (2015) A facultative endosymbiont in aphids can provide diverse ecological benefits. *J Evol Biol* 28:1753–1760
- Hrček J, Parker BJ, McLean AH, Simon J-C, Mann CM, Godfray HC (2018) Hosts do not simply outsource pathogen resistance to protective symbionts. *Evolution* 72:1488–1499
- Kindlmann P, Dixon AFG (1989) Developmental constraints in the evolution of reproductive strategies: telescoping of generations in parthenogenetic aphids. *Funct Ecol* 3:531
- Leclair M, Pons I, Mahéo F et al (2016a) Diversity in symbiont consortia in the pea aphid complex is associated with large phenotypic variation in the insect host. *Evol Ecol* 30:925–941
- Leclair M, Polin S, Jousseau T et al (2016b) Consequences of coinfection with protective symbionts on the host phenotype and symbiont titres in the pea aphid system. *Insect Sci* 24:798–808
- Martinez AJ, Ritter SG, Doremus MR et al (2014) Aphid-encoded variability in susceptibility to a parasitoid. *BMC Evol Biol* 14:1
- Martinez AJ, Doremus MR, Kraft LJ et al (2018) Multi-modal defenses in aphids offer redundant protection and increased costs likely impeding a protective mutualism. *J Anim Ecol* 87:464–477
- McBrien H, Mackauer M (1990) Heterospecific larval competition and host discrimination in two species of aphid parasitoids: *Aphidius ervi* and *Aphidius smithi*. *Entomol Exp Appl* 56:145–153
- McLean AHC, Godfray HCJ (2015) Evidence for specificity in symbiont-conferred protection against parasitoids. *Proc R Soc B Biol Sci* 282:20150977
- McLean AHC, van Asch M, Ferrari J, Godfray HCJ (2011) Effects of bacterial secondary symbionts on host plant use in pea aphids. *Proc R Soc B Biol Sci* 278:760–766
- Moran NA, Degnan PH, Santos SR et al (2005) The players in a mutualistic symbiosis: insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:16919–16926
- Moreau SJM, Asgari S (2015) Venom proteins from parasitoid wasps and their biological functions. *Toxins* 7:2385–2412
- Oliver KM, Higashi CHV (2018) Variations on a protective theme: *Hamiltonella defensa* infections in aphids variably impact parasitoid success. *Curr Opin Insect Sci* 32:1–7
- Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci* 100:1803–1807

- Oliver KM, Moran NA, Hunter MS (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12795–12800
- Oliver KM, Moran NA, Hunter MS (2006) Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proc R Soc B Biol Sci* 273:1273–1280
- Oliver KM, Campos J, Moran NA, Hunter MS (2008) Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proc R Soc B Biol Sci* 275:293–299
- Oliver KM, Degan PH, Hunter MS, Moran NA (2009) Bacteriophages encode factors required for protection in a symbiotic mutualism. *Science* 325:992–994
- Oliver KM, Degan PH, Burke GR, Moran NA (2010) Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu Rev Entomol* 55:247–266
- Oliver KM, Smith AH, Russell JA (2014) Defensive symbiosis in the real world—advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond. *Funct Ecol* 28:341–355
- Peccoud J, Ollivier A, Plantegenest M, Simon J-C (2009) A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proc Natl Acad Sci* 106:7495–7500
- Peccoud J, Mahéo F, de la Huerta M et al (2015) Genetic characterisation of new host-specialised biotypes and novel associations with bacterial symbionts in the pea aphid complex. *Insect Conserv Diver* 8:484–492
- Petterson DS, Sandström B, Cederblad Å (1994) Absorption of zinc from lupin (*Lupinus angustifolius*) based foods. *Br J Nut* 72:865
- Polin S, Simon J-C, Outreman Y (2014) An ecological cost associated with protective symbionts of aphids. *Ecol Evol* 4:836–840
- Polin S, Le Gallie J-F, Simon J-C et al (2015) Conditional reduction of predation risk associated with a facultative symbiont in an insect. *PLoS ONE* 10:e0143728
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Schmid-Hempel P (2003) Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proc Biol Sci* 270:357–366
- Simon J-C, Carre S, Boutin M et al (2003) Host-based divergence in populations of the pea aphid: insights from nuclear markers and the prevalence of facultative symbionts. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 270:1703–1712
- Simon J-C, Boutin S, Tsuchida T et al (2011) Facultative symbiont infections affect aphid reproduction. *PLoS ONE* 6:e21831
- Smith AH, Łukasik P, O'Connor MP et al (2015) Patterns, causes and consequences of defensive microbiome dynamics across multiple scales. *Mol Ecol* 24:1135–1149
- Tinsley MC, Blanford S, Jiggins FM (2006) Genetic variation in *Drosophila melanogaster* pathogen susceptibility. *Parasitol* 132:767–773
- Vorburger C, Perlman SJ (2018) The role of defensive symbionts in host–parasite coevolution. *Biol Rev* 93:1747–1764
- Vorburger C, Sandrock C, Gousskov A et al (2009) Genotypic variation and the role of defensive endosymbionts in an all-parthenogenetic host–parasitoid interaction. *Evolution* 63:1439–1450
- Vorburger C, Ganesanandamoorthy P, Kwiatkowski M (2013) Comparing constitutive and induced costs of symbiont-conferred resistance to parasitoids in aphids. *Ecol Evol* 3:706–713
- Vosteen I, Gershenzon J, Kunert G (2016) Enemy-free space promotes maintenance of host races in an aphid species. *Oecologia* 181:659–672
- Wagner K, Mendieta-Leiva G, Zotz G (2015) Host specificity in vascular epiphytes: a review of methodology, empirical evidence and potential mechanisms. *AoB Plants* 7:plu092
- Zhang YC, Cao WJ, Zhong LR et al (2016) Host plant determines the population size of an obligate symbiont (*Buchnera aphidicola*) in aphids. *Appl Environ Microbiol* 82:2336–2346

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

DISCUSSION GENERALE

Au cours de la thèse, nous nous sommes intéressés aux relations entre les insectes et leur environnement biotique en cherchant plus particulièrement à appréhender l'influence des microorganismes symbiotiques sur les comportements de leur hôte qui se manifestent lors de ces interactions.

Pour y parvenir, nous avons considéré le puceron du pois et son cortège de symbiotes secondaires héritable. Plus spécifiquement, nous avons étudié l'effet de plusieurs bactéries symbiotiques de cet aphide sur une diversité de phénotypes impliqués dans les interactions plante-insecte et insecte-ennemi naturel. Pour étudier la relation plante-insecte, nous avons proposé des expériences focalisées sur les comportements d'exploration et de sélection d'une plante, mis en relation avec le statut symbiotique des individus. Pour étudier la relation insecte-ennemi naturel, des approches expérimentales ont permis d'évaluer l'incidence du statut symbiotique sur les différentes étapes d'une interaction entre un puceron et son parasitoïde (de l'attaque à l'émergence de l'ennemi). Enfin, nous avons réuni ces deux interactions en étudiant l'effet de la plante hôte d'un puceron sur le potentiel de protection associé aux symbioses protectrices et ses coûts associés lors de l'interaction entre l'hôte et son parasitoïde.

Nos premières expériences mettent en évidence divers effets des symbiotes microbiens sur des phénotypes en lien avec l'exploitation d'une plante, comme une modification de la capacité des pucerons à explorer à longue distance (*i.e.*, production des descendants ailés) ou à courte distance. En revanche, nous n'avons trouvé que des effets très marginaux des microorganismes sur la sélection de la plante par les pucerons (cf **Chapitre 2**). Concernant l'impact des symbiotes sur les interactions avec les ennemis naturels, nous avons montré une diminution des défenses comportementales associées à l'infection par *H. defensa*, symbiote conférant une protection symbiotique très variable (*i.e.*, de l'absence de résistance à la résistance complète). Cependant, nous n'avons pas identifié d'effet de ce partenaire microbien sur les traits d'histoire de vie des parasitoïdes (cf **Chapitre 3**). En considérant à la fois la plante et les ennemis naturels, nous avons pu montrer que l'espèce de plante hôte utilisée par un puceron affecte marginalement les phénotypes de protection conférés par les symbiotes, tandis que les coûts associés à la symbiose ou à la protection symbiotique varient selon la plante hôte du puceron (cf **Chapitre 4**).

Ce travail de thèse a mis en lumière l'influence des symbiotes sur certains comportements et d'autres phénotypes des pucerons intervenant dans leurs relations avec l'environnement biotique. Il nous a également permis de poser des hypothèses quant à l'implication de ces modifications phénotypiques sur la dynamique des symbiotes protecteurs dans les populations hôtes.

I. VARIABILITE PHENOTYPIQUE ASSOCIEE AUX SYMBIOTES

A. Symbiose et comportements : variations, mécanismes et conséquences

Comme indiqué précédemment, nos expériences ont mis en avant la diversité d'effet des symbiotes sur plusieurs comportements de leur hôte puceron. Nous avons montré que l'influence des symbiotes varie d'un trait comportemental à un autre et identifié plusieurs sources à l'origine de cette variation.

1. Sources de variation

Les résultats obtenus dans nos différentes expériences montrent que l'incidence des microorganismes fluctue selon l'espèce et la souche de symbiote. L'hôte représente une seconde source de variation car une même souche de symbiote produit des effets différents selon le génotype de l'insecte. Plus généralement, nous avons constaté une certaine spécificité des effets phénotypiques des symbiotes : les variations comportementales exprimées dépendent le plus souvent de l'association hôte-symbiote considérée. La spécificité des effets symbiotiques sur les phénotypes de l'hôte est très fréquente et s'expliquerait par des interactions complexes entre l'hôte et son symbiote, bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas bien compris.

Concernant l'influence du génotype de l'hôte sur les effets symbiotiques, nos travaux suggèrent également l'importance de considérer la spécialisation écologique comme source de variation. Dans nos différentes études, on constate des effets symbiotiques variables selon les biotypes aphidiens. Par exemple, les comportements de défense des pucerons du biotype *Medicago* sont davantage affectés par la présence d'*H. defensa* comparativement aux pucerons du biotype *Genista*, et ce quelle que soit la souche du

symbiote. De manière similaire, un effet du statut symbiotique sur les comportements d'exploration des pucerons n'a été observé que chez le biotype *Medicago*. Ces résultats suggèrent des effets symbiotiques plus prononcés sur les comportements des génotypes du biotype *Medicago*. Cependant, nos études ne se basent que sur quelques génotypes de chaque biotype. Aussi, nous n'avons considéré dans cette thèse que deux bactéries (*H. defensa* et *R. insecticola*) du cortège de symbiotes facultatifs associé au puceron du pois qui en comprend 7 (si on ne tient pas compte de *Wolbachia* dont la présence est encore incertaine) et nous n'avons pas analysé les situations de coinfection qui sont pourtant assez communes dans les populations naturelles d'*A. pisum* (Henry *et al.* 2013). Pour généraliser nos résultats à l'ensemble des associations symbiotiques du puceron du pois, il serait nécessaire de réaliser de nouvelles expériences en travaillant sur un plus grand nombre de biotypes et de symbiotes, en associations simples ou multiples. Il serait également intéressant d'intégrer d'autres comportements, comme par exemple les comportements reproducteurs. En effet, les travaux de cette thèse révèlent des effets symbiotiques variables selon le comportement étudié. Si les comportements de défense d'un individu varient selon son statut symbiotique, ce dernier ne semble pas avoir d'effet notable sur les comportements liés à la sélection de la plante hôte. Cette variation d'effets suggère des effets non globaux des associations symbiotiques sur les comportements (*i.e.*, absence de syndrome comportemental lié à la symbiose) et donc a priori des mécanismes sous-jacents spécifiques.

2. Mécanismes impliqués

Dans ce manuscrit, nous proposons plusieurs hypothèses sur les mécanismes associés aux effets des symbiotes sur les comportements. La diminution systématique des comportements de défenses des individus infectés par *H. defensa* suggère un effet collatéral de l'infection bactérienne. Différents travaux montrent que l'infection par *H. defensa* peut être associée à des coûts physiologiques plus ou moins importants, engendrant des réductions de survie et de fécondité (*e.g.*, Simon *et al.* 2011). Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette infection symbiotique altère la réponse comportementale de l'hôte suite à la perception de l'ennemi. Il s'agirait alors d'un effet pathologique de l'infection symbiotique. Toutefois, des travaux annexes menés au cours de la thèse sur un densovirus hébergé par le puceron *M. persicae* montrent que si l'infection virale est associée à une réduction de masse corporelle et de fécondité des

pucerons, elle n'a aucun effet sur les comportements de défenses des pucerons porteurs (cf **Annexe** : Dupont *et al.* 2020). Il faut ajouter à cela que notre étude sur les comportements d'exploration et de sélection de la plante hôte par *A. pisum* montre que l'infection par *H. defensa* n'a que peu ou pas d'effets sur ces comportements. L'ensemble de ces travaux suggère donc un effet pathologique spécifique et donc un mécanisme plus complexe qui ne se résume pas simplement à un coût induit par la symbiose.

D'autres hypothèses ont été proposées dans notre étude sur les comportements d'approvisionnement, pouvant s'appliquer aux différents comportements observés au cours de la thèse. Une étude a montré l'implication des symbiotes dans les capacités olfactives des insectes, ce qui peut modifier l'attractivité des sources de nourriture (Peng & Wang 2009). Dans nos expériences, l'exploration en réponse à une odeur de plante ou les défenses comportementales face à un ennemi naturel pourraient s'expliquer par une modulation de la perception des stimuli environnementaux par les partenaires symbiotiques. D'autres études proposent que l'incidence des symbiotes sur les comportements ait pour base des mécanismes neuronaux (Schretter *et al.* 2018). En effet, la régulation de tous les comportements des insectes passe par les neuropeptides, y compris la nutrition ou l'activité locomotrice (Schoofs *et al.* 2017). Comme les microorganismes symbiotiques peuvent affecter la physiologie et le métabolisme de leur hôte (Rohrscheib & Brownlie 2013), on peut émettre l'hypothèse que les symbiotes altèrent une grande diversité de comportements en affectant directement ou indirectement le fonctionnement des neuropeptides chez leur hôte. Or, comme vu précédemment, nos résultats montrent l'absence de syndrome comportemental : l'infection par un symbiote n'altère pas l'ensemble des comportements de son porteur. L'hypothèse d'un mécanisme unique et global n'est donc pas privilégiée. Si les pistes mécanistiques sont multiples et méritent d'être étudiées avec attention, nous n'avons pas eu l'occasion de les développer au cours de cette thèse. Une perspective de ce travail pourrait donc être de privilégier un phénotype comportemental pour lequel l'influence des symbiotes est bien avérée et d'étudier les variations par des approches moléculaires et physiologiques, notamment au niveau du système nerveux central et périphérique.

3. Conséquences pour les hôtes

Comme nous l'avons présenté en introduction, des travaux récents chez les insectes

posent la question des conséquences écologiques et évolutives de la modification des comportements de l'hôte par les symbiotes (Frago *et al.* 2012; Vavre & Kremer 2014; Lewis & Lizé 2015; Shropshire & Bordenstein 2016, cf **Contexte général §III.B**). Bien que nos travaux concernent plusieurs comportements chez les insectes, cette thèse ne contribue que partiellement à apporter de nouveaux éléments. Notre étude des effets symbiotiques sur les comportements de défense confirme les études passées (Dion *et al.* 2011a; Polin *et al.* 2014) : l'altération des défenses comportementales par le symbiote *H. defensa* expose les pucerons porteurs à un plus grand risque de prédation et de parasitisme. Cette conséquence écologique démontre l'implication des symbiotes dans les relations entre un insecte et ses ennemis naturels. En revanche, concernant la relation avec la plante hôte, nous n'avons montré aucun effet des symbiotes sur le comportement de sélection de la plante hôte. Chez les insectes phytophages spécialisés, la relation entre l'insecte et sa plante hôte est si intime que toute association symbiotique affectant ce lien serait vraisemblablement éliminée par la sélection naturelle. Cependant, cette absence d'effet a été observée à la fois sur des lignées naturelles (*i.e.*, lignées exposées à la sélection naturelle) et des lignées artificielles (*i.e.*, non exposées à la sélection naturelle). L'absence d'effets symbiotiques sur les comportements de sélection de la plante hôte chez les lignées artificielles est un résultat intéressant. Des travaux complémentaires sont nécessaires afin de comprendre cette absence d'effets quelle que soit l'association symbiotique et son histoire.

B. Symbiose et autres phénotypes étudiés

Nos différents travaux montrent que d'autres phénotypes aphidiens sont modulés par les symbiotes, ces effets phénotypiques étant également très variables selon les symbiotes, les porteurs et/ou les associations hôte-symbiote. Ainsi, la protection contre les parasitoïdes conférée par *H. defensa* varie selon la souche du symbiote (*i.e.*, plus particulièrement du bactériophage APSE) et non du puceron porteur (Oliver *et al.* 2005; Leclair *et al.* 2016). D'un point de vue phénotypique, on observe un continuum entre deux situations extrêmes allant d'une absence de résistance symbiotique à une résistance complète. Cette variation des phénotypes symbiotiques pose la question du maintien des associations hôte-symbiote non protégée dans les populations naturelles. Notre étude ne permet pas de répondre à cette question car nous n'avons considéré qu'un seul ennemi naturel, *A. ervi*, et plusieurs études ont montré que la protection conférée par *H. defensa*

peut dépendre de l'espèce de parasitoïde (Asplen *et al.* 2014; McLean & Godfray 2015). On ne peut pas non plus exclure que les souches non protectrices d'*H. defensa* vis-à-vis d'*A. ervi* soient associées un autre bénéfique, effet qui expliquerait leur maintien dans les populations naturelles. Des études complémentaires sur les phénotypes de ces associations symbiotiques sont nécessaires. Nous pourrions considérer à la fois des phénotypes de protection vis-à-vis d'un plus large panel d'ennemis naturels et des phénotypes moins 'visibles' comme la physiologie ou l'immunité.

Nos travaux montrent des effets variables des symbiotes sur le potentiel de dispersion à longue distance des pucerons (*i.e.*, production de descendants ailés). Si ces variations phénotypiques sont difficiles à interpréter, elles pourraient être liées à la dynamique spatiale de la plante hôte, dynamique à l'origine de pressions de sélection en faveur ou non d'un maintien de la dispersion à longue-distance. Si la production d'ailés est liée à l'exploration de l'habitat, elle peut également être liée à la 'fuite' d'un environnement hostile : les pucerons produisant des ailes lorsque les conditions locales sont peu favorables (Sutherland 1969; Müller *et al.* 2001). Il faut donc également analyser l'intensité des effets symbiotiques selon ce facteur écologique : la sensibilité aux conditions locales. Enfin, nos travaux montrent que les coûts associés à l'infection symbiotique dépendent de la plante hôte utilisée par les pucerons. Ces résultats ont une implication dans la dynamique des symbiotes dans les populations de pucerons. Nous développerons cet aspect dans la partie suivante.

Plus globalement, nous devons discuter de l'approche utilisée au cours de la thèse : nos travaux sur l'influence des symbiotes sur les phénotypes aphidiens ont été menés en conditions contrôlées. Cette approche permet d'observer finement les variations des effets symbiotiques selon les facteurs sélectionnés dans le protocole expérimental, comme les génotypes en association ou les facteurs environnementaux en jeu. Cette approche doit être complétée par des expériences de terrain afin (i) d'exposer les associations étudiées à l'ensemble des pressions locales (*i.e.*, diversité des ennemis naturels, contexte abiotique...) et (ii) de mesurer les phénotypes des lignées artificielles, lignées n'ayant jamais été sujettes à la sélection naturelle (sauf dans la relation avec la plante hôte). Toutefois, en considérant des lignées naturelles et une diversité de phénotypes, nos travaux contribuent à la compréhension de la dynamique des associations symbiotiques dans les populations naturelles.

II. DYNAMIQUE DES ASSOCIATIONS SYMBIOTIQUES

Nous avons développé en introduction les différentes forces évolutives qui entrent en jeu dans la dynamique des fréquences symbiotiques dans les populations d'insectes (cf **Contexte général §II**). En étudiant différents effets symbiotiques sur les phénotypes aphidiens, en mettant en évidence des interactions complexes entre le génotype de l'hôte et celui du symbiote ainsi qu'avec l'environnement, et en mesurant les coûts directs et indirects associés aux infections symbiotiques, cette thèse contribue à mieux comprendre cette dynamique. Elle permet notamment d'apporter un éclairage à deux problématiques particulièrement intrigantes : Pourquoi trouve-t-on les symbiotes protecteurs à des fréquences intermédiaires dans les populations naturelles ? Pourquoi les symbiotes sont-ils souvent associés préférentiellement à certaines populations d'insectes phytophages spécialisées vis-à-vis de la plante hôte ?

A. Symbiotes protecteurs et fréquences intermédiaires

Dans nos différentes études, nous avons montré que le phénotype de protection variait considérablement selon les symbiotes, tant au niveau de l'espèce que de la souche. Nous avons également précisé les différentes formes que pouvait prendre cette protection : protection comportementale, résistance physiologique, effets subléthaux sur les parasitoïdes émergents. Nous avons même proposé de revoir la définition de la notion de symbiote protecteur pour prendre en compte cette variation. Par ailleurs, nous avons identifié des coûts directs associés à la présence du symbiote, ces coûts étant bien connus dans de nombreux systèmes symbiotiques. Nous avons aussi détecté des coûts supplémentaires, qui là-aussi peuvent être de natures différentes. Nous avons proposé par exemple que la réduction des comportements de défense des individus infectés face à un ennemi naturel résulte du coût de la symbiose et nous avons détecté des coûts sur la *fitness* de l'hôte induits par la protection mise en place lors de l'attaque du parasitoïde. Il semble donc que la variation des effets du symbiote sur son hôte, tant du point de vue du type de protection que de la nature et de l'incidence des coûts associés, contribue en grande partie à maintenir les fréquences des symbiotes protecteurs à des niveaux intermédiaires. A ceci, il faut bien sûr ajouter l'environnement local avec notamment la pression parasitaire (intégrant à la fois l'intensité et la diversité des ennemis naturels) comme force majeure déterminant la prévalence des symbioses protectrices, comme cela

a pu être montré en conditions contrôlées (Oliver *et al.* 2008) et naturelles (Hrček *et al.* 2016; Rothacher *et al.* 2016). Nous avons aussi montré que la plante hôte comme source de variation environnementale influe sur l'incidence du symbiote sur son hôte, ce qui n'avait jusqu'à présent pas été étudié.

Les cas de coinfections peuvent aussi affecter la dynamique des symbiotes protecteurs. Les cas de coinfections ne sont pas rares dans les populations de pucerons (Ferrari *et al.* 2012; Henry *et al.* 2013; Leclair 2016), il est donc important de bien comprendre quelle est leur contribution à la dynamique des associations symbiotiques. Dans cette thèse, nous n'avons pas considéré l'influence des infections multiples sur le phénotype et la *fitness* de l'hôte. Des travaux antérieurs ont pourtant montré des modifications du phénotype de protection en situation d'infection multiple (par exemple la co-infection *H. defensa* et *F. symbiotica* aboutit souvent à une protection complète contre le parasitisme d'*A. ervi*, Leclair *et al.* 2016) mais aussi des coûts de *fitness* associés (Leclair *et al.* 2017). Les situations de coinfection sont donc susceptibles de modifier les fréquences des symbiotes protecteurs et donc de contribuer à leur maintien à des niveaux intermédiaires.

En plus de la variation des phénotypes de protection et des coûts des symbiotes, nous avons montré que *H. defensa* et *R. insecticola* affectent la production de descendants ailés. En influençant la capacité de dispersion sur de longues distances, les symbiotes peuvent aussi directement moduler leur propre dispersion. L'augmentation de la production d'ailés devrait affecter positivement la fréquence des symbiotes dans les populations et inversement. La dispersion des pucerons reste néanmoins limitée par leur capacité à coloniser de nouvelles plantes hôtes, il est donc probable que la dynamique des symbiotes ne soit affectée par la dispersion des pucerons qu'à l'échelle du biotype.

Notre étude sur les techniques d'élimination et de transfert des symbiotes facultatifs (Sochard *et al.* 2020, cf **Chapitre 1**) sont également à rapprocher des études sur les phénomènes de gain et de perte des symbiotes, qui sont également susceptibles de moduler les fréquences des symbiotes protecteurs.

Nous voyons donc qu'il est possible d'expliquer pourquoi les fréquences des symbiotes protecteurs sont souvent à des niveaux intermédiaires dans les populations naturelles. La démonstration des hypothèses que nous venons d'évoquer et la

hiérarchisation de l'importance des différents facteurs impliqués passent bien évidemment par des études de terrain nécessaires à l'évaluation des phénotypes étendus en conditions naturelles avec une prise en compte précise des variations de l'environnement local (pression parasitaire, ressources alimentaires, facteurs climatiques). Une autre perspective pourrait être d'étudier la dynamique des associations en utilisant la modélisation. Cette approche pourrait permettre de mieux comprendre le poids relatif des différentes forces évolutives en présence mais aussi potentiellement d'identifier de nouveaux facteurs de variation des fréquences symbiotiques en observant les écarts entre les prédictions des modèles et les fréquences observées dans les populations d'hôtes.

B. Associations préférentielles des symbiotes dans les populations d'hôte

Chez plusieurs espèces d'insectes phytophages, on constate que les communautés de symbiotes microbiens se répartissent de manière préférentielle en fonction de la plante hôte des insectes (Henry *et al.* 2015). Ce phénomène concerne aussi bien les symbiotes secondaires comme cela a pu être montré chez le puceron du pois (Simon *et al.* 2003; Ferrari *et al.* 2004, 2007, 2012; Henry *et al.* 2013, 2015; Gauthier *et al.* 2015) et chez d'autres espèces de pucerons (Brady & White 2013; Brady *et al.* 2014; Henry *et al.* 2015; Guidolin & Côté 2017; Xu *et al.* 2019), que le microbiote intestinal chez d'autres espèces d'insectes phytophages (Medina *et al.* 2011; Priya *et al.* 2012). Les études phénotypiques et phylogénétiques portant sur les symbiotes secondaires et les populations d'hôtes ont permis de proposer plusieurs hypothèses pour expliquer ces distributions préférentielles.

1. Hypothèses expliquant les associations préférentielles

Une première hypothèse propose que l'acquisition des symbiotes permette aux pucerons de coloniser de nouvelles plantes hôte (Henry *et al.* 2013). Le rôle potentiel des symbiotes secondaires dans la nutrition est connu depuis longtemps, comme *S. symbiotica* qui peut compenser la perte de *B. aphidicola* (Koga *et al.* 2003), voire à terme devenir un symbiote obligatoire pour compléter la perte de certaines voies de biosynthèse de *B. aphidicola* (Pérez-Brocal *et al.* 2006). De plus, ce symbiote est souvent retrouvé chez les espèces de pucerons spécialistes, ce qui suggère son implication dans la nutrition chez de

nombreuses espèces (Henry *et al.* 2015). En plus de l'aspect purement nutritif des symbiotes secondaires, plusieurs études montrent leur potentielle implication dans la spécialisation écologique de leur hôte (Leonardo & Muiru 2003; Tsuchida *et al.* 2004, 2011; Wagner *et al.* 2015). Par exemple, il a été montré pour *R. insecticola*, qui est associé au biotype spécialisé sur le trèfle chez *A. pisum*, que la présence de la bactérie améliore la performance des pucerons sur le trèfle et réduit celle sur une plante alternative (Tsuchida *et al.* 2004, 2011). Cependant, ces travaux sont fortement nuancés par d'autres études qui montrent que les bénéfices du symbiote varient selon la souche de la bactérie et le génotype du puceron (Leonardo 2004; Ferrari *et al.* 2007). Pour *H. defensa*, son effet sur les performances des pucerons sur différentes plantes hôtes semble général et non spécifique à certaines espèces de plantes (McLean *et al.* 2011).

La deuxième hypothèse suggère que la distribution des communautés symbiotiques soit façonnée par l'environnement local que les insectes rencontrent en colonisant des plantes particulières (Ferrari *et al.* 2012). Cette hypothèse suppose que les phénotypes conférés par les symbiotes puissent être modifiés par la plante et ainsi produire des bénéfices et des coûts dépendants de l'environnement. De plus, pour soutenir cette hypothèse, les études phylogénétiques montrent que les transferts horizontaux des symbiotes secondaires arrivent indépendamment de la formation des populations spécialisées (Ferrari *et al.* 2012; Henry *et al.* 2013).

Une dernière hypothèse, proche de l'hypothèse neutre, propose que la répartition préférentielle des symbiotes dans les différents biotypes soit liée aux événements aléatoires des dynamiques symbiotiques (Mathé-Hubert *et al.* 2019). Par le jeu des acquisitions et des pertes de symbiotes, et du fait des faibles croisements entre les populations spécialisées (Via 1999; Via *et al.* 2000), les communautés symbiotiques des différents biotypes ont évolué indépendamment, donnant lieu aux associations non aléatoires observées aujourd'hui. On peut ajouter à cela que lorsque de nouvelles plantes hôtes ont été colonisées, les individus fondateurs ont amené avec eux des communautés symbiotiques particulières (effet fondateur), ce qui pourrait expliquer la fixation de certains symbiotes dans les populations de quelques biotypes (Ferrari *et al.* 2012; Peccoud *et al.* 2015), malgré des coûts de *fitness* très importants en cas de protection parasitaires (Sochard *et al.* 2019, cf **Chapitre 4**).

2. *Les symbiotes ont-ils un rôle dans la spécialisation alimentaire ?*

Au cours des différentes expériences présentées dans le chapitre 2, nous avons montré que plusieurs souches de *R. insecticola* et d'*H. defensa* n'influencent pas la sélection de la plante hôte aussi bien chez les individus ailés (cf **Article 2**) qu'aptères (cf **Article 3**). Ces résultats se basent sur un nombre limité de souches, bien que de nombreuses associations aient été testées. Nous ne pouvons donc pas exclure que nous soyons passé à côté de souches présentant des effets sur le choix de plante, mais il semble que les symbiotes n'interviennent pas ou très peu dans la préférence de leur hôte pour leur plante. A ceci s'ajoute que très peu de travaux ont montré un effet des symbiotes sur la spécialisation alimentaire chez les pucerons en général et chez le puceron du pois en particulier. Nous avons mentionné à plusieurs reprises le cas de *R. insecticola* qui pourrait favoriser les porteurs à s'alimenter sur le trèfle (Tsuchida *et al.* 2004), résultat qui n'a pas été confirmé jusqu'alors (Sugio *et al.* 2015). Les travaux antérieurs sur les performances et ce travail de thèse sur les préférences suggèrent donc d'écarter l'hypothèse selon laquelle la spécialisation alimentaire des biotypes du puceron du pois est liée à leur cortège symbiotique.

3. *La plante hôte est-elle responsable des associations préférentielles ?*

En revanche, nos résultats montrant des variations de balance coûts-bénéfices selon la plante des pucerons semblent plutôt indiquer que les associations préférentielles se forment en réponse aux conditions locales propres à chaque biotype (Ferrari *et al.* 2012). Notamment, les conditions climatiques ou les communautés d'ennemis naturels sont deux facteurs susceptibles de varier d'un environnement à l'autre, ce qui peut fortement jouer sur la sélection d'associations symbiotiques particulières. Pour pouvoir confirmer cette hypothèse, on peut par exemple proposer une expérience alliant terrain et laboratoire qui aurait pour but de mesurer la corrélation entre les conditions environnementales associées aux différents biotypes avec les bénéfices conférés par les symbiotes au sein des différentes populations spécialisées. Pour cela, il serait nécessaire de caractériser une grande diversité d'associations naturelles et de tester plusieurs paramètres comme la résistance à différents ennemis naturels, la résistance aux conditions climatiques et/ou la performance sur la plante hôte.

III. CONCLUSION

Tous les organismes que l'on observe dans la nature sont les hôtes d'une incroyable diversité de microorganismes symbiotiques. De multiples manières, ces associations symbiotiques façonnent la vie des hôtes en influençant leurs traits phénotypiques. Ce travail de thèse s'inscrit dans la mouvance scientifique qui cherche à caractériser et à comprendre l'incidence de ces partenaires symbiotiques sur les interactions entre les organismes hôtes et leur milieu.

La manipulation des associations symbiotiques et la considération des associations naturelles nous a permis de répondre en partie à cet objectif, en montrant l'importance des symbiotes dans les interactions entre une espèce hôte et ses ennemis naturels. Cependant, il reste nécessaire d'étendre ces observations à un plus large panel de comportements et d'interactions biotiques pour avoir une vision d'ensemble des effets des symbiotes sur les relations entre organismes. Nos travaux soulèvent également de nouvelles questions, comme celle de la généralité des effets comportementaux des symbiotes. De cette question découle celle des mécanismes par lesquels les symbiotes influencent les comportements de leur hôte, car nos études suggèrent des mécanismes multiples et complexes. Plusieurs pistes et perspectives ont été proposées pour tenter de répondre à ces questions.

En étudiant la variabilité des effets phénotypiques et notamment comportementaux des symbiotes sur leur hôte, cette thèse contribue à apporter de nouveaux éléments pour comprendre le rôle des microorganismes dans l'évolution des réseaux d'interactions des communautés. Pour reprendre l'expression utilisée par Ferrari & Vavre (2011) : « les associations symbiotiques, c'est l'histoire des communautés qui affectent les communautés ».

REFERENCES

-
- Akami M, Andongma AA, Zhengzhong C, Nan J, Khaeso K, et al.** 2019. Intestinal bacteria modulate the foraging behavior of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae). *PLoS ONE* **14**: e0210109.
- Angelella G, Nalam V, Nachappa P, White J, & Kaplan I** 2018. Endosymbionts differentially alter exploratory probing behavior of a nonpersistent plant virus vector. *Microbial Ecology* **76**: 453–8.
- Arakaki N, Miyoshi T, & Noda H** 2001. *Wolbachia*-mediated parthenogenesis in the predatory thrips *Franklinothrips vespiformis* (Thysanoptera: Insecta). *Proceedings of the Royal Society of London B* **268**: 1011–6.
- Archie EA & Theis KR** 2011. Animal behaviour meets microbial ecology. *Animal Behaviour* **82**: 425–36.
- Asplen MK, Bano N, Brady CM, Desneux N, Hopper KR, et al.** 2014. Specialisation of bacterial endosymbionts that protect aphids from parasitoids: defensive symbiosis in the cowpea aphid. *Ecological Entomology* **39**: 736–9.
- Ayres MP, Wilkens RT, Ruel JJ, Lombardero MJ, & Vallery E** 2000. Nitrogen budgets of phloem-feeding bark beetles with and without symbiotic fungi. *Ecology* **81**: 2198–210.
- Ballinger MJ, Gawryluk RMR, & Perlman SJ** 2019. Toxin and genome evolution in a *Drosophila* defensive symbiosis. *Genome Biology and Evolution* **11**: 253–62.
- Barr KL, Hearne LB, Briesacher S, Clark TL, & Davis GE** 2010. Microbial symbionts in insects influence down-regulation of defense genes in maize. *PLoS ONE* **5**: e11339.
- Baumann P, Baumann L, Lai C-Y, Rouhbakhsh D, Moran NA, & Clark MA** 1995. Genetics, physiology and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annual Review of Microbiology* **49**: 55–94.
- Blackman RL** 1987. Reproduction, cytogenetics and development. *Aphids: their biology, natural enemies and control* **2**: 163–95.
- Bordenstein SR & Theis KR** 2015. Host biology in light of the microbiome: ten principles of holobionts and hologenomes. *PLoS Biology* **13**: e1002226.
- Bourtzis K, Nirgianaki A, Markakis G, & Savakis C** 1996. *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in *Drosophila* species. *Genetics* **144**: 1063–73.
- Brady CM, Asplen MK, Desneux N, Heimpel GE, Hopper KR, et al.** 2014. Worldwide populations of the aphid *Aphis craccivora* are infected with diverse facultative bacterial symbionts. *Microbial Ecology* **67**: 195–204.
- Brady CM & White JA** 2013. Cowpea aphid (*Aphis craccivora*) associated with different host plants has different facultative endosymbionts. *Ecological Entomology* **38**: 433–7.
- Bright M & Bulgheresi S** 2010. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 218–30.

- Brucker RM & Bordenstein SR** 2012. Speciation by symbiosis. *Trends in Ecology & Evolution* **27**: 443–51.
- Brumin M, Kontsedalov S, & Ghanim M** 2011. *Rickettsia* influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. *Insect Science* **18**: 57–66.
- Brune A** 2014. Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nature Reviews Microbiology* **12**: 168–80.
- Burg S von, Ferrari J, Muller CB, & Vorburger C** 2008. Genetic variation and covariation of susceptibility to parasitoids in the aphid *Myzus persicae*: no evidence for trade-offs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**: 1089–94.
- Caillaud MC & Via S** 2000. Specialized feeding behavior influences both ecological specialization and assortative mating in sympatric host races of pea aphids. *The American Naturalist* **156**: 606–21.
- Caragata EP, Real KM, Zalucki MP, & McGraw EA** 2011. *Wolbachia* infection increases recapture rate of field-released *Drosophila melanogaster*. *Symbiosis* **54**: 55–60.
- Card SD, Hume DE, Roodi D, McGill CR, Millner JP, & Johnson RD** 2015. Beneficial endophytic microorganisms of *Brassica* – A review. *Biological Control* **90**: 102–12.
- Caspi-Fluger A, Inbar M, Mozes-Daube N, Katzir N, Portnoy V, et al.** 2012. Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**: 1791–6.
- Castañeda LE, Sandrock C, & Vorburger C** 2010. Variation and covariation of life history traits in aphids are related to infection with the facultative bacterial endosymbiont *Hamiltonella defensa*. *Biological Journal of the Linnean Society* **100**: 237–47.
- Casteel CL, Hansen AK, Walling LL, & Paine TD** 2012. Manipulation of plant defense responses by the tomato psyllid (*Bactericerca cockerelli*) and its associated endosymbiont *Candidatus Liberibacter Psyllaurous*. *PLoS ONE* **7**: e35191.
- Cayetano L, Rothacher L, Simon J-C, & Vorburger C** 2015. Cheaper is not always worse: strongly protective isolates of a defensive symbiont are less costly to the aphid host. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**: 20142333.
- Cayetano L & Vorburger C** 2013. Genotype-by-genotype specificity remains robust to average temperature variation in an aphid/endosymbiont/parasitoid system. *Journal of Evolutionary Biology* **26**: 1603–10.
- Cayetano L & Vorburger C** 2015. Symbiont-conferred protection against Hymenopteran parasitoids in aphids: how general is it? *Ecological Entomology* **40**: 85–93.
- Chen D-Q, Montllor CB, & Purcell AH** 2000. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **95**: 315–23.

Chen D-Q & Purcell AH 1997. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. *Current Microbiology* **34**: 220–5.

Chiel E, Zchori-Fein E, Inbar M, Gottlieb Y, Adachi-Hagimori T, et al. 2009. Almost there: transmission routes of bacterial symbionts between trophic levels. *PLoS ONE* **4**: e4767.

Chrostek E, Pelz-Stelinski K, Hurst GDD, & Hughes GL 2017. Horizontal transmission of intracellular insect symbionts via plants. *Frontiers in Microbiology* **8**: 2237.

Chung SH, Rosa C, Scully ED, Peiffer M, Tooker JF, et al. 2013. Herbivore exploits orally secreted bacteria to suppress plant defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 15728–33.

Clark EL, Karley AJ, & Hubbard SF 2010. Insect endosymbionts: manipulators of insect herbivore trophic interactions? *Protoplasma* **244**: 25–51.

Costopoulos K, Kovacs JL, Kamins A, & Gerardo NM 2014. Aphid facultative symbionts reduce survival of the predatory lady beetle *Hippodamia convergens*. *BMC Ecology* **14**: 1–7.

Cryan JF & Dinan TG 2012. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience* **13**: 701–12.

Davis TS, Wu Y, & Eigenbrode SD 2017. The effects of *Bean Leafroll Virus* on life history traits and host selection behavior of specialized pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*, Hemiptera: Aphididae) genotypes. *Environmental Entomology* **46**: 68–74.

De Bary A 1879. De la symbiose. *Rev Int Sci*: 301–9.

De Crespigny FEC, Pitt TD, & Wedell N 2006. Increased male mating rate in *Drosophila* is associated with *Wolbachia* infection. *Journal of Evolutionary Biology* **19**: 1964–72.

De Fine Licht HH, Schiott M, Rogowska-Wrzesinska A, Nygaard S, Roepstorff P, & Boomsma JJ 2013. Laccase detoxification mediates the nutritional alliance between leaf-cutting ants and fungus-garden symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 583–7.

Després L, David J-P, & Gallet C 2007. The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution* **22**: 298–307.

Dheilly NM, Maure F, Ravallec M, Galinier R, Doyon J, et al. 2015. Who is the puppet master? Replication of a parasitic wasp-associated virus correlates with host behaviour manipulation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**: 20142773.

Dicke M, Cusumano A, & Poelman EH 2020. Microbial symbionts of parasitoids. *Annual Review of Entomology* **65**: 171–90.

Dion E, Polin SE, Simon J-C, & Outreman Y 2011a. Symbiont infection affects aphid defensive behaviours. *Biology Letters* **7**: 743–6.

- Dion E, Zélé F, Simon J-C, & Outreman Y** 2011b. Rapid evolution of parasitoids when faced with the symbiont-mediated resistance of their hosts: symbiont effects on host-parasitoid evolution. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 741–50.
- Douglas AE** 1989. Mycetocyte symbiosis in insects. *Biological Reviews* **64**: 409–34.
- Douglas AE** 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology* **43**: 17–37.
- Douglas AE** 2009. The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Functional Ecology* **23**: 38–47.
- Douglas AE** 2011. Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host & Microbe* **10**: 359–67.
- Douglas AE** 2015. Multiorganismal insects: diversity and function of resident microorganisms. *Annual Review of Entomology* **60**: 17–34.
- Douglas AE** 2018. The *Drosophila* model for microbiome research. *Lab Animal* **47**: 157–64.
- Douglas AE & Prosser WA** 1992. Synthesis of the essential amino acid tryptophan in the pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) symbiosis. *Journal of Insect Physiology* **38**: 565–8.
- Douglas AE & Werren JH** 2016. Holes in the hologenome: why host-microbe symbioses are not holobionts. *mBio* **7**.
- Dupont C, Michiels A, Sochard C, Dardenne N, Meyer S, et al.** 2020. Virus mediated trophic interactions between aphids and their natural enemies. *Oikos* **129**: 274–82.
- Dykstra HR, Weldon SR, Martinez AJ, White JA, Hopper KR, et al.** 2014. Factors limiting the spread of the protective symbiont *Hamiltonella defensa* in *Aphis craccivora* aphids. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 5818–27.
- Engel P & Moran NA** 2013. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews* **37**: 699–735.
- Engelstädter J & Hurst GDD** 2009. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **40**: 127–49.
- Engl T & Kaltenpoth M** 2018. Influence of microbial symbionts on insect pheromones. *Natural Product Reports* **35**: 386–97.
- Evans O, Caragata EP, McMeniman CJ, Woolfit M, Green DC, et al.** 2009. Increased locomotor activity and metabolism of *Aedes aegypti* infected with a life-shortening strain of *Wolbachia pipientis*. *Journal of Experimental Biology* **212**: 1436–41.
- Farahani HK, Ashouri A, Goldansaz SH, Shapiro MS, Pierre J-S, & Baaren J van** 2017. Decrease of memory retention in a parasitic wasp: an effect of host manipulation by *Wolbachia*? *Insect Science* **24**: 569–83.

-
- Feldhaar H** 2011. Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecological Entomology* **36**: 533–43.
- Ferrari J, Darby AC, Daniell TJ, Godfray HCJ, & Douglas AE** 2004. Linking the bacterial community in pea aphids with host-plant use and natural enemy resistance. *Ecological Entomology* **29**: 60–5.
- Ferrari J & Godfray HCJ** 2006. The maintenance of intraspecific biodiversity: the interplay of selection on resource use and on natural enemy resistance in the pea aphid. *Ecological Research* **21**: 9–16.
- Ferrari J, Godfray HCJ, Faulconbridge AS, Prior K, & Via S** 2006. Population differentiation and genetic variation in host choice among pea aphids from eight host plant genera. *Evolution* **60**: 1574–84.
- Ferrari J, Scarborough CL, & Godfray HCJ** 2007. Genetic variation in the effect of a facultative symbiont on host-plant use by pea aphids. *Oecologia* **153**: 323–9.
- Ferrari J & Vavre F** 2011. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **366**: 1389–400.
- Ferrari J, Via S, & Godfray HCJ** 2008. Population differentiation and genetic variation in performance on eight hosts in the pea aphid complex. *Evolution* **62**: 2508–24.
- Ferrari J, West JA, Via S, & Godfray HCJ** 2012. Population genetic structure and secondary symbionts in host-associated populations of the pea aphid complex. *Evolution* **66**: 375–90.
- Fischer C, Trautman EP, Crawford JM, Stabb EV, Handelsman J, & Broderick NA** 2017. Metabolite exchange between microbiome members produces compounds that influence *Drosophila* behavior. *Elife* **6**: e18855.
- Fleury F, Vavre F, Ris N, Fouillet P, & Boulétreau M** 2000. Physiological cost induced by the maternally-transmitted endosymbiont *Wolbachia* in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma*. *Parasitology* **121**: 493–500.
- Flórez LV, Biedermann PHW, Engl T, & Kaltenpoth M** 2015. Defensive symbioses of animals with prokaryotic and eukaryotic microorganisms. *Natural Product Reports* **32**: 904–36.
- Flórez LV, Scherlach K, Gaube P, Ross C, Sitte E, et al.** 2017. Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism. *Nature Communications* **8**: 15172.
- Frago E, Dicke M, & Godfray HCJ** 2012. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends in Ecology & Evolution* **27**: 705–11.
- Frago E, Mala M, Weldegergis BT, Yang C, McLean A, et al.** 2017. Symbionts protect aphids from parasitic wasps by attenuating herbivore-induced plant volatiles. *Nature Communications* **8**: 1–9.

- Fukatsu T & Hosokawa T** 2002. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 389–96.
- Fukatsu T, Tsuchida T, Nikoh N, & Koga R** 2001. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 1284–91.
- Gauthier J-P, Outreman Y, Mieuze L, & Simon J-C** 2015. Bacterial communities associated with host-adapted populations of pea aphids revealed by deep sequencing of 16S ribosomal DNA. *PLoS ONE* **10**: e0120664.
- Gehrer L & Vorburger C** 2012. Parasitoids as vectors of facultative bacterial endosymbionts in aphids. *Biology Letters* **8**: 613–5.
- Gonella E, Crotti E, Rizzi A, Mandrioli M, Favia G, et al.** 2012. Horizontal transmission of the symbiotic bacterium *Asaia* sp. in the leafhopper *Scaphoideus titanus* Ball (Hemiptera: Cicadellidae). *BMC Microbiology* **12**: 1–13.
- Goodacre SL & Martin OY** 2012. Modification of Insect and Arachnid Behaviours by Vertically Transmitted Endosymbionts: Infections as Drivers of Behavioural Change and Evolutionary Novelty. *Insects* **3**: 246–61.
- Guidolin AS & Cònsoli FL** 2017. Symbiont diversity of *Aphis (Toxoptera) citricidus* (Hemiptera: Aphididae) as influenced by host plants. *Microbial Ecology* **73**: 201–10.
- Guo J, Hatt S, He K, Chen J, Francis F, & Wang Z** 2017. Nine facultative endosymbionts in aphids. A review. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **20**: 794–801.
- Guyomar C, Legeai F, Jouselin E, Mougèl C, Lemaitre C, & Simon J-C** 2018. Multi-scale characterization of symbiont diversity in the pea aphid complex through metagenomic approaches. *Microbiome* **6**: 1–21.
- Haine ER** 2008. Symbiont-mediated protection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**: 353–61.
- Hansen AK & Moran NA** 2014. The impact of microbial symbionts on host plant utilization by herbivorous insects. *Molecular Ecology* **23**: 1473–96.
- Hedges LM, Brownlie JC, O'Neill SL, & Johnson KN** 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* **322**: 702.
- Henry Y & Colinet H** 2018. Microbiota disruption leads to reduced cold tolerance in *Drosophila* flies. *The Science of Nature* **105**: 1–5.
- Henry LM, Maiden MCJ, Ferrari J, & Godfray HCJ** 2015. Insect life history and the evolution of bacterial mutualism. *Ecology Letters* **18**: 516–25.
- Henry LM, Peccoud J, Simon J-C, Hadfield JD, Maiden MJC, et al.** 2013. Horizontally transmitted symbionts and host colonization of ecological niches. *Current Biology* **23**: 1713–7.

-
- Heyworth ER & Ferrari J** 2015. A facultative endosymbiont in aphids can provide diverse ecological benefits. *Journal of Evolutionary Biology* **28**: 1753–60.
- Heyworth ER & Ferrari J** 2016. Heat stress affects facultative symbiont-mediated protection from a parasitoid wasp. *PLoS ONE* **11**: e0167180.
- Heyworth ER, Smees MR, & Ferrari J** 2020. Aphid facultative symbionts aid recovery of their obligate symbiont and their host after heat stress. *Frontiers in Ecology and Evolution* **8**: 56.
- Hosokawa T, Kikuchi Y, Shimada M, & Fukatsu T** 2007. Obligate symbiont involved in pest status of host insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **274**: 1979–84.
- Hosokawa T, Kikuchi Y, Shimada M, & Fukatsu T** 2008. Symbiont acquisition alters behaviour of stinkbug nymphs. *Biology Letters* **4**: 45–8.
- Hrček J, McLean AHC, & Godfray HCJ** 2016. Symbionts modify interactions between insects and natural enemies in the field. *Journal of Animal Ecology* **85**: 1605–12.
- Huigens ME, Almeida RP de, Boons PAH, Luck RF, & Stouthamer R** 2004. Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **271**: 509–15.
- Hurst GDD** 2017. Extended genomes: symbiosis and evolution. *Interface Focus* **7**: 20170001.
- Hurst GD, Jiggins FM, Schulenburg JHG von der, Bertrand D, West SA, et al.** 1999. Male-killing *Wolbachia* in two species of insect. *Proceedings of the Royal Society of London B* **266**: 735–40.
- Ingwell LL, Eigenbrode SD, & Bosque-Pérez NA** 2012. Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports* **2**: 1–6.
- Jaenike J** 2012. Population genetics of beneficial heritable symbionts. *Trends in Ecology & Evolution* **27**: 226–32.
- Jaenike J, Unckless R, Cockburn SN, Boelio LM, & Perlman SJ** 2010. Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Science* **329**: 212–5.
- Kaiser W, Huguet E, Casas J, Commin C, & Giron D** 2010. Plant green-island phenotype induced by leaf-miners is mediated by bacterial symbionts. *Proceedings of the Royal Society B* **277**: 2311–9.
- Kaltenpoth M, Roeser-Mueller K, Koehler S, Peterson A, Nechitaylo TY, et al.** 2014. Partner choice and fidelity stabilize coevolution in a Cretaceous-age defensive symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 6359–64.

- Kellner RLL** 1999. What is the basis of pederin polymorphism in *Paederus riparius* rove beetles? The endosymbiotic hypothesis. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **93**: 41–9.
- Kellner RLL** 2003. Stadium-specific transmission of endosymbionts needed for pederin biosynthesis in three species of *Paederus* rove beetles. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **107**: 115–24.
- Kenyon SG & Hunter MS** 2007. Manipulation of oviposition choice of the parasitoid wasp, *Encarsia pergandiella*, by the endosymbiotic bacterium *Cardinium*. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 707–16.
- Kikuchi Y, Hayatsu M, Hosokawa T, Nagayama A, Tago K, & Fukatsu T** 2012. Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 8618–22.
- Kikuchi Y, Hosokawa T, & Fukatsu T** 2011. Specific developmental window for establishment of an insect-microbe gut symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 4075–81.
- Koga R, Meng X-Y, Tsuchida T, & Fukatsu T** 2012. Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte-embryo interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: E1230–7.
- Koga R, Tsuchida T, & Fukatsu T** 2003. Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**: 2543–50.
- Koukou K, Pavlikaki H, Kiliass G, Werren JH, Bourtzis K, & Alahiotis SN** 2006. Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. *Evolution* **60**: 87–96.
- Kovacs JL, Wolf C, Voisin D, & Wolf S** 2017. Evidence of indirect symbiont conferred protection against the predatory lady beetle *Harmonia axyridis* in the pea aphid. *BMC Ecology* **17**: 1–11.
- Laughton AM, Fan MH, & Gerardo NM** 2014. The combined effects of bacterial symbionts and aging on life history traits in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 470–7.
- Leclair M** 2016. Dynamique évolutive des symbioses protectrices chez les insectes. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, 152p.
- Leclair M, Polin S, Jousseau T, Simon J-C, Sugio A, et al.** 2017. Consequences of coinfection with protective symbionts on the host phenotype and symbiont titres in the pea aphid system. *Insect Science* **24**: 798–808.
- Leclair M, Pons I, Mahéo F, Morlière S, Simon J-C, & Outreman Y** 2016. Diversity in symbiont consortia in the pea aphid complex is associated with large phenotypic variation in the insect host. *Evolutionary Ecology* **30**: 925–41.

Leitão-Gonçalves R, Carvalho-Santos Z, Francisco AP, Fioreze GT, Anjos M, et al. 2017. Commensal bacteria and essential amino acids control food choice behavior and reproduction. *PLoS Biology* **15**: e2000862.

Leonardo TE 2004. Removal of a specialization-associated symbiont does not affect aphid fitness. *Ecology Letters* **7**: 461–8.

Leonardo TE & Mondor EB 2006. Symbiont modifies host life-history traits that affect gene flow. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**: 1079–84.

Leonardo TE & Muiru GT 2003. Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **270**: S209–12.

Lester PJ, Sébastien A, Suarez AV, Barbieri RF, & Gruber MAM 2017. Symbiotic bacterial communities in ants are modified by invasion pathway bottlenecks and alter host behavior. *Ecology* **98**: 861–74.

Lewis Z & Lizé A 2015. Insect behaviour and the microbiome. *Current Opinion in Insect Science* **9**: 86–90.

Leybourne DJ, Bos JIB, Valentine TA, & Karley AJ 2020a. The price of protection: a defensive endosymbiont impairs nymph growth in the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi*. *Insect Science* **27**: 69–85.

Leybourne DJ, Valentine TA, Bos JIB, & Karley AJ 2020b. A fitness cost resulting from *Hamiltonella defensa* infection is associated with altered probing and feeding behaviour in *Rhopalosiphum padi*. *The Journal of Experimental Biology* **223**: jeb207936.

Li S-J, Ahmed MZ, Lv N, Shi P-Q, Wang X-M, et al. 2017. Plant-mediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *The ISME Journal* **11**: 1019–28.

Liu W, Zhang K, Li Y, Su W, Hu K, & Jin S 2017. *Enterococci* mediate the oviposition preference of *Drosophila melanogaster* through sucrose catabolism. *Scientific Reports* **7**: 13420.

Lu H, Zhu J, Yu J, Chen X, Kang L, & Cui F 2019. A symbiotic virus facilitates aphid adaptation to host plants by suppressing jasmonic acid responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **33**: 55–65.

Łukasik P, Dawid MA, Ferrari J, & Godfray HCJ 2013a. The diversity and fitness effects of infection with facultative endosymbionts in the grain aphid, *Sitobion avenae*. *Oecologia* **173**: 985–96.

Łukasik P, Guo H, Asch M van, Ferrari J, & Godfray HCJ 2013b. Protection against a fungal pathogen conferred by the aphid facultative endosymbionts *Rickettsia* and *Spiroplasma* is expressed in multiple host genotypes and species and is not influenced by co-infection with another symbiont. *Journal of Evolutionary Biology* **26**: 2654–61.

- Łukasik P, Guo H, Asch M van, Henry LM, Godfray HCJ, & Ferrari J** 2015. Horizontal transfer of facultative endosymbionts is limited by host relatedness. *Evolution* **69**: 2757–66.
- Lynch JB & Hsiao EY** 2019. Microbiomes as sources of emergent host phenotypes. *Science* **365**: 1405–9.
- Lynn-Bell NL, Strand MR, & Oliver KM** 2019. Bacteriophage acquisition restores protective mutualism. *Microbiology* **165**: 985–9.
- Margulis L** 1991. Symbiogenesis and symbiogenesis. In: Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis. MIT press: Cambridge, Massachusetts.
- Martinez J, Tolosana I, Ok S, Smith S, Snoeck K, et al.** 2017. Symbiont strain is the main determinant of variation in *Wolbachia*-mediated protection against viruses across *Drosophila* species. *Molecular Ecology* **26**: 4072–84.
- Mason CJ, Campbell AM, Scully ED, & Hoover K** 2019. Bacterial and fungal midgut community dynamics and transfer between mother and brood in the asian longhorned beetle (*Anoplophora glabripennis*), an invasive xylophage. *Microbial Ecology* **77**: 230–42.
- Mateos M, Winter L, Winter C, Higareda-Alvear VM, Martinez-Romero E, & Xie J** 2016. Independent origins of resistance or susceptibility of parasitic wasps to a defensive symbiont. *Ecology and Evolution* **6**: 2679–87.
- Mathé-Hubert H, Kaech H, Ganesanandamoorthy P, & Vorburger C** 2019a. Evolutionary costs and benefits of infection with diverse strains of *Spiroplasma* in pea aphids. *Evolution* **73**: 1466–81.
- Mathé-Hubert H, Kaech H, Hertaeg C, Jaenike J, & Vorburger C** 2019b. Nonrandom associations of maternally transmitted symbionts in insects: the roles of drift versus biased cotransmission and selection. *Molecular Ecology* **28**: 5330–46.
- McLean AHC, Asch M van, Ferrari J, & Godfray HCJ** 2011. Effects of bacterial secondary symbionts on host plant use in pea aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**: 760–6.
- McLean AHC & Godfray HCJ** 2015. Evidence for specificity in symbiont-conferred protection against parasitoids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**: 20150977.
- McLean AHC, Parker BJ, Hrček J, Henry LM, & Godfray HCJ** 2016. Insect symbionts in food webs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **371**: 20150325.
- Medina RF, Nachappa P, & Tamborindeguy C** 2011. Differences in bacterial diversity of host-associated populations of *Phylloxera notabilis* Pergande (Hemiptera: Phylloxeridae) in pecan and water hickory. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 761–71.

-
- Meseguer AS, Manzano-Marín A, Coeur d'Acier A, Clamens A-L, Godefroid M, & Jousselin E** 2017. *Buchnera* has changed flatmate but the repeated replacement of co-obligate symbionts is not associated with the ecological expansions of their aphid hosts. *Molecular Ecology* **26**: 2363–78.
- Miller WJ, Ehrman L, & Schneider D** 2010. Infectious speciation revisited: impact of symbiont-depletion on female fitness and mating behavior of *Drosophila paulistorum*. *PLoS Pathogens* **6**: e1001214.
- Minard G, Mavingui P, & Moro CV** 2013. Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors* **6**: 1–12.
- Montllor CB, Maxmen A, & Purcell AH** 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* **27**: 189–95.
- Moran NA** 2006. Symbiosis. *Current Biology* **16**: R866–71.
- Moran NA & Dunbar HE** 2006. Sexual acquisition of beneficial symbionts in aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 12803–6.
- Moran NA, McCutcheon JP, & Nakabachi A** 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annual Review of Genetics* **42**: 165–90.
- Moran NA & Sloan DB** 2015. The hologenome concept: helpful or hollow? *PLoS Biology* **13**: e1002311.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, et al.** 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* **139**: 1268–78.
- Moreno-Delafuente A, Garzo E, Moreno A, & Fereres A** 2013. A plant virus manipulates the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. *PLoS ONE* **8**: e61543.
- Morimoto J, Simpson SJ, & Ponton F** 2017. Direct and trans-generational effects of male and female gut microbiota in *Drosophila melanogaster*. *Biology Letters* **13**: 20160966.
- Müller CB, Williams IS, & Hardie J** 2001. The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids. *Ecological Entomology* **26**: 330–40.
- Nardon P & Grenier A-M** 1993. Symbiose et évolution. *Annales de la Société entomologique de France* **29**: 113–40.
- Negri I, Pellicchia M, Mazzoglio PJ, Patetta A, & Alma A** 2006. Feminizing *Wolbachia* in *Zyginidia pullula* (Insecta, Hemiptera), a leafhopper with an XX/X0 sex-determination system. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**: 2409–16.
- Niepoth N, Ellers J, & Henry LM** 2018. Symbiont interactions with non-native hosts limit the formation of new symbioses. *BMC Evolutionary Biology* **18**: 1–12.

Oliver KM, Campos J, Moran NA, & Hunter MS 2008. Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **275**: 293–9.

Oliver KM, Degnan PH, Burke GR, & Moran NA 2010. Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annual Review of Entomology* **55**: 247–66.

Oliver KM & Higashi CH 2019. Variations on a protective theme: *Hamiltonella defensa* infections in aphids variably impact parasitoid success. *Current Opinion in Insect Science* **32**: 1–7.

Oliver K & Moran N 2009. Defensive symbionts in aphids and other insects. In: *Defensive mutualism in microbial symbiosis*. CRC Press.

Oliver KM, Moran NA, & Hunter MS 2005. Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 12795–800.

Oliver KM, Moran NA, & Hunter MS 2006. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**: 1273–80.

Oliver KM, Noge K, Huang EM, Campos JM, Becerra JX, & Hunter MS 2012. Parasitic wasp responses to symbiont-based defense in aphids. *BMC Biology* **10**: 1–10.

Oliver KM, Russell JA, Moran NA, & Hunter MS 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 1803–7.

Oliver KM, Smith AH, & Russell JA 2014. Defensive symbiosis in the real world - advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond. *Functional Ecology* **28**: 341–55.

Panteleev DYu, Goryacheva II, Andrianov BV, Reznik NL, Lazebny OE, & Kulikov AM 2007. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* enhances the nonspecific resistance to insect pathogens and alters behavior of *Drosophila melanogaster*. *Russian Journal of Genetics* **43**: 1066–9.

Paredes JC, Herren JK, Schüpfer F, & Lemaitre B 2016. The role of lipid competition for endosymbiont-mediated protection against parasitoid wasps in *Drosophila*. *mBio* **7**: e01006-16.

Parker BJ & Brisson JA 2019. A laterally transferred viral gene modifies aphid wing plasticity. *Current Biology* **29**: 2098-103.

Parker BJ, Hrček J, McLean AHC, & Godfray HCJ 2017a. Genotype specificity among hosts, pathogens, and beneficial microbes influences the strength of symbiont-mediated protection. *Evolution* **71**: 1222–31.

-
- Parker BJ, McLean AHC, Hrček J, Gerardo NM, & Godfray HCJ** 2017b. Establishment and maintenance of aphid endosymbionts after horizontal transfer is dependent on host genotype. *Biology Letters* **13**: 20170016.
- Parker BJ, Spragg CJ, Altincicek B, & Gerardo NM** 2013. Symbiont-mediated protection against fungal pathogens in pea aphids: a role for pathogen specificity? *Applied and Environmental Microbiology* **79**: 2455–8.
- Patot S, Allemand R, Fleury F, & Varaldi J** 2012. An inherited virus influences the coexistence of parasitoid species through behaviour manipulation: a symbiont mediates interspecific competition. *Ecology Letters* **15**: 603–10.
- Peccoud J, Mahéo F, Huerta M de la, Laurence C, & Simon J-C** 2015. Genetic characterisation of new host-specialised biotypes and novel associations with bacterial symbionts in the pea aphid complex. *Insect Conservation and Diversity* **8**: 484–92.
- Peccoud J, Ollivier A, Plantegenest M, & Simon J-C** 2009. A continuum of genetic divergence from sympatric host races to species in the pea aphid complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 7495–500.
- Peng Y, Nielsen JE, Cunningham JP, & McGraw EA** 2008. *Wolbachia* infection alters olfactory-cued locomotion in *Drosophila* spp. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 3943–8.
- Peng Y & Wang Y** 2009. Infection of *Wolbachia* may improve the olfactory response of *Drosophila*. *Chinese Science Bulletin* **54**: 1369–75.
- Pérez-Brocal V, Gil R, Ramos S, Lamelas A, Postigo M, et al.** 2006. A small microbial genome: the end of a long symbiotic relationship? *Science* **314**: 312–3.
- Polin S, Le Gallic J-F, Simon J-C, Tsuchida T, & Outreman Y** 2015. Conditional reduction of predation risk associated with a facultative symbiont in an insect. *PLoS ONE* **10**: e0143728.
- Polin S, Simon J-C, & Outreman Y** 2014. An ecological cost associated with protective symbionts of aphids. *Ecology and Evolution* **4**: 836–40.
- Pons I, Renoz F, Noël C, & Hance T** 2019. Circulation of the cultivable symbiont *Serratia symbiotica* in aphids is mediated by plants. *Frontiers in Microbiology* **10**: 764.
- Powell JE, Martinson VG, Urban-Mead K, & Moran NA** 2014. Routes of acquisition of the gut microbiota of the honey bee *Apis mellifera*. *Applied and Environmental Microbiology* **80**: 7378–87.
- Priya NG, Ojha A, Kajla MK, Raj A, & Rajagopal R** 2012. Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE* **7**: e30768.
- Qiao H, Keeseey IW, Hansson BS, & Knaden M** 2019. Gut microbiota affects development and olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Experimental Biology* **222**: jeb192500.

- Ramírez-Cáceres GE, Moya-Hernández MG, Quilodrán M, Nespolo RF, Ceballos R, et al.** 2019. Harboring the secondary endosymbiont *Regiella insecticola* increases predation risk and reproduction in the cereal aphid *Sitobion avenae*. *Journal of Pest Science* **92**: 1039–47.
- Reyes ML, Laughton AM, Parker BJ, Wichmann H, Fan M, et al.** 2019. The influence of symbiotic bacteria on reproductive strategies and wing polyphenism in pea aphids responding to stress. *Journal of Animal Ecology* **88**: 601–11.
- Rivera FN, Gonzalez E, Gomez Z, Lopez N, Hernández-Rodríguez C, et al.** 2009. Gut-associated yeast in bark beetles of the genus *Dendroctonus* Erichson (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). *Biological Journal of the Linnean Society* **98**: 325–342.
- Rohrscheib CE & Brownlie JC** 2013. Microorganisms that manipulate complex animal behaviours by affecting the host's nervous system. *Springer Science Reviews* **1**: 133–40.
- Roossinck MJ** 2011. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology* **9**: 99–108.
- Rosenberg E & Zilber-Rosenberg I** 2018. The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome* **6**: 1–14.
- Rothacher L, Ferrer-Suay M, & Vorburger C** 2016. Bacterial endosymbionts protect aphids in the field and alter parasitoid community composition. *Ecology* **97**: 1712–23.
- Rouchet R & Vorburger C** 2012. Strong specificity in the interaction between parasitoids and symbiont-protected hosts. *Journal of Evolutionary Biology* **25**: 2369–75.
- Russell SL** 2019. Transmission mode is associated with environment type and taxa across bacteria-eukaryote symbioses: a systematic review and meta-analysis. *FEMS Microbiology Letters* **366**: fnz013.
- Russell JA & Moran NA** 2006. Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**: 603–10.
- Ryabov EV, Keane G, Naish N, Evered C, & Winstanley D** 2009. Densovirus induces winged morphs in asexual clones of the rosy apple aphid, *Dysaphis plantaginea*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 8465–70.
- Sakurai M, Koga R, Tsuchida T, Meng X-Y, & Fukatsu T** 2005. *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4069–75.
- Scarborough CL, Ferrari J, & Godfray HCJ** 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* **310**: 1781.
- Schmid M, Sieber R, Zimmermann Y-S, & Vorburger C** 2012. Development, specificity and sublethal effects of symbiont-conferred resistance to parasitoids in aphids. *Functional Ecology* **26**: 207–15.

Schoofs L, De Loof A, & Van Hiel MB 2017. Neuropeptides as regulators of behavior in insects. *Annual Review of Entomology* **62**: 35–52.

Schretter CE, Vielmetter J, Bartos I, Marka Z, Marka S, et al. 2018. A gut microbial factor modulates locomotor behaviour in *Drosophila*. *Nature* **563**: 402–6.

Selkrig J, Mohammad F, Ng SH, Chua JY, Tumkaya T, et al. 2018. The *Drosophila* microbiome has a limited influence on sleep, activity, and courtship behaviors. *Scientific Reports* **8**: 10646.

Shropshire JD & Bordenstein SR 2016. Speciation by symbiosis: the microbiome and behavior. *mBio* **7**: e01785-15.

Simon J-C, Boutin S, Tsuchida T, Koga R, Le Gallic J-F, et al. 2011. Facultative symbiont infections affect aphid reproduction. *PLoS ONE* **6**: e21831.

Simon J-C, Carre S, Boutin M, Prunier-Leterme N, Sabater-Muñoz B, et al. 2003. Host-based divergence in populations of the pea aphid: insights from nuclear markers and the prevalence of facultative symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**: 1703–12.

Simon J-C, Marchesi JR, Mougel C, & Selosse M-A 2019. Host-microbiota interactions: from holobiont theory to analysis. *Microbiome* **7**: 1–5.

Sintupachee S, Milne JR, Poonchaisri S, Baimai V, & Kittayapong P 2006. Closely related *Wolbachia* strains within the pumpkin arthropod community and the potential for horizontal transmission via the plant. *Microbial Ecology* **51**: 294–301.

Skaljac M, Kirfel P, Grotmann J, & Vilcinskis A 2018. Fitness costs of infection with *Serratia symbiotica* are associated with greater susceptibility to insecticides in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: *Serratia symbiotica* correlates with susceptibility to insecticides in pea aphid. *Pest Management Science* **74**: 1829–36.

Smith AH, Łukasik P, O'Connor MP, Lee A, Mayo G, et al. 2015. Patterns, causes and consequences of defensive microbiome dynamics across multiple scales. *Molecular Ecology* **24**: 1135–49.

Sochard C, Leclair M, Simon J-C, & Outreman Y 2019. Host plant effects on the outcomes of defensive symbioses in the pea aphid complex. *Evolutionary Ecology* **33**: 651–69.

Sochard C, Morlière S, Toussaint G, Outreman Y, Sugio A, & Simon J 2020. Examination of the success rate of secondary symbiont manipulation by microinjection methods in the pea aphid system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **168**: 174–83.

Sudakaran S, Kost C, & Kaltenpoth M 2017. Symbiont acquisition and replacement as a source of ecological innovation. *Trends in Microbiology* **25**: 375–90.

Sugio A, Dubreuil G, Giron D, & Simon J-C 2015. Plant-insect interactions under bacterial influence: ecological implications and underlying mechanisms. *Journal of Experimental Botany* **66**: 467–78.

- Sutherland ORW** 1969. The role of crowding in the production of winged forms by two strains of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology* **15**: 1385–410.
- Szklarczyk T & Michalik A** 2017. Transovarial transmission of symbionts in insects. In: *Oocytes*. Springer, Cham.
- Taylor CM, Coffey PL, DeLay BD, & Dively GP** 2014. The importance of gut symbionts in the development of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål). *PLoS ONE* **9**: e90312.
- Teixeira L, Ferreira Á, & Ashburner M** 2008. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology* **6**: e1000002.
- Teseo S, Zweden JS van, Pontieri L, Kooij PW, Sørensen SJ, et al.** 2019. The scent of symbiosis: gut bacteria may affect social interactions in leaf-cutting ants. *Animal Behaviour* **150**: 239–54.
- Toju H & Fukatsu T** 2011. Diversity and infection prevalence of endosymbionts in natural populations of the chestnut weevil: relevance of local climate and host plants. *Molecular Ecology* **20**: 853–68.
- Tsuchida T, Koga R, & Fukatsu T** 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* **303**: 1989.
- Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, Tsunoda T, Maoka T, et al.** 2010. Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science* **330**: 1102–4.
- Tsuchida T, Koga R, Matsumoto S, & Fukatsu T** 2011. Interspecific symbiont transfection confers a novel ecological trait to the recipient insect. *Biology Letters* **7**: 245–8.
- Van Arnem EB, Currie CR, & Clardy J** 2018. Defense contracts: molecular protection in insect-microbe symbioses. *Chemical Society Reviews* **47**: 1638–51.
- Varaldi J, Fouillet P, Ravallec M, López-Ferber M, Boulétreau M, & Fleury F** 2003. Infectious behavior in a parasitoid. *Science* **302**: 1930–1930.
- Varaldi J, Ravallec M, Labrosse C, Lopez-Ferber M, Boulétreau M, & Fleury F** 2006. Artificial transfer and morphological description of virus particles associated with superparasitism behaviour in a parasitoid wasp. *Journal of Insect Physiology* **52**: 1202–12.
- Vavre F & Kremer N** 2014. Microbial impacts on insect evolutionary diversification: from patterns to mechanisms. *Current Opinion in Insect Science* **4**: 29–34.
- Via S** 1999. Reproductive isolation between sympatric races of pea aphids. I. Gene flow restriction and habitat choice. *Evolution* **53**: 1446–57.
- Via S, Bouck AC, & Skillman S** 2000. Reproductive isolation between divergent races of pea aphids on two hosts. II. Selection against migrants and hybrids in the parental environments. *Evolution* **54**: 1626–37.

-
- Voirol LRP, Frago E, Kaltenpoth M, Hilker M, & Fatouros NE** 2018. Bacterial symbionts in Lepidoptera: their diversity, transmission, and impact on the host. *Frontiers in Microbiology* **9**: 556.
- Vorburger C** 2014. The evolutionary ecology of symbiont-conferred resistance to parasitoids in aphids. *Insect Science* **21**: 251–64.
- Vorburger C, Gehrler L, & Rodriguez P** 2010. A strain of the bacterial symbiont *Regiella insecticola* protects aphids against parasitoids. *Biology Letters* **6**: 109–11.
- Vorburger C & Perlman SJ** 2018. The role of defensive symbionts in host-parasite coevolution. *Biological Reviews* **93**: 1747–64.
- Wagner SM, Martinez AJ, Ruan Y-M, Kim KL, Lenhart PA, et al.** 2015. Facultative endosymbionts mediate dietary breadth in a polyphagous herbivore. *Functional Ecology* **29**: 1402–10.
- Weinert LA, Araujo-Jnr EV, Ahmed MZ, & Welch JJ** 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **282**: 20150249.
- Weldon SR, Strand MR, & Oliver KM** 2013. Phage loss and the breakdown of a defensive symbiosis in aphids. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20122103.
- Wong AC-N, Wang Q-P, Morimoto J, Senior AM, Lihoreau M, et al.** 2017. Gut microbiota modifies olfactory-guided microbial preferences and foraging decisions in *Drosophila*. *Current Biology* **27**: 2397-2404.e4.
- Xie J, Vilchez I, & Mateos M** 2010. *Spiroplasma* bacteria enhance survival of *Drosophila hydei* attacked by the parasitic wasp *Leptopilina heterotoma*. *PLoS ONE* **5**: e12149.
- Xu S, Jiang L, Qiao G, & Chen J** 2019. The bacterial flora associated with the polyphagous aphid *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae) is strongly affected by host plants. *Microbial Ecology*.
- Zchori-Fein E, Gottlieb Y, Kelly SE, Brown JK, Wilson JM, et al.** 2001. A newly discovered bacterium associated with parthenogenesis and a change in host selection behavior in parasitoid wasps. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 12555–60.
- Zheng H, Steele MI, Leonard SP, Motta EVS, & Moran NA** 2018. Honey bees as models for gut microbiota research. *Lab Animal* **47**: 317–25.
- Zilber-Rosenberg I & Rosenberg E** 2008. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiology Reviews* **32**: 723–35.
- Zytynska SE & Weisser WW** 2016. The natural occurrence of secondary bacterial symbionts in aphids. *Ecological Entomology* **41**: 13–26.

ANNEXES

OIKOS

Research

Virus mediated trophic interactions between aphids and their natural enemies

Corentin Dupont, Alexandra Michiels, Corentin Sochard, Nathalie Dardenne, Sophie Meyer, Véronique Brault, Yannick Outreman and Arnaud Sentis

A. Michiels, N. Dardenne and A. Sentis (<https://orcid.org/0000-0003-4617-3620>) ✉ (arnaud.sentis@irstea.fr), UMR 5174; EDB (Laboratoire Évolution and Diversité Biologique); CNRS, Université Toulouse III, IRD, 118 route de Narbonne, FR-31062 Toulouse Cedex 9, France. AS also at: IRSTEA, Aix Marseille Univ., UMR RECOVER, 3275 route Cézanne, FR-13182 Aix-en-Provence, France. – C. Dupont, C. Sochard and Y. Outreman, IGEPP, Agrocampus Ouest, INRA, Univ. de Rennes, Univ. Bretagne-Loire, Rennes, France. – S. Meyer and V. Brault, UMR SVQV, INRA, Univ. de Strasbourg, Colmar, France.

Oikos

129: 274–282, 2020

doi: 10.1111/oik.06868

Subject Editor: Matthew Symonds

Editor-in-Chief: Dries Bonte

Accepted 5 November 2019

Microbial endosymbionts alter the phenotype of their host which may have cascading effects at both population and community levels. However, we currently lack information on whether the effects of viruses on both host phenotypic traits and host population demography can modify interactions with upper trophic levels. To fill this gap, we investigated whether a prevalent densovirus infecting the aphid *Myzus persicae* (i.e. MpDENV) can modify trophic interactions between host aphids and their natural enemies (i.e. predators and parasitoids) by influencing aphid phenotypic traits (i.e. body mass and defensive behaviours), population demography (i.e. density and age-structure) and susceptibility towards both predation and parasitism. We found that the virus decreased aphid body mass but did not influence their behavioural defences. At the population level, the virus had a minor effect on aphid adult mortality whereas it strongly reduced the density of nymphs and influenced the stage structure of aphid populations. In addition, the virus enhanced the susceptibility of aphids to parasitism regardless of the parasitoid species. Predation rate on adult aphids was not influenced by the virus but ladybeetle predators strongly decreased the number of aphid nymphs, especially for uninfected ones compared to infected ones. As a result, the virus decreased predator effect on aphid populations. By reducing both aphid quality and availability, increasing their susceptibility to parasitism, and modulating predator effect on aphid populations, we highlighted that viral endosymbionts can be prevalent drivers of their host ecology as they modify their phenotypes and interspecific interactions. These virus-mediated ecological effects may have consequences on enemies foraging strategies as well as trophic webs dynamics and structure.

Keywords: behavioural defences, densovirus infection, life-history traits, natural enemies' susceptibility, physiological costs



www.oikosjournal.org

© 2019 Nordic Society Oikos. Published by John Wiley & Sons Ltd

Introduction

Microbial symbionts can profoundly modify the ecology and evolution of host species and, by extent, the interactions between species within trophic webs (Kooi et al. 2004, Frago et al. 2012). In insects, bacterial symbionts can induce variation in the nutritional quality and availability of their hosts which can affect foraging strategies and intake rate by natural enemies (Monticelli et al. 2019). By extent, symbiotic bacteria can indirectly influence both the structure and dynamics of food webs (Hrček et al. 2016, McLean et al. 2016, McLean 2019). Similar to bacterial endosymbionts, insects can also host viruses that can be transmitted vertically as viral particles from parent to offspring. Recent studies refer to these viruses as endosymbionts given their intimate relationships with their hosts (Longdon and Jiggins 2012, Roossinck 2015). Viruses are extremely diverse and prevalent but, since the advent of virology with the discovery of the *Tobacco mosaic virus* in 1886 (Mayer et al. 1942), they have mostly been considered as causative agents of diseases (but see Roossinck and Bazán 2017). Nevertheless, their effect on host fitness can vary widely and range from mutualism (i.e. the host derives a fitness benefit) to parasitism (i.e. the host suffers a fitness decline) (Xu et al. 2008, Roossinck 2015). A recent meta-analysis conducted by Flick et al. (2016), including 50 studies, showed that natural enemies can avoid pathogen-infected prey and if not, predators and parasitoids consuming these prey can have reduced fecundity, survival and longevity. However, most of these studies excluded viruses that do not regularly kill their hosts and it remains unclear if non-lethal viruses can modulate interactions between virus-infected prey and natural enemies. For instance, viral endosymbionts could modify the structure of the prey populations (e.g. proportion of adults relative to juvenile), which, in turn, could influence the impact of natural enemies on prey population dynamics. Given that viral endosymbionts often decrease both quality and abundance of their hosts (Van Munster et al. 2003a), we hypothesised that parasitism and predation rates would be weaker on infected hosts compared to uninfected ones. Alternatively, infection with microbes may alter host defensive behaviours (Dion et al. 2011, Polin et al. 2014) so that infected hosts may be more affected by natural enemies. Overall, the influence of the virus on trophic interactions may likely depend on the balance between virus effects on both host phenotypes and host demography.

Here, we investigated the role of a viral endosymbiont on trophic interactions within aphid-based food webs. Aphids can host densoviruses that are non-enveloped single-stranded DNA viruses (Tijssen et al. 2016). In the green peach aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), the *M. persicae* densovirus (MpDENV hereafter) negatively impacts aphid growth and fecundity without being lethal (Van Munster et al. 2003a, b). The MpDENV is vertically transmitted to the progeny at a rate of 40% but is also efficiently propagated in the aphid colony through the plant vasculature (horizontal transmission) resulting in all individuals

being infected in laboratory conditions (Van Munster et al. 2003a, 2005). Interestingly, the MpDENV is highly prevalent in French crops with more than 94% of aphid populations being infected (Brault unpubl.). This high MpDENV prevalence suggests that it could play an important role for aphid populations and interactions with upper (i.e. natural enemies) and lower trophic levels (i.e. aphid host plants). As the MpDENV infection reduces aphid growth and fecundity (Van Munster et al. 2003b), we hypothesised that both parasitoids and predators would be more reluctant at attacking these low-quality prey. However, if the MpDENV infection alters aphid defensive behaviours then virus-infected individuals would be most accessible prey. To test these hypotheses, we measured the effect of MpDENV infection on aphids' ecology at three organization levels: the individual, the population and the community. At the individual level, we analysed the effects of MpDENV infection on aphids' quality as prey by measuring their weight (i.e. the amount of nutrients for enemies) and defensive behaviours. At the population level, we tested the influence of MpDENV infection on aphid population density and population structure (i.e. proportion of adults and nymphs). At the community level, we measured the effects of MpDENV infection on aphid susceptibility towards strict predators and parasitoids. Overall, our study showed that MpDENV infection could affect trophic interactions by modulating aphid traits, population demography and susceptibility toward natural enemies.

Material and methods

Biological materials

Myzus persicae were maintained on plants of the sweet pepper *Capsicum annuum* (Solanales: Solanaceae) cv. Lamuyo F1. The natural enemies used in the study were the predatory Harlequin ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and the two parasitoid species *Aphidius matricariae* and *Aphidius ervi* (Hymenoptera: Aphidinae). These two parasitoids parasitize *M. persicae* on sweet pepper crops in greenhouses (Gavkare et al. 2014) and the ladybeetle *H. axyridis* is often used to control *M. persicae* populations (De Clercq et al. 2003).

Two lineages of a single aphid clone of *M. persicae* (Hemiptera: Aphididae) originated from Colmar (France) and designated as the Colmar clone were used. One aphid lineage was infected with the *Myzus persicae* densovirus (MpDENV) while the other was cured of MpDENV (Clavijo et al. 2016). The presence/absence of MpDENV in both aphid lineages was checked by a specific polymerase chain reaction (PCR) (Clavijo et al. 2016) at the beginning and the end of all experiments. Both aphid lineages were maintained at low population density (i.e. less than 60 adults per plant) on sweet pepper host plants grown from seeds in nylon cages (30×30×30 cm) for two months before the experiments. To avoid confounding effects of aphid age or developmental stage, third-instar larvae or two-day-old adult

M. persicae females obtained from synchronous cohorts were used in experiments.

Approximately 200 *H. axyridis* adults were collected in October 2015 on the campus of the Ecole Nationale Supérieure de Formation de l'Enseignement Agricole (Auzeville-Tolosane, France). Adult ladybeetles were then reared in 5-l plastic boxes at 20°C and fed three times a week with pollen and an excess of pea aphids *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae). Pea aphids were reared on broad bean *Vicia faba* cv. Aquadulce. A piece of corrugated filter paper was added to each plastic boxes to provide a suitable substrate for oviposition. Ladybeetle eggs were collected three times a week and neonate larvae were reared in 175-cm³ plastic boxes and fed with pea aphids until they reach the second larval instar at which they were used for the experiments.

Aphidius matricariae and *A. ervi* parasitoid mummies (i.e. dead aphids each containing a single parasitoid pupae) were purchased from Koppert Biological Systems. After their emergence, parasitoid females were isolated from aphid mummies and enclosed singly in plastic tubes (22×1 cm) containing moistened cotton, a diluted drop of honey and one male for mating. In all experiments, only 1–5 days old parasitoid females were used. Just prior to the experimental test, females were allowed to oviposit in one-third-instar aphid larva (infected or not according to the experimental treatment). This allowed the parasitoid female to gain experience in aphid handling and to reduce the possibility of any behavioural traits associated with first host attacks that might affect wasp's parasitism efficiency. Each parasitoid female was used only once in the experiments.

Insect rearing, plant culture and experiments were all performed in controlled conditions at 20°C, 70±10% relative humidity and 16L:8D photoperiod. These experimental conditions mimic summer conditions during which *M. persicae* only reproduces by parthenogenesis.

MpDNV infection and aphids' quality as prey

To test the effect of MpDNV infection on aphids' quality as prey, we measured both aphid body mass and aphid defensive behaviours according to their MpDNV infection status. For each infection status (i.e. infected or not infected by MpDNV), twenty-five adult *M. persicae* females obtained from synchronous cohorts were individually weighed to the nearest 0.1 µg using a microbalance. For the aphid behavioural defences study, *A. matricariae* parasitoids were used as natural enemies. A female parasitoid was transferred to a glass petri dish (3.5 cm in diameter) containing 15 third-instar *M. persicae* larvae from a given lineage (infected or not by MpDNV) feeding on a disc of sweet pepper leaf lining the bottom of the dish. Behavioural observations began when the parasitoid wasp attacked the first aphid and ended when ten aphids were attacked. When the parasitoid stopped searching after both locating and contacting (i.e. displaying antennal tapping on aphid host and/or inserting ovipositor in the aphid's body), the event was classified as an encounter by the parasitoid wasp. The following aphid behaviours were

recorded during the trials: kicking and shaking the body (i.e. aggressive defensive behaviours), walking or running away (i.e. escape behaviour) and emitting cornicle secretions containing alarm pheromone (i.e. collective defence). The outcome of an encounter was also recorded: aphid acceptance for oviposition or its rejection by the parasitoid. Piercing the aphid cuticle with the ovipositor was scored as an acceptance while any attack by a parasitoid that did not lead to a stinging behaviour was scored as a rejection. Rejection events can be associated with either aphid defensive behaviours or parasitoid females' foraging decision (i.e. rejection of passive aphid individuals due to their quality). During our experiments, all encountered aphids were attacked by the females and the rejection events observed were associated with the behavioural defences of aphids only. For each aphid lineage (i.e. infected or not by MpDNV), ten experimental replicates (i.e. 100 aphid individuals attacked per lineage) were performed.

MpDNV infection, aphid population properties and predation susceptibility

A full factorial experiment was conducted to investigate the effects of the MpDNV infection (i.e. presence versus absence) and predation by predatory ladybeetle (i.e. presence versus absence) on various aphid population properties: total aphid density, number of nymphs, proportion of adult aphids and adult survival. For the experiment, 36-days-old sweet pepper plants with four unfurled leaves and two cotyledons were individually placed in 500 ml plastic pots containing 400 ml of fertilized soil substrate. Fifty parthenogenetic adult females of *M. persicae* obtained from synchronous cohorts from a given lineage (infected or not by MpDNV) were then transferred on the first leaf of each plant using a fine paintbrush. Eighteen replicates of each treatment were performed, leading to 72 samples (i.e. 72 sweet pepper plants) (4 treatments×18 replicates). For technical reason, not all replicates were conducted simultaneously, and the samples were collected from three independent experiments performed in similar conditions. After the aphid introduction, plants were enclosed in transparent plastic cylinders (diameter: 14 cm; high: 29 cm). The top of the cylinder and the two lateral openings were covered with mesh muslin for ventilation. One hour later, allowing aphid settlement, a single *H. axyridis* second-instar ladybeetle larva was introduced at the bottom of the plant in each experimental cylinder of the predation treatment. Ladybird larvae were not fed 24 h prior to prevent satiated predators from being used in the experiment. Twenty-four hours after predator introduction, the ladybeetle larvae were collected and the number of adults and new-born aphids (i.e. larvae) were counted.

MpDNV infection and parasitism susceptibility

Both parasitoid species, *A. matricariae* and *A. ervi*, were used to evaluate the aphid susceptibility to parasitism depending on their viral infection status. The experiment started

with the introduction of a single parasitoid female in a glass petri dish (3.5 cm in diameter) containing 15 third-instar *M. persicae* larvae from a given lineage (infected or not by MpDENV) feeding on a disc of sweet pepper leaf lining the bottom of the dish. Aphids were carefully removed from the arena once stung by a parasitoid wasp to prevent multiple stings on a single individual. A parasitoid sting corresponds to an ovipositor insertion, which leads to a single egg injection into the aphid's body (McBrien and Mackauer 1990). The experiment ended when 10 aphids were stung by the parasitic wasp. The stung aphids were then transferred onto a 36-days-old sweet pepper host plant. Twenty days later, stung aphids were inspected to determine whether they developed into mummies. The proportion of mummification was calculated by dividing the number of aphid mummies by the total number of stung aphids. In addition, a round hole on the mummies was an indication of an adult parasitoid emergence and the proportion of parasitoid emergence (i.e. the number emergences divided by the number of mummies) was calculated. For each aphid lineage, ten experimental replicates were performed with each parasitoid species leading to about 400 stung aphids (i.e. about 100 aphid individuals stung per lineage and per parasitoid species).

Statistical analyses

All analyses were computed using R ver. 3.4.2 (<www.r-project.org>). The effect of the MpDENV infection on the aphid body mass was analysed using a Student's t-test. We used a series of Binomial GLMMs (generalized linear mixed models) to test the effect of the MpDENV infection on 1) the proportion of aphids exhibiting aggressive behaviours (i.e. kicking and/or shaking the body), or escaping, or emitting alarm pheromone when attacked by *A. matricariae* female (one model for each response variable) and 2) the proportion of parasitoid attacks that aborted due to aphids' behavioural defence. Binomial GLMMs were used to test the effects of the MpDENV infection status (presence/absence), the parasitoid species (*A. ervil*/*A. matricariae*) and their interaction on both the proportion of mummification and the proportion of parasitoid emergence from aphid mummies (one model for each response variable). As several aphids were exposed to the same parasitoid female, parasitoid identity was considered as a random factor in all these Binomial GLMMs in order to include data substructure.

We used a series of GLMMs with experimental date as a random effect to test the effects of the MpDENV infection status, the predator treatment (presence/absence) and their interaction on 1) both aphid (adults and nymphs) population density (i.e. number of aphids per plant) and aphid nymph density and 2) on both the proportion of adult aphids and the adult aphid survival (i.e. the proportion of adult aphids found alive at the end of the experiment). We used Poisson and Binomial errors for the densities and the proportions, respectively. Overdispersion in GLMMs was tested using the *blme* package that computes the estimated scale in a GLMM (Korner-Nievergelt et al. 2015). No case

of overdispersion was detected. We did not take into account possible correlations among the three response variables as we are not aware of a statistical analysis that would allow testing the effects of multiple explanatory variables (and their interactions) on multiple response variables (with different distribution families) and that would also take into account random effects. GLMMs were computed using the 'lme4' package (Bates et al. 2015).

Results

MpDENV infection and aphids' quality as prey

Contrary to our predictions, MpDENV did not impact the quality of aphids as prey with the exception of prey body mass. The MpDENV infection significantly reduced aphid body mass ($t=4.03$, $df=45$, $p=0.002$): the infected aphids were 38% lighter than uninfected ones. The mean (\pm SE) body mass of infected aphids was $0.203 \pm 0.019 \mu\text{g}$ while the mass of uninfected ones was $0.329 \pm 0.025 \mu\text{g}$. Our behavioural experiments showed that aphid MpDENV infection status did not influence the propensity of aphids to exhibit aggressiveness ($\chi^2=1.341$, $df=1$, $p=0.246$, Fig. 1a), escape behaviours ($\chi^2=0.064$, $df=1$, $p=0.799$, Fig. 1b) and alarm pheromone emission ($\chi^2=0.028$, $df=1$, $p=0.865$, Fig. 1c) when attacked by *A. matricariae* parasitoid. Moreover, the proportion of parasitoid attacks that aborted due to aphid defensive behaviours did not vary according to their infection status ($\chi^2=0.702$, $df=1$, $p=0.402$, Fig. 1d).

MpDENV infection, predation susceptibility and aphid population properties

Accordingly to our predictions, our results showed that the infection with MpDENV modified the effects of predators on aphid demography. The MpDENV infection influenced the aphid population density (i.e. the number of adults and nymphs per plant) but this effect varied according to presence of predators (Table 1, Fig. 2a). While both viral infection and presence of predators induced a decline in aphid population density, the detrimental effect of predation on density was weaker in infected populations compared to uninfected ones (32 versus 37%). Similar results were found for the density of aphid nymphs: the viral infection effect on this population property varied according to presence of predators (Table 1, Fig. 2b). Predators reduced the density of infected nymphs by 31% whereas they reduced the density of uninfected nymphs by 41%.

Both MpDENV infection and presence of predators had negative effect on the adult aphid survival (Table 1, Fig. 2c). Adult survival decreased by 4% when infected with MpDENV and presence of predators led to a survival reduction of about 30% regardless to the aphid infection status (Table 1, Fig. 2c). Finally, the proportion of adults in aphid population was affected by the MpDENV infection but this effect varied according to the presence of predators (Table 1, Fig. 2d).

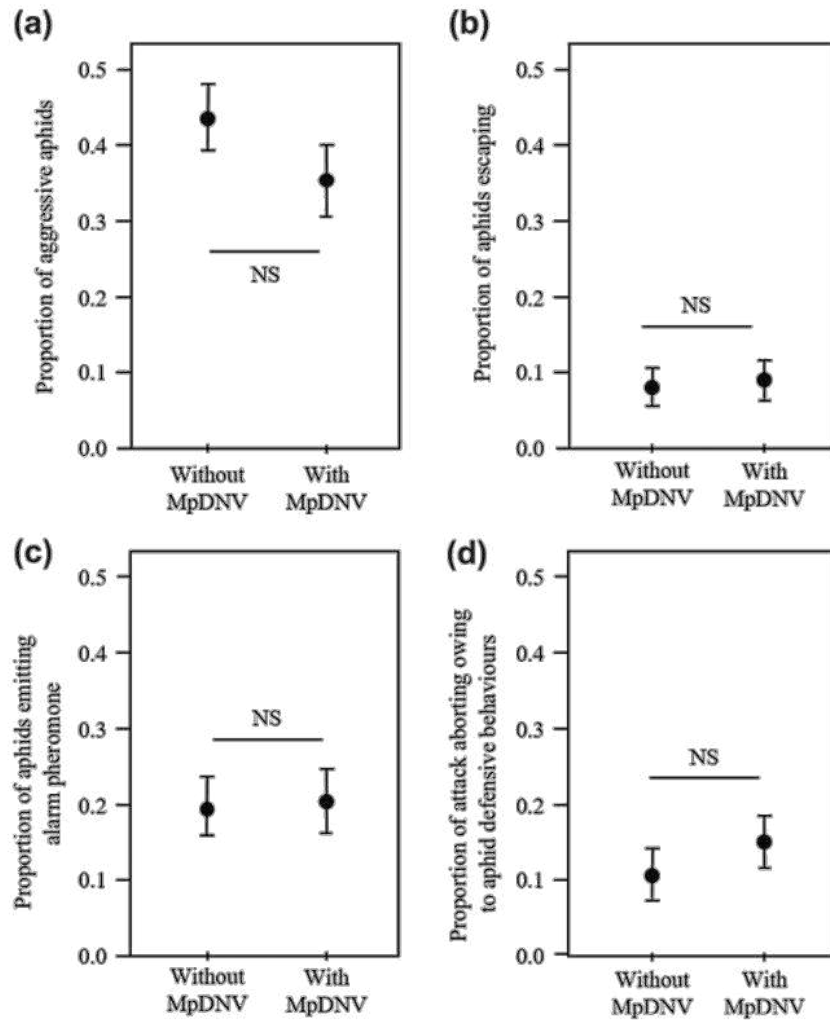


Figure 1. Behavioural defences of *M. persicae* when attacked by *A. matricariae* parasitoid in uninfected (left) and MpDNV-infected (right) aphid individuals: (a) proportion of individuals that exhibited aggressive behaviours when attacked; (b) proportion of individuals that escaped during attack; (c) proportion of individuals that emitted pheromone alarm during attack; (d) proportion of parasitoid attacks that aborted due to aphid behavioural defences. Statistical significance: NS (non-significant): $p > 0.05$. The significance was tested using χ^2 -test from analysis of deviance.

Predators increased the proportion of adults in MpDNV non-infected populations only.

MpDNV infection and parasitism susceptibility

Interestingly, our experiments showed that infected aphids were more susceptible to their parasitoids. Once stung by a parasitoid female, the proportion of mummified aphids significantly varied between both parasitoid species: mummification was higher with *Aphidius matricariae* than with *A. ervi* ($\chi^2 = 23.845$, $df = 1$, $p < 0.001$; Fig. 3a). Moreover, mummification was higher when aphids were infected with the MpDNV ($\chi^2 = 5.789$, $df = 1$, $p = 0.016$), independently of the parasitoid species (interaction parasitoid species \times MpDNV: $\chi^2 = 0.094$, $df = 1$, $p = 0.758$; Fig. 3a). Overall, mummification

increased by a factor of 1.5 in MpDNV infected aphids. In addition, the proportion of parasitoid emergence from aphid mummies did not differ between parasitoid species ($\chi^2 = 3.249$, $df = 1$, $p = 0.071$; Fig. 3b) and was not affected by the MpDNV infection ($\chi^2 = 1.641$, $df = 1$, $p = 0.200$; Fig. 3b).

Discussion

Most previous studies focused on effects of insect viral endosymbionts on trophic interactions concerned lethal pathogens (Jiang et al. 2011, Flick et al. 2016) and implied a single natural enemy. Moreover, we lack information on the mechanisms explaining why the impact of natural enemies on prey population density would differ depending on the

Table 1. Values of the χ^2 statistics, degrees of freedom (df) and p-values of the GLMMs for the effects of MpDENV infection, predator presence and their interactions on aphid population density, nymph aphid density, adult aphid survival and the proportion of adult aphids.

| Covariates | Variables (distribution family) | | | | | | | |
|-----------------------|------------------------------------|---------|-------------------------------|---------|---------------------------------|---------|---------------------------------------|---------|
| | Aphid population density (Poisson) | | Nymph aphid density (Poisson) | | Adult aphid survival (Binomial) | | Proportion of adult aphids (Binomial) | |
| | χ^2 (df) | p-value | χ^2 (df) | p-value | χ^2 (df) | p-value | χ^2 (df) | p-value |
| MpDENV infection (1) | 183.85 (1) | <0.001 | 248.85 (1) | <0.001 | 11.62 (1) | <0.001 | 77.15 (1) | <0.001 |
| Predator presence (2) | 320.35 (1) | <0.001 | 235.34 (1) | <0.001 | 312.90 (1) | <0.001 | 3.79 (1) | 0.052 |
| Interaction (1)×(2) | 3.96 (1) | 0.047 | 7.60 (1) | 0.006 | 2.26 (1) | 0.132 | 4.12 (1) | 0.047 |

viral infection status. Our results showed that the infection of *Myzus persicae* by the MpDENV induced various detrimental effects on aphid individuals and populations: it declines aphid body mass and population density. Although MpDENV infection did not influence the aphid defensive behaviours toward parasitoids, it did enhance parasitism susceptibility by increasing the proportion of successful mummifications. In line with our hypothesis, we found that the MpDENV

infection decreased the impact of predator on population density. Overall, the impacts of the MpDENV infection depended on the natural enemies considered with a positive effect on parasitism and a negative effect on predation.

As reported by Van Munster et al. (2003a) we found that aphids MpDENV-infected were lighter than uninfected ones. Van Munster et al. (2003a) used a different aphid clone suggesting that these effects could be generalized to

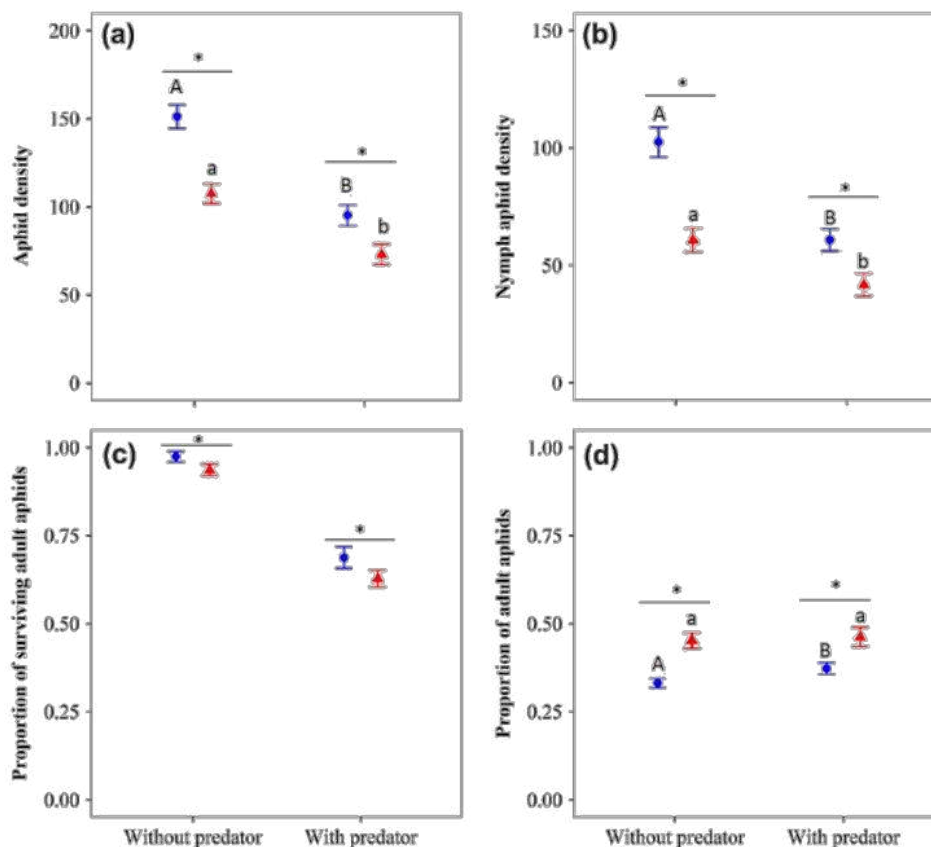


Figure 2. Mean (\pm SE) aphid population density (a), nymph aphid density (b), adult aphid survival (c) and adult aphid proportion (d) for MpDENV-infected aphids (red triangles) or uninfected ones (blue circles) in absence or presence of predators (x-axis). Within each predation treatment, an asterisk denotes a significant ($p < 0.05$) effect of MpDENV infection. Within each MpDENV treatment (i.e. within black circles or within grey triangles), different letters denote significant effects ($p < 0.05$) of the predator. The significance was tested using a χ^2 -test from analysis of deviance and post hoc Tukey tests.

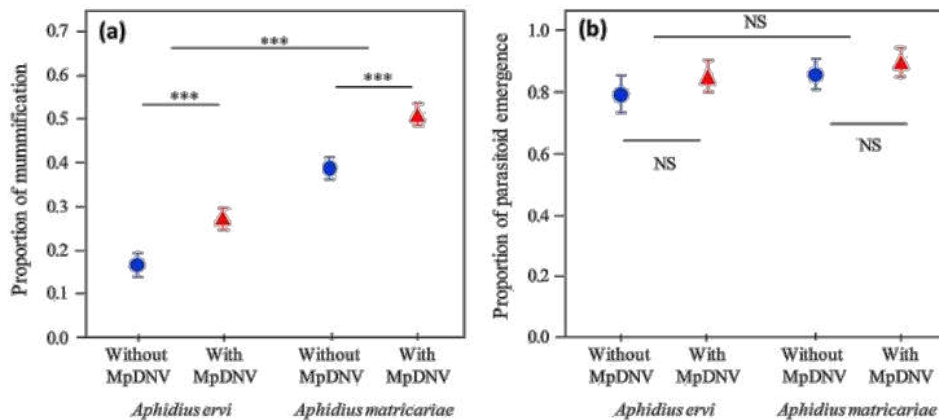


Figure 3. Susceptibility of *M. persicae* to parasitism by *A. ervi* or *A. matricariae* in uninfected (blue circles) and MpDNV-infected (red triangles) aphid individuals: (a) proportion of mummified aphids (mean \pm SE) and (b) proportion of parasitoid emergence (mean \pm SE). Statistical significance: *** $p < 0.001$ and NS (non-significant): $p > 0.05$. The significance was tested using χ^2 -test from analysis of deviance.

multiple aphid genotypes. Body mass is strongly related to aphid fecundity and former studies have reported that the smaller aphids infected by MpDNV reproduce less than the uninfected larger ones which could represent a physiological cost of viral infection (Van Munster et al. 2003a). We thus hypothesised that this effect of MpDNV infection on aphid life-history traits may thus have effects at the population scale. Our results showed that MpDNV infection reduces the survival of adult aphids as well as both the density and the proportion of aphid nymphs within populations. These demographic effects of MpDNV infection can have important consequences on aphid populations' dynamics as well as on interactions with upper trophic levels.

Due to their lower body mass, infected aphids present a deficit in nutritional value for enemies as reported in other biological systems (Flick et al. 2016). In parasitoids, smaller aphids can be identified as low-quality hosts and influence parasitoid foraging behaviours, leading to indirect effects on parasitoid populations (Monticelli et al. 2019). Overall, body mass is a master trait that determines the abundance, growth rate and trophic position of many organisms (Gillooly et al. 2002, Cohen et al. 2003, Brown et al. 2004, Savage et al. 2004) and by modifying this trait, viruses may have important consequences on consumer fitness (Flick et al. 2016) and dynamics and structure of food webs (Sentis et al. 2017).

In the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, infection with the bacterial endosymbiont *Hamiltonella defensa* induces reduction in aphid defensive behaviours (Dion et al. 2011, Polin et al. 2014) and by consequence, increases in predation rates (Polin et al. 2014). Altered behaviours were also observed in aphids infected with entomopathogenic fungi (Jensen et al. 2001) and plant viruses acquired from infected host plants (Mauck et al. 2018). As viral infection can be associated with physiological costs for aphids, this may induce some reductions in aphid defensive behaviours (Dion et al. 2011). Here MpDNV infection did not influence aphid behavioural defences once attacked by parasitoid

nor the proportion of aborted attacks due to aphid behavioural defences. In other words, the MpDNV infection did not influence the likelihood of being stung by a parasitoid. However, once a parasitoid egg was inserted into the aphid's body, the MpDNV infection influenced the parasitoid larval development positively: the proportion of mummified aphids was higher in MpDNV-infected aphids, independent of the parasitoid species. This result can be explained by two non-exclusive hypotheses. First, a reduction in immune defence associated with viral infection would enhance parasitism rate. Manipulation of insect immunity by viruses has been shown in insects (Kroemer and Webb 2004) and may benefit parasitoids (Bouletreau and Fleury 2005). By reducing body mass, viral infection may also decline resource allocation to immunity. Secondly, MpDNV infection may enhance susceptibility of aphids to components injected by parasitoids during oviposition (e.g. cocktail of venoms that could manipulate aphid physiology, development and immunity (Digilio et al. 2000)). Whatever the underlying mechanisms of the ecological cost associated with MpDNV infection, our results showed that the viral infection increased parasitism rate for both parasitoid species.

We found that both the virus and the ladybeetle predator decreased aphid population density. However, their effects were not additive as the impact of ladybirds on aphid population density was weaker for infected aphids compared to uninfected ones. Ladybeetle predators strongly decreased the number of aphid nymphs, especially for uninfected ones compared to infected ones but predation rate on adult aphids was not influenced by the viral infection. The stronger predation on uninfected nymphs also explains why predators increased the proportion of adult aphids in uninfected populations but not in infected ones. We thus conclude that the combined effects of the viral infection and the predator on aphid density are not additive and depend on aphid developmental instar which highlights the importance of taking into account population structure when assessing the ecological

consequences on the viral infection. The mechanisms underlying these results remain to be investigated in more details, but it is possible that both biotic stresses (MpDENV infection and ladybeetle) share aphid physiological defence responses and, consequently do not result in additive effects. This hypothesis is in agreement with a previous study by Sentis et al. (2013) in which *M. persicae* exposed to an abiotic stress (heat waves) were less impacted by ladybeetles than aphids non-exposed to heat waves. The mechanism sustaining these results needs further investigation, but our results indicate that, although the MpDENV infection decreased the predator effect on aphid density, it did not increase aphid survival under predation. We thus conclude that, as hypothesized, the MpDENV virus mitigates the effects of the ladybeetle predator.

Our results evidenced sub-lethal effects of MpDENV infection on aphid fitness. These physiological and ecological costs associated with MpDENV infection could limit viral propagation in host populations as they reduce aphid population density and aphid survival. Interestingly, that is in contradiction with the high prevalence of the virus observed in nature (Brault et al. unpubl.). The evolutionary dynamics of MpDENV is thus questioned here. First, it may be hypothesized that MpDENV infection would provide some benefits to infected aphids towards abiotic or biotic factors not tested here. For instance, Xu et al. (2014) found that *Helicoverpa armigera densovirus-1* (HaDENV) can enhance the resistance of Lepidoptera larvae against another virus (*H. armigera nucleopolyhedrovirus*) that has lethal consequences. In addition to potential beneficial effects of MpDENV infection, high prevalence could be explained by transmission routes of viruses. For microbial endosymbionts, transmission mode is often mixed, involving both vertical and horizontal transfers from either the environment or host switching (Ferrari and Vavre 2011). For instance, Van Munster et al. (2005) showed that the aphid's host plant can transport MpDENV particles, without viral replication, from infected aphids to uninfected ones via the phloem. This horizontal route can complement vertical transmission rate to end up with all individuals being infected within a *M. persicae* colony (Van Munster et al. 2003a). Further studies on both virus-mediated phenotypes and host switching transfers are needed to understand MpDENV epidemiology.

Conclusion

By reducing both aphid nutritional quality and availability, increasing their susceptibility to parasitism, and modulating the predator effect on aphid population's growth rate, our study highlighted that viral endosymbionts can be prevalent drivers of their host ecology as well as their interactions with natural enemies. Interestingly, the influence of the virus on trophic interactions depended on the natural enemies as it increased parasitism rate and decreased predation rate. These virus-mediated ecological effects may have consequences on upper (i.e. natural enemies) and lower trophic levels (i.e. aphid host plants). As hidden players in evolutionary ecology of insects,

viral endosymbionts require further attention to better understand their dynamics and ecological consequences in nature.

Data availability statement

Data are available from the Dryad Digital Repository: <<https://dx.doi.org/10-5061/dryad.t4b8gthxn>> (Dupont et al. 2019).

Acknowledgements – Funding – This work was supported by the French 'Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche' and the ANR funded French Laboratory of Excellence projects 'LABEX TULIP' and 'LABEX CEBA' (ANR-10-LABX-41, ANR-10-LABX-25-01) and the ANR funded Toulouse Initiative of Excellence 'IDEX UNITI' (ANR11-IDEX-0002-02). AS was also funded by the People Program (Marie Curie Actions) of the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under REA grant agreement no. PCOFUND-GA-2013-609102, through the PRESTIGE program coordinated by Campus France.

Author contributions – A. Michiels and C. Dupont, and A. Sentis and Y. Outreman, contributed equally to this paper.

References

- Bates, D. et al. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. – J. Stat. Softw. 67: 1–48.
- Bouletreau, M. and Fleury, F. 2005. Parasitoid insects and their prokaryotic helpers: gifted parasites? – Bull. Soc. Zool. France 130: 177.
- Brown, J. H. et al. 2004. Toward a metabolic theory of ecology. – Ecology 85: 1771–1789.
- Clavijo, G. et al. 2016. Transcription of densovirus endogenous sequences in the *Myzus persicae* genome. – J. Gen. Virol. 97: 1000–1009.
- Cohen, J. E. et al. 2003. Ecological community description using the food web, species abundance and body size. – Proc. Natl Acad. Sci. USA 100: 1781–1786.
- De Clercq, P. et al. 2003. Interaction between *Podisus maculiventris* and *Harmonia axyridis* two predators used in augmentative biological control in greenhouse crops. – BioControl 48: 39–55.
- Digilio, M. C. et al. 2000. Host castration by *Aphidius ervi* venom proteins. – J. Insect Physiol. 46: 1041–1050.
- Dion, E. et al. 2011. Symbiont infection affects aphid defensive behaviours. – Biol. Lett. 7: 743–746.
- Dupont, C. et al. 2019. Virus mediated trophic interactions between aphids and their natural enemies. – Dryad Digital Repository, <<https://dx.doi.org/10-5061/dryad.t4b8gthxn>>
- Ferrari, J. and Vavre, F. 2011. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. – Phil. Trans. R. Soc. B 366: 1389–1400.
- Flick, A. J. et al. 2016. The negative effects of pathogen-infected prey on predators: a meta-analysis. – Oikos 125: 1554–1560.
- Frago, E. et al. 2012. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. – Trends Ecol. Evol. 27: 705–711.
- Gavkare, O. et al. 2014. Effectiveness of native parasitoids of *Myzus persicae* in greenhouse environments in India. – Phytoparasitica 42: 141–144.
- Gillooly, J. F. et al. 2002. Effects of size and temperature on developmental time. – Nature 417: 70–73.

- Hrček, J. et al. 2016. Symbionts modify interactions between insects and natural enemies in the field. – *J. Anim. Ecol.* 85: 1605–1612.
- Jensen, M. et al. 2001. Altered behavior and distribution of pea aphids, *Acyrtosiphon pisum* (Homoptera: Aphididae), infected with *Pandora neoaphidis* (Zygomycetes: Entomophthorales). – *BioControl* 46: 337–343.
- Jiang, J. et al. 2011. Combined effect of nucleopolyhedrovirus and *Microplitis pallidipes* for the control of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. – *Pest Manage. Sci.* 67: 705–713.
- Kooi, B. W. et al. 2004. Consequences of symbiosis for food web dynamics. – *J. Math. Biol.* 49: 227–271.
- Korner-Nievergelt, F. et al. 2015. Bayesian data analysis in ecology using linear models with R, BUGS and Stan. – Elsevier Academic Press.
- Kroemer, J. A. and Webb, B. A. 2004. Polydnavirus genes and genomes: emerging gene families and new insights into polydnavirus replication. – *Annu. Rev. Entomol.* 49: 431–456.
- Longdon, B. and Jiggins, F. M. 2012. Vertically transmitted viral endosymbionts of insects: do sigma viruses walk alone? – *Proc. R. Soc. B* 279: 3889–3898.
- Mauck, K. E. et al. 2018. Chapter seven – evolutionary determinants of host and vector manipulation by plant viruses. – In: Malmstrom, C. M. (ed.), *Advances in virus research*. Academic Press, pp. 189–250.
- Mayer, A. et al. 1942. Concerning the mosaic disease of tobacco. – *Am. Phytopathol. Soc.* 1: 1–62.
- McBrien, H. and Mackauer, M. 1990. Heterospecific larval competition and host discrimination in two species of aphid parasitoids: *Aphidius ervi* and *Aphidius smithi*. – *Entomol. Exp. Appl.* 56: 145–153.
- McLean, A. H. 2019. Cascading effects of defensive endosymbionts. – *Curr. Opin. Insect Sci.* 32: 42–46.
- McLean, A. H. et al. 2016. Insect symbionts in food webs. – *Phil. Trans. R. Soc. B* 371: 20150325.
- Monticelli, L. S. et al. 2019. Impact of host endosymbionts on parasitoid host range – from mechanisms to communities. – *Curr. Opin. Insect Sci.* 32: 77–82.
- Polin, S. et al. 2014. An ecological cost associated with protective symbionts of aphids. – *Ecol. Evol.* 4: 836–840.
- Roossinck, M. J. 2015. Move over, bacteria! Viruses make their mark as mutualistic microbial symbionts. – *J. Virol.* 89: 6532–6535.
- Roossinck, M. J. and Bazán, E. R. 2017. Symbiosis: viruses as intimate partners. – *Annu. Rev. Virol.* 4: 123–139.
- Savage, V. M. et al. 2004. Effects of body size and temperature on population growth. – *Am. Nat.* 163: 429–441.
- Sentis, A. et al. 2013. Effects of simulated heat waves on an experimental plant–herbivore–predator food chain. – *Global Change Biol.* 19: 833–842.
- Sentis, A. et al. 2017. Temperature-size responses alter food chain persistence across environmental gradients. – *Ecol. Lett.* 20: 852–862.
- Tijssen, P. et al. 2016. Diversity of small, single-stranded DNA viruses of invertebrates and their chaotic evolutionary past. – *J. Invert. Pathol.* 140: 83–96.
- Van Munster, M. et al. 2003a. Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid *Myzus persicae*. – *J. Invert. Pathol.* 84: 6–14.
- Van Munster, M. et al. 2003b. A new virus infecting *Myzus persicae* has a genome organization similar to the species of the genus *Densovirus*FN1. – *J. Gen. Virol.* 84: 165–172.
- Van Munster, M. et al. 2005. Can plants use an entomopathogenic virus as a defense against herbivores? – *Oecologia* 143: 396–401.
- Xu, P. et al. 2008. Virus infection improves drought tolerance. – *New Phytol.* 180: 911–921.
- Xu, P. et al. 2014. Densovirus is a mutualistic symbiont of a global crop pest (*Helicoverpa armigera*) and protects against a baculovirus and Bt biopesticide. – *PLoS Pathogens* 10: e1004490.

Titre : Incidence des partenaires microbiens sur les interactions des insectes avec leur environnement biotique : approche comportementale des associations symbiotiques **par Corentin Sochard**

Mots clés : Symbiotes secondaires, phénotype étendu, comportements, *Acyrtosiphon pisum*, *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola*, ennemis naturels, plante hôte

Résumé : Les associations symbiotiques entre un hôte eucaryote et un ou plusieurs partenaires microbiens sont ubiquistes. La symbiose est souvent associée à la modification de nombreux phénotypes de l'espèce hôte, on parle alors de phénotypes étendus. L'objectif de cette thèse est de mieux comprendre en quoi les phénotypes étendus et en particulier la modification des comportements engendrée par les symbiotes microbiens peuvent influencer les interactions biotiques des insectes-hôtes. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à l'incidence des bactéries symbiotiques facultatives d'un insecte phytophage, le puceron du pois *Acyrtosiphon pisum*, sur ses relations avec sa plante hôte et un de ses ennemis naturels principaux, le parasitoïde *Aphidius ervi*. Nos études menées sur des lignées de pucerons différant par leur composition symbiotique suggèrent une influence limitée d'*Hamiltonella defensa* et de *Regiella insecticola* sur les

comportements d'exploration et de choix lors des interactions entre les pucerons et leur plante hôte. En revanche, nos résultats montrent que les microorganismes symbiotiques jouent un rôle important dans les relations puceron-ennemi naturel. Les pucerons infectés par *H. defensa* présentent généralement moins de comportements de défense, alors que le phénotype de protection et les coûts associés au symbiote varient d'une espèce et d'une souche à l'autre. Ces différents travaux montrent que l'incidence des symbiotes sur les comportements est très variable et dépend de l'association hôte-symbiote considérée. Ce travail de thèse permet de mieux appréhender les forces évolutives impliquées dans la dynamique des symbiotes dans les populations d'hôte et apporte de nouveaux éclairages sur le rôle des microorganismes symbiotiques dans l'écologie et l'évolution des espèces hôtes.

Title: Effect of microbial partners on biotic interactions of their insect hosts: behavioral approach of symbiotic associations **by Corentin Sochard**

Keywords: Secondary symbionts, extended phenotype, behaviors, *Acyrtosiphon pisum*, *Hamiltonella defensa*, *Regiella insecticola*, natural enemies, host plant

Abstract: Symbiotic associations between an eukaryotic host and a microbial symbiont are ubiquitous. Symbiosis is often associated with the modification of hosts' phenotypes, referred to as extended phenotypes. The objective of this thesis is to better understand how extended phenotypes and in particular modulation of host behaviors caused by symbionts can influence the biotic interactions of insects. In particular, we focus on the effect of the symbiotic bacteria of a phytophagous insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*, on its relationships with its host plant and one of its natural enemies, the parasitoid *Aphidius ervi*. Our studies suggest a limited influence of *Hamiltonella defensa* and *Regiella insecticola* on host behaviors involved

in foraging and plant selection. However, our results show that symbiotic microorganisms play an important role in aphid-natural enemy relationships. Aphids infected with *H. defensa* exhibit less defensive behaviors, while the protection phenotype and the costs associated with the symbiont vary from one symbiont species and strain to the other. These various works show that the impact of symbionts on behaviors is highly variable and depends on the host-symbiont association. This thesis provides a better understanding of the evolutionary forces involved in the dynamic of symbiont associations and give new insights on the role of symbionts in the ecology and evolution of their host species.